



UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

**MODIFICACIÓN DEL PATRÓN DE METILACIÓN DEL  
ADN EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL  
DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES**

Rosa Hernández Pérez





**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Modificación del patrón de metilación del ADN en el proceso de  
diferenciación neuronal de células madre mesenquimales**

Memoria presentada por Dña. Rosa Hernández Pérez

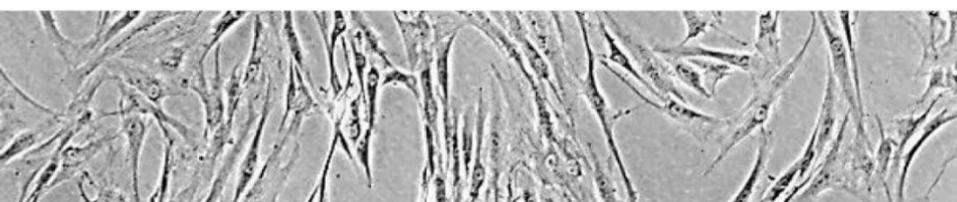
para optar al grado de Doctora Internacional por la Universidad de Granada

Granada, 1 de Diciembre de 2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Rosa Hernández Pérez  
ISBN: 978-84-1117-182-3  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/72066>







## ÍNDICE





# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>iii</b>
----------------	------------

<b>SUMMARY</b>	<b>ix</b>
----------------	-----------

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>xv</b>
---------------------	-----------

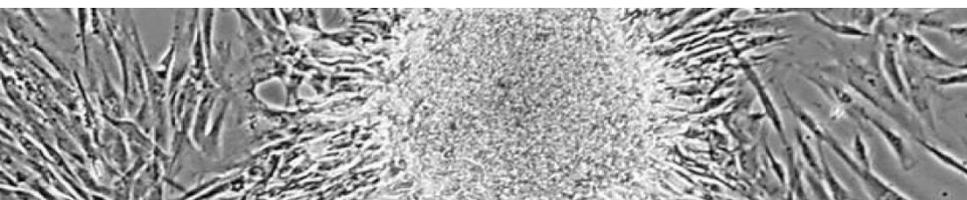
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>- 3 -</b>
------------------------	--------------

I.1. MEDICINA REGENERATIVA	- 3 -
I.1.1. DEFINICIÓN Y CONTEXTO HISTÓRICO	- 3 -
I.1.2. CÉLULAS MADRE: DEFINICIÓN, CARACTERÍSTICAS Y CLASIFICACIÓN	- 4 -
I.1.2.1. TIPOS DE CÉLULAS MADRE SEGÚN SU POTENCIALIDAD	- 4 -
I.1.2.2. TIPOS DE CÉLULAS MADRE SEGÚN SU ORIGEN	- 6 -
I.1.2.3. TIPOS DE CÉLULAS MADRE ADULTAS	- 9 -
I.1.3. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSC)	- 11 -
I.1.3.1. MSCs DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO	- 15 -
I.2. MEDICINA REGENERATIVA EN EL TRATAMIENTO DEL SISTEMA NERVIOSO	- 19 -
I.2.1. ASPECTOS GENERALES DE LAS PATOLOGÍAS DEL SISTEMA NERVIOSO	- 19 -
I.2.2. NEUROGÉNESIS	- 21 -
I.2.3. APLICACIONES DE LAS CÉLULAS MADRE EN PATOLOGÍAS DEL SN	- 23 -
I.2.4. DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE LAS hASCs	- 26 -
I.2.4.1. FARMACOS PSICOTRÓPICOS	- 27 -
I.2.4.2. MOLÉCULAS PEQUEÑAS	- 28 -
I.2.4.3. MEDIOS ENRIQUECIDOS	- 28 -
I.3. MODIFICACIÓN EPIGENÉTICA DIRIGIDA A LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL	- 36 -
I.3.1. EPIGENÉTICA Y DIFERENCIACIÓN CELULAR	- 36 -
I.3.1.1. MOLECULAS INVOLUCRADAS EN LA REGULACIÓN EPIGENÉTICA	- 37 -
I.3.1.2. DIFERER. NEURONAL POR MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS	- 39 -
I.3.1.3. SISTEMA CRISPR/dCas9	- 41 -
I.4. UTILIZACION DE CÉLULAS MADRE EN CLÍNICA	- 46 -
I.5. PRINCIPALES LESIONES EN EL SN Y FUTURAS PERSPECTIVAS PARA TRATARLAS	- 48 -
I.5.1. LESIÓN CEREBRAL POR INFARTO O TRAUMATISMO	- 52 -
I.5.2. LESIÓN EN LA MÉDULA ESPINAL	- 54 -
I.5.3. OTRAS ENFERMEDADES DEL SISTEMA NERVIOSO	- 57 -

<b>II.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>- 63 -</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>- 67 -</b>
III.1.	AISLAMIENTO DE LAS CÉLULAS MADRE A PARTIR DE TEJIDO ADIPOSO	- 67 -
III.1.1.	PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE LIPOASPIRADO	- 67 -
III.1.2.	CULTIVO DE LAS hASCs	- 70 -
III.1.3.	CONTAJE CELULAR	- 71 -
III.1.4.	CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES	- 71 -
III.1.5.	ESTUDIO DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS POR MICROSCOPIA	- 72 -
III.1.6.	CARACTERIZACIÓN DE LAS hASC POR CITOMETRÍA DE FLUJO	- 72 -
III.2.	CREACIÓN DE NEUROESFERAS	- 75 -
III.2.1.	FABRICACIÓN DE PLACAS DE AGAROSA Y MATRIGEL	- 75 -
III.2.2.	FORMACIÓN DE NEUROESFERAS	- 75 -
III.3.	DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE LAS MSCs <i>IN VITRO</i>	- 76 -
III.3.1.	MEDIOS NEU1, NEU2 Y NEU3	- 76 -
III.4.	DESDIFERENCIACIÓN DE LAS MSCs <i>IN VITRO</i>	- 79 -
III.5.	ESTUDIO DE MARCADORES NEURONALES POR WESTERN BLOT	- 80 -
III.5.1.	OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	- 81 -
III.5.2.	PREPARACIÓN DEL GEL SDS-PAGE	- 82 -
III.5.3.	PREPARACIÓN Y CARGA DE MUESTRAS	- 83 -
III.5.4.	ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA	- 83 -
III.5.5.	BLOQUEO E INCUBACIÓN CON AB PRIMARIOS Y SECUNDARIOS	- 84 -
III.6.	ANÁLISIS DE MARCADORES PROTEICOS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA	- 85 -
III.6.1.	FIJACIÓN DE PLACAS Y CHAMBER	- 85 -
III.6.2.	PERMEABILIZACIÓN Y BLOQUEO	- 86 -
III.6.3.	INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS	- 86 -
III.7.	ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE GENES MEDIANTE <i>REAL TIME PCR</i>	- 88 -
III.7.1.	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN CELULAR	- 88 -
III.7.2.	OBTENCIÓN DE ADNc A PARTIR DE ARN MEDIANTE RT	- 89 -
III.7.3.	ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE ARNm MEDIANTE <i>REAL TIME PCR</i>	- 90 -
III.8.	ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR	- 91 -
III.9.	ENSAYO DE INTERACCIÓN CON CÉLULAS DEL ENDOTELIO	- 91 -
III.10.	ESTUDIOS EPIGENÉTICOS: ANÁLISIS DEL METILOMA Y TRANSCRIPTOMA	- 93 -
III.10.1.	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN CELULAR	- 94 -

III.10.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA GLOBAL POR <i>MICROARRAY</i>	- 94 -
III.10.3. SELECCIÓN DE GENES CANDIDATOS	- 95 -
III.10.4. CONVERSIÓN DEL ADN POR BISULFITO SÓDICO Y SECUENCIACIÓN	- 95 -
III.10.5. AMPLIFICACIÓN DEL ADN TRANSFORMADO POR PCR	- 97 -
III.10.6. PURIFICACIÓN DE LAS BANDAS DE PCR	- 98 -
III.10.7. LIGACIÓN DE LOS GENES CANDIDATOS EN EL VECTOR pGEMT	- 99 -
III.10.8. PREPARACIÓN DE PLACAS DE AGAR CON IPTG Y XGAL	- 100 -
III.10.9. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS	- 100 -
III.10.10. RECOGIDA DE COLONIAS Y MINIPREP	- 101 -
III.10.11. PURIFICACIÓN DE MINIPREP	- 102 -
III.10.12. PCR DE SECUENCIACIÓN	- 102 -
III.10.13. PURIFICACIÓN DE LA PCR DE SECUENCIACIÓN	- 103 -
III.10.14. SECUENCIACIÓN SANGER	- 103 -
III.10.15. ANÁLISIS DE LOS DATOS BIOINFORMÁTICOS DE SECUENCIACIÓN	- 104 -
III.10.16. <i>REAL TIME PCR</i> PARA CORROBORAR EL ESTADO DE METILACIÓN	- 106 -
III.11. INGENIERÍA GENÉTICA. ESTUDIOS FUNCIONALES	- 107 -
III.11.1. CREACIÓN DE SISTEMAS DE TRANSFECCIÓN	- 107 -
III.11.2. SOBREENPRESIÓN DE HOXA-5 TRANSFECTANDO CON LENTIVIRUS	- 118 -
III.11.3. SOBREENPRESIÓN DE HOXA-5 CON UN SISTEMA CRISPR	- 123 -
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>- 131 -</b>
IV.1. AISLAMIENTO DE LAS hASCs A PARTIR DE TEJIDO ADIPOSO	- 131 -
IV.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS hASCs POR CITOMETRÍA DE FLUJO	- 131 -
IV.3. DIFERENCIACIÓN Y DESDIFERENCIACIÓN NEURONAL DE hASCs: MODIFICACIONES MORFOLÓGICAS	- 132 -
IV.4. ESTUDIO DE MARCADORES PROTEICOS POR WESTERN BLOT	- 140 -
IV.5. ESTUDIO DE MARCADORES PROTEICOS POR INMUNOFLORESCENCIA	- 142 -
IV.6. ESTUDIO DE MARCADORES PROTEICOS POR <i>REAL TIME PCR</i>	- 144 -
IV.7. FORMACIÓN DE NEUROESFERAS	- 147 -
IV.8. DIFERENCIACIÓN Y DESDIFERENCIACIÓN NEURONAL DE NEUROESFERAS	- 147 -
IV.9. CAPACIDAD DE MIGRACIÓN CELULAR	- 151 -
IV.10. ENSAYO DE INTERACCIÓN CON EL ENDOTELIO	- 153 -
IV.11. ESTUDIOS EPIGENÉTICOS: ANÁLISIS DEL METILOMA Y EL TRANSCRIPTOMA	- 157 -
IV.11.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA GLOBAL POR <i>MICROARRAY</i>	- 157 -
IV.11.2. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR <i>MICROARRAY</i>	- 159 -

IV.12. ESTUDIOS FUNCIONALES	- 166 -
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>- 179 -</b>
V.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS hASCs	- 181 -
V.2. INDUCCIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE LAS hASCs	- 181 -
V.3. CAPACIDAD DE MIGRACIÓN	- 184 -
V.4. CAMBIOS EPIGENÉTICOS Y COMPROMISO CON EL LINAJE CELULAR	- 186 -
V.5. EL GEN HOXA-5 EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL	- 188 -
V.6. REVERSIÓN DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN NEURONAL	- 190 -
V.7. ENSAYO DE COCULTIVO CON CÉLULAS ENDOTELIALES	- 190 -
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>- 195 -</b>
<b>VII. CONCLUSIONS (ENGLISH)</b>	<b>- 199 -</b>
<b>VIII. CONCLUSIONS (FRANÇAIS)</b>	<b>- 203 -</b>
<b>IX. ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>- 207 -</b>
<b>X. ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>- 211 -</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>- 215 -</b>



## RESUMEN



**RESUMEN**

Las lesiones en el sistema nervioso central (SNC) y los trastornos neurodegenerativos agudos constituyen la tercera causa de muerte más frecuente en Europa y Estados Unidos, solo por detrás del cáncer y las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, todavía no existen tratamientos eficaces para sustituir las células nerviosas dañadas. La medicina regenerativa propone el trasplante de células madre obtenidas de distintas fuentes y diferenciadas *in vitro* como un método prometedor de reparación del tejido neuronal, y son muchos los estudios clínicos que avalan su eficacia. No obstante, la aplicación clínica de esta metodología es muy reducida, debido sobre todo a la incapacidad actual de garantizar su bioseguridad a largo plazo. Este estudio pretende implementar un protocolo eficaz de inducción neuronal *in vitro* y profundizar en el estudio de los cambios epigenéticos que tienen lugar durante la diferenciación neuronal, en el afán de conocer mejor cuáles son los acontecimientos moleculares que tienen lugar en la célula y conseguir así prever el comportamiento de éstas una vez trasplantadas al paciente.

Las células madre mesenquimales (MSCs) adultas derivadas de tejido adiposo (hASCs) ofrecen importantes ventajas prácticas frente a otros tipos de células madre en su potencial aplicación clínica, ya que pueden obtenerse en grandes cantidades, cultivarse y expandirse fácilmente, y presentan muy bajo riesgo de desarrollar neoplasias malignas. En este trabajo se emplearon células madre humanas obtenidas de tejido adiposo (hASCs), concretamente de lipoaspirados, cedidos previo consentimiento firmado por pacientes del hospital La Salud de Granada. Tras ser aisladas siguiendo un protocolo de extracción estándar, que incluye una digestión del tejido con colagenasa tipo I, las células fueron caracterizadas por citometría de flujo. Se obtuvieron porcentajes superiores al 98% para los marcadores mesenquimales CD73, CD105 y CD90 e inferiores al 2% para los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34 y CD133. Este hecho confirmó que el experimento partía de un cultivo homogéneo de hASCs.

El potencial de diferenciación neuronal de las hASCs fue estudiado empleando tres protocolos de diferenciación químicos. Dichos protocolos fueron llamados Neu1, de 21 días de duración, Neu2, de 15 días y Neu3, de 10 días. Todos ellos eran ricos en factores de crecimiento y otras sustancias que según la bibliografía consultada favorecían el proceso de neurogénesis. La diferenciación neuronal se llevó a cabo

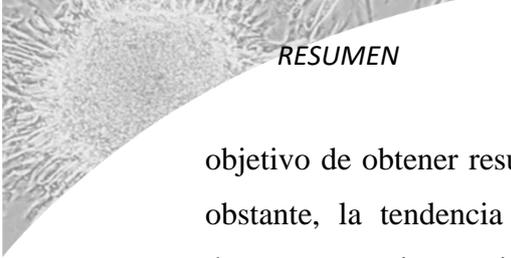
empleando células sembradas en monocapa y en neuroesferas para poder estudiar su comportamiento en tres dimensiones. Una vez finalizado el tiempo de inducción, la mayoría de las hASCs mostraron evidencias morfológicas de una especialización hacia linaje neuronal. Las hASCs adquirieron una morfología alargada y la aparición de prolongaciones citoplasmáticas a modo de neuritas, especialmente llamativas en el caso de las neuroesferas. Se estudió también la desdiferenciación de las células inducidas previamente. Para ello, se retiró el medio de inducción y se sustituyó por un medio de cultivo estándar durante la mitad del tiempo que duró la diferenciación neuronal, diez días en el caso de Neu1, siete días en Neu2 y cinco días en Neu3. Se observó un retorno hacia la morfología inicial, que fue más aparente en el caso de Neu1. También se observó la presencia de abundantes puentes citoplasmáticos intercelulares, más abundantes en el caso de Neu2.

Para evaluar si existían evidencias inmunocitoquímicas de la diferenciación neuronal y la desdiferenciación, se estudiaron marcadores proteicos específicos del sistema nervioso por inmunofluorescencia de placas celulares fijadas y western blot de extractos proteicos de los cultivos celulares, para más de una docena de marcadores neuronales. También se estudiaron marcadores funcionales relacionados con la capacidad celular para transmitir impulsos nerviosos. Estos estudios se complementaron con *Real Time PCR* para los mismos marcadores. La Nestina, proteína propia de células madre neuronales y la Tubulina, abundante en neuronas jóvenes, mostraron un incremento de expresión frente a los controles de hASCs sin tratar, más patente en células tratadas con Neu1. De los marcadores proteicos propios de neuronas maduras empleados, MAP-2, Neurofilamentos, Enolasa, Proteína Tau y Tirosina hidroxilasa, solo los tres últimos mostraron un incremento de marcaje frente al control, que fue más acentuado en Neu1 y Neu3 en los tres casos. GFAP se utilizó como marcador proteico de astrocitos y su marcaje fue ligeramente superior al control en Neu1 y Neu2. La proteína GalC se estudió como marcador de oligodendrocitos, obteniéndose un incremento de marcaje en Neu1 frente al control. En el caso de los marcadores funcionales, la acetiltransferasa (CHAT) mostró un aumento de marcaje tanto en Neu2 como en Neu3, y en el caso de la proteína SNAP25 todos los tratamientos presentaron un incremento de marcaje con respecto al control. En general, parece que los medios de diferenciación Neu1 y Neu3 fueron los que presentaron resultados más prometedores según todas las técnicas.

Para estudiar los cambios que acontecían a nivel epigenético durante el proceso de diferenciación neuronal, se obtuvieron muestras de ADN y ARN para el análisis del metiloma y transcriptoma de las células madre mesenquimales diferenciadas y desdiferenciadas, que fueron enviadas al laboratorio de la Dra. María Berdasco en Barcelona, para someterse a arrays de metilación. El resultado de estos arrays permitió seleccionar un total de siete genes relacionados con la diferenciación celular y la neurogénesis, que presentaban una metilación diferencial frente a los controles, tres genes hipometilados (*Hoxa-5*, *GRM4* y *FGFR1*) y cuatro hipermetilados (*RETL1*, *METRN1*, *EN1* y *Pax-9*). Para confirmar los resultados de los arrays, se realizó una secuenciación con bisulfito de múltiples clones y *Real Time PCR* para comprobar que los cambios en el genoma se correlacionaban con una transcripción modificada de estos genes. Tras la realización de estas técnicas, los genes *Hoxa-5* y *Pax-9* fueron seleccionados como candidatos para el estudio funcional.

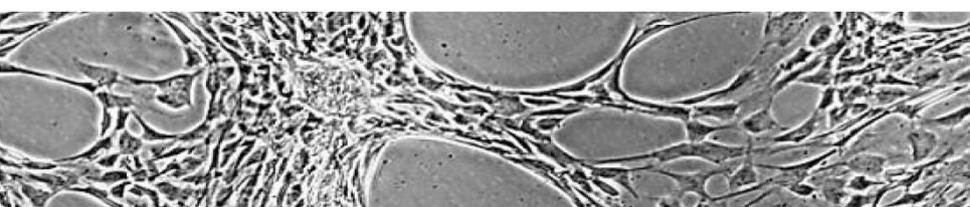
Para estudiar la importancia del gen *Hoxa-5*, hipometilado tras la diferenciación neuronal, se planeó crear una línea estable de hASCs que lo sobreexpresara empleando dos metodologías. Se propuso la inserción estable del gen mediante una transfección con lentivirus y una activación transcripcional de su promotor mediante un sistema CRISPR/dCas9. En ambos casos se realizaron controles negativos transfectando con sistemas no funcionales. Se realizaron estudios paralelos de western blot e inmunofluorescencia para demostrar la presencia del gen *Hoxa-5* en las células transfectadas y se comprobó que su expresión era mayor en las hASCs tratadas con el sistema CRISPR/dCas9. A continuación se hicieron ensayos de expresión de marcadores neuronales en las líneas que sobreexpresaban *Hoxa-5* para estudiar la importancia de este gen en el proceso de diferenciación neuronal. Los resultados mostraron que las células que sobreexpresaban este gen tenían mayor capacidad para expresar marcadores neuronales que los controles de hASCs sin tratar y que aquellas suplementadas además con el medio de diferenciación neuronal Neu1 maximizaban esta capacidad. Esto demostró que el gen *Hoxa-5* juega un importante papel en la diferenciación neuronal activando rutas que en última instancia favorecen la expresión de marcadores neuronales.

En conclusión, la terapia con hASCs está experimentando avances importantes, con un número cada vez mayor de ensayos clínicos en todo el mundo. Sin embargo, es necesaria una mayor comprensión de su modo de acción a nivel epigenético y una estandarización de las prácticas de aislamiento, caracterización y trasplante con el



## *RESUMEN*

objetivo de obtener resultados comparables, reproducibles y estables a largo plazo. No obstante, la tendencia al alza de las publicaciones relacionadas con estas células demuestra una intensa investigación para superar estos obstáculos.



## SUMMARY



**SUMMARY**

Central nervous system lesions and acute neurodegenerative disorders are the third most frequent cause of death in Europe and the United States, only behind cancer and cardiovascular diseases. However, there are still no effective treatments to replace the cells from the damaged nerves. Regenerative medicine proposes the transplant of stem cells obtained from different sources and differentiated *in vitro* as a promising method of tissue repair, with many clinical studies supporting its effectiveness. Nevertheless, the clinical application of this methodology is very limited, mainly due to the current inability to guarantee its biosecurity in the long term. This study aims to implement an effective *in vitro* neuronal induction protocol and carry out a thorough study of the epigenetic changes that take place during neuronal differentiation, in order to better understand the molecular events that take place in the cell and thus to anticipate its behavior once transplanted to the patient.

Adult mesenchymal stem cells (MSCs) derived from adipose tissue (hASCs) offer important practical advantages over other types of stem cells when it comes to their potential clinical application, since they can be obtained in large quantities, easily cultured and expanded and they present a very low risk of developing malignant neoplasms. In this work, hASCs obtained from lipoaspirates, under a signed consent, were donated by patients of the La Salud hospital in the city of Granada. After being isolated following a standard extraction protocol that includes tissue digestion with type I collagenase, the cells were characterized by flow cytometry. Percentages higher than 98% were obtained for the mesenchymal markers CD73, CD105 and CD90 and less than 2% for the hematopoietic markers CD45, CD34 and CD133. This fact confirmed that the experiment started from a homogenous culture of hASCs.

Neuronal differentiation potential of hASCs was studied using three chemical differentiation protocols. These protocols were called Neu1, 21 days long, Neu2, 15 days long and Neu3, 10 days long. All of them were rich in growth factors and other substances that, according to the consulted bibliography, favor the process of neurogenesis. The neuronal differentiation was carried out using cells seeded in monolayer and in neurospheres in order to study their three-dimensional behavior. Once the induction time was over, most of the hASCs showed morphological evidence of a specialization towards neuronal lineage. The hASCs displayed an elongated

morphology and we observed the appearance of cytoplasmic prolongations as neurites, especially striking in the case of the neurospheres. The dedifferentiation of previously induced cells was also studied. For this purpose, the induction medium was removed and replaced by a standard culture medium for half the induction time, ten days in the case of Neu1, seven days in Neu2 and five days in Neu3. A return to the initial morphology was observed, which was more apparent in the case of Neu1. The presence of abundant intercellular cytoplasmic bridges, more abundant in the case of Neu2, was also noted.

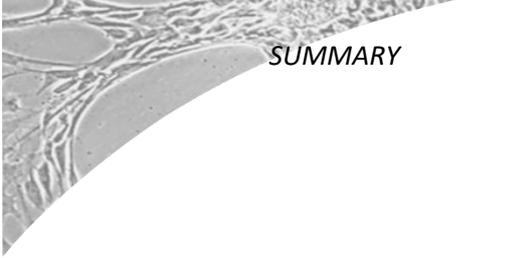
To evaluate whether there was immunocytochemical evidence of neuronal differentiation and dedifferentiation or not, specific nervous system protein markers were studied by immunofluorescence of fixed cell plates and western blotting of protein extracts from cell cultures for more than a dozen neuronal markers. Functional markers related to cellular ability to transmit nerve impulses were also studied. These studies have been complemented with Real Time PCR for the same markers. Nestin, a neuronal stem cell protein and Tubulin, abundant in young neurons, both showed an increase in expression compared to the controls of untreated hASCs, and it was more patent in Neu1-treated cells. Among the protein markers characteristic of mature neurons used, i.e. MAP-2, Neurofilaments, Enolase, Tau Protein and Tyrosine hydroxylase, only the last three showed an increase in labeling versus control, which was more prominent in Neu1 and Neu3 in the three cases. GFAP was used as a protein marker for astrocytes and its labeling was slightly higher in Neu1 and Neu2 than in the control. The GalC protein was studied as an oligodendrocyte marker, obtaining an increase in Neu1 labeling compared to control. In the case of functional markers, acetyltransferase showed an increase in labeling in both Neu2 and Neu3, and in the case of the SNAP25 protein all treatments showed an increase in labeling with respect to the control. In general, it seems that the differentiation media Neu1 and Neu3 are those that present the most promising results according to all the techniques carried out.

To study the changes that take place at the epigenetic level during the process of neuronal differentiation, DNA and RNA samples were obtained for the analysis of the methylome and transcriptome of differentiated and dedifferentiated mesenchymal stem cells, and next were sent to the laboratory of Dr. Maria Berdasco, in Barcelona, to undergo methylation arrays. The result of these arrays allowed us to select a total of seven genes related to cell differentiation and neurogenesis, which presented the most pronounced differential methylation against the controls, three hypomethylated genes

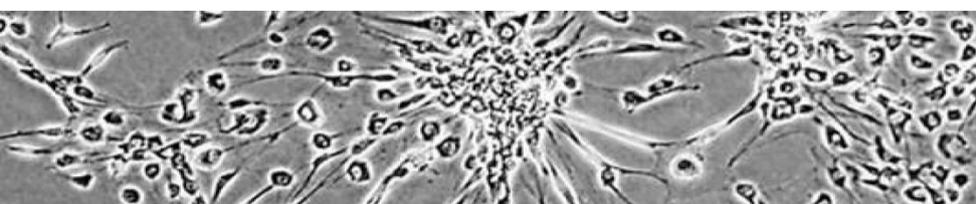
(Hoxa-5, GRM4 and FGFR1) and four hypermethylated genes (RETL1, METRN1, EN1 and Pax-9). To confirm the data from the array assay, bisulfite sequencing of multiple clones and Real Time PCR were performed to verify that the changes in the genome correlated with a modified transcription of these genes. After performing these techniques, the Hoxa-5 and Pax-9 genes were selected as candidates for functional studies.

To determine the importance of the Hoxa-5 gene, hypomethylated after neuronal differentiation, a stable line of hASCs was created that overexpressed it by using two methodologies: a stable insertion of the gene was proposed by means of a transfection with lentivirus and a transcriptional activation of its promoter with a CRISPR/dCas9 system. In both cases, transfectant negative controls were performed with non-functional systems. Parallel western blot and immunofluorescence studies were performed to demonstrate the presence of the Hoxa-5 gene in the transfected cells and its expression was found to be higher in the hASCs transfected with CRISPR. Next, expression studies of neuronal markers were carried out in the cell lines that overexpressed Hoxa-5 to see the importance of this gene in the process of neuronal differentiation. The results showed that cells that overexpress this gene are more able to express neuronal markers than the controls of untreated hASCs and that supplementation with the neural differentiation medium Neu1 maximizes this ability. These results demonstrate that the Hoxa-5 gene plays an important role in neuronal differentiation by activating pathways that ultimately favor the expression of neuronal markers. We also studied the importance of the Pax-9 gene, hypermethylated after neuronal differentiation, silencing its expression by transfecting with a small interfering RNA. However, due to its low baseline expression in undifferentiated hASCs, the results were inconclusive and thus they were not included.

In conclusion, therapy with hASCs is undergoing significant advances, with an increasing number of clinical trials around the world. In spite of that, a greater understanding of their mode of action at the epigenetic level and a standardization of isolation, characterization and transplant practices are necessary in order to obtain comparable, reproducible and stable long-term results. However, the upward trend of publications related to these cells demonstrates intense research to overcome these obstacles.



*SUMMARY*



## ABREVIATURAS



## ABREVIATURAS

### A

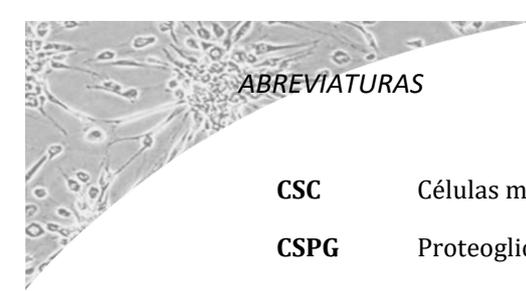
<b>Ab</b>	Antibiótico
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>AFS</b>	Células madre del fluido amniótico
<b>APC</b>	Aloficocianina ( <i>Allophycocyanin</i> )
<b>APS</b>	Persulfato amónico ( <i>Ammonium persulfate</i> )
<b>AR</b>	Ácido retinoico ( <i>Retinoic acid</i> )
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNip</b>	ARN interferente pequeño
<b>ASC</b>	Células madre derivadas de tejido adiposo
<b>aSC</b>	Células madre adultas ( <i>Adult stem cells</i> )
<b>ASIA</b>	Asociación Americana de Lesiones Medulares ( <i>American Spinal Injury Association</i> )

### B

<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico cerebral ( <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> )
<b>BMP</b>	Proteínas morfogenéticas óseas ( <i>Bone morphogenetic proteins</i> )
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina ( <i>Bovine serum albumin</i> )

### C

<b>CAS</b>	Nucleasa asociada a las secuencias CRSPR ( <i>CRSPR associated system</i> )
<b>CHAT</b>	Acetiltransferasa de colina o colinacetiltransferasa ( <i>Choline acetyltransferase</i> )
<b>CIPRO</b>	Ciprofloxacino
<b>CMG</b>	Células madre germinales
<b>CMM</b>	Células madre multipotentes
<b>CMP</b>	Células madre pluripotentes
<b>CMT</b>	Células madre totipotentes
<b>CMU</b>	Células madre unipotentes
<b>CpG</b>	Sitios CpG o sitios CG (5'-C-fosfato-G-3')
<b>crARN</b>	ARN CRISPR
<b>CRISPR</b>	Repeticiones palindrómicas cortas regularmenteinterespaciadas ( <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> )



## ABREVIATURAS

<b>CSC</b>	Células madre tumorales ( <i>Cancer Stem Cells</i> )
<b>CSPG</b>	Proteoglicano de condroitín sulfato ( <i>Chondroitin sulfate proteoglycan</i> )

### D

---

<b>DCX</b>	Doblecortina, doblina o lisencefalina-X ( <i>Doublecortin-X</i> )
<b>dCas9</b>	Proteína Cas9 catalíticamente inactiva ( <i>Dead Cas9</i> )
<b>dNTPs</b>	Dideoxínucleótido trifosfato
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado por Dulbecco

### E

---

<b>ECC</b>	Células madre de teratocarcinoma embrionario ( <i>Embryonal carcinoma stem cell</i> )
<b>ELA</b>	Esclerosis lateral amiotrófica
<b>EM</b>	Esclerosis múltiple
<b>ESC</b>	Células madre embrionarias ( <i>Embryonic stem cell</i> )

### F

---

<b>FBS</b>	Suero bovino fetal ( <i>Fetal bovine serum</i> )
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos ( <i>Fibroblast growth factor</i> )
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína ( <i>Fluorescein isothiocyanate</i> )
<b>FOXO 4</b>	Proteína O4 forkhead box

### G

---

<b>GALC</b>	Galactosilceramidasa
<b>GDNF</b>	Factor neurotrófico derivado de la glía ( <i>Glial-derived neurotrophic factor</i> )
<b>GFAP</b>	Proteína fibrilar ácida ( <i>Glial fibrillary acidic protein</i> )
<b>GSC</b>	Escala de Coma de Glasgow

### H

---

<b>hASCs</b>	MSCs humanas derivadas de tejido adiposo ( <i>Human adipose mesenchymal stem cells</i> )
<b>HSC</b>	Células madre hematopoyéticas ( <i>Hematopoietic stem cells</i> )
<b>HP1</b>	Proteína de la heterocromatina ( <i>Heterochromatin protein</i> )

## I

<b>IBMX</b>	3-Isobutyl-1-methylxantina
<b>icMSC</b>	Células madre mesenquimales derivadas de la cresta ilíaca
<b>IGF</b>	Factor de crecimiento insulínico ( <i>Insulin growth factor</i> )
<b>IPSC</b>	Células madre pluripotentes inducidas ( <i>Induced pluripotent stem cell</i> )
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido
<b>ISCT</b>	Sociedad Internacional de Terapia Celular ( <i>International Society of Cellular Therapy</i> )

## L

<b>LTR</b>	Repetición terminal larga ( <i>Long terminal repetition</i> )
------------	---

## M

<b>MAP2</b>	Proteína 2 asociada a los microtúbulos ( <i>Microtubule-associated protein 2</i> )
<b>miARN</b>	Micro-ARN
<b>MSC</b>	Células madre mesenquimales ( <i>Mesenchymal Stem Cells</i> )

## N

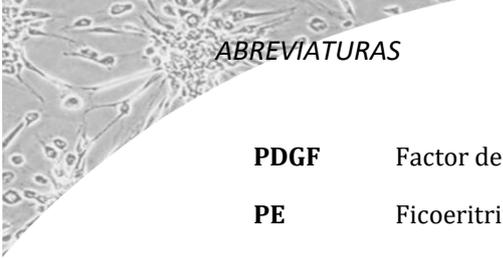
<b>NCBI</b>	National Cancer for Biotechnology Information
<b>NFM</b>	Proteína del filamento intermedio de los neurofilamentos ( <i>Neurofilament intermediate filament protein</i> )
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento neurotrófico ( <i>Neurotrophic Growth Factor</i> )
<b>NPC</b>	Células progenitoras neuronales ( <i>Neuronal Progenitor Cells</i> )
<b>NSC</b>	Células madre neuronales ( <i>Neuronal Stem Cells</i> )
<b>NSE</b>	Enolasa o fosfopiruvato hidratasa

## O

<b>OPC</b>	Células progenitoras de oligodendrocitos ( <i>Oligodendrocyte progenitor cells</i> )
------------	--

## P

<b>PAM</b>	Motivo adyacente al protoespaciador ( <i>Protospacer adjacent motif</i> )
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PcG</b>	Grupo de proteínas Policomb ( <i>Polycomb Group Protein</i> )



## ABREVIATURAS

<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas ( <i>Platelet derived growth factor</i> )
<b>PE</b>	Ficoeritrina ( <i>Phycoerythrin</i> )
<b>PEBC</b>	<i>Cancer Epigenetics and Biology Program</i>
<b>PGC</b>	Células madre germinales primordiales ( <i>Primordial germ cells</i> )

### R

---

<b>RAR</b>	Receptores del ácido retinoico
------------	--------------------------------

### S

---

<b>SC</b>	Célula madre ( <i>Stem cell</i> )
<b>SCN8A</b>	Subunidad alfa del canal de sodio voltaje dependiente de tipo VIII o Nav1.6 ( <i>Sodium channel, voltaje gated, type VIII, alpha subunit</i> )
<b>SCN9A</b>	Subunidad alfa del canal de sodio voltaje dependiente de tipo IX ( <i>Sodium channel, voltaje gated, type IX, alpha subunit</i> )
<b>SDS</b>	Sodiododecilsulfato
<b>SDS-PAGE</b>	<i>SDS- polyacrilamide gel electrophoresis</i>
<b>SGZ</b>	Zona subgranular ( <i>Subgranular zone</i> )
<b>SN</b>	Sistema nervioso
<b>SNAP25</b>	Proteína asociada sinaptosomal 25 ( <i>Synaptosomal-associated protein 25</i> )
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central ( <i>Central Nervous System</i> )
<b>SVZ</b>	Zona subventricular ( <i>Subventricular zone</i> )

### T

---

<b>TAU</b>	Proteína Tau
<b>TEA</b>	Trastornos del espectro autista
<b>TEMED</b>	Tetrametiletiletilendiamina
<b>TGF</b>	Factor transformante del crecimiento ( <i>transforming growth factor</i> )
<b>TH</b>	Tirosina hidroxilasa ( <i>Tyrosine hydroxylase</i> )
<b>Tm</b>	Temperatura de melting ( <i>Primer Melting Temperature</i> )
<b>tPA</b>	Activador del plasminógeno tisular
<b>TracrARN</b>	Transactivador de crARN
<b>TRIS</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>TSA</b>	Tricostatina
<b>TUB III</b>	$\beta$ -Tubulina III

---

**V**

---

**VEGF** Factor de crecimiento del endotelio vascular (*Vascular endothelial growth factor*)

**VPA** Ácido valproico

---

**X**

---

**XGAL** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido

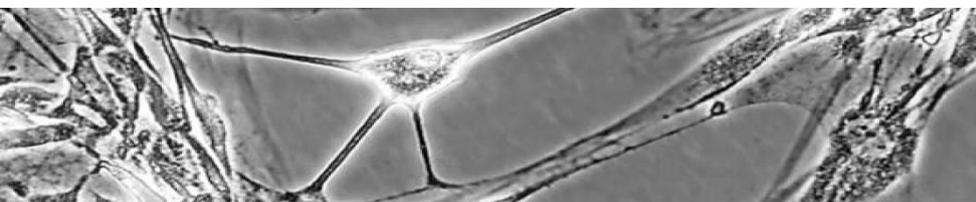
---

**Z**

---

**ZnFn** Proteína de unión al ADN dedo de zinc (*ADN binding zinc finger protein*)





# 1. INTRODUCCIÓN



# I. INTRODUCCIÓN

## I.1. MEDICINA REGENERATIVA

---

### I.1.1. DEFINICIÓN Y CONTEXTO HISTÓRICO

---

La medicina regenerativa, también conocida como terapia celular o ingeniería de tejidos, es la rama de la bioingeniería que se sirve de la combinación de células, métodos de ingeniería de materiales, bioquímica y fisicoquímica para mejorar o reemplazar funciones biológicas. Su objetivo es restaurar la función de órganos y tejidos dañados a consecuencia de enfermedades degenerativas o lesiones traumáticas, mediante la implantación de células sanas o factores producidos por éstas. En España, de acuerdo a la normativa establecida por la Agencia Española del Medicamento (orden SCO/3461/2003 de 26 de noviembre del Real Decreto 763/1993), la terapia celular se define como:

*“La utilización en seres humanos de células somáticas vivas, tanto autólogas (procedentes del propio paciente), alogénicas (de otro ser humano) o xenogénicas (de animales), cuyas características biológicas han sido alteradas sustancialmente como resultado de su manipulación para obtener un efecto terapéutico, diagnóstico o preventivo por medios metabólicos, farmacológicos e inmunológicos. Dicha manipulación incluye la expansión o activación de poblaciones celulares autólogas ex vivo o la utilización de células alogénicas y xenogénicas asociadas con productos sanitarios empleados ex vivo o in vivo (por ejemplo, microcápsulas, matrices y andamiajes intrínsecos, biodegradables o no biodegradables)”.*

En este contexto, las células madre se presentan como uno de los elementos fundamentales en la terapia celular como alternativa terapéutica para un gran número de patologías que en la actualidad carecen de un tratamiento efectivo.

## I.1.2. CÉLULAS MADRE: DEFINICIÓN, CARACTERÍSTICAS Y CLASIFICACIÓN

Las células madre son células indiferenciadas presentes en todos los organismos multicelulares, que tienen la capacidad de auto-renovarse y diferenciarse en distintos tipos celulares (Ayala-Cuellar, Kang et al. 2019, Fuchs and Blau 2020). Pueden tener distintos orígenes, lo que las hace similares en muchos aspectos, pero también les confiere características propias en lo relacionado a su tasa de diferenciación, secreción de factores tróficos o comportamiento en un ambiente patológico. En los últimos años han empezado a realizarse estudios que comparan la eficacia de distintos tipos de células madre en el mismo experimento sin que se haya alcanzado aun un consenso sobre el tipo más efectivo en medicina regenerativa (Hakki, Turac et al. 2017).

### I.1.2.1. TIPOS DE CÉLULAS MADRE SEGÚN SU POTENCIALIDAD

Las células madre pueden clasificarse en base a su origen o más comúnmente en base a su plasticidad o capacidad de diferenciación. Según la capacidad de las células madre para diferenciarse en otros tipos celulares, pueden clasificarse en cinco tipos (*Figura 1*) (Sobhani, Khanlarkhani et al. 2017):

#### ❖ Células madre totipotentes

Son aquellas a partir de las cuales puede desarrollarse un organismo completo, tanto los componentes extraembrionarios como los embrionarios, es decir, las tres capas embrionarias, el linaje germinal y el saco vitelino. El cigoto es la célula totipotente por excelencia.

#### ❖ Células madre pluripotentes

Son aquellas a partir de las cuales pueden desarrollarse las tres capas embrionarias, endodermo, ectodermo y mesodermo, pero no los tejidos extraembrionarios. Las células madre pluripotentes más estudiadas son las embrionarias, aisladas de la masa celular interna del blastocisto, llamada embrioblasto.

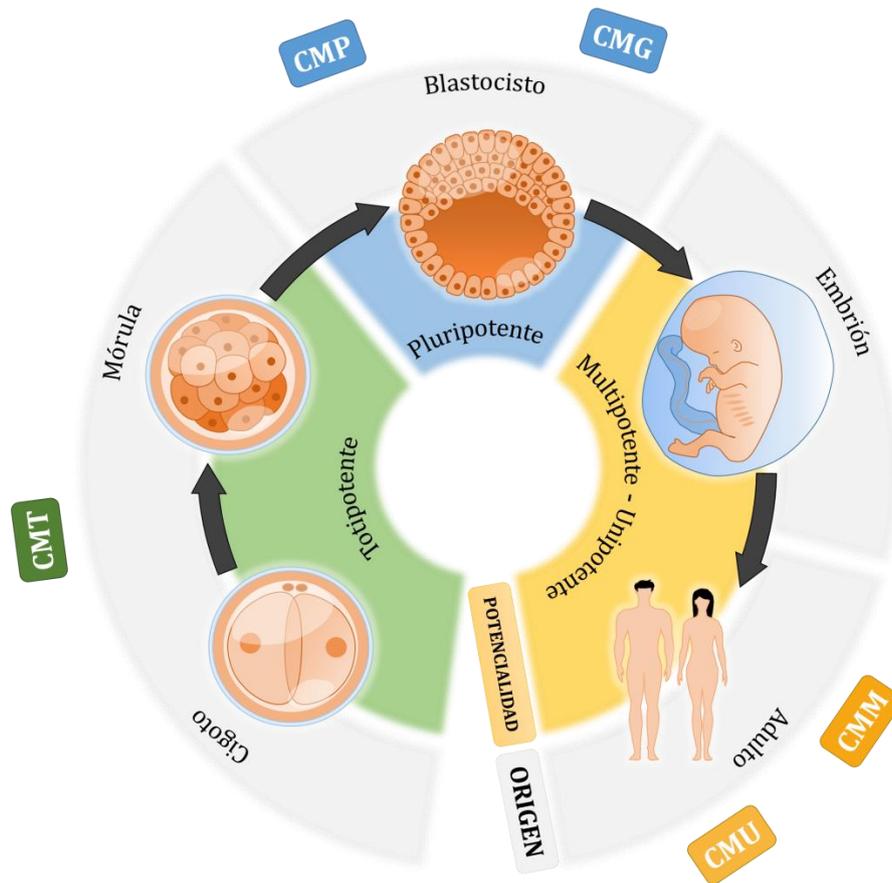


Figura 1. Tipos de células madre según su potencialidad.

**CMT:** células madre totipotentes; **CMP:** células madre pluripotentes; **CMG:** células madre germinales; **CMM:** células madre multipotentes; **CMU:** células madre unipotentes.

Figura diseñada usando Microsoft PowerPoint.

#### ❖ Células madre germinales

Son células madre embrionarias pluripotentes derivadas de los esbozos gonadales del embrión, situados en la cresta gonadal, capaces de dar lugar a las gónadas, ovarios y testículos, y los gametos, óvulos y espermatozoides respectivamente.

#### ❖ Células madre multipotentes

Son aquellas que darán lugar solo a células de su misma capa embrionaria. Es el caso de una célula madre mesenquimal que, al ser de origen mesodérmico, solo podrá diferenciarse a células propias de esta capa embrionaria como son los miocitos, adipocitos u osteocitos. Por el contrario, una célula madre hematopoyética se diferenciará hacia los distintos tipos de células sanguíneas.

### ❖ Células madre unipotentes

Llamadas también células progenitoras, son aquellas que tienen la capacidad de diferenciarse a un solo tipo celular. Son típicamente las células madre adultas presentes en tejidos y órganos del individuo adulto, capaces de regenerar los tejidos dañados o envejecidos.

## I.1.2.2. TIPOS DE CÉLULAS MADRE SEGÚN SU ORIGEN

A lo largo del desarrollo ontogénico, podemos identificar y aislar seis tipos distintos de células madre atendiendo a su origen (*Figura 2*):

### ❖ Células madre embrionarias (ESC)

Son células pluripotentes aisladas de la masa celular interna de embriones en estado de blastocisto (Priester, MacDonald et al. 2020). Se caracterizan por su capacidad de división simétrica ilimitada gracias a la actividad telomerasa, por tener un cariotipo normal y por mantenerse indiferenciadas y estables en las condiciones adecuadas de cultivo *in vitro*. Su trasplante puede generar teratomas, tienen una identidad inmunológica propia, pudiendo inducir rechazo tras su administración, y su origen despierta intensos debates éticos.

### ❖ Células madre germinales primordiales (PGC)

Se obtienen de la cresta gonadal de embriones humanos cuando están entre la quinta y novena semana de gestación. Las PGCs tienen propiedades bioquímicas, morfológicas, inmunológicas y de desarrollo comunes a las células madre embrionarias (Barati, Akhondi et al. 2021), son pluripotentes y contribuyen a la formación de la línea germinal cuando se inyectan en blastocistos para dar lugar a animales quiméricos. Así mismo, pueden diferenciarse a cuerpos embrioides y formar teratomas *in vivo*. Sin embargo, existen diferencias a nivel de metilación entre las PGCs y las ESCs.

### ❖ Células madre de fluido amniótico (AFS)

Estas células tienen su origen en muestras de amniocentesis, de villi coriónico o de placentas de embarazos a término (Costa, Ceresa et al. 2021). Se caracterizan por una gran capacidad proliferativa, marcadores celulares comunes con células madre adultas y embrionarias, capacidad pluripotente, actividad telomerasa y cariotipo normal. Sin embargo, a pesar de su potencialidad, su uso no está muy extendido.

❖ Células madre pluripotentes inducidas (iPSC)

Se trata de células somáticas adultas reprogramadas hasta estadios tempranos de desarrollo, mediante la expresión de factores de transcripción de desarrollo temprano (Oct3/4, Sox2, Klf4 y cMyc), normalmente empleando vectores virales (Logan, Arzua et al. 2019).

Durante el proceso, las células reprogramadas presentan una alta plasticidad y son capaces de volver a expresar actividad telomerasa, produciendo en algunos casos teratomas en ratones inmunodeprimidos. Puesto que estas células pueden obtenerse de una fuente autóloga, no producen rechazo en el paciente tratado. Actualmente, su uso está muy extendido a pesar de los posibles problemas que ocasionarían la formación de teratomas y la infección con los virus empleados en su formación.

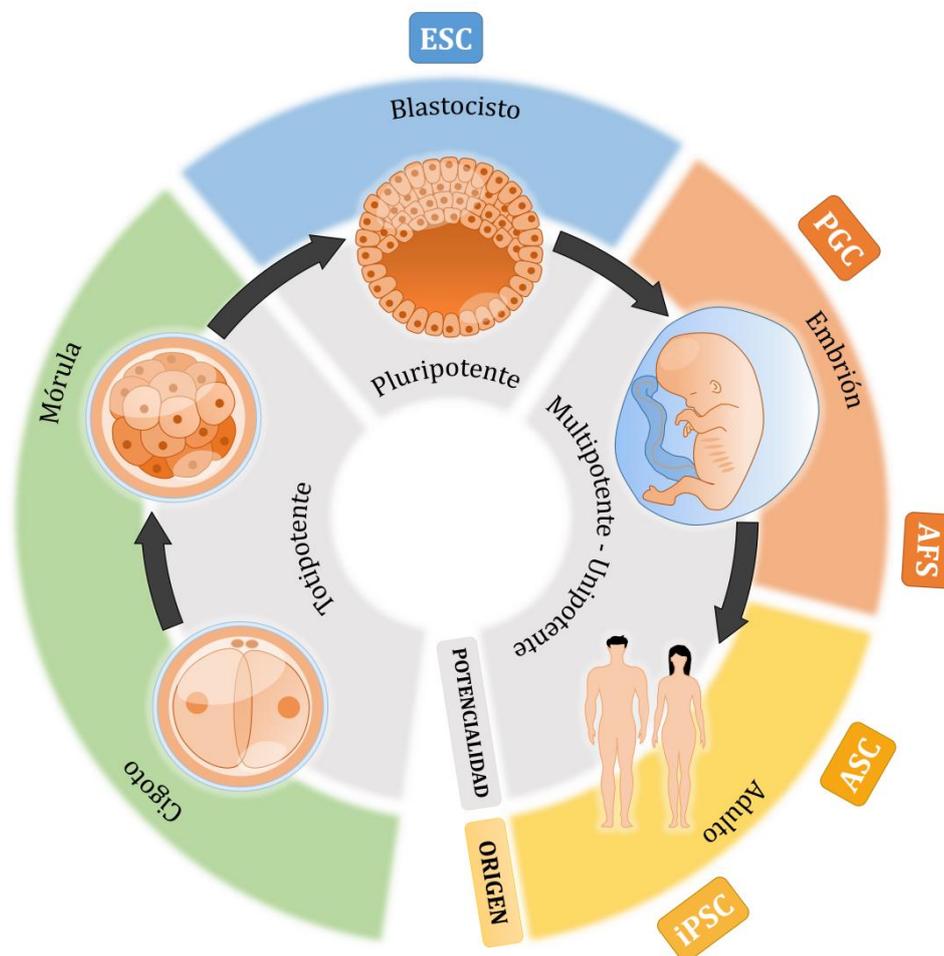


Figura 2. Tipos de células madre aisladas según el desarrollo ontogénico.

**ESC:** células madre embrionarias; **PGC:** células madre germinales primordiales; **ECC:** células madre de teratocarcinoma embrionario; **AFS:** células madre de fluido amniótico; **ASC:** células madre de tejido adiposo; **iPSC:** células madre pluripotentes inducidas.

Figura diseñada usando Microsoft PowerPoint.

❖ Células madre adultas (aSC)

Las aSCs proceden de tejidos adultos donde se mantienen pequeñas poblaciones de células indiferenciadas con capacidad para diferenciarse a tipos celulares maduros y perpetuarse a lo largo de la vida del individuo (Figura 3). Contribuyen no solo a la formación de órganos y tejidos, sino al mantenimiento, crecimiento y renovación de los mismos. Se han conseguido aislar a partir de médula ósea, piel, corazón, músculo, cerebro, tejido adiposo, etc.

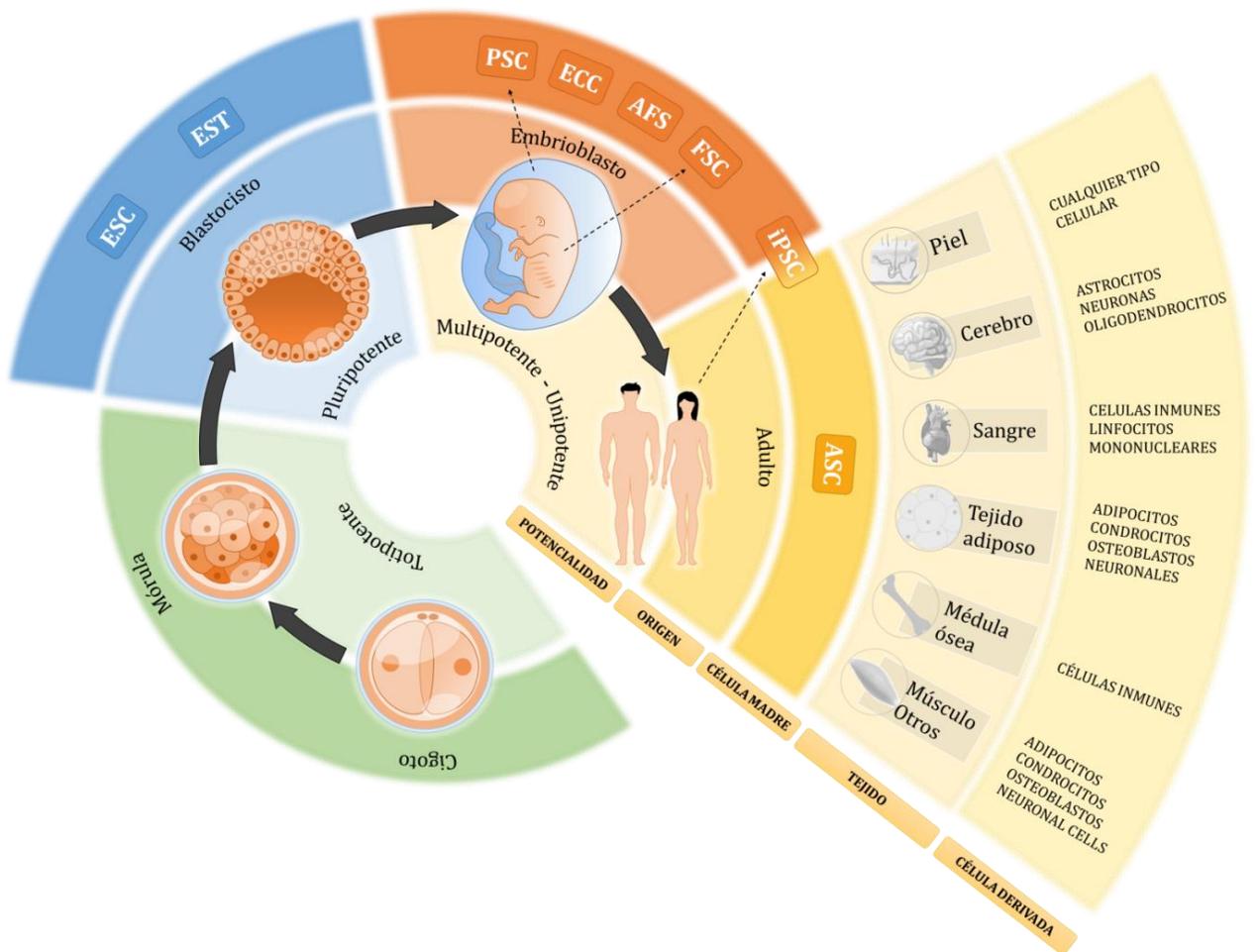


Figura 3. Fuentes de células madre adultas.

Las células madre adultas obtenidas de multitud de tejidos sirven para cultivo in vitro o trasplante y tienen la potencialidad para diferenciarse en gran cantidad de células.

Figura diseñada usando Microsoft PowerPoint.

### I.1.2.3. TIPOS DE CÉLULAS MADRE ADULTAS

Está fuera de toda controversia la existencia de células madre adultas en distintos tejidos, como el neuronal, el epidérmico, el muscular o el hematopoyético, sin embargo, cada vez existen más estudios que demuestran que su potencial es mayor de lo que se imaginaba. Según su potencialidad, encontramos que las células madre adultas pueden ser:

- a) Unipotentes: dan lugar, como ya se ha comentado, a un único tipo celular, como las células madre germinales que pueden convertirse únicamente en óvulos o espermatozoides cuando maduran (Bozdog, Yuksel et al. 2018).
- b) Multipotentes: se consideran células madre adultas debido a su capacidad limitada para diferenciarse en una o más líneas celulares, y entre ellas encontramos las células madre hematopoiéticas, las células madre mesenquimales o las células madre multipotentes del cerebro, capaces de dar lugar a los diferentes tipos de células neuronales y de la glía (Sobhani, Khanlarkhani et al. 2017).
- c) Pluripotentes: tradicionalmente se han considerado a las células madre embrionarias como células pluripotentes, a diferencia de las células madre adultas que se han caracterizado sólo como multi o unipotentes. Sin embargo, trabajos publicados recientemente sugieren que la potencialidad de algunos tipos de células madre adultas podría ser mayor de lo esperado, existiendo células troncales pluripotentes en algunos órganos adultos con capacidad de diferenciarse en tejidos derivados de cualquiera de las capas embrionarias (Mohammad, Dakik et al. 2019). Este fenómeno, denominado versatilidad, es apoyado por muchos estudios y desmentido por otros tantos.

De forma paralela, podemos clasificar los distintos tipos de células madre adultas según su tejido de origen del siguiente modo:

#### a) CÉLULAS MADRE DE LA MÉDULA ÓSEA:

Son las más ampliamente descritas y se han identificado diferentes tipos como hematopoyéticas, las llamadas *Side Population Cells*, las células progenitoras adultas multipotenciales y las células madre mesenquimales:

1. Células madre hematopoyéticas:

Se han identificado tanto *in vivo* como *in vitro* y han sido utilizadas clínicamente desde hace más de sesenta años mediante el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos presentes en la médula ósea y en la sangre periférica del donante. Al tratarse de células multipotentes, su potencial para convertirse en neuronas adultas, células de la glía, músculo esquelético o epitelio de diferentes tipos ha sido ampliamente descrito (Jurecic 2019).

2. Side Population Cells:

Este tipo de células son aisladas por citometría de flujo a partir de músculo y médula ósea y han demostrado ser capaces de diferenciarse a células de linaje hematopoyético tanto en humanos como en otras especies, pudiendo convertirse también en músculo cardíaco y endotelio (Yellamilli and van Berlo 2016).

3. Células progenitoras adultas multipotenciales:

Son las células adultas más recientemente descritas. Se trata de células pluripotenciales aisladas de médula ósea humana y murina, con una capacidad diferenciadora parecida a las células madre embrionarias (Ahangar, Mills et al. 2020). Pueden proliferar *in vitro* más de 100 divisiones celulares sin un aparente envejecimiento, consiguiendo niveles altos de telomerasa durante todo el tiempo de cultivo. Además, no expresan CD34, CD44, CD45 y c-kit y del mismo modo que las células madre embrionarias, en las células progenitoras adultas multipotenciales se detecta la activación de los factores de transcripción Oct-4, nanog y Rex-1, factores que son necesarios para mantener la célula en un estado proliferativo e indiferenciado. Además se ha probado que una única célula es capaz de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias (Carty, Corbett et al. 2018).

4. Células madre mesenquimales de médula ósea:

Se describirán en el próximo apartado.

**b) CÉLULAS MADRE NO DERIVADAS DE LA MÉDULA ÓSEA:**

Han sido descritas células madre adultas en multitud de órganos, lo que es ya ampliamente aceptado por la comunidad científica, aboliendo la idea de que órganos como el corazón o el sistema nervioso carecen de células con potencial proliferativo (Liu, David et al. 2020, Trentesaux, Striedinger et al. 2020). Entre los tejidos donde se han encontrado podemos destacar:

1. Mamario: permiten el crecimiento de la glándula mamaria durante la pubertad y la gestación, y son determinantes en los procesos de carcinogénesis mamarios.
2. Neural: la existencia de estas células en el cerebro adulto permite la neurogénesis durante la etapa adulta de algunas zonas concretas del sistema nervioso central (Andreotti, Silva et al. 2019, Ottoboni, von Wunster et al. 2020).
3. Mucosa olfativa: se han obtenido con éxito de las células de la mucosa olfativa humana que reviste la nariz (Fan, Lee et al. 2018).
4. Pulpa dentaria (Yam, Teo et al. 2018).
5. Músculo esquelético (Sasaki, Sachs et al. 2016).
6. Piel (Urban and Cheung 2021).
7. Cornea y retina (Stern, Tian et al. 2018).
8. Conductos pancreáticos.
9. Tejido gastrointestinal (Sasaki, Sachs et al. 2016, Clevers and Watt 2018).
10. Tejido adiposo: es una fuente muy abundante de células madre mesenquimales, como se describirá en sucesivos apartados.

**I.1.3. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSC)**

Las células madre mesenquimales (MSCs) son la población de células madre más estudiada debido a sus potenciales aplicaciones en biología experimental y en medicina regenerativa (Mishra, Shih et al. 2020). Las primeras MSCs fueron extraídas en 1960 por Alexander Friedenstein (Friedenstein, Petrakova et al. 1968), quien aisló células no hematopoyéticas de médula ósea y las calificó como fibroblastos formadores de colonias

(*colony-forming unit-fibroblasts*) debido a su adherencia al plástico y a su crecimiento parecido al de fibroblastos. Su adquisición relativamente sencilla las ha convertido en una herramienta muy interesante en medicina regenerativa y a pesar de que las primeras fueran medulares, actualmente es posible aislarlas de multitud de tejidos.

La *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) propuso los criterios mínimos para definir a este tipo de células (Salehi, Amirpour et al. 2016, Mishra, Shih et al. 2020):

- (i) **Capacidad para adherirse al plástico.**
- (ii) **Morfología típica:** las MSCs son una población heterogénea que contiene células con morfología que varía de fibroblástica a cuboidal (Pittenger, Mackay et al. 1999).
- (iii) **Fenotipo característico (>95% de las células):** no se ha especificado una combinación de antígenos de superficie concreta, pero se sabe que las MSCs no expresan marcadores de linaje hematopoyético como CD34, CD45, glicoforina A, CD11a, CD14 o HLA-DR, ni marcadores de linaje endotelial como CD11b, CD31. Algunos marcadores propios de este tipo celular son el CD29, CD44, CD49, CD51, CD62, CD73, CD90, CD105, CD117, CD166, CD27 o Stro-1. Independientemente del tejido de origen, las MSCs comparten unos criterios biológicos comunes, aunque tienen especificidad tisular. Por ejemplo, las derivadas de líquido amniótico son CD270+, lo que podría afectar a su funcionalidad (Sousa, Parreira et al. 2014).
- (iv) **Capacidades potenciales:** las MSCs son capaces de diferenciarse *in vitro* a distintos tipos celulares de origen mesodérmico, como adipocitos, condrocitos, osteoblastos, hepatocitos o miocitos (Wilson, Webster et al. 2019). También tienen la capacidad de transformarse a células derivadas de otras capas embrionarias, como son las de linaje neuronal o las endoteliales, a través de un proceso llamado transdiferenciación (Luo, Hu et al. 2018, Abdal Dayem, Lee et al. 2019).

El concepto de MSCs es controvertido y, en un intento por definir su comportamiento, se ha desvelado que no representan una población celular única, sino lo que parece ser una combinación heterogénea de tipos celulares (Fillion, El Andalousi et al. 2017). Se sabe que las MSCs tienen la capacidad de migrar a zonas dañadas del sistema nervioso central (SNC) gracias a la liberación de señales por parte del tejido inflamado o isquémico (Fernandez-Francos, Eiro et al. 2021). Este proceso, llamado *homing* o

anidamiento (Liesveld, Sharma et al. 2020), permite que las MSCs se implanten en el tejido dañado en el que tendrán efectos funcionales y de protección.

Las MSCs también pueden modular la respuesta inmunitaria adaptativa a diferentes niveles: participan en la reprogramación de monocitos y macrófagos, en la diferenciación de células dendríticas, en la maduración y funcionamiento de las células *natural killer*, así como en la activación de células T (Liesveld, Sharma et al. 2020). Se ha estudiado la liberación, por parte de las MSCs, de factores tróficos como el factor neurotrófico cerebral (BDNF), el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) o el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), en respuesta a un microambiente localizado, lo que estimula la neurogénesis, angiogénesis y la inmunomodulación (Castro-Manrreza and Montesinos 2015). También se ha observado que las MSCs favorecen la supervivencia de los astrocitos, encargados a su vez de la reparación endógena de las neuronas (Gao, Li et al. 2005).

Las fuentes más usuales de MSCs son tejidos adultos hematopoyéticos como la médula ósea, y tejidos no hematopoyéticos como el adiposo, células progenitoras endoteliales, células progenitoras de sangre periférica o pulpa dental (Zhuang, Lin et al. 2021). Otras fuentes potenciales son algunos tejidos fetales o neonatales como la placenta, la membrana y el líquido amniótico, la sangre de cordón umbilical, la gelatina de Wharton (Kaltz, Funari et al. 2008), o la sangre menstrual (Luz-Crawford, Torres et al. 2016)

❖ MSCs derivadas de médula ósea:

Fueron las primeras MSCs aisladas, pero presentan algunas limitaciones como;

- i) el método invasivo de obtención,
- ii) la diferente capacidad de diferenciación según la edad del paciente del que se extraen,
- iii) el descenso de células obtenidas en función de la edad del donante, y
- iv) el número escaso de MSCs en el tejido, que se estima de una por cada 10.000 células nucleares.

Hasta la fecha, la anemia aplásica es la única enfermedad en la que está extendido el uso de MSC derivadas de médula ósea (Bacigalupo 2017). Recientemente el uso de estas células ha resurgido en el marco de los trasplantes haploidenticos, es decir, entre donantes emparentados a medias (Passweg, Baldomero et al. 2017), si bien el

proceso de obtención es bastante tedioso, y junto con la lentitud del injerto ha limitado seriamente su aplicación clínica.

Estas células son capaces de migrar a los tejidos inflamados inhibiendo activamente la proliferación de células T (Le Blanc, Rasmusson et al. 2004), por lo que su uso es muy prometedor en inmunoterapia, existiendo varios estudios en fase I y II que demuestran su seguridad y aplicabilidad.

En el campo de la medicina regenerativa, las MSCs derivadas de médula ósea se han investigado ampliamente para tratar afecciones músculoesqueléticas, especialmente para daños óseos y cartilagosos como la artritis, las fracturas óseas o las malformaciones esqueléticas congénitas (Polymeri, Giannobile et al. 2016). Además, también han sido utilizadas para tratar trastornos cardíacos o endocrinos (Bhansali, Dutta et al. 2017), dando resultados prometedores en ensayos clínicos recientes que empleaban inyecciones intracardíacas tras un infarto de miocardio (Naseri, Madani et al. 2018). Mas recientemente varios ensayos clínicos de fase temprana han investigado el papel de estas células en el tratamiento de enfermedades neurológicas, como la esclerosis lateral amiotrófica o la múltiple, así como las lesiones cerebrales traumáticas o por infarto cerebral, siendo en todos los casos métodos seguros aunque con una eficacia clínica controvertida (Cox, Hetz et al. 2017, Dahbour, Jamali et al. 2017, Hess, Wechsler et al. 2017). Por último, es notable el interés que los llamados exosomas, o vesículas extracelulares secretadas por las MSCs derivadas de médula ósea, que contienen ácidos nucleicos y proteínas, han despertado, al ser importantes en la respuesta inmunitaria y la transducción de señales (Mead and Tomarev 2017, Zhang, Chopp et al. 2017).

❖ MSCs de sangre de cordón umbilical:

La sangre de cordón umbilical humano contiene las MSCs más jóvenes y primitivas (Um, Ha et al. 2020). Su extracción no es invasiva ni controvertida, pero la eficiencia de obtención no supera el 35% (Wagner, Wein et al. 2005, Kern, Eichler et al. 2006) y aunque su capacidad osteogénica es del 100%, no pueden diferenciarse a linaje adipogénico. Pese a esto, su uso es generalizado debido fundamentalmente a la creación de bancos de sangre de cordón umbilical que permiten su almacenamiento y posterior uso autólogo, sin perder su viabilidad con el paso del tiempo (Roura, Pujal et al. 2015). Además, la sangre de cordón umbilical presenta un bajo riesgo de transmisión de infecciones víricas y mutaciones somáticas tras el trasplante clínico (Liao, Geyer et al. 2011). A pesar de

tener una morfología similar, las MSCs derivadas de cordón umbilical presentan otras ventajas además de su fácil aislamiento: su tasa de proliferación y su rendimiento por unidad de volumen son mayores que otras células mesenquimales y su trasplante da lugar a menos incompatibilidades (Um, Ha et al. 2020). Estudios recientes han demostrado que este tipo de MSCs no muestran anomalías cromosómicas hasta el pase 15 (Kim, Bae et al. 2020). Además, la evaluación de la carcinogenicidad confirmó que no se indujeron tumores *in vitro* y que no se observó la formación de tumores *in vivo* a las 13 semanas de una única administración subcutánea de MSCs en los órganos internos de ratones BALB/c (Park, Kim et al. 2016). El enorme coste en fabricación y control de calidad del cultivo de estas células limita su comercialización, por lo que es imprescindible reducir costes para desarrollar terapias optimizadas, como los bioreactores modernos que controlan el estado metabólico de estas células en tiempo real minimizando los tiempos y sustituyendo el actual trabajo manual (Mesquita, Sargo et al. 2019, Robb, Fitzgerald et al. 2019).

❖ MSCs derivadas de tejido adiposo:

Debido a su accesibilidad y la facilidad de su aislamiento, las MSCs humanas derivadas de tejido adiposo (hASCs) se emplean cada vez más en medicina regenerativa, reemplazando a otros tipos de MSCs (Urrutia, Caviedes et al. 2019).

#### I.1.3.1. MSCs DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSEO

##### *Aislamiento de las hASCs*

---

Las hASCs o células madre/estromales adiposas son ampliamente utilizadas en medicina regenerativa como una nueva alternativa terapéutica en la reparación y regeneración tisular. La liposucción es actualmente la cirugía estética más común en el mundo y la técnica más empleada para la obtención de tejido adiposo. El primer paso es la infiltración, en la zona que va a aspirarse, de lidocaína, epinefrina, bicarbonato sódico y solución salina para reducir la pérdida de sangre (Freitag, Li et al. 2017, Fitzsimmons, Mazurek et al. 2018).

En la práctica, la extracción de tejido adiposo por lipoaspiración simple se considera un método con baja morbilidad del donante, alto rendimiento celular (100 ml en 3 L de lipoaspirado) y mínimas molestias postoperatorias. Un estudio realizado por la Sociedad Americana de Dermatología mostró que no existían muertes registradas en casi 70.000 liposucciones llevadas a cabo entre 1994 y 2000, y las complicaciones de la cirugía eran consideradas eventos raros con una tasa de 0,68 por cada 1.000 casos (Fraser, Wulur et al. 2006). Además, debido al gran contenido celular por extracción, se evitan los cultivos *in vitro* de larga duración, reduciéndose el riesgo de anomalías cromosomales.

La fracción estromal del tejido adiposo contiene, entre otros tipos celulares, entre un 2-10% de MSCs, lo que significa 10.000 veces más que en una extracción de médula ósea (Pikula, Marek-Trzonkowska et al. 2013). La fracción estromal contiene además otros tipos celulares como preadipocitos, células endoteliales, pericitos, fibroblastos y células madre hematopoyéticas (Peinado, Pardo et al. 2012). El cultivo final tiene también eritrocitos, linfocitos T, células B, macrófagos y mastocitos, todos ellos con una supervivencia *in vitro* más corta que la de las MSCs, siendo las células progenitoras el 3% de la población total (*Figura 4*) (Tsuji, Rubin et al. 2014).

#### *Caracterización de las hASCs y nicho celular*

---

Las hASCs humanas cumplen los criterios para su aplicación en medicina regenerativa:

- i) Se encuentran en cantidades abundantes, cerca del 2% de la muestra de lipoaspirado, lo que se considera el mayor porcentaje en comparación con las de otros tejidos (Vallee, Cote et al. 2009, Mazini, Rochette et al. 2019).
- ii) Pueden ser obtenidas y conservadas por procedimientos poco invasivos.
- iii) Se diferencian a múltiples linajes celulares de forma reproducible.
- iv) Pueden ser segura y eficazmente trasplantadas ya sea a un huésped autólogo o alogénico. Muchos estudios señalan a las hASCs como las células con mayor potencial inmunosupresor, comparadas con MSCs extraídas de otras fuentes, incluidas las de médula ósea (Ivanova-Todorova, Bochev et al. 2009, Strioga, Viswanathan et al. 2012). Asimismo, las hASCs presentan mayores capacidades pro-angiogénicas, antiapoptóticas y antioxidantes que otras células mesenquimales (Kim, Park et al. 2008, Kim, Park et al. 2009).

El análisis citométrico destaca los marcadores nombrados anteriormente en MSCs, aunque algunos como CD14, CD34 y CD45, pierden su expresión a medida que las células permanecen en cultivo, mientras que otros como CD29, CD73 y CD45 aumentan en pases más altos (Seo, Shin et al. 2019). Es por este motivo que los pases celulares se consideran un factor de selección cuando se pretende conseguir un cultivo más homogéneo.

El nicho de las hASCs es un microambiente celular que controla su capacidad de autorrenovación y su expresión génica, existiendo una fuerte interacción entre las células madre y la matriz extracelular (Jiang, Berry et al. 2017). Varios estudios recientes indican que se puede relacionar la presencia de hASCs en el tejido adiposo con su vascularización (Leto Barone, Khalifian et al. 2013), estando localizadas las hASCs en la adventicia externa de los vasos sanguíneos. La presencia de CD146 y 3G5 así como los marcadores de pericitos, sugieren que estas células pueden identificarse como pericitos ubicados en la vasculatura del tejido adiposo (Xu, Gong et al. 2017), si bien la presencia de CD146 impide que se confirme que ambos tipos celulares sean el mismo.

### *Cultivo de las hASCs*

---

El protocolo de cultivo de las hASCs varía entre laboratorios y actualmente no solo hay un método válido. Su morfología típica es la de células de tamaño medio, alargadas y estrechas, con un núcleo grande y redondo, y un nucléolo prominente. En comparación con otras MSCs, las hASCs tienen una mayor tasa de proliferación, comenzando con una fase de crecimiento logarítmico que multiplica su número al poco tiempo de haber sido sembradas. Este tipo celular también muestra actividad telomerasa, que aunque menos importante que en células tumorales, evidencia su capacidad de autorrenovación (Jeon, Kumar et al. 2011). A pesar de esto, la longitud de los telómeros disminuye en los sucesivos pases, lo que indica que existe un mecanismo de senescencia celular (Sachs, Francis et al. 2012). En condiciones *in vitro*, el fenotipo de las hASCs se ve afectado por los ingredientes del medio de cultivo y por las condiciones ambientales, lo que en muchos casos las lleva a diferenciarse a un tipo celular determinado. El medio puede suplementarse también con suero, lisado de plaquetas, factores de crecimiento, corticoides o antioxidantes, siendo las hASCs especialmente sensibles también a la concentración de oxígeno (Fan, Zhang et al. 2020).

Son muchos los estudios que demuestran la multipotencialidad de las hASCs *in vitro*, definiendo su origen mesodérmico y por tanto, su potencial para diferenciarse hacia adipocitos, condrocitos, osteoblastos y miocitos, si bien las hASCs también han demostrado tener capacidad para diferenciarse en células no mesodérmicas, es decir, ectodérmicas o endodérmicas (Mazini, Rochette et al. 2020). Las diferenciaciones *in vitro* se realizan principalmente con medios de cultivo suplementados con factores de crecimiento específicos, que permiten la diferenciación hacia multitud de tipos celulares (Kocan, Maziarz et al. 2017) (Figura 4) como adipocitos de grasa blanca (Mauney, Nguyen et al. 2007), adipocitos de grasa parda (Schulz, Huang et al. 2011), osteoblastos (Li, Yao et al. 2010), condrocitos (Erickson, Gimble et al. 2002, Zheng, Cao et al. 2006), miocitos estriados (Kang, Park et al. 2010) o lisos (Ning, Lin et al. 2006, Jack, Zhang et al. 2009), cardiomiocitos (Zhu, Liu et al. 2009), células hematopoyéticas (Minana, Carbonell-Uberos et al. 2008), células endoteliales (De Francesco, Tirino et al. 2009), células epiteliales (Vossmerbaeumer, Ohnesorge et al. 2009), hepatocitos (Sgodda, Aurich et al. 2007), células pancreáticas (Kajiyama, Hamazaki et al. 2010) o pulpa dental (Ferro, Spelat et al. 2011).

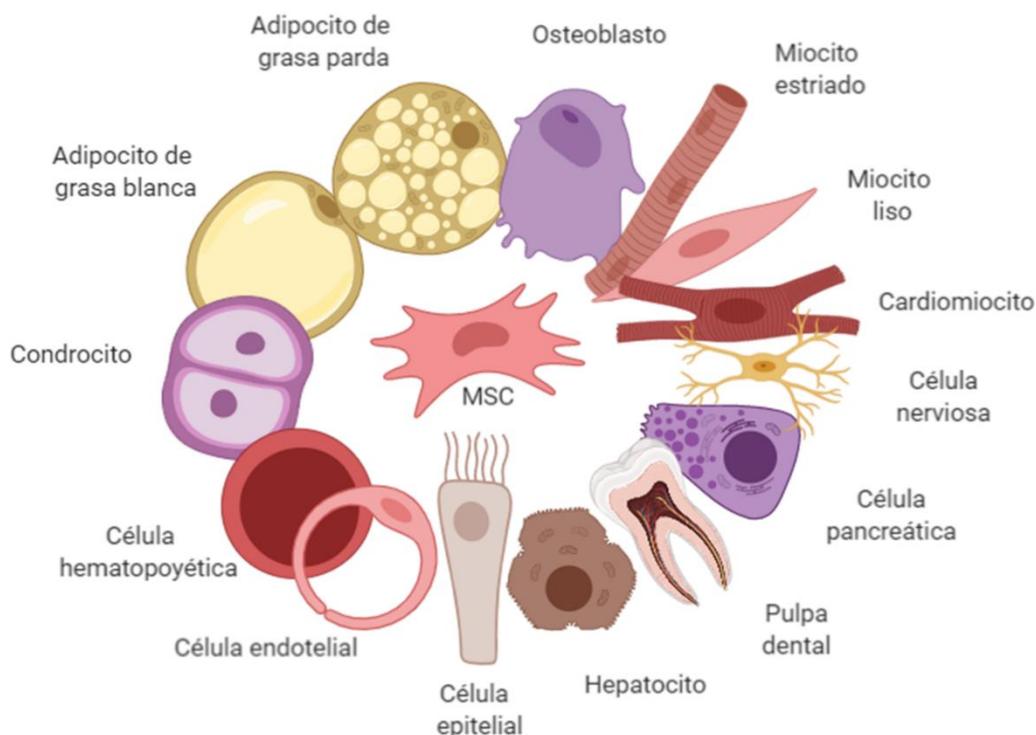


Figura 4. Tipos celulares en los que pueden diferenciarse las hASCs.  
Figura diseñada empleando el programa BioRender.

Su participación en la formación de vasos sanguíneos es clara, adoptando una estructura vascular con función endotelial cuando se las cultiva en matrigel (Hutchings, Janowicz et al. 2020) y en modelos *in vivo* en ensayos de infarto de miocardio, regeneración de epitelio o tejido nervioso (Baptista, Silva et al. 2015). Otros estudios hablan de la posible diferenciación a células B productoras de insulina, glucagón y somatostatina (Colazzo, Chester et al. 2010) o a hepatocitos secretores de albúmina y  $\alpha$ -fetoproteína (Lindroos, Suuronen et al. 2011).

También se tiene constancia de su capacidad para diferenciarse *in vitro* en células de linaje neuronal, tales como neuronas maduras u oligodendrocitos, tanto morfológica como funcionalmente (Seo, Suh et al. 2005, Wrage, Tran et al. 2008), lo que las convierte en una prometedora herramienta para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso (SN) o enfermedades neurodegenerativas (Sumarwoto, Suroto et al. 2021). Sin embargo, existe una gran necesidad de investigar su estabilidad cromosómica en condiciones no fisiológicas. Las hASCs parecen tener mayor estabilidad genética que las células madre derivadas de otros tejidos (Neri, Bourin et al. 2013) pero se han documentado transformaciones neoplásicas en cultivos de larga duración (Kozłowska, Krawczenko et al. 2019). La tendencia hacia una mayor aneuploidía en cultivos *in vitro* aún se está debatiendo (Sensebe, Tarte et al. 2012, Debnath and Chelluri 2019, Kozłowska, Krawczenko et al. 2019), así como la frecuencia de las irregularidades cariotípicas.

## **I.2. MEDICINA REGENERATIVA EN EL TRATAMIENTO DEL SISTEMA NERVIOSO**

### **I.2.1. ASPECTOS GENERALES DE LAS PATOLOGÍAS DEL SISTEMA NERVIOSO**

Las lesiones en el SNC y los trastornos neurodegenerativos agudos constituyen la segunda causa de muerte más frecuente en el mundo. Según el Instituto Nacional de Estadística español, el pasado año 2020 el 5,4% de las muertes en nuestro país fueron causadas por una enfermedad del SN y de los órganos de los sentidos, siendo esta cifra más elevada en mujeres que en varones, estando esta información disponible en la web del INE (<https://www.ine.es>).

A pesar de que los desórdenes neurológicos aparecen globalmente, su incidencia no es la misma en todo el mundo. La región en la que se dan mas casos es Europa con un 11,2% de la población afectada, seguida de la región del Pacífico oriental con un 10%, siendo estos porcentajes mucho más altos que en la región africana, donde solo el 2,9% de la población las padece. Además, aunque se calcula que los desórdenes neurológicos causan actualmente alrededor del 11,8% de las defunciones mundiales, este porcentaje tiende a aumentar y se calcula que en 2030 será del 12,22% (WHO 2006). Estas patologías pueden afectar a las capacidades cognitivas de la persona, incluyendo la capacidad de aprendizaje y pensamiento. Además, los enfermos que las padecen a menudo sufren síntomas a largo plazo que incluyen daños físicos y cognitivos, lo que acaba por afectar a su calidad de vida y productividad.

Las patologías más frecuentes del SN son los traumatismos y las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la epilepsia, el Parkinson, la esclerosis múltiple o la migraña, entre otras (*Tabla 1*). Las principales causas de traumatismo cerebral y de la médula en la población son los accidentes de automóvil, las heridas relacionadas con el deporte, las caídas, y el trauma profesional (Santiago, Oh et al. 2012).

*Tabla 1. Incidencia de los desórdenes neurológicos más habituales.  
Datos recogidos a nivel mundial por la OMS (WHO 2006, Silberberg, Anand et al. 2015).*

		% DEL TOTAL DE DESÓRDENES NEUROLÓGICOS	% MUERTES DEL TOTAL DE DESÓRDENES NEUROLÓGICOS	% DE MUERTES MUNDIALES ATRIBUIDAS
DESÓRDENES NEUROPSIQUIÁTRICOS	Epilepsia	7,9	1,86	0,22
	Alzheimer y otras demencias	12	6,28	0,73
	Parkinson	1,8	1,55	0,18
	Esclerosis múltiple	1,6	0,24	0,03
	Migraña	8,3	0	0
DESÓRDENES O LESIONES CON CONSECUENCIAS NEUROLÓGICAS	Enfermedad cerebrovascular	55	83,5	9,9
	Tétanos	7	2,83	0,33
	Meningitis	5,8	2,24	0,26
	Lesión medular	2,8	1,5	1,8

## I.2.2. NEUROGÉNESIS

La neurogénesis se define como el proceso que conduce a la generación de neuronas funcionales a partir de células madre. Hasta mediados del siglo XX, la comunidad científica internacional creía que el proceso de neurogénesis en mamíferos se limitaba a las células fetales en desarrollo, siendo inexistente en el tejido adulto. En 1965 Altman (Altman and Das 1965) fue el primero en demostrar neurogénesis postnatal en el cerebro de ratas, contradiciendo las ideas de Cajal, siendo corroborado este fenómeno en humanos por muchos estudios posteriores (Yoo and Blackshaw 2018, Augusto-Oliveira, Arrifano et al. 2019). Con este descubrimiento se llegaba a la conclusión de que todos los tejidos del cuerpo humano tienen la capacidad de regenerarse.

Pruebas convincentes han demostrado repetidamente que en el cerebro de los mamíferos se producen nuevas neuronas hasta la edad adulta. La neurogénesis adulta se ha descrito mejor en el hipocampo y la zona subventricular (SVZ), en los que se ha caracterizado bien una serie de etapas distintas de desarrollo neuronal. Sin embargo, más recientemente, también se han encontrado nuevas neuronas en otras regiones del cerebro de los mamíferos adultos, como el hipotálamo, el cuerpo estriado, la sustancia negra, el córtex y la amígdala. El proceso de neurogénesis incluye cuatro etapas (Ming and Song 2011): (i) proliferación celular por división asimétrica, (ii) especificación del destino celular, (iii) migración celular y (iv) diferenciación celular, maduración sináptica e integración en los circuitos neuronales. La neurogénesis cerebral expande la cantidad de células neuronales durante la vida embrionaria y se mantiene activa después del nacimiento solo en áreas discretas del SN, aunque cada vez son más las zonas que parecen regenerarse durante la etapa adulta (Jurkowski, Bettio et al. 2020).

Mientras que algunos estudios han sugerido que estas nuevas neuronas se originan a partir de reservas de células madre endógenas situadas en estas regiones cerebrales, otros han demostrado la migración de neuronas desde la zona subventricular a estas regiones. En particular, se ha demostrado que la generación de nuevas neuronas en estas regiones cerebrales se ve afectada por procesos neurológicos como el ictus, la isquemia y los trastornos neurodegenerativos. Además, numerosos factores como el apoyo neurotrófico, las intervenciones farmacológicas, las exposiciones ambientales y la terapia con células madre pueden modular este proceso endógeno. Aunque la presencia y la importancia de la neurogénesis adulta en el cerebro humano (y en particular fuera de las regiones neurogénicas clásicas) sigue siendo un área de debate, los avances recientes han permitido

investigar si los hallazgos de los estudios en animales se correlacionan con lo que ocurre en el cerebro humano adulto (Boldrini, Fulmore et al. 2018, Sorrells, Paredes et al. 2018) Este potencial neurogénico intrínseco y su posible regulación a través de medidas terapéuticas presentan una alternativa apasionante para el tratamiento de varias afecciones neurológicas (Jurkowski, Bettio et al. 2020).

La primera prueba de neurogénesis en el cerebro humano adulto se comunicó en 1998, cuando se detectaron células marcadas con BrdU en el hipocampo de pacientes con cáncer (Eriksson, Perfilieva et al. 1998). Las consideraciones éticas impiden la replicación de dicho estudio, pero los recientes avances en la metodología han proporcionado alternativas. Empleando carbono 14 en el tejido cerebral, se ha estimado que en la zona subgranular humana aparecen 700 nuevas neuronas cada día, lo que corresponde a una regeneración anual del 1,75%, con un declive modesto durante el envejecimiento (Spalding, Bergmann et al. 2013, Nguemeni, McDonald et al. 2018). Además, análisis de muestras fetales y adultas de hasta 100 años de edad, muestran la presencia de células positivas para doblecortina y otros marcadores neuronales como Sox2, Nestina o calretinina (Knoth, Singec et al. 2010). En el hipotálamo adulto hay evidencias de un nicho de NSCs que recubre el tercer ventrículo en diferentes especies (Migaud, Batailler et al. 2010) y las células basales del epitelio olfativo son una fuente de células neuronales, manteniendo progenitores de larga vida que permanecen inactivos durante la mayor parte del tiempo (Leung, Coulombe et al. 2007, Ponti, Obernier et al. 2013). Otros estudios también demuestran que las células basales globosas son capaces de restaurar el epitelio olfativo después de la ablación química (Newman, Feron et al. 2000).

Aunque se creía que en la corteza cerebral no se generaban nuevas neuronas, hay evidencias que indican que el tejido cortical tiene propiedades neurogénicas durante el periodo postnatal en roedores y primates (Gould 2007), y humanos (Tamaki, Orié et al. 2017). Los progenitores neuronales residen en la capa granular externa del cerebelo, donde producen neuronas granulares, mientras que progenitores gliales permanecen en la sustancia blanca del cerebelo, generando células de linaje interneuronal como astroglia y oligodendroglía (Leto and Rossi 2012).

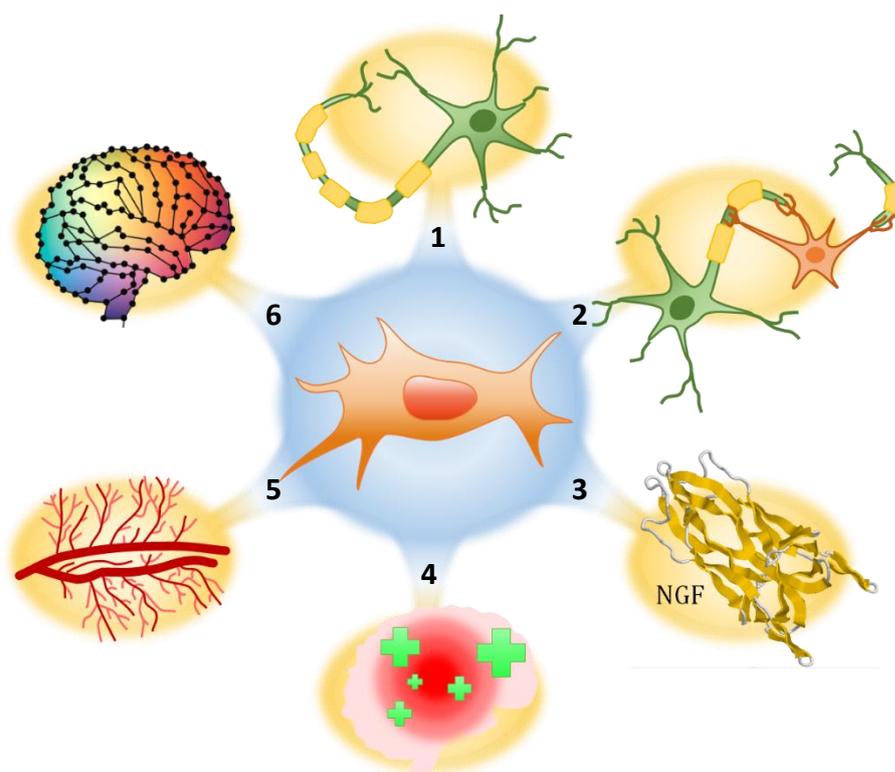
En la médula espinal también existen evidencias de reemplazo neuronal, residiendo las células madre, de lenta capacidad proliferativa, en la capa ependimal del canal (Beech, Cleary et al. 2004). Así pues, la perspectiva de la generación de nuevas neuronas en el cerebro humano presenta un área de investigación apasionante y relevante para los

trastornos neurodegenerativos crónicos, las afecciones neurológicas agudas y las enfermedades metabólicas, así como para el tratamiento de estas patologías.

### I.2.3. APLICACIONES DE LAS CÉLULAS MADRE EN PATOLOGÍAS DEL SN

La primera aplicación de las células madre en neurología fue el trasplante de tejido de mesencéfalo fetal para reemplazar el mesencéfalo dañado de un paciente (Peschanski, Defer et al. 1994), y desde entonces, son muchos los enfoques que la medicina regenerativa ha barajado. El efecto terapéutico que las células madre provocan en el sistema nervioso dañado puede explicarse por los siguientes mecanismos de acción (*Figura 5*):

1. **Diferenciación** de células madre y **reemplazo celular**.
2. **Estabilización de células dañadas** mediante la transferencia de genes y proteínas.
3. **Aumento de la supervivencia y la proliferación** de las células a través de la secreción de quimiocinas y factores de crecimiento.
4. **Reducción del edema y la inflamación** causada, promoviendo tanto en el SN como en la circulación sistémica, la secreción de citoquinas antiinflamatorias y la reducción de la secreción de citoquinas proinflamatorias.
5. **Aumento de la angiogénesis y la vasculogénesis**.
6. **Desarrollo de vías de comunicación** entre las zonas neurogénicas y la lesión.



*Figura 5. Mecanismos terapéuticos de las SC en el tejido nervioso dañado. (1) Diferenciación de células madre y reemplazo celular , (2) estabilización de células dañadas, (3) aumento de la supervivencia y la proliferación de las células regionales, (4) reducción del edema y la inflamación, (5) aumento de la angiogénesis y vasculogénesis y (6) desarrollo de vías de comunicación. Figura diseñada usando Microsoft PowerPoint.*

En particular, las MSCs son capaces de los siguientes mecanismos terapéuticos en el SN:

#### **Secreción de factores neurotróficos:**

Las MSCs trasplantadas son capaces de secretar gran cantidad de citoquinas y factores de crecimiento que promueven el crecimiento neuronal endógeno, la neurogénesis y la angiogénesis, favorecen la formación de conexiones sinápticas, la remielinización de axones dañados, disminuyen la apoptosis y tienen función neuroprotectora (Fan, Zhang et al. 2020, Mishra, Shih et al. 2020) . Algunos de estos factores neurotróficos son el BDNF (Ahn, Chang et al. 2017) o el factor neurotrófico ciliar, el GDNF (Chen, Wang et al. 2020).

#### **Inducción de la neurogénesis y activación astrogial:**

Las MSCs inducen la proliferación de células progenitoras neuronales en la zona subventricular y son críticas en la supervivencia de las células neuronales que acaban de formarse (Sykova, Cizkova et al. 2021) . Ante una lesión en el SN, son capaces de inducir una mayor plasticidad en neuronas dañadas y activar las células astrogiales para que produzcan neurotrofinas.

**Crecimiento axonal y mejora de las conexiones sinápticas:**

Algunos estudios sugieren que los componentes de la matriz extracelular derivados de las MSCs, como la fibronectina, pueden ayudar en la reparación del SN dañado, promoviendo el crecimiento axonal, disminuyendo la apoptosis y el daño neuronal (Kwon, Yoo et al. 2019). Algunas moléculas de adhesión como las integrinas o las cadherinas también promueven la regeneración axonal (Giger, Hollis et al. 2010).

**Efecto anti-apoptótico:**

Este efecto unido a la liberación de factores neurotróficos puede explicar la mejora funcional que produce la administración de MSCs en modelos de traumatismo cerebral y medula espinal lesionada (Han, Li et al. 2019, Fan, Zhang et al. 2020).

**Efecto inmunomodulador:**

En la última década se habla de las propiedades inmunomoduladoras que presentan las MSCs (Bulati, Miceli et al. 2020). Las MSCs han demostrado tener efectos inmunosupresores en linfocitos B, disminuyendo su proliferación y diferenciación al mismo tiempo que inhiben la proliferación de las células T citotóxicas y las *natural killer* (Kaundal, Bagai et al. 2018).

**Efecto antiinflamatorio:**

También actúan como neuroprotectores actuando en la respuesta antiinflamatoria para regular la actividad de la microglía y proteger a las neuronas dopaminérgicas. Las MSCs no solo disminuyen los niveles de citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  proinflamatorias y TGF- $\beta$ 1, también aumentan los niveles de citoquina IL-10 antiinflamatoria, lo que demuestra que un rápido tratamiento con MSCs tras la lesión proporcionaría una respuesta inmunomoduladora rápida y una mayor y más rápida recuperación funcional.

La capacidad de las MSCs para migrar hasta el lugar de la lesión también depende del estado de inflamación del tejido y éste a su vez depende de un gran número de receptores, factores de crecimiento y quimiocinas (Caretta, Peli et al. 2019, Salari, Mengoni et al. 2020).

**Reducción del estrés oxidativo:**

Numerosos estudios han demostrado la capacidad de las MSCs para reducir el estrés oxidativo e incluso secretar la proteína superóxido dismutasa (Angeloni, Gatti et al. 2020, Fan, Zhang et al. 2020).

**Secreción de exosomas:**

Las MSCs son capaces de formar microvesículas que contienen gran variedad de moléculas biológicamente activas, como lípidos, proteínas, receptores de factores de crecimiento, miARN, etc, y vertirlas al espacio extracelular (Mansoor, Ong et al. 2019, Ma, Yang et al. 2020). Se ha demostrado que en un derrame cerebral, la liberación de miARN contenido en exosomas al espacio extracelular por parte de las MSCs, provoca la recuperación funcional de las células adyacentes (Xin, Li et al. 2013).

**Inducción de la angiogénesis:**

Las MSCs secretan citoquinas y factores de crecimiento que favorecen la proliferación de células madre y progenitores hematopoyéticos (Caplan and Dennis 2006, Fan, Zhang et al. 2020, Kangari, Talaei-Khozani et al. 2020), además de estimular la diferenciación de células endoteliales (Miranville, Heeschen et al. 2004).

**Expresión génica:**

Las MSCs expresan un gran número de genes relacionados con procesos neuronales como NCAM, NG2, S100 o p75, así como factores de transcripción (Arboleda, Forostyak et al. 2011).

#### I.2.4. DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE LAS hASCs

La reprogramación celular se puede definir como la transformación de una célula madre o especializada en otro tipo celular diferente. Las hASCs pueden diferenciarse hacia linaje neuronal habiendo sido reprogramadas *in vitro* anteriormente o no. La diferenciación neuronal de hASCs que no han sido previamente inducidas también ha sido probada *in vivo* tras el trasplante en distintos tejidos dañados. Las hASCs reprogramadas *in vitro* son capaces de mejorar su supervivencia y acelerar su diferenciación (Lu, Li et al. 2001, Mahmood, Lu et al. 2002, Ho, Woo et al. 2020). Esta reprogramación hacia linaje neuronal puede ser llevada a cabo *in vitro* de cuatro formas diferentes (*Figura 6*) mediante: (i) fármacos psicotrópicos, (ii) moléculas pequeñas, (iii) medios enriquecidos y (iv) modificaciones epigenéticas.

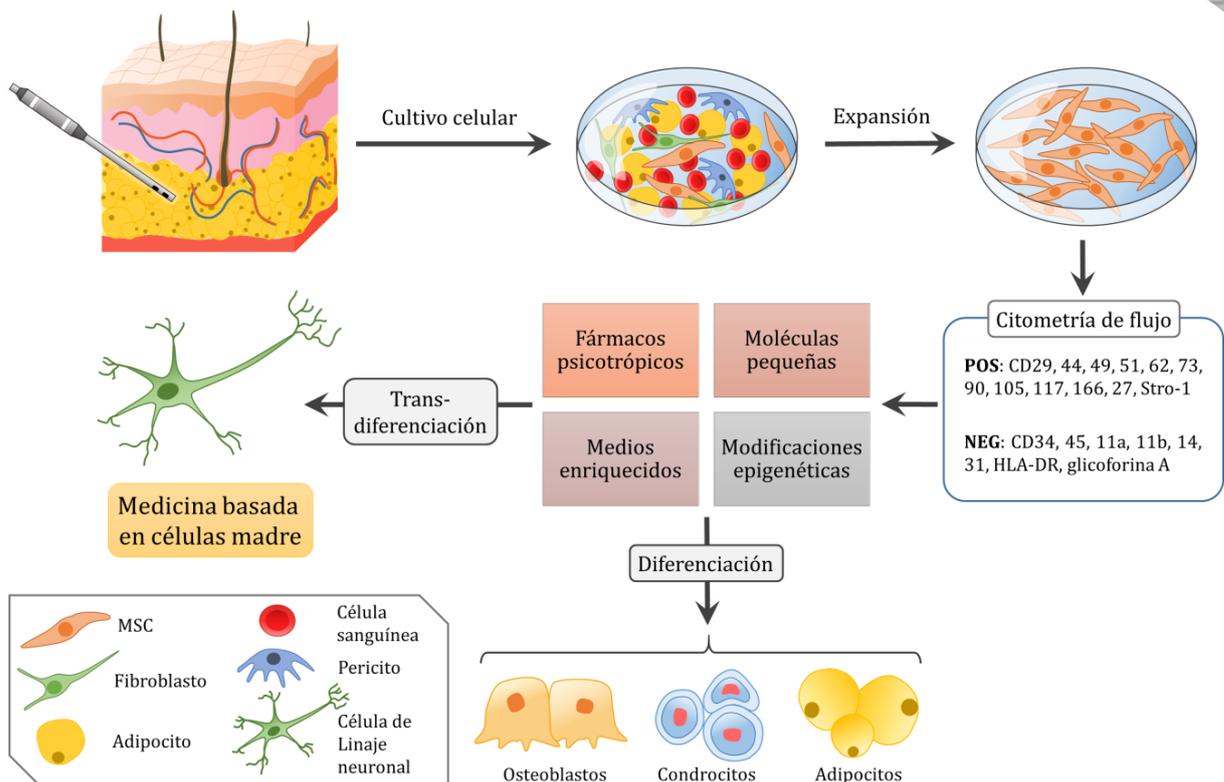


Figura 6. Mecanismos para reprogramar las hASCs hacia distintos linajes celulares.  
Figura diseñada usando Microsoft PowerPoint.

#### I.2.4.1. Fármacos psicotrópicos

Algunas sustancias conocidas como antipsicóticos y antidepresivos pueden incrementar la tasa de proliferación y diferenciación de las MSCs hacia linaje neuronal (Nakagawa 2010). Estos fármacos han probado revertir la pérdida de materia gris y ralentizar la reducción del volumen cerebral en pacientes con trastornos neurodegenerativos como la esquizofrenia o la depresión. Sin embargo, el mecanismo de acción de estas sustancias no se conoce completamente (Nasrallah, Hopkins et al. 2010). Fármacos antipsicóticos como la Risperidona, la Olanzapina y el Aripiprazol, y antidepresivos como la Desvenlafaxina (Asokan, Ball et al. 2014) han demostrado en modelos de rata aumentar la neurogénesis *in vitro* y la maduración neuronal, respectivamente. Además, los antidepresivos Imipramina, Desipramina, Fluoxetina y Tianeptina han demostrado mejorar la eficacia de la diferenciación neuronal de MSCs de ratas (Borkowska, Kowalska et al. 2015).

#### I.2.4.2. Moléculas pequeñas

Las moléculas pequeñas también están emergiendo como una herramienta de vanguardia en la farmacoterapia de las lesiones cerebrales. Pueden imitar la actividad de proteínas endógenas como citoquinas, factores de crecimiento, integrinas o morfogenes, y modular ciertas vías de señalización. Entre estas moléculas pequeñas encontramos una gran cantidad de inhibidores de GSK-3 $\beta$ , proteína quinasa que media la adición de moléculas de fosfato en los residuos de aminoácidos de serina y treonina, entre los que destacan el litio, que aumenta la neurogénesis del hipocampo adulto (Boku, Nakagawa et al. 2010, Zanni, Michno et al. 2017).

Las moléculas derivadas de vitaminas también juegan un papel en la diferenciación de los progenitores neuronales, como por ejemplo el ácido retinoico, que induce la diferenciación de las MSCs (Gao, Bai et al. 2014, Halder, Kim et al. 2015). Los derivados de la vitamina K2 pueden promover la diferenciación neuronal selectiva *in vitro* de las células progenitoras neuronales (Suhara, Hirota et al. 2015), aunque el mecanismo aún se desconoce. Finalmente, Alexanian y cols. (Alexanian, Liu et al. 2013) probaron una combinación de inhibidores de señalización SMAD con agentes modificadores de la cromatina, como tricostatina A y RG108, y moduladores de los niveles de AMPc, lo que mostró una alta tasa de diferenciación de BM-MSCs hacia células similares a neuronas y una mejor formación de estructuras sinápticas.

#### I.2.4.3. Medios enriquecidos

Los medios de cultivo enriquecidos con factores de crecimiento y otras sustancias inductoras, permiten la diferenciación *in vitro* de las hASCs hacia diversos tipos de células tanto morfológica como funcionalmente (Zhu, Liu et al. 2009, Kajiyama, Hamazaki et al. 2010, Ferro, Spelat et al. 2011). Desde la publicación del primer medio de diferenciación neuronal para MSCs en el año 2000 (Woodbury, Schwarz et al. 2000), son muchos los empleados para este fin, sin que exista un consenso sobre cuál es el más eficiente. Fueron Safford y cols. en 2002 (Safford, Hicok et al. 2002), los primeros en inducir hASCs en fase 4-5 *in vitro* a fenotipo neuronal, empleando un medio enriquecido con ácido valproico, insulina e hidrocortisona y sembrando las células en monocapa. Se observó un

gran cambio morfológico a los tres días, pero nunca se probó la funcionalidad de las células inducidas y éstas comenzaron a desprenderse y morir poco tiempo después.

En 2003, Ashjian y cols. (Ashjian, Elbarbary et al. 2003) promovieron la diferenciación de hASCs en fase 2 a progenitores neuronales tempranos, empleando un medio enriquecido con insulina, indometacina e isobutilmetilxantina (IBMX) durante 2 semanas. La máxima diferenciación que se obtuvo fue del 25% y se comprobó que las células eran incapaces de despolarizarse y repolarizarse usando la técnica del *patch clamp*. Más recientemente los protocolos de diferenciación han variado y las células diferenciadas, tanto *in vivo* como *in vitro* (Franco Lambert, Fraga Zandonai et al. 2009, Erba, Terenghi et al. 2010, Zavan, Vindigni et al. 2010), son capaces de transmitir los impulsos nerviosos, convirtiéndose en potenciales células nerviosas funcionales (Jang, Cho et al. 2010).

También se han probado protocolos de diferenciación *in vitro* cultivando las células en neuroesferas no adherentes. Anghileri y cols. probaron el potencial de diferenciación de hASCs en fase 7-16 crecidas en neuroesferas, con un medio enriquecido en FGF y EGF durante 6 días (Anghileri, Marconi et al. 2008). Pasado este tiempo se disociaron las esferas para sembrarlas en monocapa y suplementarlas con BDNF y ácido retinoico durante 30 días. Se comprobó que las células diferenciadas mostraban más expresión de marcadores neuronales y un potencial de membrana negativo de -60 mV, siendo estos cambios estables durante siete días tras la eliminación del medio de inducción. Ahmadi y cols. demostraron que si las neuroesferas permanecían en suspensión durante todo el tiempo de estudio, la diferenciación duraba estable por más tiempo (Ahmadi, Razavi et al. 2012). De acuerdo con estos resultados y los de otros estudios, la diferenciación *in vitro* parece más exitosa cuando las células crecen en esferas en suspensión que cuando lo hacen en monocapa. Sin embargo, el trasplante de hASCs cultivadas en monocapa indujo mayor neuroprotección y mejores efectos funcionales que los trasplantes de hASCs crecidas en neuroesferas en el estudio de Berg y cols. (Berg, Roch et al. 2015). Tomando en conjunto estos datos, parece claro que el tratamiento con factores neurotróficos favorece la diferenciación neuronal y prolonga el tiempo que permanecen inducidas las hASCs. Los ingredientes más empleados en los medios de diferenciación neuronal, así como los marcadores neuronales más estudiados para comprobar la efectividad de la diferenciación, se recogen en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Sustancias y marcadores neuronales más estudiados en diferenciación neuronal

<b>Compuesto</b>	<b>Marcador neuronal</b>	<b>Tipos de MSC</b>	<b>Referencia</b>
EGF	CHAT, TH, TUB-III, MAP2	hASC	(Marei, El-Gamal et al. 2018)
bFGF	GFAP, MAP2, MBP, Nestina	UCSC	(Rafieemehr, Kheyrandish et al. 2015)
BDNF	Nestina, NSE, GFAP	BD-MSC	(Liu, Cheng et al. 2015)
DMSO	NSE, GFAP	BD-MSC	(Xu, Lu et al. 2016)
LIF	GFAP, MBP, TH	hDPSC	(Chun, Soker et al. 2016)
NGF	TUB-III, NF-M, PSD-95	UCSC	(Jahan, Kumar et al. 2017)
Insulina	GFAP, TUB-III	hASC	(Ying, Hu et al. 2012)
IBMX	TUB-III, GFAP, NF, NeuN	BD-MSC/eMSC	(Zemel'ko, Kozhukharova et al. 2014)
Ácido ascórbico	GFAP, MAP2, MBP, Nestina	UCSC	(Rafieemehr, Kheyrandish et al. 2015)
BHA	MAP2, NSE, GFAP	BD-MSC	(Mu, Zhao et al. 2015)
5-Azacidina	MAP2	hASC	(Zemel'ko, Kozhukharova et al. 2013)
SHH	Hb-9, Pax-6, NF, CHAT	UCSC	(Yousefi, Sanooghi et al. 2017)
Ácido retinoico	NF	BD-MSC	(Wang, Xu et al. 2013)
BHE	Nestina, NSE	BD-MSC	(Shi, Hu et al. 2016)
AMPc	TUB-III, NSE, MAP2, GFAP	UCSC	(Shahbazi, Safa et al. 2016)

**EGF:** factor de crecimiento epidérmico; **bFGF:** factor básico de crecimiento de fibroblastos; **BDNF:** factor neurotrófico derivado de cerebro; **DMSO:** dimetil sulfóxido; **LIF:** factor inhibidor de leucemia; **NGF:** factor de crecimiento nervioso; **IBMX:** 3-isobutil-1-metilxantina; **BHA:** hidroxianisol butilado; **SHH:** sonic hedgehog; **BHE:** 2-mercaptoetanol; **CHAT:** colina O-acetiltransferasa; **GFAP:** proteína glial fibrilar ácida; **MAP2:** proteína 2 asociada a los microtúbulos; **TH:** tiroxina hidroxilasa; **TUB-III:**  $\beta$ -Tubulina III; **MBP:** proteína de mielina básica; **NSE:** enolasa; **NF:** neurofilamentos; **PSD-95:** proteína 95 postsináptica densa; **Hb-9:** gen 9 homeobox; **Pax-6:** proteína 6 del paired box; **hDPSC:** célula madre de pulpa dental humana; **BM-MS:** células madre mesenquimales derivadas de médula ósea; **hASC:** células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo; **UCSC:** células madre derivadas de sangre de cordón umbilical; **eMSC:** células madre derivadas de sangre menstrual; **NCC:** células de la cresta neuronal.

La expresión de marcadores neuronales en células diferenciadas se produce de forma cronológica, apareciendo unos al comienzo de la inducción neuronal y otros transcurrido un tiempo. La *Tabla 3* recoge el tiempo de aparición de los marcadores más estudiados en diferenciación neuronal *in vitro*:

*Tabla 3. Expresión de marcadores neuronales estudiados en hASCs. Modificada de (Salehi, Amirpour et al. 2016).*

Tipo de marcaje	Marcador	Control	hASCs inducidas								Referencia	
			HORAS				DÍAS					
			1	3	8	16	3	7	12	14		
NEURONALES Y DE LA GLÍA	Nestina											(Ayala-Grosso, Pieruzzini et al. 2020, Menezes, Rosa et al. 2020)
NEURONAS EN DESARROLLO	PSA-NCAM											(Herdy, Schafer et al. 2019)
	B-Tubulina											(Karakas, Bay et al. 2020)
NEURONAS MADURAS	NeuN											(Cortes-Medina, Pasantes-Morales et al. 2019)
	NSE											(Lee, George et al. 2019)
	Trk-A											(Ciervo, Ning et al. 2017)
	MAP2											(Sultan, Amin et al. 2020)
	NFH											(Zhang, Zhang et al. 2021)
	PMP-22											(Hopf, Schaefer et al. 2020)
	Neuro-filamentos											(Laudani, La Cognata et al. 2020)
	Tau											(Cortes-Medina, Pasantes-Morales et al. 2019)
	NF200											(Yu, Zhao et al. 2019)
	Sinapto-Fisina											(Park, Wu et al. 2021)
	SNAP25										(Singh, Vaishnav et al. 2020)	
	SYN1										(Lee, George et al. 2019)	
CÉLULAS DE SCHWANN	GAP43										(Martellucci, Santacroce et al. 2019)	
OLIGO-DENDROCITOS	Gal-C										(Carelli, Giallongo et al. 2019)	
	CNPasa										(Zhang, Wang et al. 2021)	
ASTROCITOS	GFAP										(Yu, Zhao et al. 2019, Ayala-Grosso, Pieruzzini et al. 2020)	
	S-100										(Strebel, Haller et al. 2020)	

Otros compuestos, como el  $\beta$ -mercaptoetanol, el hidroxianisol butilado o el dimetilsulfósido han demostrado no inducir diferenciación neuronal *in vitro*, pese a los cambios morfológicos que provocan y que se deben a un reordenamiento del citoesqueleto transitorio y reversible (Tao, Rao et al. 2005, Krampera, Marconi et al. 2007).

### *Rutas de señalización activadas con los medios enriquecidos*

---

Los medios enriquecidos pueden diferenciar las hASCs gracias a la activación y/o desactivación de varias vías de señalización intracelulares. Algunas de las más importantes implicadas en la diferenciación neuronal de las MSCs son:

#### **1. Ruta de las neurotrofinas**

Las neurotrofinas son una familia de factores de crecimiento que juegan un importante papel en la regulación del crecimiento, la supervivencia y la diferenciación de las neuronas del sistema nervioso central y periférico (Kashyap, Roberts et al. 2018). Algunas de estas proteínas son el NGF, el BDNF, el GDNF y las neurotrofinas 3, 4, 5 y 6 (NT-3, 4, 5 y 6) que se unen a receptores tirosina-quinasa de alta fidelidad (TrkA, TrkB y TrkC) (Bucci, Alifano et al. 2014). De los miembros de la familia de las neurotrofinas, el NGF tiene la especificidad más restringida en el sistema nervioso central y se dirige específicamente a las neuronas colinérgicas de la región cerebral. Sin embargo, en la periferia y otras regiones del sistema nervioso, actúa sobre los nervios simpáticos y sensoriales. Tanto el BDNF como la NT-3 se expresan en estructuras corticales y neocorticales, mientras que la NT-4 se expresa ampliamente en mamíferos adultos en comparación con otras neurotrofinas (Li, Xia et al. 2017).

Los estudios han demostrado claramente que, después del desarrollo, estos factores están involucrados en la remodelación continua de la funcionalidad neuronal que subyace a la plasticidad de las neuronas (Fang, Liu et al. 2017). Por lo tanto, es probable que los métodos que estimulan el potencial de regeneración del cerebro, como ocurre durante el desarrollo empleando neurotrofinas, tengan un gran potencial para revertir las funciones anómalas a funciones normales, los trastornos neurológicos o las enfermedades psiquiátricas.

La unión a receptores muy afines de este tipo de moléculas activa la vía MAPK/ERK que induce la diferenciación neuronal, mientras que la unión a receptores de baja afinidad, como p75<sup>TNR</sup>, media en la formación de neuritas que indirectamente facilitará la unión de más neurotrofinas (Király, Porcsalmy et al. 2009). Las ERKs, también conocidas como proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPKs), son quinasas multifuncionales con diversas actividades dentro de la célula. Se ha demostrado que median en la supervivencia de las neuronas, la elongación de los procesos neuríticos y los niveles de enzimas neuronales y canales iónicos específicos (Kashyap, Roberts et al. 2018). Mientras que algunos efectos de la activación de las ERK son muy rápidos debido a la fosforilación de los receptores de membrana, lo que conduce a un aumento de la actividad, otros son retardados y persistentes debido a los cambios genómicos. Además de activar la ruta de las ERK/MAPK, las neurotrofinas pueden activar otras rutas como la de la fosfolipasa Ca<sub>2</sub> y la de la proteína quinasa-Akt-fosfatidilinositol-3 (PI3K). Se sabe que PI3K contribuye a la activación de ERK tanto por vías dependientes como independientes de Ras. Los receptores activados fosforilan la PI3K, que a su vez fosforila los lípidos de la membrana plasmática para formar el segundo mensajero fosfatidilinositol-trifosfato (PIP<sub>3</sub>). La proteína Akt es reclutada entonces para activar respuestas relacionadas con el crecimiento y la migración celular o la fosforilación de otras proteínas intracelulares (Bernd 2008). Además, existen evidencias de que otros factores de crecimiento como EGF, FGF o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), también pueden activar la ruta de MAPK/ERK (Cargnello and Roux 2011, Park, Jung et al. 2011). Además, muchas de estas proteínas, como PI3K, existen en múltiples isoformas diferentes debido a diferentes genes o al empalme diferencial del mismo gen (Hashmi, Liu et al. 2016). Aunque estas isoformas se expresan de forma diferencial durante el desarrollo y en diferentes regiones del cerebro, sigue habiendo un gran solapamiento. Además, la complejidad de la expresión de las proteínas y la comunicación cruzada en estas vías de señalización y expresión suponen una enorme oportunidad para el descubrimiento de posibles fármacos en el cerebro y la periferia. Actualmente se están probando en clínica fármacos que actúan sobre estos receptores para frenar las enfermedades neurodegenerativas. La sobreexpresión del NGF en los órganos periféricos está siendo atacada por anticuerpos monoclonales para reducir el dolor y la sensibilización aferente (Kashyap, Roberts et al. 2018).

## 2. Ruta del ácido retinoico (AR)

El ácido retinoico (AR), un compuesto metabólico derivado de la vitamina A, es importante en la diferenciación celular y la neurogénesis (Wu, Zhao et al. 2017). El AR puede inducir varios efectos de manera dependiente de la concentración. Por ejemplo, dosis bajas de AR aumentan la generación de células progenitoras hematopoyéticas, mientras que dosis bajas de AR potencian la generación de células sanguíneas *in vitro* (Ronn, Guibentif et al. 2015). Este metabolito de la vitamina A ingresa en el citoplasma para unirse a su proteína de unión celular, CRABP. El complejo que forman entra en el núcleo y se une a receptores específicos que activan la transcripción de genes diana como Oct4 o la familia de genes Hox (Gudas and Wagner 2011, Cai, Radtke et al. 2012). La expresión de receptores para el ácido retinoico (RAR) ha sido probada en MSCs, así como el aumento de su expresión durante la inducción neuronal (Liao and Liu 2005). También se ha demostrado que la preactivación de estos receptores mejora la diferenciación neuronal de MSCs y de que el subtipo RARb inicia la diferenciación de las motoneuronas (Bi, Gong et al. 2010) mientras que RARa lo hace para astrocitos y oligodendrocitos.

Los primeros estudios sugirieron una relación entre la deficiencia de vitamina A y la mielinización *in vivo* (Clausen 1969) y posteriormente se descubrió que la señalización de AR apoya la diferenciación de precursores de oligodendrocitos y la remielinización tras una lesión de la médula espinal (Goncalves, Wu et al. 2019).

## 3. Ruta del adenosín-monofosfato cíclico (AMPC) y la proteína kinasa A (PKA)

El segundo mensajero intracelular AMPC se une a la PKA a través de un complejo catalizador, activándola (Kim, Cheng et al. 2007) para que medie en procesos como la proliferación, diferenciación, apoptosis o migración celular (Dorsa, Santos et al. 2010). Esta vía está involucrada en la diferenciación neuronal, regulando el crecimiento de neuritas, la memoria a largo plazo y la plasticidad neuronal (Sanchez, Jimenez et al. 2004). En los protocolos que inducen la diferenciación neuronal de hASCs, a menudo se usan sustancias que aumentan la cantidad de AMPC intracelular, como IBMX, que actúa como inhibidor de la fosfodiesterasa A, encargada de degradar el AMPC. Otros estudios afirman que la

activación de la vía del AMPc no causa la diferenciación completa, sino sólo el inicio, provocando la aparición de una morfología similar a la neuronal por la reordenación del citoesqueleto (Zhang, Seitz et al. 2011).

#### **4. Ruta de Sonic Hedgehog (Shh)**

Una cantidad sustancial de datos ha puesto de manifiesto la influencia crucial de la señalización Shh en la generación de diversas clases de neuronas y células gliales en todo el sistema nervioso central en desarrollo (Danesin and Soula 2017). Shh actúa como un morfógeno de largo alcance para dirigir el patrón de neurogénesis confiriendo información posicional a las células progenitoras neurales. Durante la transformación de la placa neural en el tubo neural, Shh desencadena la elaboración de cinco dominios discretos de células progenitoras, denominados p3, pMN, p2, p1 y p0, dispuestos a lo largo del eje dorso-ventral. Distintas poblaciones de astrocitos se originan en los dominios p3, p2, p1 y p0, mientras que las células progenitoras del dominio pMN generan oligodendrocitos (Danesin and Soula 2017). Esta ruta implica dos proteínas transmembrana, Ptc y Smo. La activación de este complejo por Shh hace que el factor de transcripción Gli ingrese en el núcleo y comience la transcripción de genes diana relacionados con la proliferación celular y la neurogénesis (ciclina D y E, y gen Myc) (McMahon 2000, Beachy, Hymowitz et al. 2010). Shh está relacionado con la proliferación de células precursoras neuronales en el cerebelo en desarrollo, así como en el tubo neuronal y la retina (Berman, Karhadkar et al. 2002). En la inducción de hASCs, Shh a menudo está acoplado con el AR en el medio de inducción (Liqing, Jia et al. 2011).

#### **5. Ruta de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP)**

Son un grupo de factores de crecimiento que desempeñan un papel importante durante el desarrollo embrionario (Grafe, Alexander et al. 2018). La señalización BMP parece ser necesaria para la renovación de células madre y generalmente bloquea las vías de diferenciación neuronal predeterminadas (Ying, Nichols et al. 2003), por lo que debe ser suprimida en la diferenciación neuronal *in vitro*. Para este fin se han usado antagonistas de BMP como Noggin o Chordin (Cardozo, Ielpi et al. 2010).

## 6. Ruta de las glucoproteínas Wnt

Está implicada en la remodelación de patrones neuronales, el crecimiento axonal y la sinaptogénesis durante el desarrollo embrionario (Ji, Hao et al. 2019). Se sabe que tanto Wnt (Cardozo, Gomez et al. 2011) como la proteína transmembrana Notch están presentes en la proliferación de hASCs y ambas rutas de señalización se regulan negativamente en una diferenciación hacia fenotipo neuronal (Cardozo, Gomez et al. 2011). Además, Wnt interactúa con RAR de distintas formas. El RA puede regular positivamente la proteína Sfrp2, que bloquea el descenso de Wnt y puede también mejorar la destrucción de  $\beta$ -catenina para inhibir los efectos antineuronales de Wnt, si bien la comprensión de estos efectos requiere más estudio (Lu, Tan et al. 2009). Otros trabajos, sin embargo, afirman que la vía Wnt5a participa en la diferenciación neuronal a través del crecimiento axonal inicial (Rosso and Inestrosa 2013). Se sabe también que el envejecimiento, la inflamación y el estrés oxidativo "apagan" la expresión de esta proteína, afectando a la restauración de la neurogénesis y la regeneración (Marchetti, Tirolo et al. 2020).

## I.3. MODIFICACIÓN EPIGENÉTICA DIRIGIDA PARA LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL

---

### I.3.1. EPIGENÉTICA Y DIFERENCIACIÓN CELULAR

---

Dado que la secuencia genética de las hASCs y las células adultas es casi idéntica (Jaenisch and Bird 2003), los factores epigenéticos desempeñan un papel crucial en la determinación del destino celular. Los principales mecanismos epigenéticos son la metilación y la hidroximetilación del ADN, las modificaciones postraduccionales de las proteínas histónicas, la remodelación/reposicionamiento de los nucleosomas y la reorganización de la cromatina de orden superior, la regulación de los ARN no codificantes y la edición del ARN. Estos mecanismos están íntimamente implicados en la ejecución de programas genómicos fundamentales, como la transcripción de genes, el procesamiento y transporte postranscripcional del ARN, la traducción, la inactivación del cromosoma X, la impronta genómica, la regulación de los retrotransposones, la replicación del ADN y la reparación del ADN y el mantenimiento de la estabilidad genómica (Qureshi and Mehler

2018). En el caso del sistema nervioso, la epigenética ofrece un marco novedoso y sólido para explicar cómo se producen el desarrollo y el envejecimiento del cerebro, cómo se genera la diversidad celular neuronal, cómo se median la conectividad y la plasticidad de las redes sinápticas y neuronales, y cómo se heredan transgeneracionalmente fenotipos cognitivos y conductuales complejos (Qureshi and Mehler 2018). Los cambios epigenéticos han demostrado dirigir a las MSCs a un linaje particular, al reprimir los genes relacionados con el estado indiferenciado (Teven, Liu et al. 2011, Herlofsen, Bryne et al. 2013).

### *1.3.1.1. Moléculas involucradas en la regulación epigenética*

Las modificaciones epigenéticas suceden mayoritariamente en las islas CpG del ADN, las moléculas de ARN no codificantes, los complejos de remodelación de la cromatina y las enzimas modificadoras de histonas (Pasque, Jullien et al. 2011). Todas estas moléculas experimentan diversas transformaciones como metilaciones, acetilaciones, ubiquitinaciones o fosforilaciones (Strahl and Allis 2000), resumidas a continuación (Qureshi and Mehler 2018):

- (i) **Metilación:** este proceso implica la adición de un grupo metilo a la citosina en posición 5' por la enzima ADN-metiltransferasa, para dar lugar a una 5'-metilcitosina. En general, la metilación del ADN se asocia con el silenciamiento génico, aunque existen excepciones. Una de ellas es la que ocurre en el gen H3K27me3, que se activa metilando la lisina en posición 4 y se silencia al metilar la lisina en posición 27 (Voigt, Tee et al. 2013).
- (ii) **Acetilación:** la acetilación de histonas implica la unión de un grupo acetilo al residuo de lisina N-terminal de la histona. Esta reacción es regulada por la enzima acetiltransferasa y la desacetilasa de histonas, que tienen acciones opuestas entre sí (Bannister and Kouzarides 2011). La enzima desacetilasa elimina el grupo acetilo del residuo de lisina, manteniendo una carga positiva en el aminoácido, mientras que la acetiltransferasa regula la transferencia del grupo acetilo neutralizando la carga de la lisina, y esta interrupción de la estabilidad electrostática es lo que regula la expresión génica (Delcuve, Khan et al. 2012).

- (iii) **Fosforilación:** la fosforilación de histonas, catalizada por las enzimas quinasa y fosfatasa, implica la adición de grupos fosfato a aminoácidos tales como serina, treonina o tirosina (Hans and Dimitrov 2001). La fosforilación implica la modificación de la carga en el aminoácido y, por tanto, de la estructura de la cromatina.
- (iv) **miARN:** el otro tipo de moléculas involucradas en modificaciones epigenéticas son los miARN. Se trata de pequeñas moléculas de ARN no codificante que participan en el silenciamiento de genes a nivel transcripcional. Desempeñan un papel importante en la expresión génica específica de tejido durante el desarrollo (Saetrom, Snove et al. 2007), y en ocasiones también se relacionan con la progresión tumoral (Song, Li et al. 2014, Garg, Vijayakumar et al. 2015, Xie, Zong et al. 2015).

Otras proteínas de unión al ADN son el grupo de las policomb (PcG), complejos multiproteicos que contribuyen al silenciamiento de genes mediante cambios en la cromatina, asociados a las actividades modificadoras de histonas de algunas de sus subunidades (Shao, Raible et al. 1999). Las modificaciones sobre las islas CpG actúan como reguladoras esenciales del mantenimiento de tejidos cuya renovación depende de células madre, participando en la supresión tumoral.

Otros tipos de proteínas de unión al ADN son las de la heterocromatina (HP1) (Norwood, Grade et al. 2004) y las de dedo de zinc (ZnFn), que son específicas para una secuencia particular de ADN en el genoma y modifican la estructura de la cromatina para regular la expresión génica (Bonifer and Cockerill 2011, Najafabadi, Mnaimneh et al. 2015). Curiosamente, también el ejercicio y la dieta pueden influir en la modificación epigenética y la expresión génica. Durante el ejercicio, el cuerpo libera exosomas que contienen miARN capaz de modificar la expresión génica. Del mismo modo, la ingesta de vitaminas (B6 y B12) tiene un impacto en la homocisteína, que es un subproducto de la metilación del ADN (Abel and Rissman 2013).

Tabla 4. Reguladores epigenéticos de la expresión génica más importantes.

<b>Molécula</b>	<b>Modificación</b>	<b>Método de acción</b>	<b>Referencia</b>
HISTONAS	METILACIÓN	La metilación de histonas comúnmente silencia la expresión de genes reprimiendo su transcripción.	(Ghavifekr Fakhr, Farshdousti Hagh et al. 2013, Voigt, Tee et al. 2013)
	ACETILACIÓN	La acetilación de histonas activa la expresión de genes permitiendo su transcripción.	(Qureshi and Mehler 2018)
	FOSFORILACIÓN	La fosforilación de histonas ayuda en el remodelado de la cromatina y repara daños en el ADN.	(Sawicka and Seiser 2014, Kwon, Park et al. 2015)
miARN	METILACIÓN	Permiten el silenciamiento de genes a nivel transcripcional.	(Song, Li et al. 2014, Xie, Zong et al. 2015)
PROTEÍNAS DE UNIÓN AL ADN	METILACIÓN	CpG: silenciamiento de genes mediante cambios en la cromatina asociados a las actividades modificadoras de histonas de algunas de sus subunidades.	(Qureshi and Mehler 2018)
		HP1 y ZnFn: específicas para una secuencia particular de ADN en el genoma. Modifican la estructura de la cromatina para regular la expresión génica.	(Norwood, Grade et al. 2004); (Najafabadi, Mnaimneh et al. 2015)

### 1.3.1.2. Diferenciación neuronal promovida por modificaciones epigenéticas

El potencial de expresión génica en la diferenciación de las células madre está regulado por procesos epigenéticos que otorgan una conformación específica a la cromatina del genoma, entre los que la metilación de los dinucleótidos CpG es la modificación epigenética mejor caracterizada. Se ha propuesto que la fuerte metilación de los promotores de linaje específicos es la que impone una restricción de la capacidad de diferenciación de las células madre de diferentes orígenes. Esto podría explicar por qué el potencial adipogénico y miogénico se encuentra más restringido en células hematopoyéticas progenitoras o cómo la diferenciación endotelial de células madre derivadas de tejido adiposo es menos efectiva. Existen estudios experimentales *in vitro* que refuerzan este control epigenético de procesos multipotenciales y de diferenciación, como los tratamientos *in vitro* con fármacos que modifican la cromatina y que pueden alterar el

potencial de las células madre pluripotentes y multipotentes para diferenciarse hacia varios linajes (Chambers, Fasano et al. 2009). Como consecuencia, no sólo el genoma debe preservarse, sino que el patrón epigenético debe ser fuertemente considerado para certificar la identidad celular después de su diferenciación, garantizando que el tipo celular con el que se inicia la investigación no se transforme en uno diferente en el momento en el que se trasplante al paciente.

La modificación genética en MSCs puede ser un método eficaz para lograr una diferenciación neuronal más rápida y duradera por sí misma o en combinación con medios de diferenciación, buscando mejorar la supervivencia celular, aumentar la migración, la localización y la adhesión a los lugares de destino (Ocansey, Pei et al. 2020). Las MSCs modificadas genéticamente han demostrado su potencial para secretar factores neurotróficos como BDNF, VEGF, NGF o IGF-1 (Song, Honmou et al. 2009, Gu, Zhang et al. 2010, Wyse, Dunbar et al. 2014), neurotrofinas (Zhang, Zhang et al. 2012), otras proteínas (Blurton-Jones, Spencer et al. 2014, Crane, Rossignol et al. 2014, d'Anglemont de Tassigny, Pascual et al. 2015), o actuar como transportadores de fármacos en terapia génica para tratar trastornos neurodegenerativos (Choi, Lee et al. 2012). Para mejorar la migración de las MSCs se ha empleado la inducción de la sobreexpresión de los receptores de quimioquinas CXCR1, 4 y 7 (De Becker and Riet 2016). Estos estudios informan de que la sobreexpresión de CXCR4/CXCR7 en las MSCs derivadas del tejido adiposo promueve sus capacidades paracrina, proliferativa y migratoria. Existen multitud de estudios de este tipo, como el de Li y cols. que informaron que la sobreexpresión de miR-9-5p por parte de las MSCs no sólo causaba un aumento de la migración, sino también mejoraba la adhesión celular (Li, He et al. 2017).

Un estudio reciente indicó que los cambios en el fenotipo neuronal de las MSCs son el resultado de modificaciones epigenéticas (Alexanian 2015). La exposición de hASCs a modificadores epigenéticos y factores de inducción neuronal puede convertirlas en células similares a las nerviosas, lo que sugiere que la plasticidad celular puede manejarse mediante la combinación de enzimas moduladoras epigenéticas y vías de señalización específicas. A pesar de que los patrones de expresión génica cambian dinámicamente durante la diferenciación neuronal, los mecanismos por los que las MSCs se someten a transdiferenciación todavía no están claros. Con base en un estudio de Chambers (Chambers, Fasano et al. 2009), Alexanian y cols. desarrollaron un protocolo para la diferenciación neuronal probando diferentes moduladores epigenéticos, tales como tricostatina (TSA), ácido valproico (VPA), butirato de sodio, DNZep, RG108, 5-aza-dC,

zebularina o BIX 01294, combinados con sustancias que promueven la diferenciación de iPSCs a linaje neuronal. Los autores demostraron que los compuestos modificadores de la cromatina aumentan la plasticidad de las células ya diferenciadas y las hacen adecuadas para responder a las señales que inducen la diferenciación (Alexanian 2015).

Algunos estudios han demostrado que la exposición de MSCs a VPA, un inhibidor de la histona desacetilasa, sobreexpresa marcadores específicos de progenitores neuronales como GFAP y Nestina (Dong, Pan et al. 2013). Fila-Danilow y cols. (Fila-Danilow, Borkowska et al. 2017) confirmaron que la TSA y el VPA afectaban a la expresión de genes de linaje neuronal e inhibían la proliferación celular y la formación de neuroesferas en un cultivo de MSCs de rata (Fila-Danilow, Borkowska et al. 2017). El mecanismo de acción del VPA fue estudiado por Okubo, quien demostró que esta sustancia era capaz de diferenciar las MSCs derivadas de tejido adiposo de rata, promoviendo la diferenciación neuronal a través de la acetilación de la histona H3 (Okubo, Hayashi et al. 2016). La Rapamicina, un medicamento inmunosupresor usado para evitar el rechazo de órganos trasplantados, funciona junto con el VPA para mediar la regulación de la expresión del gen *Ngn1* en las MSCs inducidas por VPA (Zhang, He et al. 2017). Gurgul (Gurgul, Opiela et al. 2017) utilizó TSA para la transformación epigenética de BD-MSCs derivadas de cerdo. La TSA estimuló las vías de diferenciación neurogénica, posiblemente a través de la interacción con la señalización mediada por el gen *Wnt*.

Revisiones como la de Damasceno del pasado año (Damasceno, de Santana et al. 2020) recogen la enorme cantidad de estudios recientes realizados con MSCs modificadas genéticamente para tratar distintas enfermedades. Tanto la fuente de extracción de las MSCs como los métodos de modificación genética (retrovirus, lentivirus, adenovirus, transfección plasmática, CRISPRa *system*...) son variados y las enfermedades tratadas interminables, lo que nos da una idea del enorme potencial de este método.

### 1.3.1.3. Sistema CRISPR/dCas9

Las siglas CRISPR provienen del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, que en español significa “Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas”. Cas (*CRISPR associated system*) es el nombre de una serie de proteínas, mayoritariamente nucleasas, asociadas a este tipo de secuencias. Las repeticiones CRISPR fueron descubiertas en bacterias a finales de los años

ochenta por Ishino y cols. (Ishino, Shinagawa et al. 1987) y en los noventa en arqueas por Mojica y cols. (Mojica, Juez et al. 1993), si bien adquirieron su actual nombre en 2002 (Jansen, Embden et al. 2002). Comprenden de 21 a 47 pares de bases, separados por secuencias denominadas “espaciadoras”, del mismo tamaño aproximadamente (Mojica, Diez-Villasenor et al. 2000).

El sistema CRISPR/Cas, presente en el 40% de las bacterias estudiadas y en la mayoría de arqueas, puede considerarse un sistema inmune procariota (*Figura 7*). Antes de establecerse su función biológica, se encontró que las secuencias CRISPR presentaban altas similitudes con regiones localizadas en fagos y plásmidos (Mojica, Diez-Villasenor et al. 2005), de lo que se dedujo que este sistema impediría la entrada de ADN foráneo. Barrangou y cols. demostraron este hecho al constatar que, durante la infección de *Streptococcus thermophilus* por un fago, aparecía una inserción de nuevos espaciadores en el CRISPR del hospedador y que este hecho le confería inmunidad frente al invasor (Barrangou, Fremaux et al. 2007).

Las bacterias que presentan CRISPR en su ADN tienen un complejo formado por el ARN producido a partir de las secuencias CRISPR y por una proteína Cas. Este complejo interacciona con el virus, inactivándolo y degradándolo a continuación. Además, parte del ADN viral se modifica e integra dentro de las secuencias CRISPR, permitiendo que, en caso de una segunda infección vírica en esta célula o en su descendencia, la inactivación sea más eficiente (Karginov and Hannon 2010).

Los *loci* CRISPR suelen presentar en uno de sus extremos una región rica en adeninas y timinas denominada *leader* que cumple al menos dos funciones: (i) albergar el promotor del pre-crARN que contiene todas las repeticiones asociadas (Lillestol, Redder et al. 2006) y (ii) constituir una señal de reconocimiento para la incorporación de nuevos espaciadores en su extremo adyacente (Diez-Villasenor, Guzman et al. 2013). Desde 2013, el sistema CRISPR/Cas se ha utilizado para la edición de genes y la regulación génica en varias especies. Además, algunas modificaciones recientes han permitido también actuar sobre la transcripción de los genes, modificando así su nivel de funcionamiento, sin alterar la información genética.

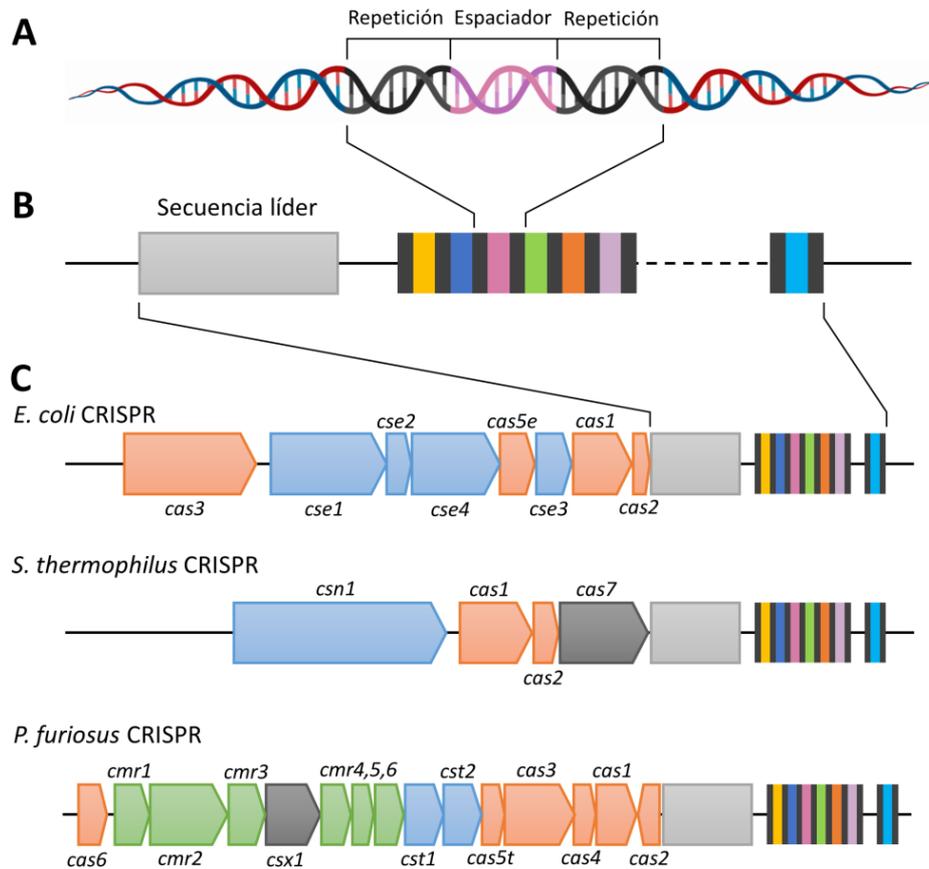


Figura 7. Representación de un sistema CRISPR/Cas.

Hebra de ADN con secuencias palindrómicas repetidas separadas por espaciadores (A), precedidas por una secuencia "líder" (B) y asociadas a agrupaciones de genes que codifican nucleasas de la familia Cas (C) que varían según la bacteria. Imagen modificada de (Karginov and Hannon 2010).

El sistema CRISPR/Cas procarionta actúa en tres fases (Figura 8):

- (i) **Adquisición:** donde el sistema incorpora espaciadores procedentes de organismos invasores. El complejo Cas reconoce en el genoma invasor la secuencia precursora del espaciador llamada PAM (*protospacer adjacent motif*), que tiene de 2 a 5 nucleótidos, y escinde un fragmento adyacente (Mojica, Diez-Villasenor et al. 2009). Este fragmento se integra en el hospedador en el extremo más próximo a la secuencia *leader* de una agrupación CRISPR. Para que Cas se una a la secuencia diana, es imprescindible que reconozca tanto los nucleótidos homólogos a los que se une el crARN como a la secuencia PAM. Cuando esto sucede se forma un lazo que une el ADN y el crARN. Sólo con modificar la secuencia crARN, el sistema CRISPR/Cas podría reconocer otro ADN diana distinto y actuar sobre él (Gasiunas, Barrangou et al. 2012).

- (ii) **Expresión:** el *locus* CRISPR se transcribe formando un pre-crARN que las proteínas Cas procesan para generar los crARN (Haurwitz, Sternberg et al. 2012). Estos ARN integran la secuencia de un espaciador flanqueada por repeticiones CRISPR.
- (iii) **Interferencia:** el crARN se asocia a la nucleasa Cas y el complejo aparece con la secuencia complementaria al espaciador del genoma invasor, permitiendo que las proteínas Cas actúen y lo degraden (Sinkunas, Gasiunas et al. 2013). Tras la acción de la endonucleasa Cas se activa un mecanismo de reparación del ADN llamado “Indel” (inserción-delección). Este mecanismo hace que, tras el corte en la cadena, se produzca una mutación por inserción o delección, lo que conlleva en cualquier caso a la pérdida de función original del segmento de ADN cortado.

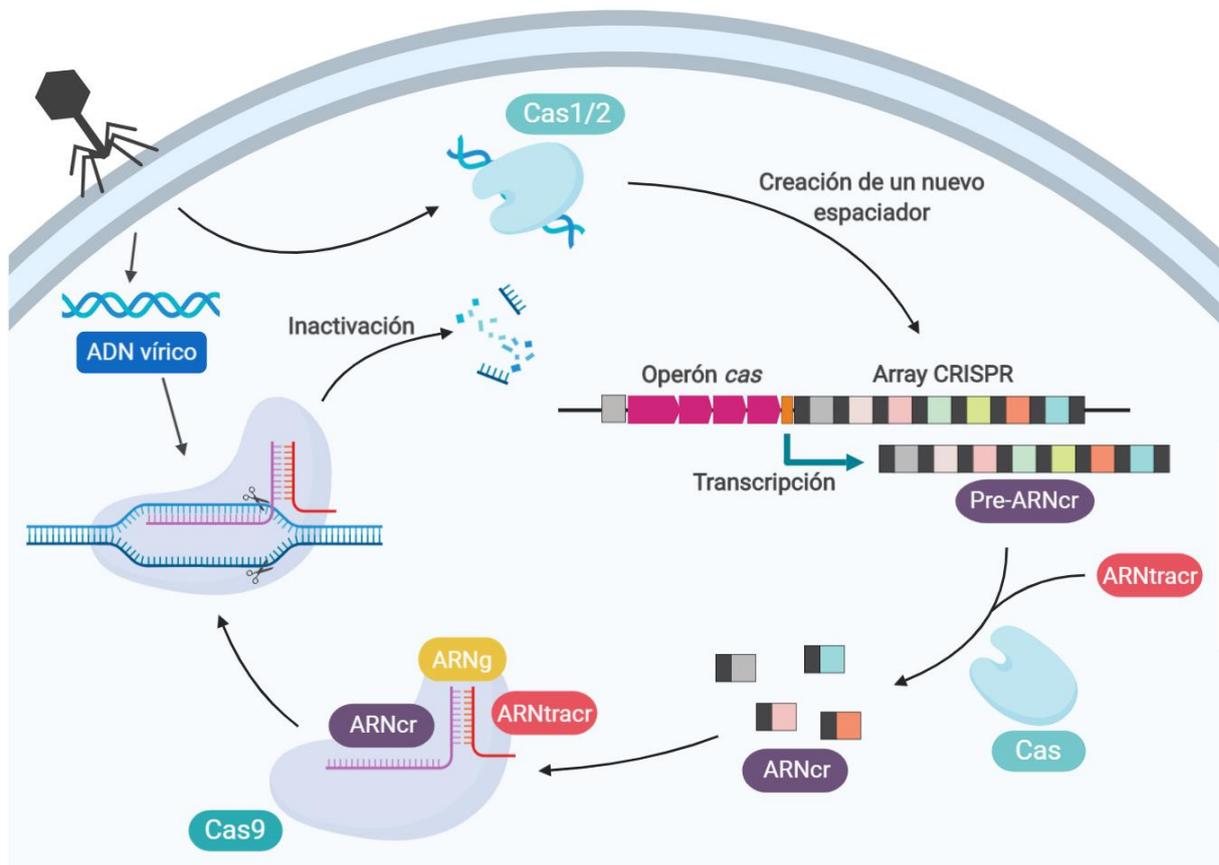


Figura 8. Esquema del mecanismo de actuación del sistema CRISPR/Cas. Cuando un organismo invasor introduce su material génico en la célula, el complejo CRISPR/Cas lo reconoce y degrada, permitiendo que pequeños fragmentos del ADN viral sean integrados en las secuencias CRISPR. Figura diseñada empleando el programa BioRender.

El sistema CRISPR/Cas9 puede ser utilizado para introducir una secuencia de ADN de interés en cualquier clase de ser vivo, lo que nos permite hacer terapia génica de precisión. La enzima nucleasa Cas9 tiene dos sitios activos que abren cada una de las cadenas de una doble hélice de ADN en un lugar preciso que le señala la secuencia PAM, que puede ser diseñada en el laboratorio. Los sistemas de reparación de la célula vuelven a ligar las hebras y, si en ese momento hay en el medio celular un ADN homólogo a la secuencia que se ha cortado, puede introducirse por recombinación homóloga y realizarse una inserción génica dirigida (Charpentier and Doudna 2013) (Figura 9).

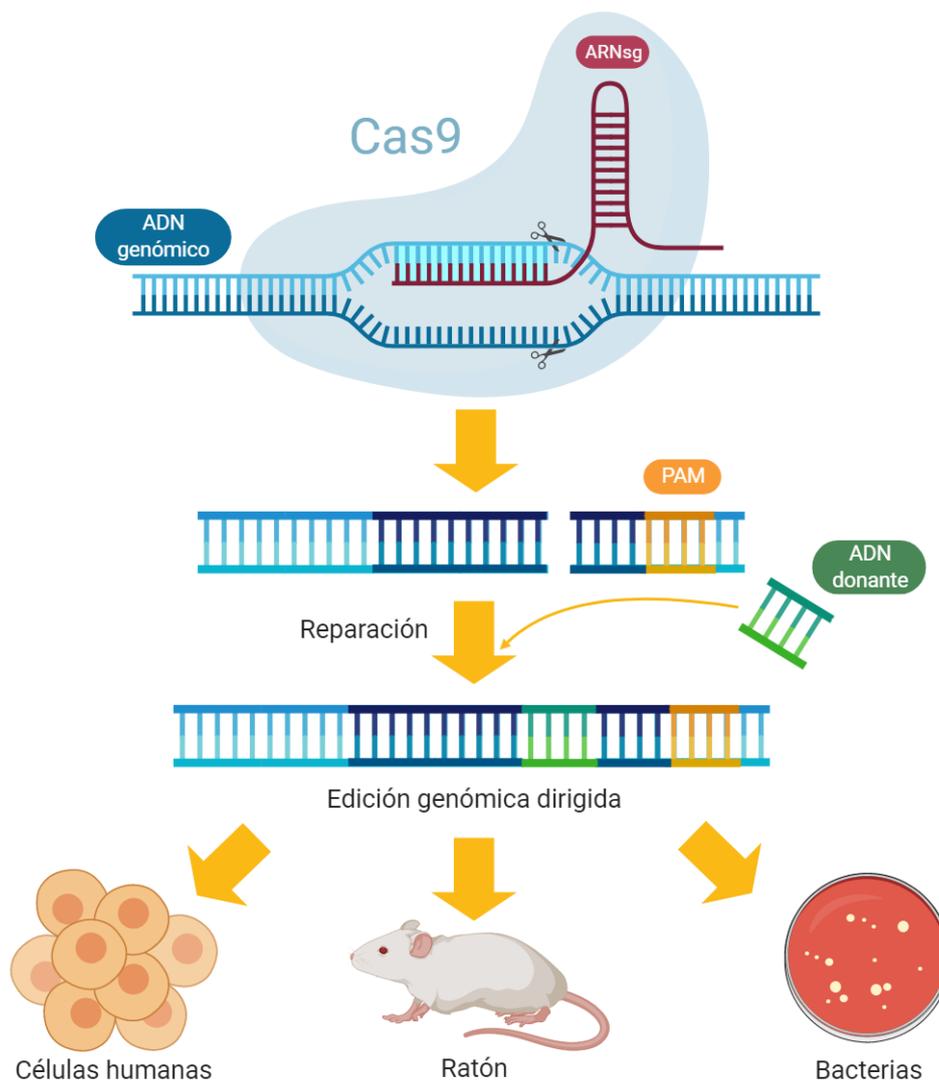


Figura 9. Esquema del funcionamiento de la nucleasa Cas9.  
Figura diseñada empleando el programa BioRender.

CRISPR/Cas9 también puede ser utilizado para introducir modificaciones epigenéticas. Para ello es necesaria la inactivación de Cas9 y la incorporación de módulos reguladores de la metilación o capaces de modificar histonas. El sistema CRISPR/dCas9 es de este tipo (Josipovic, Tadic et al. 2019): la endonucleasa Cas9 está inactivada pasando a llamarse dCas9 (*Catalytically inactive or dead Cas9*) y puede unirse a un dominio efector. El dominio VP64 es un activador transcripcional compuesto por cuatro copias de la proteína 16 del virus del Herpes simple, con 437-447 aminoácidos ensamblados por uniones glicina-serina. Este sistema CRISPR es capaz de situarse cerca del promotor de un gen y actuar como un potente activador transcripcional.

#### **I.4. UTILIZACION DE CÉLULAS MADRE EN CLÍNICA**

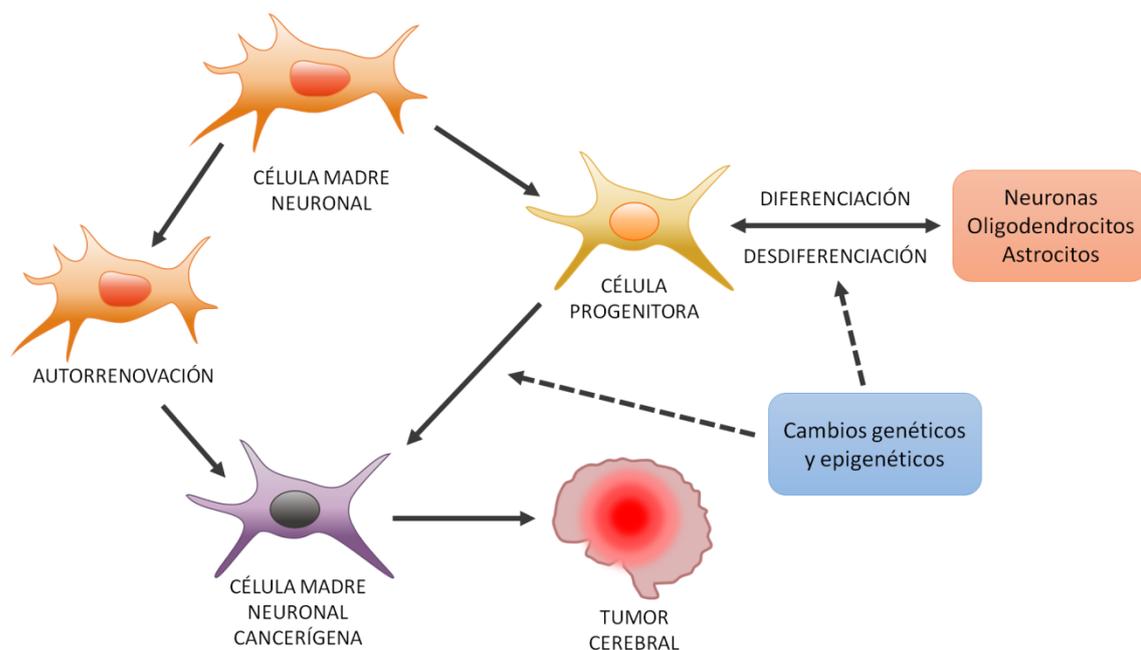
---

Aunque la reprogramación celular artificial se muestra como una herramienta muy prometedora en el apoyo a la terapia celular en el SN, su uso en clínica puede generar consecuencias no deseadas y requiere precaución. Existen varios problemas técnicos asociados al uso de las MSCs en clínica (Clement, Grockowiak et al. 2017):

- La difícil estandarización de los protocolos de aislamiento.
- La heterogeneidad de las MSCs, que afecta a su expansión *in vitro*.
- El limitado número de clones que son capaces de expandirse a largo plazo, perdiendo su potencial multipotente.
- La elección de la vía de administración en el paciente, que puede afectar a su movilización o posterior localización en el tejido dañado.
- La transformación espontánea durante la fase de proliferación en otro tipo celular, incluyendo su transformación tumoral.

En la actualidad se sabe que es poco probable que las células madre adultas autólogas y los tejidos derivados de las mismas produzcan rechazos una vez trasplantados en el paciente. Esto representa un avance muy significativo, ya que un rechazo inmunológico solo puede ser eludido mediante la continua administración de fármacos inmunosupresores. Sin embargo, las células madre son entidades dinámicas y por eso su uso debe ir unido a procesos de regularización que garanticen que el tipo celular con el que se inicia la investigación, no se transforme en uno diferente en el momento en el que se trasplante al paciente.

Es importante considerar que, en algunos casos, un prerrequisito para la expansión *in vitro* a gran escala previa a la implantación con propósito terapéutico, es la no inmortalización de las células y aparición de tumorigénesis esporádica. Ha sido ampliamente descrito el papel aberrante de la metilación en genes supresores de tumores y en consecuencia en la tumorigénesis (Zhang 2002, Zhang, Yuan et al. 2017). Además, se ha estudiado la asociación de tumores sólidos con células estromales no neoplásicas, incluyendo MSCs, reclutadas por el epitelio tumoral de los tejidos adyacentes, que pasan a formar parte del microambiente del tumor y a modular su progresión (Nishimura, Semba et al. 2012, Kansy, Dissmann et al. 2014). Este reclutamiento está mediado por señales extrínsecas liberadas por el ambiente tumoral que incluyen quimiocinas, citoquinas y factores de crecimiento (Bergfeld and DeClerck 2010).



*Figura 10. Células madre y cáncer en el sistema nervioso.*

*Los cambios genéticos y epigenéticos pueden conducir a las células madre neuronales y a las células progenitoras a generar células madre cancerígenas y también a la desdiferenciación de células neuronales diferenciadas. Figura diseñada usando Microsoft PowerPoint.*

En el SN, las células madre neuronales pueden convertirse en células tumorales de origen neuronal a causa de modificaciones epigenéticas que transforman células diferenciadas en células más primitivas y, finalmente, en células tumorales (Figura 10) (Achanta, Sedora Roman et al. 2010). El descubrimiento de este tipo de células, así como el de las células madre tumorales (CSCs) cerebrales, ha proporcionado una nueva

perspectiva sobre las vías moleculares y los mecanismos de la carcinogénesis en el cerebro, y sirve como explicación para el alto porcentaje de recidivas asociadas, especialmente en glioblastoma (Fedele, Cerchia et al. 2019). También se tiene constancia de su acción inhibidora del crecimiento e invasión tumoral de forma directa o indirecta, aunque no se conocen bien los mecanismos (Norozi, Ahmadzadeh et al. 2016). Algunos estudios llevados a cabo en células tumorales primarias, concluyen que las hASCs pueden inducir el crecimiento de células tumorales en presencia de tumores activos pero no lo hacen frente a células mitóticamente inactivas (Zimmerlin, Donnenberg et al. 2011). Eterno y cols. (Eterno, Zambelli et al. 2014) mostraron que las ASCs pueden aumentar la proliferación de células de cáncer de mama a través de la activación de HGF y  $\beta$ -catenina, fomentando la recurrencia del cáncer de mama después de los injertos de grasa. Desafortunadamente, la información relacionada con la diferenciación errónea de ASCs es muy escasa y el único caso descrito se refiere a la aparición de quistes y microcalcificaciones, en 4 de 70 pacientes, que fueron sometidos a una reconstrucción mamaria con lipoaspiración (Yoshimura, Sato et al. 2008).

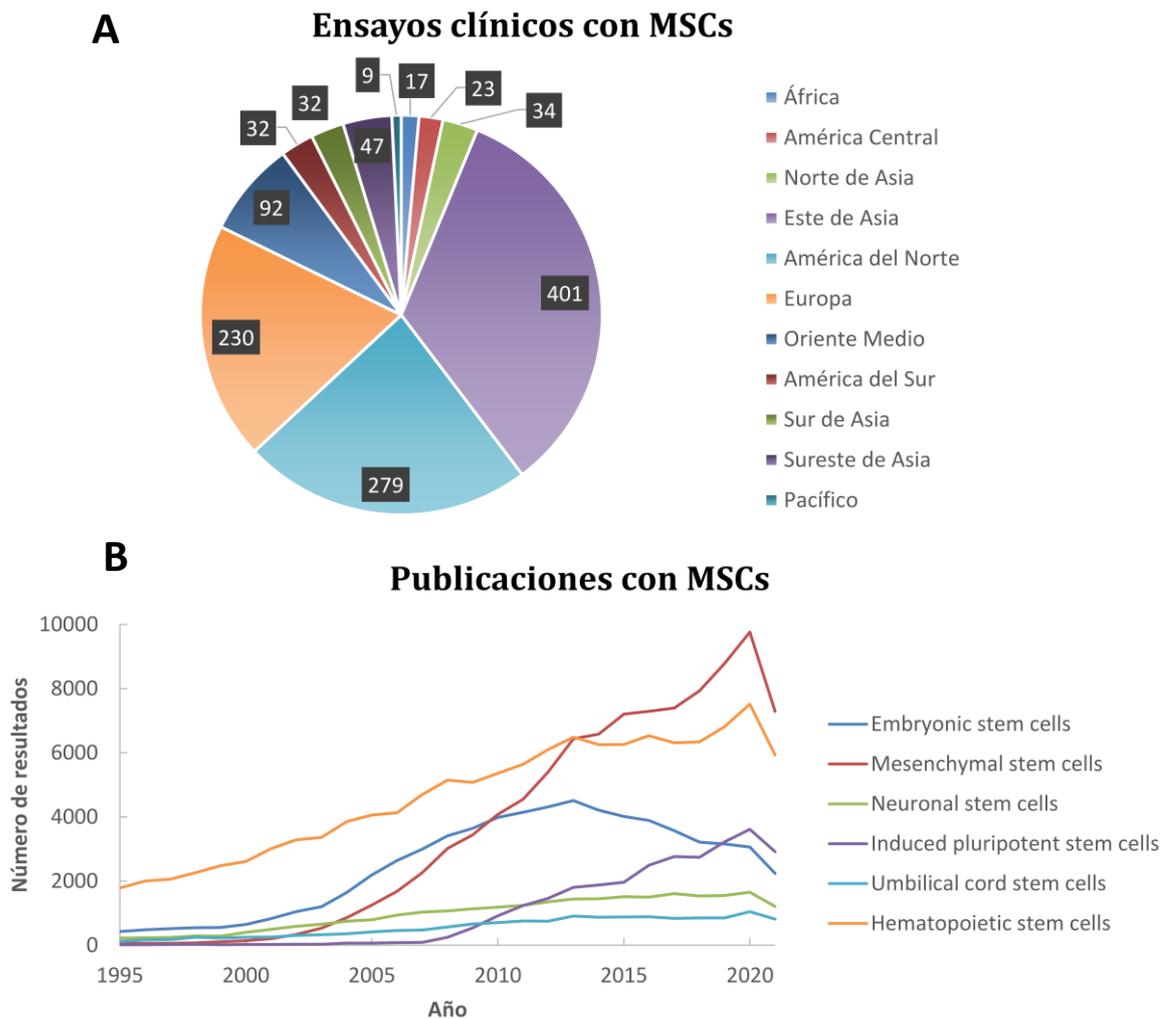
Un tumor puede desarrollarse a partir de la reprogramación espontánea *in vivo* o *in vitro* de una célula indiferenciada (Trosko 2008, Trosko 2014), lo que hace imprescindible que se mejore la eficacia del proceso de diferenciación para obtener un 100% de células diferenciadas, o que se diseñen condiciones de cultivos más simples. Para conseguir que todas las células trasplantadas conserven su estado de diferenciación se han probado diferentes técnicas genéticas como la acetilación del ADN o la remodelación de la cromatina (Li, Wei et al. 2009). Estos resultados generan la necesidad de una información más detallada y la caracterización molecular de las hASCs. Se necesitan más estudios para dilucidar el mecanismo que siguen las células madre durante su transformación, que ayuden a regular el destino celular e inhibir procesos oncogénicos.

## **I.5. PRINCIPALES LESIONES EN EL SISTEMA NERVIOSO Y FUTURAS PERSPECTIVAS EN EL USO DE MSCs PARA TRATARLAS**

---

El uso de MSCs para el tratamiento del sistema nervioso es muy prometedor por su fácil adquisición no invasiva, sus propiedades inmunológicas que permiten extraerlas de una fuente autóloga y un perfil de seguridad demostrado (Lalu, McIntyre et al. 2012). Los ensayos clínicos realizados hasta la fecha son alentadores, sobre todo porque han

demostrado no presentar efectos secundarios graves. La *Figura 11-A* muestra el elevado impacto de las MSCs en clínica, con 1045 ensayos clínicos registrados en <https://ClinicalTrials.gov> y 213 en marcha en el momento actual (búsqueda el 28 de septiembre de 2021 con el término “*mesenchymal stem cell*”). Además, el incremento cada vez más acentuado en las publicaciones anuales sobre MSCs frente a otros tipos de células madre (*Figura 11-B*) no hace sino corroborar esta tendencia (búsqueda en Scopus el 28 de junio de 2019).



*Figura 11. Perspectivas futuras de la investigación con MSCs.*

(A) Ensayos clínicos clasificados por región hasta el año 2021, excluyendo aquellos cuyo estado es desconocido. El diagrama ha sido diseñado a partir de los datos recogidos en la base de datos bibliográfica Scopus. (B) Publicaciones relacionadas con las células madre (términos de búsqueda en la leyenda) entre el año 1995 y 2021. Gráfica elaborada a partir de los datos recogidos en la web [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov).

Actualmente el uso de MSCs autólogas se ve limitado principalmente por la dificultad de generar grandes cantidades de estas células para tratar al paciente. Además,

numerosas revisiones insisten en la necesidad de establecer prácticas estandarizadas de aislamiento, caracterización y mantenimiento de las células en cultivo, antes de la utilización de las MSCs en clínica, ya que las discrepancias actuales impiden interpretaciones generales de los resultados obtenidos en laboratorios y de los efectos beneficiosos observados en ensayos clínicos (Brunt, Weisel et al. 2012).

Es importante conocer las limitaciones de las hASCs y superarlas: aislar y cultivar poblaciones homogéneas de células madre, mejorar la eficiencia de la diferenciación, establecer una etapa óptima de trasplante y mejorar la migración posterior y la tasa de regeneración (Lim, Jeong et al. 2011, Bajek, Olkowska et al. 2014). Las cuestiones que aún siguen planteándose en el uso de estos tipos celulares tienen que ver con el momento y el modo más idóneo de administración, la monitorización de las células, las dosis, el tiempo de seguimiento del paciente y su seguridad pasado un tiempo medio-largo tras la administración.

Las inyecciones estereotáxicas son un método altamente invasivo que requiere la pericia de un neurocirujano, mientras que la administración celular por vía intravenosa o intratecal es mucho más fácil y accesible. Los mejores resultados preclínicos con MSCs se han obtenido con una administración celular temprana tras la lesión neuronal, para suprimir la respuesta inflamatoria inicial y la activación de células inmunitarias, no existiendo muchas evidencias de beneficios cuando el trasplante se hace después de una semana (Woodcock and Morganti-Kossmann 2013).

A pesar de todo, la administración de MSCs aún no ha arrojado resultados clínicos consistentes debido a que las células inyectadas muestran una supervivencia limitada en el tejido hospedador. No obstante, el hecho de que se aprecie una mejora clínica de los pacientes ha llevado a proponer ideas alternativas sobre sus efectos tróficos, esto es, su capacidad para generar un medio reparador a través del contacto célula a célula, junto a la secreción de moléculas bioactivas que promueven la inmunomodulación de células inflamatorias que participan en la reparación del tejido y la diferenciación de células progenitoras endógenas. Se ha visto que las MSCs son capaces de restaurar la función de un tejido dañado por la generación de estos factores, no sólo por su implantación y el reemplazamiento celular en el propio tejido. Además, dado que las MSCs aisladas de diferentes donantes no muestran diferencias importantes en su potencial de diferenciación o la expresión de marcadores de membrana, la variabilidad en su capacidad regeneradora *in vivo* podría deberse a diferencias en estos perfiles de secreción (Samsonraj, Raghunath et al. 2017).

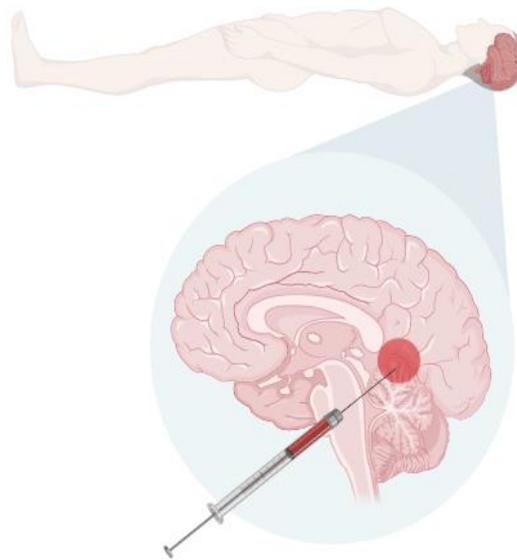
Para garantizar la seguridad y la eficacia del tratamiento, se debería hacer una monitorización que combinara resonancia magnética para mostrar la lesión y la perfusión, el estudio de parámetros biológicos como las concentraciones sistémicas de citoquinas pro- y antiinflamatorias y pruebas neurológicas que permitan una visión general exhaustiva del estado neurológico del paciente. Otro obstáculo significativo para este tipo de ensayos es el coste, especialmente el de generación, procesamiento y almacenamiento de las células madre y progenitoras antes de la administración al paciente. Por último, aún permanece el riesgo de generar tumores iatrogénicos como consecuencia del tratamiento. Aunque emplear fuentes autólogas disminuye este riesgo, no existe actualmente un dispositivo de monitorización adecuado para diferenciar los focos de tumor iatrogénico de las zonas inflamadas fruto de la lesión.

Mientras que es necesario abordar todos los temas mencionados para lograr un traslado efectivo a la clínica, estandarizado y con resultados comparables entre laboratorios, se sigue investigando para mejorar la eficacia terapéutica de las MSCs. Por ejemplo, Baig y cols. comprobaron que el uso de las BM-MSCs junto con nanopartículas de quitosano con extracto de *Thymus serpyllum*, que reduce los daños por estrés oxidativo y aumenta la supervivencia de las MSCs, ejerce un efecto protector sobre las MSCs *in vitro*. Dado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) son abundantes en el microambiente de enfermedades isquémicas, estas nanopartículas con extractos naturales pueden ser un potencial coadyuvante para emplear en el trasplante de MSCs (Baig, Azizan et al. 2019). Lee y cols. obtuvieron conclusiones similares con extractos de *Cirsium setidens* (Lee, Jung et al. 2016). Wang y cols. también encontraron que la melatonina es capaz de atenuar la apoptosis de MSCs inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y reducir la generación intracelular de ROS, aumentando por tanto la supervivencia de las MSCs (Wang, Wang et al. 2013).

En cualquier caso las principales lesiones del sistema nervioso siguen sin tener un tratamiento eficaz y es en su estudio donde se centran los ensayos clínicos con MSCs como resumimos a continuación.

### I.5.1. LESIÓN CEREBRAL POR INFARTO O TRAUMATISMO

La lesión cerebral isquémica por infarto o traumatismo es un problema de salud mundial, que a menudo causa la muerte o discapacidad al paciente, ocasionando fuertes cargas sociales y médicas (Venkat, Shen et al. 2017). También plantea un gran desafío en su diagnóstico por su heterogeneidad en términos de causa, patología, severidad y pronóstico y es un factor de riesgo importante en el desarrollo de trastornos y enfermedades neurodegenerativas crónicas (Arvanitakis, Capuano et al. 2016, Taylor, Saint-Hilaire et al. 2016).



#### *Fisiopatología y tratamiento de la lesión cerebral por infarto o traumatismo*

Las lesiones en el SNC, especialmente en el encéfalo, normalmente evolucionan en dos fases. La fase primaria corresponde al daño inmediato que sufre el tejido, (Sims and Muyderman 2010), mientras que la fase secundaria se produce pocas horas después de la lesión y puede durar varios días. Se caracteriza sobre todo por la apoptosis y necrosis de células neuronales (Hokkanen, Hunter et al. 2018). Este ambiente inflamado puede impedir también la función de las células madres presentes en el SNC y por tanto, la reparación del tejido (Molcanyi, Riess et al. 2007).

Las opciones para pacientes lesionados son limitadas y se centran en controlar la presión intracraneal y optimizar la perfusión cerebral (Sahuquillo and Dennis 2019, Chen, Song et al. 2020). Hasta la fecha, el activador del plasminógeno tisular (tPA) es el único fármaco aprobado para tratar esta lesión, pero su uso está limitado al estrecho intervalo de tiempo entre 3-5 horas tras su inicio, lo que hace que se necesiten urgentemente terapias alternativas o complementarias.

## *Ensayos preclínicos y clínicos con MSCs para la lesión cerebral*

---

Para el tratamiento de lesiones cerebrales con MSCs, las células empleadas fueron extraídas de distintos tejidos como cordón umbilical (Hong, Zhang et al. 2011), médula ósea (Bonsack, Corey et al. 2020), líquido amniótico (Yan, Zhang et al. 2013) o tejido adiposo (Gao, Zhao et al. 2014), sin que existan estudios rigurosos que comparen su funcionalidad según el lugar de aislamiento. Algunas MSCs trasplantadas se cultivaron sin factores de crecimiento, mientras que otros grupos optaron por suministrárselos para aumentar las tasas de supervivencia y la velocidad de diferenciación de estas células tras el trasplante en el paciente (Lu, Li et al. 2001, Mahmood, Lu et al. 2002, Bhang, Lee et al. 2007). Otros grupos inyectaron directamente los factores de crecimiento en la zona en la que se realizó el trasplante (Liu, Yi et al. 2014). El método y momento de administración, así como la dosis de MSCs administrada, varían entre estudios.

La mayoría de estudios mostraron mejoras en la función motora y en la neurogénesis, hecho que fue constatado empleando pruebas como la de Rotarod, la de Stepping, la Puntuación de Severidad Neurológica modificada, o la prueba de Morris Water Maze. Además, las MSCs trasplantadas redujeron el volumen de la lesión cerebral, sobre todo si se implantaron de forma estereotáctica en la zona lesionada o en la zona cortical adyacente (Hong, Zhang et al. 2011, Gao, Zhao et al. 2014). El mecanismo de acción parece ser la regulación a la baja de las citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 o TNF- $\alpha$  aproximadamente 24 horas después de la administración de las MSCs (Galindo, Filippo et al. 2011). Estas citoquinas pueden causar daño cerebral, por lo que su disminución contribuye a mejorar los resultados neurológicos tras la lesión.

Los buenos resultados obtenidos en ensayos preclínicos, sumados a la efectividad de los trasplantes de MSCs en el tratamiento de patologías hematológicas, condujo a los primeros ensayos clínicos, si bien los que emplean MSCs para el tratamiento de lesiones en el SN no son muy abundantes. Esto se debe probablemente a que los efectos derivados de su aplicación aún no han sido extensamente estudiados y no se pueden asegurar la estabilidad y naturaleza no tumoral de las SC una vez insertadas en el paciente. Cox y cols. (Cox, Baumgartner et al. 2011) realizaron un estudio prospectivo no aleatorizado en 10 niños con edad comprendida entre cinco y catorce años. Tras el tratamiento con células madre autólogas derivadas de médula ósea, los pacientes no presentaron episodios de crisis post-lesión, presión refractaria intra-craneal o alteraciones de la presión de perfusión cerebral, y aunque todos los pacientes mostraron mejoras neurológicas solo tres se

recuperaron completamente. Tampoco se apreció un cambio morfológico cerebral significativo por resonancia magnética.

Tian y cols. (Tian, Wang et al. 2013) realizaron un estudio prospectivo en fase I-II, no aleatorizado con 97 pacientes que presentaban un traumatismo severo en el cerebro en fase sub-aguda. Les fueron administradas MSCs derivadas de médula ósea en los dos meses siguientes a la lesión, realizándoles un seguimiento posterior de 40 días. El resultado fue más favorable en pacientes jóvenes y para aquellos que recibieron el tratamiento rápidamente tras el traumatismo, no encontrándose complicaciones en ningún caso.

Liao y cols. (Liao, Harting et al. 2015) realizaron otro ensayo aleatorizado en fase I-II que estudiaba los efectos autólogos de MSCs derivadas de médula ósea. Los resultados mostraron una mejora general que fue comprobada por resonancia magnética y un aumento en las capacidades funcionales y neurocognitivas.

Gennai y cols. (Gennai, Monsel et al. 2015) realizaron un ensayo en fase I-II que estudia los efectos de células MSCs derivadas de médula ósea autóloga, inyectadas por vía intravenosa en adultos de 18 a 55. Este estudio demostró que las células madre y las células progenitoras migran hacia el cerebro dañado y proliferan, ejerciendo efectos protectores a través de la posible sustitución celular, la transferencia de genes y proteínas y la liberación de factores antiinflamatorios y de crecimiento.

Aunque los beneficios de la terapia basada en MSC se han demostrado claramente en los estudios preclínicos, quedan algunas preguntas sobre los mecanismos biológicos de reparación y seguridad, la dosis, la ruta y el momento de administración celular, lo que finalmente determinará su uso clínico óptimo.

## I.5.2. LESIÓN EN LA MÉDULA ESPINAL

---

### *Patofisiología y tratamiento de la médula espinal lesionada*

---

La lesión de la médula espinal ocurre con una incidencia anual mundial de 15-40 casos por millón de personas (Sahni and Kessler 2010). La gravedad es variable según la ubicación de la lesión, y las deficiencias funcionales asociadas pueden ser de tipo

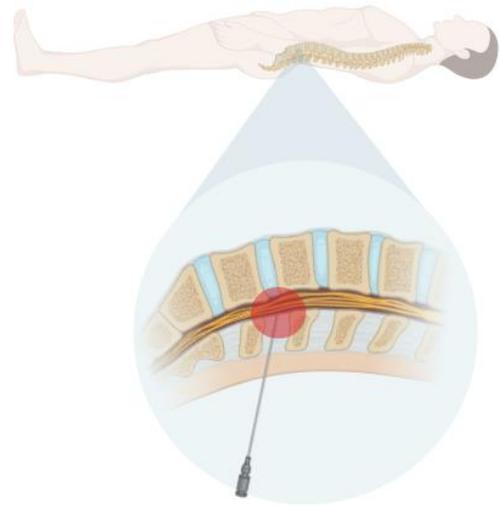
sensorial, motor o autonómico. Las lesiones torácicas inferiores pueden causar paraplejía, mientras que las lesiones a nivel cervical se asocian a tetraplejía (Alizadeh, Dyck et al. 2019).

Las lesiones medulares cursan con tres fases, una fase aguda, una subaguda y una crónica. La fase aguda comienza al producirse la lesión medular y su primera consecuencia es la toxicidad tisular, terminando en la muerte celular por necrosis, apoptosis o daño excitotóxico (Wilson, Tetreault et al. 2017).

La fase subaguda se caracteriza por procesos que conducen a un daño secundario del tejido nervioso después del traumatismo inicial. La fase crónica puede durar años y se caracteriza por la desmielinización continua de axones (Totoiu and Keirstead 2005), la inflamación local y la apoptosis (Fleming, Norenberg et al. 2006). La mayoría de pacientes permanece en esta fase, en mayor o menor medida, por el resto de sus días.

El enfoque terapéutico actual para tratar una lesión medular se divide en tres fases dirigidas a los eventos moleculares que van teniendo lugar. La metodología primera trata de estabilizar las funciones vitales del paciente e interrumpir en la medida de lo posible la cascada de reacciones que conducen a una lesión secundaria (Huang, Young et al. 2020). La fase segunda tiene como objetivo la neuroprotección de los tejidos dañados y al ser una fase crítica para el restablecimiento de las funciones neuronales del paciente, es aquí donde se centran la mayoría de ensayos clínicos humanos.

La tercera fase terapéutica se ocupa de controlar las consecuencias de esta lesión. Los esfuerzos de la medicina regenerativa con células madre deben centrarse en la regeneración axonal, la inhibición de la cicatriz glial, la síntesis de proteoglicanos inhibidores (Bavelier, Levi et al. 2010), la modulación de la respuesta inmunitaria (Lu, Wang et al. 2013), la estimulación de células madre endógenas (Martens, Seaberg et al. 2002) y el relleno con biomateriales de la cavidad formada tras la lesión (Kubinova, Horak et al. 2015).



Ya se han realizado estudios preclínicos y clínicos de lesiones medulares que emplean ESCs, MSCs y NSCs, así como células progenitoras de oligodendrocitos (OPC) y células de Schwann (Enzmann, Benton et al. 2006, Sahni and Kessler 2010, Fehlings and Wawda 2011). El trasplante de MSCs ha demostrado una mejora significativa en la función motora de individuos tratados tras la lesión (Chopp, Zhang et al. 2000).

Las células trasplantadas tienen tasas de supervivencia bajas, lo que requiere alguna modificación en las propias células o el microambiente del trasplante. Los hidrogeles secretores de factores de crecimiento (Vulic and Shoichet 2012) mitigan la respuesta inmunitaria que generan las células trasplantadas, al formar una barrera física temporal que las aísla del sistema inmunitario, aumentando su supervivencia (Lippens, Swennen et al. 2013, Mayfield, Tilokee et al. 2014). Los factores de crecimiento como el FGF o el EGF, junto con agentes antiinflamatorios, han demostrado el mismo efecto (Karimi-Abdolrezaee, Eftekharpour et al. 2010).

A pesar de los resultados favorables de muchos estudios preclínicos, si consideramos la complejidad del SN y las vías de interacción celular en la médula espinal, quizás un enfoque terapéutico acertado para una lesión de médula crónica sea la combinación de terapia celular junto con otras estrategias médicas (Huang, Kuo et al. 2010, Karimi-Abdolrezaee, Eftekharpour et al. 2010).

Otra estrategia prometedora para el tratamiento crónico del sistema nervioso es la combinación del trasplante de MSCs con biomateriales y factores de crecimiento, terapias que han sido revisadas por Kubinova y Sykova (Kubinova and Sykova 2012, Pego, Kubinova et al. 2012).

Los logros actuales y perspectivas futuras de estudios preclínicos *in vivo* que implican la terapia celular con hASCs de lesiones medulares, han sido revisados con el fin de resumir los avances obtenidos antes de proceder con ensayos clínicos en humanos (Kwon, Soril et al. 2013).

Los datos recopilados por diversos estudios muestran que la implantación de MSCs autólogas en la médula espinal no parece causar efectos secundarios adversos ni cambios estructurales debidos a la formación de tejido tumoral o ectópico, ni tampoco deterioro psicosocial. En Praga se realizó un estudio clínico no aleatorizado de fase I/II con

pacientes que presentaban una lesión en la médula espinal y fueron tratados con hASCs autólogas que se trasplantaron a través de la arteria vertebral. Los resultados mostraron que el procedimiento era seguro y se tuvo constancia de mejoras regenerativas. Estos resultados se correlacionan con los ensayos realizados por Park y cols. (Park, Shim et al. 2005) y Cristante y cols. (Cristante, Barros-Filho et al. 2009), que aislaron MSCs de médula ósea y sangre periférica y las combinaron con factores estimulantes de granulocitos y macrófagos, para posteriormente evaluar la respuesta neurológica.

Uno de los métodos más recientes es el trasplante autólogo de MSCs en el líquido cefalorraquídeo a través de una punción lumbar en pacientes con lesiones medulares subagudas. El resultado de los ensayos realizados muestra una marcada recuperación en casi la mitad de los pacientes tratados y no se conocen efectos secundarios relacionados (Karamouzian, Nematollahi-Mahani et al. 2012). Park y cols. informaron además de mejoras de tipo electrofisiológico, así como una disminución en el tamaño de la cavidad producida tras la lesión (Park, Kim et al. 2012). Ra y cols. (Ra, Shin et al. 2011) también mostraron que el trasplante de hASCs no tenía efectos secundarios adversos a corto plazo. Solo unos pocos grupos han publicado los resultados de sus estudios y muchos aún no están disponibles, sin embargo, la cantidad de nuevos ensayos clínicos aumenta cada año, probablemente por el número creciente de resultados experimentales *in vivo* de fase I y II positivos.

### I.5.3. OTRAS ENFERMEDADES DEL SISTEMA NERVIOSO

#### *Patofisiología de otras enfermedades*

El trasplante de MSCs también se ha llevado a la clínica para otras muchas enfermedades del sistema nervioso como la esclerosis, Alzheimer, Parkinson o autismo.

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica e inflamatoria del SNC que acarrea en última instancia la desmielinización y pérdida de axones. Se trata de una enfermedad compleja en la que intervienen múltiples factores, si bien el principal evento etiopatogénico conlleva una respuesta aberrante de las células del sistema inmunitario (linfocitos T y B) frente a proteínas de la mielina (Dulamea 2015). El tratamiento actual

varía según la fase en la que se encuentre la enfermedad, incluyendo interferón- $\beta$ , acetato de glatiramer o Metilprednisolona (Pandit and Murthy 2011).

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una rara enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por la pérdida de neuronas motoras, lo que desemboca en debilidad muscular, parálisis progresiva y finalmente la muerte a los 3-5 años aproximadamente desde el inicio de la enfermedad debido a fallo respiratorio. Dado que no existe tratamiento actual, el trasplante de MSCs puede considerarse una posible herramienta para el tratamiento de la ELA (Hajivalili, Pourgholi et al. 2016).

La enfermedad de Parkinson es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes, afectando a unos 10 millones de personas en todo el mundo. Es causada por una pérdida progresiva y extensiva de neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriada y de neuronas de la parte compacta de la sustancia negra, lo que resulta en síntomas motores como inestabilidad postural, rigidez, bradicinesia (lentitud en los movimientos) y temblor en reposo, además de alteraciones en la función cognitiva o autonómica, entre otras. Los principales tratamientos usados en la actualidad son la estimulación cerebral profunda, el uso de inhibidores enzimáticos y Levodopa. No obstante, sólo producen alivio sintomático, por lo que existe la necesidad de explorar tratamientos más efectivos (Mendes Filho, Ribeiro et al. 2018).

El Alzheimer es una de las causas más comunes de demencia, caracterizada por diferentes etapas de deterioro cognitivo y funcional. 46 millones de personas en el mundo sufrían demencia en el año 2015 según el Informe Mundial de Alzheimer, cifra que se estima ascenderá a 131,5 millones para 2050. Al igual que otras enfermedades neurodegenerativas como la ELA o el Parkinson, el Alzheimer es incurable y empeora progresivamente con la edad, finalizando con la muerte (Bali, Lahiri et al. 2017).

Por último, los trastornos del espectro autista (TEA) engloban un amplio rango de enfermedades que se caracterizan por deficiencias graves y generalizadas en la comunicación social y un comportamiento repetitivo. El TEA es uno de los desórdenes psiquiátricos más frecuentes, afectando a 1 de cada 59 niños de 8 años. Debido al desconocimiento del mecanismo concreto de la enfermedad, el tratamiento es sólo sintomático (Liu, Chen et al. 2019).

En resumen, dada la gran cantidad de enfermedades neurológicas para las cuales el tratamiento actual es ineficaz o inexistente, es necesario explorar otras terapias

alternativas. En este sentido, el trasplante de MSCs puede ser de vital importancia a la hora de mejorar la calidad de vida de los pacientes que sufren estos desórdenes.

### *Ensayos clínicos con MSCs en otras lesiones del sistema nervioso*

---

Un número considerable de ensayos clínicos con MSCs están siendo llevados a cabo para ELA y esclerosis múltiple. Los primeros ensayos han probado que dichas células pueden ser utilizadas de forma segura y que es posible llegar a realizar extensivos ensayos de fase II. Los resultados de un estudio de fase I/II mostraron que la administración de MSCs autólogas en 19 pacientes con ELA y 15 con EM no acarrió efectos secundarios significativos (Karussis, Karageorgiou et al. 2010). En otro estudio llevado a cabo en Irán, 10 enfermos de esclerosis múltiple secundaria progresiva fueron tratados con MSCs, experimentando una mejora estructural, funcional y fisiológica de su función visual (Connick, Kolappan et al. 2011). De forma similar, no se han encontrado efectos secundarios tras el trasplante de BM-MSCs en enfermos de Parkinson (Venkataramana, Kumar et al. 2010) ni atrofia sistémica múltiple, observándose además en esta última una gran mejora de los pacientes (Lee, Kim et al. 2008). En el caso del Alzheimer, los ensayos que se están llevando a cabo actualmente tampoco muestran la existencia de efectos secundarios derivados de la administración de MSCs, postulándose como una metodología segura (Kim, Seo et al. 2015).

En conclusión, la terapia con MSCs está experimentando avances importantes, con un número cada vez mayor de ensayos clínicos en todo el mundo. A pesar de esto, es necesaria una mayor comprensión de su modo de acción y una estandarización de las prácticas de aislamiento, caracterización y trasplante con el objetivo de obtener resultados comparables y reproducibles. No obstante, la tendencia al alza de las publicaciones relacionadas con MSCs demuestran una intensa investigación para superar estos obstáculos (*Figura 12*).

## INTRODUCCIÓN

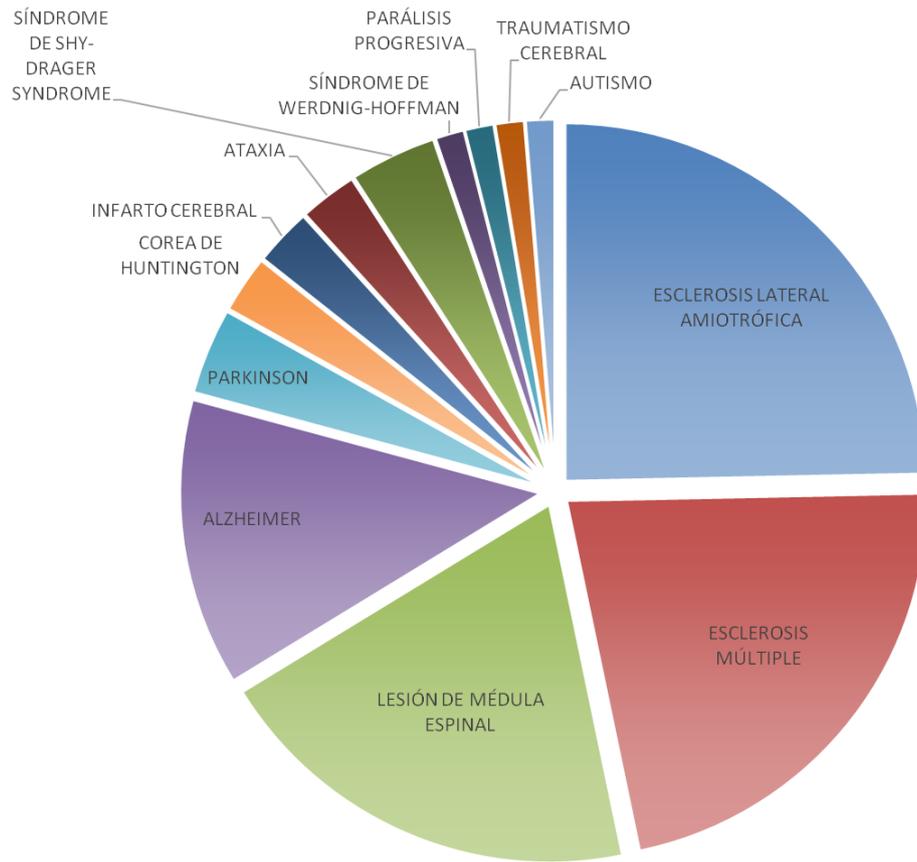
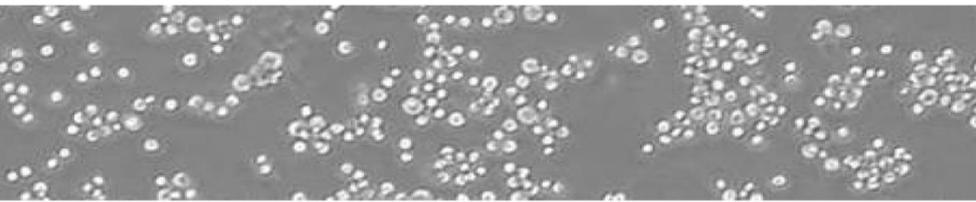


Figura 12. Ensayos clínicos con MSCs para el tratamiento de enfermedades neuronales.



## 2. OBJETIVOS



## II. OBJETIVOS

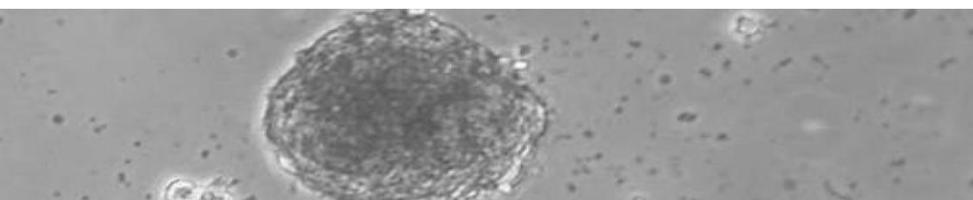
El principal objetivo de la presente tesis doctoral fue la determinación del papel de la metilación del ADN en la diferenciación neuronal de células madre derivadas de tejido adiposo.

Se subdivide a su vez en los siguientes cinco objetivos específicos:

1. Optimizar el proceso de obtención y caracterización de células madre humanas derivadas de tejido adiposo.
2. Realizar la diferenciación neuronal de las células madre mesenquimales de tejido adiposo mediante el uso de medios de diferenciación específicos.
3. Analizar el genoma completo del metiloma y transcriptoma durante la diferenciación neuronal de las células madre derivadas de tejido adiposo.
4. Seleccionar los principales genes hipermetilados o hipometilados durante el proceso de diferenciación neuronal.
5. Realizar ensayos funcionales con los principales genes modulados epigenéticamente para determinar su participación en el proceso de diferenciación neuronal.



*OBJETIVOS*



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

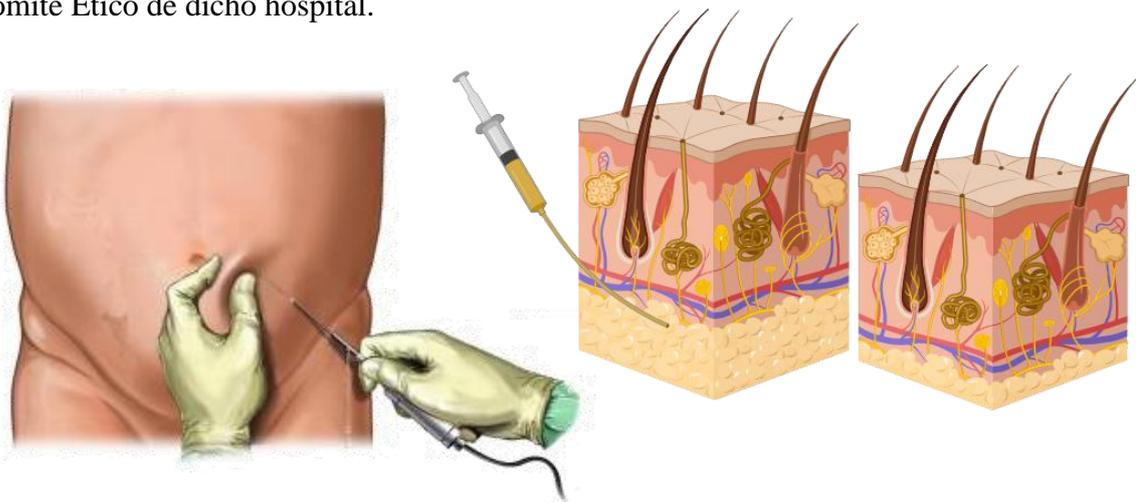


### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### III.1 AISLAMIENTO DE LAS CÉLULAS MADRE A PARTIR DE TEJIDO ADIPOSO

##### III. 1.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE LIPOASPIRADO

Las muestras de tejido adiposo fueron obtenidas mediante una liposucción estándar poco invasiva, realizada a pacientes con edades comprendidas entre los 30 y los 55 años, intervenidos en el Hospital Nuestra Señora de la Salud de Granada, España. Previamente a la intervención, todos los pacientes leyeron el consentimiento informado aprobado por el Comité Ético de dicho hospital.



*Figura 13. Representación de la técnica de lipoaspirado.*

*Esta técnica introduce una cánula en las zonas a tratar permitiendo la recolección del tejido adiposo y de las células madre, al mismo tiempo que introduce la anestesia, fármacos vasoconstrictores que minimizan la hemorragia y una solución salina que facilita el licuado de la grasa (imagen modificada de [www.lipoadvisor.com](http://www.lipoadvisor.com)).*

El lipoaspirado de grasa se procesó en condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar (*Aura Vertical S.D.4, Bio Air Instruments, Italy*) y el protocolo de extracción de hASCs empleado fue el siguiente:

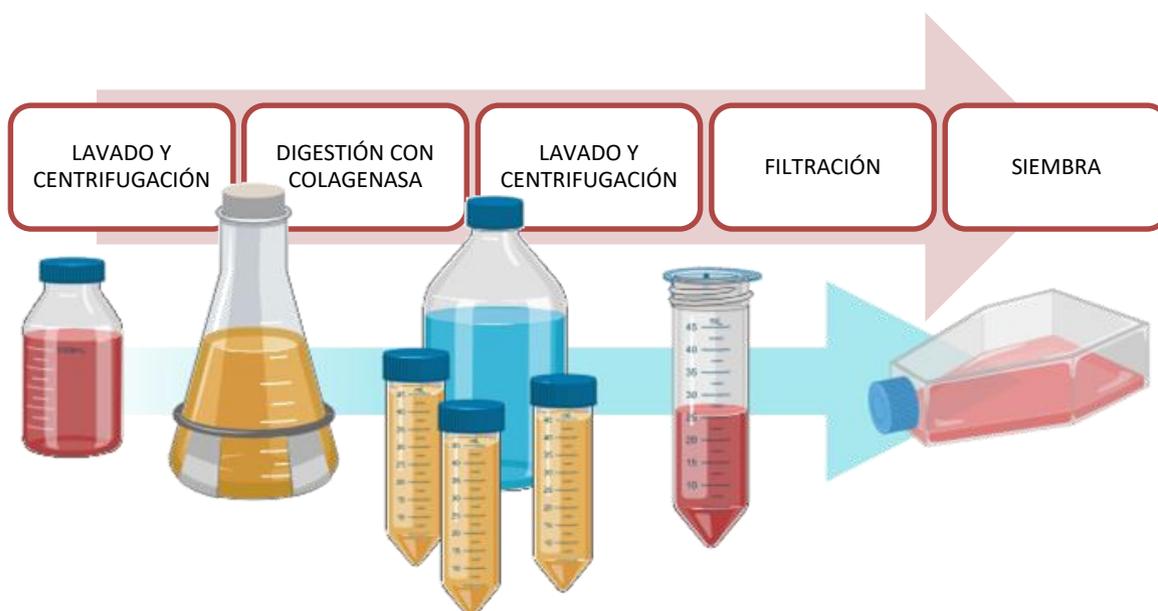


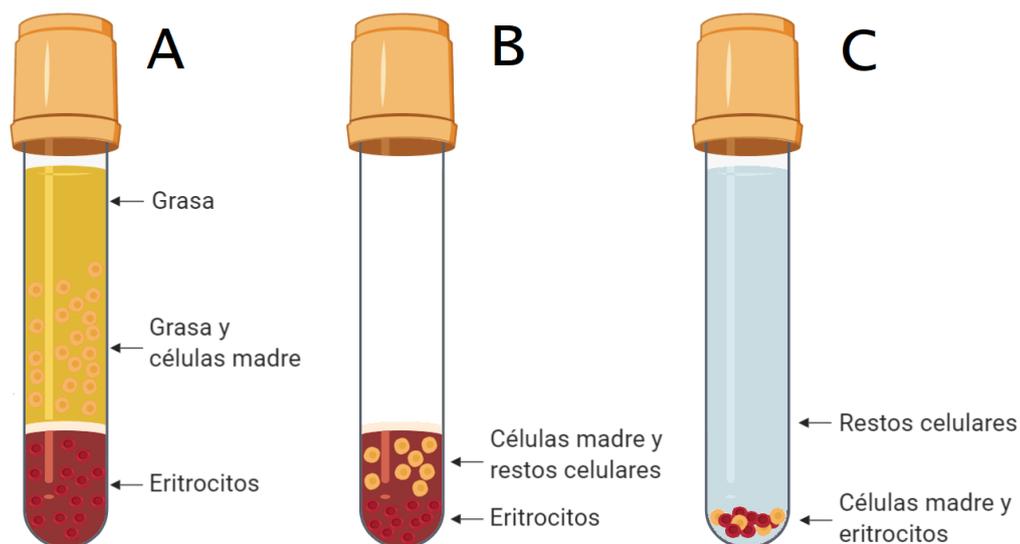
Figura 14. Esquema del procesamiento del lipoaspirado.  
Figura diseñada empleando el programa BioRender.

Tabla 5. Material necesario en el procesamiento de los lipoaspirados.

<b>Material</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Cantidad</b>
Tubos estériles de policarbonato de 50 ml		30
PBS		1 L
Colagenasa tipo I (1g/L)	Invitrogen	
Solución de Hanks	Sigma	500 ml
Albúmina de suero bovino (BSA) 1%	Sigma	
Suero bovino fetal (FBS)	Gibco	80 ml
DMEM completo	Sigma	1 L
Frascos de cultivo de 75 cm <sup>2</sup>	Nunc	

En primer lugar, se mezcló el PBS con el antibiótico para lograr una mezcla homogénea. A continuación, se añadió a cada tubo de 25 ml de lipoaspirado, 25 ml de la mezcla de PBS y antibiótico y se centrifugó a 4 °C y 400 g durante 10 min. Una vez sacados los tubos de la centrifuga con la precaución de no alterar sus fases, se retiró el sobrenadante aceitoso con ayuda de una pipeta Pasteur (*Figura 15-A*). Posteriormente se vertió en tubos de 25 ml limpios, de nuevo con ayuda de pipetas pasteur estériles, 25 ml de la capa intermedia amarillenta donde estaban las hASCs y se descartó el pellet. Se enrasó hasta 50 ml con la mezcla de PBS y antibiótico y volvió a centrifugarse del mismo modo.

Se preparó la mezcla de colagenasa empleando 200 mg de colagenasa, 2 g de BSA y 200 ml de solución de Hanks, agitándose bien hasta su completa disolución. A continuación, se pasó la mezcla a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  y se completó con solución de Hanks hasta llegar a medio litro. Una vez que los tubos fueron sacados de la centrifuga, se vertieron 25 ml de la capa grasa superficial a un tubo de 25 ml limpio y se rellenó hasta 50 ml con solución de colagenasa (*Figura 15-B*). Esta mezcla fue agitada durante una hora a 37 °C para que la colagenasa actuase. Pasado este tiempo, se inactivó la colagenasa con 1 ml de FBS por cada 10 ml de la mezcla de colagenasa y grasa. Se mezcló por inversión y se repartió la mezcla en tubos de 50 ml que fueron centrifugados de nuevo 10 min a 400 g y 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se añadió al *pellet* aproximadamente 20 ml de DMEM completo (*Figura 15-C*) para centrifugarse de nuevo 10 min a 400 g y 4 °C. Se realizó otro lavado y centrifugación del mismo modo. Posteriormente se retiró el sobrenadante, se resuspendió el resto con medio DMEM completo y toda la mezcla se pasó a través de un filtro de 70  $\mu\text{m}$  para eliminar los restos celulares. En el paso siguiente se añadieron 20 ml aproximadamente de medio DMEM completo, se centrifugó de nuevo de la misma forma y fue retirado el sobrenadante con cuidado. Para finalizar se añadió medio DMEM completo para repartir 10 ml por frasco de cultivo de 25  $\text{cm}^2$ , a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/frasco y los cultivos celulares fueron mantenidos en la estufa a 37 °C, 95% de humedad y 5% de  $\text{CO}_2$ , y lavados a las 48 horas con PBS para eliminar las células no adheridas.



*Figura 15. Etapas del protocolo de extracción de MSCs a partir de un lipoaspirado. La muestra se somete a distintos procesamientos al final de los cuales se obtienen las fracciones celulares que se observan en la imagen: (A) al final de la primera centrifugación, (B) tras la acción de la colagenasa y (C) previo al filtrado. Figura diseñada empleando el programa BioRender.*

Durante la primera semana después de procesar el lipoaspirado, diferentes tipos de células compartieron el espacio del frasco de cultivo con las hASCs, incluidas células endoteliales, pericitos, adipocitos, leucocitos y eritrocitos, que se denominaron colectivamente fracción estromal. Después de 48 horas de aislamiento, las hASCs comenzaron a adherirse a la superficie plástica y exhibir su típica forma fibroblástica. Tras cambios sucesivos del medio DMEM completo, la fracción estromal terminó eliminándose y se obtuvo un cultivo puro de hASCs como muestran estudios similares (Eto, Suga et al. 2009, Marei, El-Gamal et al. 2018).

Solo las células que permanecieron adheridas a la base del frasco de cultivo en los pases 5-6, aproximadamente a las tres semanas, se consideraron hASCs. El resto de tipos celulares de vida media más corta fueron eliminados con los sucesivos lavados.

### III. 1.2. CULTIVO DE LAS hASCs

Las células obtenidas fueron expandidas en condiciones estándar de cultivo, 37 °C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>, en una estufa *Steri-Cult CO<sub>2</sub> Incubator (Thermo Electron Corporation, USA)*. Todas las manipulaciones se realizaron en una cabina de flujo laminar, empleando medios y soluciones estériles. Los cambios de medio se realizaron cada tres días usando el medio DMEM (*Sigma*) completo, suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS, *Lonza*), previamente descomplementado a 56 °C durante 30 minutos, y solución de penicilina-estreptomina al 1% (*Sigma*).

Cuando los frascos de cultivos alcanzaron una confluencia del 80%, se realizó un pase celular para expandir y congelar células, empleando 5 ml solución de tripsina al 0,25% en PBS-EDTA para despegarlas. Pasados cinco minutos y tras comprobar que las células estaban en suspensión, la tripsina fue bloqueada con el mismo volumen de medio suplementado con suero y las células se recogieron y centrifugaron a 1.650 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Desechado el sobrenadante, las células se expandieron en un mayor número de frascos de cultivo o se congelaron.

### III. 1.3. CONTAJE CELULAR

Para determinar el número de células obtenidas, las células se despegaron y se centrifugaron a 1.650 rpm durante 5 minutos. Tras resuspender las células en medio DMEM, se diluyeron en un volumen conocido de medio y se tomó una alícuota que se mezcló con el mismo volumen de azul tripán al 0,4% (dilución 1:1) para llevarla a la cámara de Neubauer.

El cálculo se realizó con la siguiente fórmula:

$$\text{Células/ ml} = \frac{\text{Media de las células contadas por cuadrante}}{[\text{Superficie (mm}^2\text{)} \cdot \text{Profundidad de la cámara (mm)}]} \times \text{Dilución}$$

- $[\text{Superficie (mm}^2\text{)} \cdot \text{Profundidad de la cámara (mm)}] = 10^3$
- Dilución = 2 (muestra-azul tripán 1:1)

### III. 1.4. CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Una vez que se obtuvo el *pellet* celular tras la centrifugación, las células se resuspendieron y se mezclaron con medio de congelación a una densidad de  $0,5 \times 10^6$  células por ml de medio de congelación. La composición de este medio es dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma*) al 7% en FBS. El DMSO es un solvente bipolar hidrosoluble con acción crioprotectora, que protege a las células de la ruptura de su membrana por la formación de cristales de hielo y previene de la acumulación excesiva de electrolitos en el interior celular durante la congelación. Las células se repartieron en criotubos y se mantuvieron 24 horas a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  para almacenarlas después en nitrógeno líquido. Para la descongelación celular, una vez sacado el criotubo del nitrógeno, se añadió rápidamente medio DMEM para ir descongelando las células y diluyendo el DMSO, que es tóxico para ellas a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugaron las células a 1.650 rpm durante 5 minutos y tras tirar el sobrenadante, se sembraron en un frasco de cultivo con medio DMEM completo a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ .

### III. 1.5. ESTUDIO DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS POR MICROSCOPIA

Para el seguimiento del crecimiento y los cambios morfológicos experimentados por las hASCs, se empleó un microscopio invertido de contraste de fase (*Nikon TM Phase Contrast-2, ELWD 0.3*) con el que se realizaron fotografías a las células a intervalos regulares.

### III. 1.6. CARACTERIZACIÓN DE LAS hASC POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para asegurar la naturaleza de las hASCs, se estudiaron marcadores de membrana propios de células madre mesenquimales mediante citometría de flujo empleando el *FACSCanto II Cytometer (BD Biosciences)*. Las células se lavaron previamente dos veces con PBS para eliminar los restos celulares y a continuación fueron despegadas con PBS-EDTA al 0,04% durante 10 min. Para bloquear el PBS-EDTA se añadió el mismo volumen de PBS para diluirlo y se centrifugó a 1.500 rpm y temperatura ambiente durante 10 minutos. El pellet fue resuspendido en 100 µl de PBS frío al que se añadieron 900 µl de etanol frío al 70% para fijar las células. Tras el mezclado por vortex, se incubaron las células 5 minutos a 4 °C con suero humano AB para posteriormente centrifugarse a 1.500 rpm durante 10 minutos. El suero AB es utilizado como bloqueante para evitar uniones inespecíficas. Tras tirar el sobrenadante, el pellet se lavó dos veces con PBS frío y se incubó a continuación con PBS suplementado al 10% con FBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron las células a 1.500 rpm durante 10 minutos para eliminar el sobrenadante y se incubaron con el anticuerpo correspondiente 20 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, las células fueron lavadas dos veces con PBS y resuspendidas en 400 µl de PBS para analizarlas en el citómetro.

Los anticuerpos empleados (*Tabla 6*), estaban unidos a isotiocianato de fluoresceína (FICT), alofocianina (APC) y ficoeritrina (PE), y eran los siguientes:

- Marcadores propios de hASCs:
  - CD73-PE
  - CD105-APC
  - CD90-FITC

- Marcadores hematopoyéticos:
  - CD45-FITC
  - CD34-FITC
  - CD133-FITC

Tabla 6. Anticuerpos empleados en la caracterización de las MSCs por citometría.

Marcadores	Descripción	Referencias
ANTÍGENOS PROPIOS DE hASCs	CD73 BD Biosciences Ref:550257	<p>Se ha postulado como un mediador de adhesión celular en MSCs, al encontrarse co-expresado con moléculas tipo integrinas.</p> <p>(Zhao, Jiang et al. 2015);</p>
	CD105 BD Biosciences Ref:17-1057-42	<p>También conocido como endoglina, es una glicoproteína que forma parte del complejo del receptor del Factor Transformante del Crecimiento (TGF) y se expresa en un gran número de células. Interviene en la regulación de componentes de la matriz extracelular como fibronectina y colágeno, razón por la cual se cree que está relacionada con procesos de angiogénesis y reparación vascular.</p> <p>(Dizaji Asl, Shafaei et al. 2017)</p>
	CD90 BD Biosciences Ref:11-0909-73	<p>También conocida como Thy-1, es una proteína de superficie celular anclada al glicofosfatidilinositol que puede ser utilizada como marcador para una gran variedad de células madre, así como para reconocer algunos procesos axonales de neuronas maduras.</p> <p>(Kawamoto, Konno et al. 2013)</p>

ANTÍGENOS HEMATOPOYÉTICOS	CD45 MILTENYI BIOTEC Ref:130-080-202	<p>Cúmulo de diferenciación 45 o <i>cluster of differentiation 45</i> en inglés, es una proteína tirosina fosfatasa, presente en todos los leucocitos, con una mayor expresión en los linfocitos. Se expresa de manera constitutiva en todas las células hematopoyéticas y permanece de manera estable en células maduras.</p>	(Manochantr, Marupanthorn et al. 2015, Shahbazi, Safa et al. 2016)
	CD34 MILTENYI BIOTEC Ref:130-081-001	<p>CD34 o cúmulo de diferenciación 34, es una glicoproteína de 110 kDa situada en la superficie celular, que actúa como molécula de adhesión y se expresa selectivamente en las células madre precursoras de la hematopoyesis.</p>	(Yu, Hong et al. 2020)
	CD133 MILTENYI BIOTEC Ref:130-080-801	<p>El antígeno CD133, también conocido como prominina-1, es una glicoproteína expresada en células madre hematopoyéticas, células progenitoras endoteliales, glioblastoma, células madre neuronales y gliales.</p>	(Florek, Haase et al. 2005)

CONTROLES	<i>FITC</i> <i>Mouse IgG2a-FITC</i>	<i>APC</i> <i>Mouse IgG1-APC</i>	<i>PE</i> <i>Mouse IgG1-PE</i>
	Isotiocianato de fluoresceína	Aloficocianina	Ficoeritrina

Además de las células tratadas con los anticuerpos propios de linaje mesenquimal y hematopoyético, se hicieron controles de isotipo tratados con cada uno de los fluoróforos y controles sin tratar.

## III. 2. CREACIÓN DE NEUROESFERAS

### III. 2.1. FABRICACIÓN DE PLACAS DE AGAROSA Y MATRIGEL

Para la preparación de placas de agarosa (*Sigma*), ésta se disolvió en agua bidestilada a una concentración del 0,5% y se llevó a ebullición durante diez minutos para su esterilización. 100 µl de agarosa líquida fueron añadidos por pocillo a una placa de 96, que fue mantenida a continuación durante 30 minutos a 37 °C. Cuando gelificó la agarosa, se añadieron 150 µl de medio DMEM completo por pocillo.

Para la preparación de las placas de matrigel (*BD*), éste se disolvió en agua bidestilada a una concentración del 50% y 100 µl de la mezcla fueron añadidos por pocillo a una placa de 96 pocillos. Se mantuvo la placa durante 30 min a 37 °C para su gelificado y posteriormente se cubrió con 150 µl de medio DMEM completo por pocillo.

### III. 2.2. FORMACIÓN DE NEUROESFERAS

Se sembraron  $2.5 \times 10^5$  hASCs por pocillo en una placa de 6 pocillos *low attachment*, con medio DMEM/F12 suplementado con B27 (*Gibco*). Las placas se mantuvieron a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 7 días para que las células se agrupasen. Una vez formadas las neuroesferas, fueron recogidas una por una con ayuda de una pipeta de 100 µl y sembradas en las placas de 96 pocillos de agarosa o matrigel previamente preparadas. Pasadas 24 horas, pudo iniciarse la diferenciación neuronal siguiendo el mismo protocolo que para las células sembradas en monocapa (*Apartado III.1.2. Cultivo de las hASCs*).

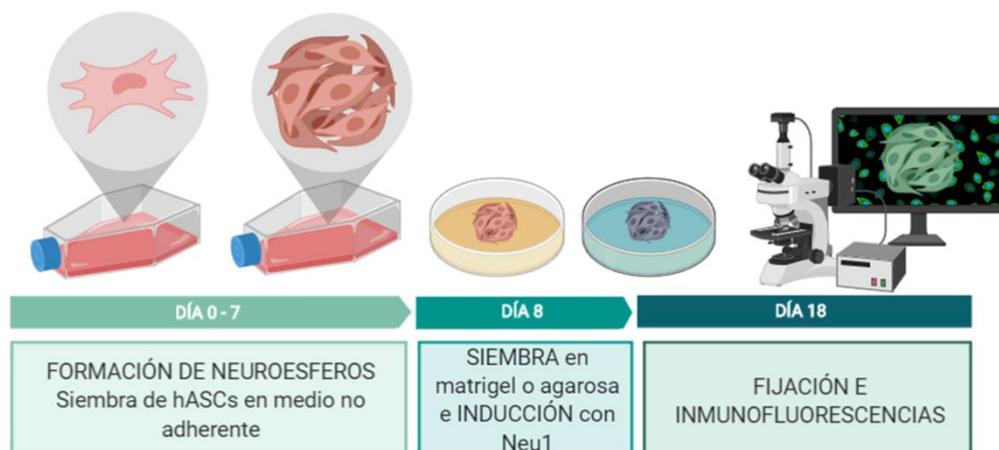


Figura 16. Esquema de la formación y diferenciación de neuroesferas.  
Figura diseñada empleando el programa BioRender.

### III. 3. DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE LAS MSCs *IN VITRO*

---

#### III. 3.1. MEDIOS NEU1, NEU2 Y NEU3

---

- **Neu1:** este medio es una modificación del empleado por Bossolasco y cols. (Bossolasco, Cova et al. 2005) cuya composición se especifica en la *Tabla 7* (Neu1). El medio se cambió cada tres días a lo largo de los 21 que se mantuvo el medio de diferenciación neuronal.

Emplea medio DMEM, que es una modificación del Basal Medium Eagle, que contiene 4 veces la concentración de aminoácidos y vitaminas original y que se suplementó con un 10% de FBS. El DMEM utiliza un sistema tampón de bicarbonato de sodio y requiere de niveles artificiales de CO<sub>2</sub> para mantener el pH necesario (Gaggi, Di Credico et al. 2020). Además, se suplementó con un 1% de penicilina-estreptomicina, controlando así una posible contaminación bacteriana (Li, Shi et al. 2011), y con un 0,001% de ciprofloxacino o ciprofloxacina (2mg/ml) que es un antibiótico de amplio espectro que paraliza la replicación del ADN bacteriano al unirse a la enzima ADN girasa, de esta forma se previno la proliferación de micoplasma, resistente a la penicilina-estreptomicina (Romorini, Riva et al. 2013).

El medio Neu1 esta suplementado con FGF, EGF y LIF. El FGF (Fibroblast growth factor) es un poderoso mitógeno que mejora la nutrición de las células madre neuronales y de células precursoras presentes en el SN maduro. Se expresa ampliamente *in vivo* y su función neuroprotectora ha sido muy estudiada (Lanzetta, Gal et al. 2003, Liu, Wang et al. 2011, Hu, Wang et al. 2013, Hu, Zhang et al. 2016, Pan, Yu et al. 2016). El EGF (Epidermal growth factor) es un polipéptido con actividad mitógena sobre diferentes tipos celulares. En el SNC su receptor se expresa en varias neuronas de la corteza cerebral, el cerebelo y el hipocampo. Se ha demostrado que actúa como un factor neurotrófico incrementando el crecimiento neuronal y su supervivencia (Kornblum, Raymon et al. 1990, Hu, Wang et al. 2013). Por su parte, LIF (Leukemia inhibitory factor) es un mediador de comunicación celular con un amplio rango de actividades biológicas que incluyen diferenciación celular, crecimiento y proliferación celular, efecto anti-apoptótico, desarrollo neuronal y embriogénesis. Desempeña sobre todo un efecto protector y

reparador en las partes distales de los axones y las placas neuromusculares (Patterson 1994, Murphy, Dutton et al. 1997, Alizadeh, Hassanzadeh et al. 2016, Chun, Soker et al. 2016).

- **Neu2:** la metodología fue una modificación del trabajo de Bae (Bae, Park et al. 2011). Las hASCs se mantuvieron en medio HAM-F12 (*Sigma*), suplementado con los ingredientes que se especifican en la *Tabla 7* (Neu2), cambiándose cada tres días durante los 15 del proceso de inducción.

Emplea medio DMEM/HAM F12, que es una mezcla 1:1 original de medio DMEM y Ham F-12 con una excepción, el piridoxal ha sido sustituido por piridoxina, mejorándose la estabilidad del medio. Es adecuado para el crecimiento de una amplia gama de tipos celulares en condiciones de suero bajo. El tampón HEPES se incluye en la formulación a una concentración final de 15 mM para compensar la pérdida de capacidad tamponante debida a la ausencia de suero (Alizadeh, Hassanzadeh et al. 2016). Este medio fue suplementado con HGF, VEGF y EGF. El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) inicialmente fue identificado como un potente mitógeno en cultivos primarios de hepatocitos, pero en la actualidad se le conocen múltiples funciones biológicas en una gran variedad de células. Este factor participa en la regeneración y supervivencia axonal de motoneuronas y astrocitos, lo que hace que tenga un gran potencial terapéutico en el tratamiento de múltiples enfermedades del SNC como isquemia transitoria, enfermedades neurodegenerativas (ELA, Alzheimer y enfermedad de Parkinson), daño del cordón espinal, retinopatía diabética y neuropatía periférica (Sun, Funakoshi et al. 2002, Kato, Funakoshi et al. 2012, Li, Yin et al. 2013). El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una proteína principalmente secretada por células endoteliales, siendo el factor más importante en el desarrollo vascular y la neovascularización. La evidencia reciente indica que el VEGF puede actuar como un factor neurotrófico y producir efectos neurogénicos en progenitores neuronales. Zhang y cols. mostraron que es un potente activador de las células progenitoras neuronales inmaduras y que podría guiar el crecimiento de los vasos sanguíneos y la migración de células madre neuronales en el cerebro de los mamíferos en desarrollo (Jin, Zhu et al. 2002, Zhang, Vutskits et al. 2003, Xie, Wei et al. 2004).

- **Neu3:** este medio de diferenciación es una modificación del utilizado por Tondreau y cols. (Tondreau, Dejeneffe et al. 2008). Las hASCs se mantuvieron en un medio

basal de progenitores neuronales (NPBM, Lonza), suplementado con los ingredientes descritos en la *Tabla 7* (Neu3) y cambiándose cada tres días durante los 10 del proceso de inducción.

Emplea medio NPBM (Neuronal Progenitor Basal Medium), que es una solución libre de suero y factores de crecimiento, que ha sido optimizada para el crecimiento y la diferenciación *in vitro* de células madre neuronales (Tondreau, Dejeneffe et al. 2008). Además, se suplementó con AMPc, NGF, insulina e IBMX. Se ha demostrado que al inducir un aumento del AMPc en células de origen neuronal, se incrementa específicamente la actividad de la tirosina hidroxilasa y de la dopamina b-hidroxilasa y se estimula el crecimiento de neuritas en las células de neuroblastoma en cultivo (Rindler, Bashor et al. 1978, Waymire, Gilmer-Waymire et al. 1978, Kao, Song et al. 2002). El NGF incrementa el número de neuroblastos si se aplica en un estadio precoz del desarrollo e incrementa el tamaño neuronal y el crecimiento de los axones del sistema simpático periférico y de los ganglios sensoriales, tanto *in vivo* como *in vitro*. También aumenta el tamaño neuronal y la producción de neurotransmisores en ganglios cuando se aplica después de que estén constituidas las sinapsis y de que hayan dejado de alargarse las prolongaciones. Se trata pues, de una proteína con una influencia profunda en el crecimiento y desarrollo neuronal. En las neuronas maduras, el NGF regula la síntesis de la norepinefrina y constituye una condición necesaria para la supervivencia y el crecimiento de las neuronas simpáticas inmaduras (Colafrancesco and Villoslada 2011, Ding, Cheng et al. 2011, Zhang, Lu et al. 2016). Los suplementos de medios libres de suero como la insulina, son esenciales para el crecimiento a largo plazo de líneas celulares de mamíferos de uso común. Cuando la insulina está ausente de los medios, las células pueden presentar alteraciones en la morfología y la tasa de crecimiento. Recientemente se ha descrito que la máxima expresión de los receptores de insulina y del factor de crecimiento insulínico (IGF) durante el desarrollo del cerebro de rata, coinciden con el período de proliferación neuronal. La insulina estimula la síntesis de proteínas, activa ciertas actividades enzimáticas en cultivos de neuronas, favorece la producción de neuritas y la adquisición de la capacidad de neurotransmisión (Tondreau, Dejeneffe et al. 2008, Ying, Hu et al. 2012). Por último, El IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) eleva los niveles de AMPc intracelular posiblemente activando la proteína quinasa A (PKA), siendo la vía PKA un mediador crucial de la diferenciación neuronal de las MSCs. Además, está implicado en la regulación de la expresión de Nurr1, que juega un papel importante

en el mantenimiento del sistema dopaminérgico del cerebro y en la fosforilación diferencial de TH (Tondreau, Dejeneffe et al. 2008, Tio, Tan et al. 2010).

Tabla 7. Composición de los medios de inducción neuronal: Neu1, Neu2 y Neu3.

<b>Medio</b>	<b>Composición</b>	<b>Referencia</b>	<b>Concentración</b>
NEU1	DMEM	SIGMA D6429	
	AB	SIGMA P0781	1%
	CIPROFLOXACIN	FRESENIUS KABI	1%
	FGF	SIGMA F0291	25 ng/ ml
	EGF	SIGMA E9644	25 ng/ ml
	LIF	SIGMA L5283	20 ng/ ml
NEU2	DMEM/HAM F12	SIGMA 8437	
	AB	SIGMA P0781	1%
	CIPROFLOXACIN	FRESENIUS KABI	1%
	HGF	SIGMA H1404	20 ng/ ml
	VEGF	SIGMA V7259	20 ng/ ml
	EGF	SIGMA E9644	10 ng/ ml
NEU3	MEDIO NPBM	LONZA 3210	
	AB	SIGMA P0781	1%
	CIPROFLOXACIN	FRESENIUS KABI	1%
	AMPc	SIGMA A9501	10 mg/ ml
	NGF	SIGMA SRP3015	25 ng/ ml
	INSULINA	SAFC 91077C	2,5 µg/ ml
	IBMX	SIGMA I7018	5 µM

### III. 4. DESDIFERENCIACIÓN DE LAS MSCs *IN VITRO*

Acabada la diferenciación neuronal, tanto en hASCs sembradas en monocapa como formando neuroesferas, se llevó a cabo la desdiferenciación celular. Para ello se retiró el medio de inducción neuronal y se reemplazó por DMEM completo durante un periodo de tiempo equivalente a la mitad del proceso de inducción, que en el caso de Neu 1 fueron diez días, en el caso de Neu2 siete y en el caso de Neu3 cinco.

### III. 5. ESTUDIO DE MARCADORES NEURONALES POR WESTERN BLOT

Para estudiar la efectividad de las diferenciaciones neuronales y las desdiferenciaciones, se analizó la expresión de las siguientes proteínas propias de linaje neuronal mediante western blot:

Tabla 8. Marcadores neuronales estudiados en la reprogramación celular de las hASCs.

<b>Tipo celular</b>	<b>Marcador</b>	<b>Características</b>	<b>Referencias</b>
CÉLULAS MADRE NEURONALES	NESTINA	Forma los filamentos intermedios y ayuda al crecimiento radial del axón.	(Baizabal and Covarrubias 2009, Li, Liu et al. 2009, Mohammad, Al-Shammari et al. 2016)
NEURONAS JOVENES	TUBULINA III (TUB-III)	Proteína globular que forma parte de los microtúbulos y está presente casi exclusivamente en neuronas.	(Kornack and Rakic 2001, Manochantr, Marupanthorn et al. 2015)
NEURONAS MADURAS	MAP-2	Se asocia con la Tubulina para formar microtúbulos durante el desarrollo de las dendritas.	(Kornack and Rakic 2001, Mu, Zhao et al. 2015)
	NEURO FILAMENTOS (NFM)	Es el componente mayoritario del citoesqueleto neuronal, aportando sostén al axón y regulando su diámetro.	(Heng, Saxena et al. 2014)
	ENOLASA (NSE)	Metaloenzima relacionada con la glicólisis del tejido nervioso.	(Hu, Guan et al. 2013, Mu, Zhao et al. 2015)
	TAU	Pertenece a la familia de proteínas asociadas con los microtubulos del citoesqueleto, estabilizándolo al unirse a monómeros de Tubulina.	(Buee, Bussiere et al. 2000, Tantrawatpan, Manochantr et al. 2013)
	TIROSINA HIDROXILASA (TH)	Está relacionada con la síntesis de catecolaminas.	(Iohara, Zheng et al. 2008, Fu, Lv et al. 2013)
ASTROCITOS	GFAP	Forma parte de las proteínas estructurales de los filamentos intermedios de las células gliales.	(Kornack and Rakic 2001, Manochantr, Marupanthorn et al. 2015, Mu, Zhao et al. 2015)

OLIGODENDROCITOS	GALC	Enzima lisosomal que degrada varios complejos lipídicos como la galactosilceramida, esencial para el mantenimiento de la vaina de mielina.	(Ara, Fekete et al. 2010)
	CHAT	Enzima transferasa responsable de la síntesis del neurotransmisor acetilcolina.	(Sun, Shao et al. 2013, Shimojo, Onodera et al. 2015)
	SNAP25	Forma un complejo que une las vesículas sinápticas con la membrana plasmática.	(Sun, Shao et al. 2013)
MARCADORES FUNCIONALES	SCN9A y SCN8A	Son responsables de iniciar la despolarización de membrana durante la generación del potencial de acción.	(Akin, Sole et al. 2015, Li, Liu et al. 2015)
	FOXO-4	Los factores de transcripción de la familia FOXO son los efectores aguas abajo de la vía de señalización del factor de crecimiento similar a la insulina, necesario en la diferenciación neuronal de SCs.	(Vilchez, Boyer et al. 2013)

### III. 5.1. OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las células se lavaron 3 veces con PBS para eliminar posibles restos celulares o de medio que pudieran interferir en la técnica. Posteriormente, se despegaron con PBS-EDTA al 0,04% durante 5 min a 37 °C y se resuspendieron después en el mismo volumen de PBS para bloquear la actividad del EDTA. A continuación, se centrifugaron durante 10 min a 1.800 rpm para recoger el máximo número posible de células. Desechado el sobrenadante, el *pellet* se resuspendió en solución de extracción de proteínas (*Tabla 9*) a 4 °C, para posteriormente guardarse a -20 °C hasta su posterior cuantificación.

*Tabla 9. Componentes de la solución de extracción de proteínas.*

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>	<b>pH</b>
TRIZMA BASE	0,302 g	6,8
SACAROSA	4,29 g	
EDTA	0,073 g	7,4
TRITON X100 0,5%	250 µl	

Para determinar la concentración de proteínas de las muestras, se procedió a sonicarlas en frío para posteriormente cuantificarlas mediante el método de Bradford. Se empleó una curva patrón de albúmina de suero bovino (*Sigma*) de concentraciones conocidas (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 5 µg/ml y 10 µg/ml). Para la cuantificación se empleó una placa de 96 pocillos de fondo plano, en la que se pusieron por pocillo 5 µl de muestra y 280 µl de reactivo Bradford (*Bio-Rad Laboratories*), incubándose 10 minutos en oscuridad. Se realizó un control negativo empleando PBS en lugar de muestra. A continuación, la absorbancia de la placa se leyó en el espectrofotómetro *Multiskan EX de Thermo Fisher Scientific*, empleando el programa *Ascent Software* a una longitud de onda de 570 nm.

### III. 5.2. PREPARACIÓN DEL GEL SDS-PAGE

La técnica de western blot empleada fue la SDS-PAGE (*SDS-polyacrilamide gel electrophoresis*). Es una electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida, realizada en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS). El SDS desnaturiza la muestra y envuelve las proteínas de cargas netas negativas facilitando su separación. La migración de las proteínas se produce una vez han perdido su estructura tridimensional, permitiendo que su movilidad dependa únicamente de su carga y su tamaño.

En la *Tabla 10* se especifica la composición de los *buffers*, tanto el inferior o *Running buffer*, por el que migran las proteínas en función de su peso molecular, como el superior o *Stacking buffer*, que se encarga de agrupar las proteínas para que la migración de todos los pocillos se produzca al mismo tiempo:

*Tabla 10. Composición de los geles y los buffers empleados en el western blot.*

<b>Reactivos de los geles</b>	<b>Running 7,5%</b>	<b>Stacking</b>
ACRILAMIDA (ml)	3	0,64
AGUA BIDEDESTILADA (ml)	6	3,05
<i>RUNNING BUFFER 4X</i> (ml)	3	-
<i>STACKING BUFFER 4X</i> (ml)	-	1,25
APS 10% (µl)	60	25
TEMED (µl)	3	5
VOLUMEN TOTAL (ml)	12,063	5,015

- RUNNING BUFFER 4X: 1,5 M tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), 10% SDS en agua destilada, pH 8,8.
- STACKING BUFFER 4X: 0,5 M TRIS, 10% SDS en agua destilada, pH 6,8.

### III. 5.3. PREPARACIÓN Y CARGA DE MUESTRAS

Las proteínas se mezclaron con tampón de carga 6X (*Tabla 11*) y se calentaron durante 5 min a 95 °C para facilitar la acción del SDS. El volumen final fue de 24 µl por muestra, incluyendo 4 µl de tampón de carga y completando con agua bidestilada hasta ese volumen.

*Tabla 11. Componentes del tampón de carga 6X.*

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>	<b>pH</b>
TRIS-Cl	0,373 mM	6,8
SDS	12%	
β-MERCAPTOETANOL	30%	
GLICEROL	2 ml	
AZUL DE BROMOFENOL	0,1%	

### III. 5.4. ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA

Los geles se dispusieron en la cubeta de electroforesis (*Bio-Rad*) que se rellenó con *Running buffer*. Se empleó un marcador de pesos moleculares (*Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad*) y el voltaje empleado fue de 120 mA de forma constante durante aproximadamente una hora, hasta que el frente de banda alcanzó el borde inferior del gel. La transferencia se realizó utilizando el equipo *Trans blot SD semi-dry transfer cell (Bio-Rad)* a 20 V y 0,1 A durante 35 min.

## III. 5.5. BLOQUEO E INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS

Una vez que las proteínas del gel habían sido transferidas a la membrana de nitrocelulosa, ésta se sometió a un bloqueo de los sitios inespecíficos de unión del anticuerpo primario. Para ello se sumergió durante una hora en una solución de bloqueo con PBS-Tween 20 al 0,1%, suplementado con un 5% de leche desnatada en polvo y se mantuvo en agitación. A continuación, se lavó la membrana tres veces durante 5 min con PBS-Tween al 0,1%, para posteriormente añadirle el anticuerpo disuelto en solución de bloqueo a la dilución recomendada por el fabricante.

A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C y en agitación. Pasado ese tiempo se procedió a lavar la membrana tres veces durante 5 min, en agitación y temperatura ambiente con PBS-Tween 0,1% para eliminar posibles restos de anticuerpo primario. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario disuelto en solución de bloqueo y se mantuvo durante 1 hora en agitación suave y temperatura ambiente. Los anticuerpos empleados y sus diluciones se especifican en la *Tabla 12*.

Finalmente, para detectar la presencia de la proteína de interés en la membrana se empleó quimioluminiscencia. Para ello se utilizó el equipo *LAS-4000 mini (GE Healthcare)* y se incubó la membrana durante 5 min en oscuridad con la solución *Pierce ECL Plus (Termo Fisher)*. El análisis y cuantificación de las bandas se llevó a cabo con el programa *Imagej*.

*Tabla 12. Anticuerpos primarios usados en western blot.*

<b>Anticuerpo</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>	<b>Tipo de marcaje</b>	<b>Dilución</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>
NESTINA	SANTA CRUZ	sc-23927	NEURONAL INMADURO	1:500	190-200
TUB III	CHEMICAL MILLIPORE	mab1637	NEURONAS MADURAS	1:1000	55
NSE	SANTA CRUZ	sc-51882	NEURONAS MADURAS	1:400	48
TAU	ABCAM	ab3931	NEURONAS MADURAS	1:100	60
MAP2	SANTA CRUZ	sc-74421	NEURONAS MADURAS	1:500	280
NFM	CHEMICAL MILLIPORE	05744	NEURONAS MADURAS	1:800	150
TH	SIGMA	T2928	NEURONAS DOPAMINÉRGICAS	1:4000	60-68

CHAT	SANTA CRUZ	sc-55557	FUNCIONAL	1:400	69-82
SNAP25	SANTA CRUZ	sc7538	FUNCIONAL	1:400	25
FOXO4	SIGMA	sab4501887	FUNCIONAL	1:100	53
GALC	CHEMICAL MILLIPORE	mab342	OLIGODENDROCITOS	1:500	55
GFAP	SANTA CRUZ	sc-58766	CÉLULAS GLIALES	1:500	50
SCN8A	ABCAM	114304	FUNCIONAL	1:200	33
Hoxa-5	ABCAM	ab180229	FUNCIONAL	1:500	30

Tabla 13. Anticuerpos secundarios usados en Western blot.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>	<b>Conjugación</b>	<b>Color y dilución</b>
ANTI-MOUSE IgG	SANTA CRUZ	SC-2005	HRP ( <i>horseradish peroxidase conjugated secondary antibody</i> )	Verde (1:2500)

### III.6. ANÁLISIS DE MARCADORES PROTEICOS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA

Una vez finalizadas las distintas diferenciaciones y desdiferenciaciones neuronales, se procedió a la localización celular mediante inmunofluorescencia de los mismos marcadores, propios de linaje neuronal, estudiados anteriormente por western blot.

#### III. 6.1. FIJACIÓN DE PLACAS Y CHAMBER

Para mantener las células en sus lugares originales e impedir su degradación, se empleó un método de fijación químico con metanol, que fija por deshidratación y coagulación de proteínas, sobre todo las citosólicas. Tras probar distintos métodos de fijación, el metanol fue seleccionado frente al etanol, la acetona o el glutaraldehído, por aportar una mejor preservación, carecer de efecto mordiente y crear mayor número de poros en la membrana celular, ayudando a la internalización del anticuerpo.

Para fijar las células en cultivo, se retiró el medio de las placas o *chamber* con cuidado y se lavaron dos veces con PBS, asegurándose de que no quedasen restos celulares al finalizar. Seguidamente se añadió una cantidad suficiente de metanol a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para cubrir el pocillo y se introdujeron las placas o *chamber* en el congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 min. Pasado este tiempo se lavó tres veces con PBS-Tween para eliminar los restos de metanol y se añadió PBS estéril hasta cubrir el pocillo.

### III. 6.2. PERMEABILIZACIÓN Y BLOQUEO

Para permeabilizar aún más la membrana de las hASCs fijadas, se empleó el detergente Tritón X-100. Se retiró el PBS de los pocillos y se añadió una solución de PBS-Tritón al 0,1% hasta cubrir toda la superficie. Pasados 10 min se retiró esta solución y se añadió solución de bloqueo (*Tabla 14*) que se mantuvo durante 1 hora en agitación y temperatura ambiente, para a continuación hacer 3 lavados de 5 min con PBS-Tween.

*Tabla 14. Componentes de la solución de bloqueo para inmunofluorescencia.*

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
GOAT SERUM	500 $\mu\text{l}$
TWEEN-20 0,1%	9,5 ml
TRITÓN X-100	30 $\mu\text{l}$

### III. 6.3. INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS

Las hASCs fijadas se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a continuación se lavaron 3 veces durante 5 min con PBS-Tween al 0,1% y se añadió el anticuerpo secundario disuelto en solución de bloqueo a la concentración recomendada por el fabricante. El anticuerpo secundario permaneció en agitación y oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente, para posteriormente lavarse del mismo modo que el primario. Los anticuerpos empleados y sus diluciones están recogidos en las *Tablas 15 y 16*.

Finalmente, se procedió a teñir los núcleos celulares con el marcador fluorescente Hoechst a una concentración 1:1000. Para observar las muestras y tomar las imágenes se utilizó un microscopio *Nikon Eclipse 50i* (*Nikon Instruments Inc, Melville, NY*) y para el montaje de las fotografías se empleó el programa *Imagej*.

Tabla 15. Anticuerpos primarios usados en inmunofluorescencias.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>	<b>Tipo de marcaje</b>	<b>Dilución</b>	<b>Localización</b>
NESTINA	SANTA CRUZ	sc-23927	NEURONAL INMADURO	1:100	INTRACELULAR
TUB III	CHEMICAL MILLIPORE	mab1637	NEURONAS MADURAS	1:200	INTRACELULAR
NSE	SANTA CRUZ	sc-51882	NEURONAS MADURAS	1:100	INTRACELULAR
TAU	ABCAM	ab3931	NEURONAS MADURAS	1:50	INTRACELULAR
MAP2	SANTA CRUZ	sc-74421	NEURONAS MADURAS	1:500	INTRACELULAR
NFM	CHEMICAL MILLIPORE	05744	NEURONAS MADURAS	1:100	INTRACELULAR
TH	SIGMA	T2928	NEURONAS DOPAMINÉRGICAS	1:2500	INTRACELULAR
CHAT	SANTA CRUZ	sc-55557	FUNCIONAL	1:200	INTRACELULAR
SNAP25	SANTA CRUZ	sc7538	FUNCIONAL	1:200	INTRACELULAR
FOXO4	SIGMA	sab4501887	FUNCIONAL	1:200	INTRACELULAR
GALC	CHEMICAL MILLIPORE	mab342	OLIGODENDROCITOS	1:50	MEMBRANA
GFAP	SANTA CRUZ	sc-58766	CÉLULAS GLIALES	1:50	INTRACELULAR
SCN9A	ABCAM	114304	FUNCIONAL	1:50	INTRACELULAR
N-CADHERINA	SANTA CRUZ	sc-7939	FUNCIONAL: UNIONES CELULARES	1:40	INTRACELULAR
VIMENTINA	SANTA CRUZ	sc6260	CITOESQUELETO	1:50	INTRACELULAR
Hoxa-5	ABCAM	ab82645	FUNCIONAL	1:500	INTRACELULAR

Tabla 16. Anticuerpos secundarios usados en inmunofluorescencias.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>	<b>Conjugación</b>	<b>Color y dilución</b>
GOAT ANTI-MOUSE IgG	LIFE-TECHNOLOGIES	A11001	Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L)	Verde (1:2500)
GOAT ANTI-RABBIT IgG	THERMOFISHER	A11011	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	Rojo (1:2500)

### III. 7. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE GENES MEDIANTE *REAL TIME PCR*

---

Tras finalizar el proceso de diferenciación y desdiferenciación neuronal, se procedió al estudio de expresión de genes propios del linaje neuronal empleando *Real Time PCR*.

#### III. 7.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN CELULAR

---

Para obtener el ARN de las muestras celulares se empleó el kit de extracción *RNAQiagen Mini Kit*, combinándolo con la técnica del trizol-cloroformo. Brevemente:

- (i) Las células se despegaron con PBS-EDTA durante 5 min a 37 °C después de haber sido lavadas con PBS dos veces. A continuación, se centrifugaron a 1.800 rpm durante 5 min y se congeló el *pellet* resuspendido en 800 µl de trizol por frasco de 75 cm<sup>3</sup>, pudiendo permanecer durante semanas a -80 °C.
- (ii) En el momento de procesarse, las muestras se descongelaron en hielo y se pasaron por una jeringa de insulina 15 veces aproximadamente para homogeneizarlas de forma mecánica y favorecer la ruptura celular. A continuación, se añadieron 350 µl de cloroformo por cada 800 µl de trizol, se mezclaron bien y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente.
- (iii) Para separar las muestras por fases, se centrifugaron 15 min a 4 °C, distinguiéndose después una fase acuosa superior donde se encontraba el ARN, que fue recogido cuidadosamente para no mezclarlo con otras fases.
- (iv) A continuación, se añadieron 500 µl de etanol absoluto antes de ponerlo todo en la columna de extracción. Se centrifugó 1 min a 10000 rpm y 4 °C, quedando el ARN retenido en la membrana de la columna, que se lavó con 700 µl de *buffer* AW1 y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones descritas.
- (v) Tras eliminar el eluato, se añadieron 500 µl del *buffer* de lavado RPE y se centrifugó de la misma forma, repitiendo este paso dos veces.
- (vi) Para finalizar, se centrifugó la columna vacía y abierta para evaporar los posibles restos de etanol que pudieran quedar, se eluyó el ARN añadiendo 25 µl de agua bidestilada libre de RNasas y centrifugando 1 min a máxima velocidad. Las muestras fueron almacenadas a -80 °C.

La concentración de la muestra fue cuantificada empleando el *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific*). Para verificar la calidad del ARN extraído, se cargaron 100 ng en un gel de agarosa al 1% con *SYBR Safe* (*Thermo Fisher*) y las muestras se corrieron a 150 V durante 15 min. Se empleó un transiluminador (*Bio-Rad*) para visualizar el gel. Se consideró un ARN de calidad cuando aparecían dos bandas: una de mayor peso molecular que pertenecía al ARN genómico y otra de menor peso que pertenecía al plasmídico.

### III. 7.2. OBTENCIÓN DE ADNc A PARTIR DE ARN MEDIANTE RETRO-TRANSCRIPCIÓN

Para obtener ADN complementario (ADNc) a partir del ARN obtenido, se empleó el kit *M-MLV Reverse Transcriptase* (*Sigma*) que utiliza 1 µg de ARN en la reacción (*Tablas 17 y 18*). Siguiendo las indicaciones del fabricante se hizo primero una mezcla con los dNTPs, el oligo(dT) y el ARN, y se completó con agua libre de RNasas hasta 10 µl. Se hizo entonces un primer ciclo de 70 °C y 10 min en el termociclador. Se añadió a continuación el *buffer*, la enzima retro-transcriptasa y el inhibidor de RNasas, completándose el volumen hasta 20 µl con agua libre de RNasas, y la muestra se sometió a un segundo ciclo a 37 °C durante 50 min y a 85 °C durante 5 min. Finalmente se añadió 1 µl de RNasa H y se mantuvo durante 20 min a 37 °C. El ADNc resultante se conservó a -20 °C hasta su utilización.

Tabla 17. Componentes de la Real Time PCR.

Ciclo RT	Componente	Concentración
1º	DNTPs	10 Mm
	Oligo(dT)	5 µM
	ARN	2 µg
	VOLUMEN TOTAL	10 µl
2º	M-MLV <i>buffer</i>	1X
	M-MLV enzima	0,5 µl
	Inhibidor RNasa	40 unid/µl
	VOLUMEN TOTAL	20 µl
3º	RNasa H	1 µl
	VOLUMEN TOTAL	21 µl

Tabla 18. Condiciones de la Real Time PCR.

Tª (°C)	Tiempo (min)
70	10
4	Infinito
37	50
4	Infinito
37	20
4	Infinito

III. 7.3. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE ARNm MEDIANTE *REAL TIME PCR*

Para realizar la *Real Time PCR* se emplearon 2  $\mu$ l del ADNc por muestra, que se cargaron en placas de 96 pocillos para termociclador y a los que se añadió 10  $\mu$ l de la *master mix*, compuesta por los *primers* 10X, el *SYBR Green* (Takara) y el agua bidestilada. Se utilizó GADPH como control endógeno. Los genes amplificados y las temperaturas de hibridación (*annealing*) están recogidos en la *Tabla 19*.

*Tabla 19. Primers usados y Tm empleadas en las Real Time PCR.*

Gen	Secuencia Sentido	Tm	Secuencia Antisentido	Tm
SCN9A	5'-CTTCATCTATGGGGACATTC	58,4	5'-GTCTTTTTGTCTGCATAGTAGG	57,2
SNP25	5'-AAGGCTGATTCCAACAAAAC	60,6	5'-GAAAAGCATGAAGGAGCTATC	59,5
TUB III	5'-GCGTCTACTACAACGAGG	55,8	5'-ACTCTGACCAAAGATGAAATTG	59,7
NESTINA	5'-CACCTCAAGATGTCCCTC	58,0	5'TGGGGTCCTGAAAGC	59,7
CHAT	5'-TCAGTTCTTTGTCTTGGATG	57,8	5'-TGGAAGCCATTTTGACTATC	59,2
GFAP	5'-GCAGATTCGAGAAACCAG	58,4	5'-CACATCACATCCTTGTGC	58,5
MAP2	5'-GAAGATTTACTTACAGCCTCG	57,2	5'-GGTAAGTTTTAGTTGTCTCTGG	56,2
FOXO4	5'-GATATGTATATGGAGAACCCTGG	56,5	5'-AGAGTAGATATGAACACGCC	55,8
NFM	5'-GCTGCGTACAGAAAACCTC	56,0	5'-CCTGGGTTTCTGAATCTTAC	59,1
GALC	5'-ATATGCTTTAGGACGTGTTG	56,8	5'-GAGGTGAAATGACCCTTAATAG	58,2

La expresión de cada gen se calculó como:

$$\Delta Ct = \text{valor } Ct \text{ medio (ARNm de referencia)} - \text{valor } Ct \text{ medio (ARNm de interés)}$$

La normalización de cada muestra se hizo comparándola con la expresión del gen endógeno, correspondiendo la expresión de cada gen al valor de  $2^{\Delta Ct}$ .

### III. 8. ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR

---

La capacidad de las hASCs para migrar hacia un tejido neuronal dañado fue evaluada con un ensayo de migración usando placas *Transwell* de 24 pocillos con filtro de 8  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (*Corning*). Se comparó la capacidad migratoria de hASCs sembradas en monocapa frente a las sembradas formando neuroesferas, con o sin diferenciación neuronal, hacia células SH-SY5Y de neuroblastoma. Las células fueron sembradas en medio DMEM rico en glucosa y en medio pobre en glucosa, como describieron previamente Mukai y cols. (Mukai, Nagamura-Inoue et al. 2016). Brevemente, las hASCs sembradas en monocapa o en neuroesferas fueron tratadas con el medio de inducción Neu1 desde una semana antes del comienzo del experimento. El primer día del experimento, las células SH-SY5Y fueron sembradas a una densidad de 10.000 células/pocillo en los pocillos inferiores de la placa *Transwell* en medio DMEM normal (4,5 mg/ ml de glucosa) o en medio pobre en glucosa (1 mg/ ml) (*GE Healthcare Life Sciences*), y mantenidas a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Pasadas 24 horas, las hASCs fueron sembradas en la cámara superior de la placa *Transwell* a una concentración de  $5 \times 10^4$  células/pocillo, permaneciendo de nuevo toda la noche en las mismas condiciones. Las neuroesferas fueron disgregados mecánicamente con mucha suavidad pipeteando repetidas veces antes de contabilizar y sembrar las células individualizadas. Para cada tratamiento se realizaron tres réplicas.

Transcurridas 24 horas, las células que no habían migrado a través del filtro fueron retiradas cuidadosamente con un hisopo de algodón y los filtros fueron fijados con paraformaldehído al 4% durante 20 min y teñidos con Hoechst (*Sigma*). Ocho campos elegidos al azar fueron contabilizados en cada tratamiento usando para ello un microscopio de fluorescencia a 10 aumentos (*Nikon Eclipse E400*).

### III.9. ENSAYO DE INTERACCIÓN CON CÉLULAS DEL ENDOTELIO

---

En la adaptación de las hASCs diferenciadas *in vitro* al microambiente del paciente una vez trasplantadas, es vital su interacción con otros tipos celulares. Para estudiar la importancia del tejido endotelial en este proceso, se realizó un experimento con hASCs y células endoteliales de la vena del cordón umbilical (HUVECs).

Para ello se sembraron células HUVECs en pase dos en el medio *Endothelial Cell Growth* (Lonza, CC-3156), compuesto por los siguientes factores:

- Gentamicina sulfato-anfotericina B (0,1%)
- Heparina (0,1%)
- Factor de crecimiento de fibroblastos-B (0,4%)
- Factor de crecimiento endotelial vascular humano (0,1%)
- Hidrocortisona (0,04%)
- Ácido ascórbico (0,1%)
- Suero bovino fetal (2%)
- Factor de crecimiento 1 similar a insulina (0,1%)
- Factor de crecimiento epidérmico humano (0,1%)

Una vez que se tuvo el número de células necesario, se sustituyó el medio por DMEM estándar durante tres días, para evitar que los factores del medio endotelial interfiriesen posteriormente con el proceso de diferenciación neuronal. Este medio DMEM fue recogido a los tres días y filtrado a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  para evitar la presencia de células o restos celulares. Al mismo tiempo, se sembraron hASCs en placas de 24 pocillos a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/pocillo (*Figura 17*). A los dos días, se sustituyó el medio DMEM en el que fueron sembradas las hASCs, por el medio retirado a las HUVECs suplementado con los factores del medio de diferenciación Neu1, a las mismas concentraciones que las descritas en el *Apartado III.3.1. Medios Neu1, Neu2 y Neu3*. Este medio de diferenciación neuronal se sustituyó cada tres días. A los ocho días de experimento, la mitad de las placas fueron fijadas con metanol frío siguiendo la metodología anteriormente descrita en el *Apartado III.6.1 Fijación de placas y chamber*, y la otra mitad continuaron en cultivo, sustituyéndose el medio de HUVECs suplementado por medio de diferenciación Neu1 normal. Pasados ocho días más, en los que se sustituyó el medio Neu1 cada tres días, se fijaron las placas de igual forma. Se hizo un control con placas de hASCs sembradas a la misma concentración pero mantenidas solo con medio Neu1 hasta el octavo y el catorceavo día, en los que fueron fijadas. Cada dos días las células fueron fotografiadas para documentar los cambios morfológicos, en el microscopio *Nikon Eclipse E400* a 10 aumentos.

A continuación se realizaron inmunofluorescencias para los marcadores neuronales estudiados anteriormente, empleando la misma metodología que la descrita en el *Apartado III.6. Análisis de marcadores proteicos mediante inmunofluorescencia.*

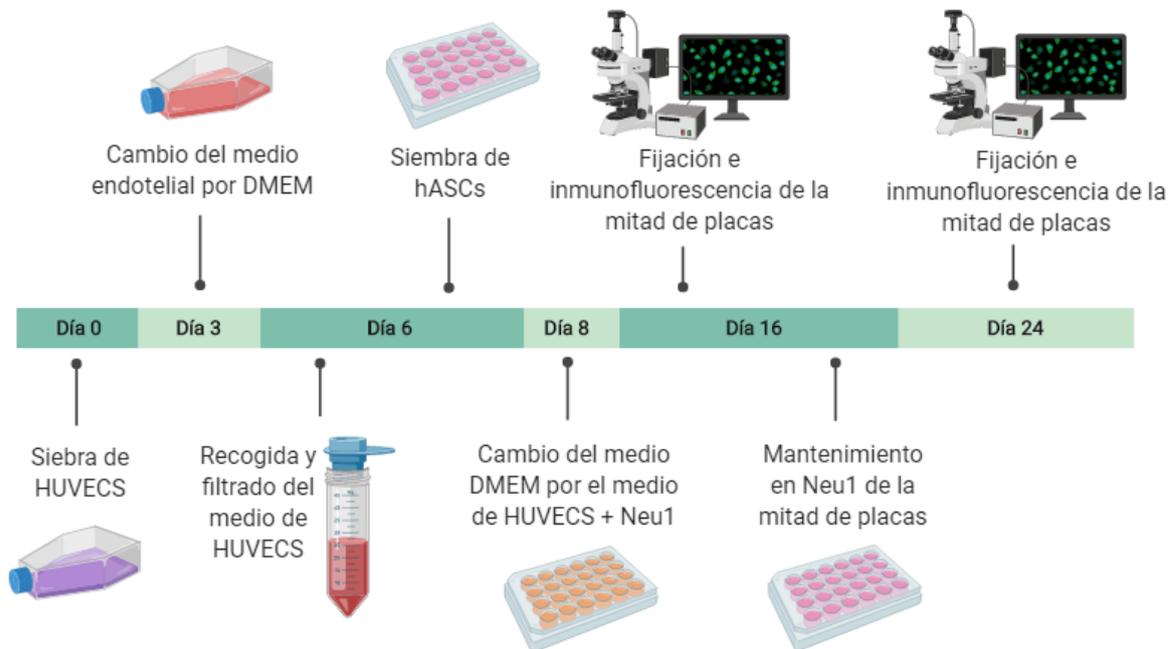


Figura 17. Esquema de los pasos seguidos en el experimento realizado con HUVECS. Figura diseñada empleando el programa BioRender.

### III.10. ESTUDIOS EPIGENÉTICOS: ANALISIS DEL METILOMA Y TRANSCRIPTOMA

La firma epigenética influye en el potencial de diferenciación de las células madre adultas y los genes específicos de linaje son regulados epigenéticamente. En este estudio se propuso realizar un análisis de alto rendimiento usando *arrays* de metilación de una población de hASC bien caracterizada, antes y después de la inducción neuronal *in vitro*, que permitiera identificar los cambios en la metilación del ADN durante el proceso de diferenciación.

### III.10.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN CELULAR

Para la extracción del ADN celular, las células se lavaron dos veces con PBS para a continuación despegarse con PBS-EDTA al 0,04% durante 3 min tal como se ha descrito anteriormente. El PBS-EDTA se bloqueó con el mismo volumen de PBS y las células se centrifugaron a 1.650 rpm durante 5 min. Para la extracción se empleó el kit *DNA Qiagen Mini (Qiagen)* y se siguieron las indicaciones del fabricante. El pellet celular se incubó durante 15 min a 56 °C con 20 µl de proteinasa K y 200 µl de *buffer* de lisis. Para retener los ácidos nucleicos en la columna del kit de extracción, se añadieron 200 µl de etanol absoluto a la membrana para favorecer su precipitación. Una vez vertida la mezcla en la columna, ésta se centrifugó durante 1 min a 8.000 rpm y temperatura ambiente. Tras eliminar el eluato, la columna se lavó primero con 500 µl del *buffer* AW1 y, tras centrifugar en las mismas condiciones anteriores, se hizo un segundo lavado con 500 µl del *buffer* AW2. La columna vacía y abierta se centrifugó una vez más, antes de eluir la muestra para evaporar restos de etanol presentes. Finalmente se eluyó el ADN añadiendo 25 µl de agua bidestilada ligeramente tibia, incubando la membrana durante 2 min y centrifugando a continuación 1 min a 10000 rpm. El ADN se cuantificó en NanoDrop y se almacenó a -80 °C.

### III.10.2. ANALISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA GLOBAL POR *MICROARRAY*

El análisis de expresión génica global del ADN por *microarray* fue llevado a cabo en el Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge, Barcelona, (IDIBELL) dirigido por el Dr. Manel Esteller y con especial colaboración de la Dra. María Berdasco. Se aplicó el sistema *HumanMethylation2 BeadChip Infinium Methylation Arrays (Illumina)* a todas las muestras de ADN. Se disponía de muestras tanto de células madre mesenquimales normales como de células previamente inducidas a linaje neuronal empleando los medios Neu1, Neu2 y Neu3. Se analizaron 27.578 islas CpG, llegando a estudiarse 14.495 genes con una resolución de metilación de un solo nucleótido. Las secuencias incluidas en el panel de estudio procedían del *National Cancer for Biotechnology Information (NCBI): "Consensus coding sequence database" (Genome Build 36)*.

Para realizar el *array* de metilación, todas las muestras fueron convertidas primero con la técnica del bisulfito, que se explica posteriormente, y a continuación purificadas. Se aplicó entonces el sistema *BeadChips* (*Illumina*), que hibrida las moléculas de ADN amplificadas con sondas ADN-específicas, existiendo para cada *locus* CpG dos sondas capaces de reconocer el estado metilado o no metilado. Esta fase de unión se continúa con otra de extensión simple usando dinitrofenilo y dNTPs marcados con biotina. Se continúa con un escaneo de la placa de *array* que determina la intensidad de señal de zonas metiladas y no metiladas. Los valores de cada *locus* CpG son registrados por el *Software BeadStudio* (*Illumina*) y están comprendidos entre 0 y 1, siendo el 0 completamente desmetilado y el 1 completamente metilado.

### III.10.3. SELECCIÓN DE GENES CANDIDATOS

Tras estudiar los datos bioinformáticos aportados por los *arrays*, se seleccionaron los genes más diferencialmente metilados con respecto al control, cuya actividad estaba relacionada con el proceso de diferenciación neuronal o con la neurogénesis en general. Una secuencia fue clasificada como hipo- o hipermetilada cuando al menos un 70% de las muestras de cada categoría tuvieron un valor de beta menor o mayor de 0,25 con respecto al control no inducido.

### III.10.4. CONVERSIÓN DEL ADN MEDIANTE BISULFITO SÓDICO Y SECUENCIACIÓN

Para corroborar los resultados obtenidos por los *arrays*, se procedió a estudiar el estado de metilación de los promotores de cada gen candidato mediante una secuenciación tipo Sanger de las muestras transformadas con bisulfito sódico ( $\text{NaHSO}_3$ ). La incubación del ADN de estudio con bisulfito sódico, da lugar a la conversión de los residuos no metilados de citosina en citosina sulfonada, manteniendo las citosinas metiladas en su estado natural. Posteriormente, las citosinas sulfonadas se desaminan dando como resultado un uracilo sulfonado. En presencia de condiciones alcalinas, alcanzadas gracias al *desulfonation buffer*, este uracilo es desulfonado, rindiendo finalmente un uracilo simple.

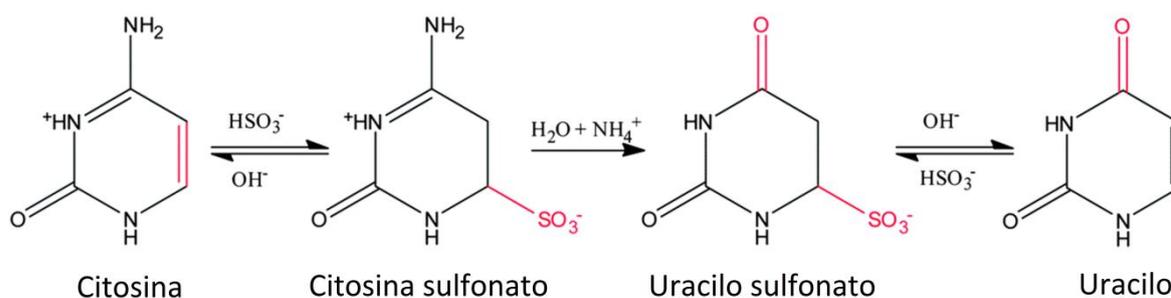


Figura 18. Tratamiento de ADN con bisulfito sódico.

Esquema de las tres etapas de la transformación de las citosinas desmetiladas en uracilos: sulfonación, desaminación y desulfonación (Saheb, Patterson et al. 2014).

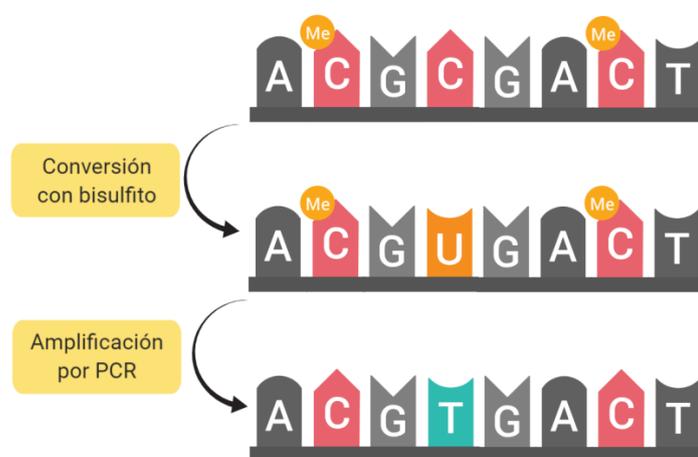


Figura 19. Transformación de ADN con bisulfito según su estado de metilación. Figura modificada de EpiGentek.

Se empleó ADN de células madre mesenquimales normales, células inducidas a linaje neuronal mediante Neu1, Neu2 o Neu3 y células que habían sido desdiferenciadas. Para la transformación del ADN con bisulfito se utilizó el kit *EZ-96 DNA Methylation* (Zymo Research) en una placa de 96 pocillos, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se necesitó 1  $\mu\text{g}$  de ADN por muestra, diluido en agua hasta 45  $\mu\text{l}$ , al que se le añadieron 5  $\mu\text{l}$  de *M-Dilution*. Se incubó entonces la placa a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 15 min para a continuación añadirle 100  $\mu\text{l}$  de *CT Convesion Reagent* por pocillo. Se volvió a incubar a 50  $^{\circ}\text{C}$  en oscuridad durante 16 horas y se mantuvo después a 4  $^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Seguidamente se añadieron 400  $\mu\text{l}$  de *M-Binding Buffer* a cada muestra, y se transfirieron al *Binding Plate* donde se centrifugaron a 3.000 g durante 5 min, descartando el eluato. Se añadieron 400  $\mu\text{l}$  de *M-Wash Buffer* y volvió a centrifugarse de igual modo. A continuación, se cargaron 200  $\mu\text{l}$  de *M-Desulphonation Buffer* a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min, para centrifugarse después 5 min a 3.000 g. Se hicieron dos lavados con 500  $\mu\text{l}$  de

*M-Wash Buffer* con una centrifugación intermedia. Para finalizar, se centrifugaron las columnas para evaporar posibles restos de las soluciones de lavado y se eluyó el ADN en 20 µl de agua libre de RNasas.

### III.10.5. AMPLIFICACIÓN DEL ADN TRANSFORMADO POR PCR

Para estudiar el estado de metilación de las muestras tratadas con bisulfito, se amplificaron las secuencias de interés por PCR simple para cortar y purificar las bandas y en última instancia clonarlas en bacterias. En la *Tabla 20* se muestran los *primers* diseñados para la amplificación de los genes candidatos creados con el programa *Methyl Primer Express V.1*.

*Tabla 20. Primers empleados en las PCR tras la transformación con bisulfito.*

<b>Gen hipometilado</b>		<b>Secuencia</b>	<b>Tm</b>
FGFR1	Sentido	5'-GGAAAGTTGAAATTTAAGGGAA-3'	59,9
	Antisentido	5'-ACCCTTCTCTCCTACAACCTA-3'	59,7
GRM4	Sentido	5'-GAGGGTAAGTTTTGTGGAGAAT-3'	59,9
Hoxa-5	Antisentido	5'-ACCAACCAAAACACTAACCTTAA-3'	60,2
	Sentido	5'-TTAAAAAATAAATGAGTTTTTATTTTG-3	57,0
<b>Gen hipermetilado</b>		<b>Secuencia</b>	<b>Tm</b>
EN1	Sentido	5'-GGTAATTGGTTTTGGGGTTATT-3'	61,4
	Antisentido	5'-AACCTAACTATTTTACACCCCA-3'	61,2
METRN	Sentido	5'-GTTGTAGTTGGAGGGGTAGGTA -3'	60,7
	Antisentido	5'-AACCR AATAACAACCACTCAAC-3'	55,0
Pax-9	Sentido	5'-AGGGTTTTTGGAGTTTAATGGA-3	62,3
	Antisentido	5'-ACCAACCACTAACCAACACAAAC-3'	62,5
RETL1	Sentido	5'-TGTATGGGGGGTATTGAAATTT-3'	62,7
	Antisentido	5'-AACTCCCATACCCCAAAAAAAC-3'	62,6

La PCR se realizó para cada muestra empleando 1,2 µl de ADN pretratado con bisulfito, al que se le añadieron 14 µl de *Master mix*. Los componentes de la *Master mix* para 10 muestras y los ciclos de la PCR se muestran en las *Tablas 21 y 22*.

Tabla 21. Componentes de la PCR para los genes seleccionados.

Reactivos	Cantidad
BUFFER 10X	15 µl
MgCl	6 µl
dNTPs (2 mM)	15 µl
PRIMERS (100 mM)	0,8 µl
TAQ POLIMERASA	0,6 µl
H <sub>2</sub> O	104 µl

Tabla 22. Ciclos de la PCR de secuenciación.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	7'	1
94 °C	30''	30
59 °C	30''	30
72 °C	30''	30
72 °C	10''	1
4 °C	infinito	1

El producto de la PCR se corrió en un gel de agarosa al 2% con *SYBR Safe*, durante 15 min a 150 V. Las secuencias amplificadas tenían un tamaño comprendido entre 300 y 500 pb y al finalizar, las bandas fueron visualizadas en un transiluminador y extraídas del gel con un bisturí para posteriormente purificarlas.

### III.10.6. PURIFICACIÓN DE LAS BANDAS DE PCR

La purificación de las bandas extraídas del gel se realizó siguiendo las indicaciones del kit *PCR clean-up Gel extraction (Macherey-Nagel)*. Para ello, se siguió el siguiente protocolo:

- (i) Se solubilizó la agarosa que contiene el ADN de interés añadiendo 200 µl del *buffer* NTI por cada 100 mg de gel de agarosa e incubándose 10 min a 50 °C.
- (ii) Se transfirió la muestra a una columna permitiendo que el ADN se uniese a su membrana y se centrifugó durante 30 segundos a 11.000 g.
- (iii) Se hicieron dos lavados con 700 µl del *buffer* NT3 y se centrifugó después de cada uno igual que anteriormente. Se realizó una última centrifugación en vacío para evaporar restos de la solución de lavado.
- (iv) Se eluyó el ADN añadiendo 20 µl de *buffer* NE e incubando 2 min antes de centrifugar 1 min a 11.000 g.

### III.10.7. LIGACIÓN DE LOS GENES CANDIDATOS EN EL VECTOR pGEMT

Para clonar los genes candidatos primero es necesario ligar la secuencia a un vector como el pGEM-T (*Promega*) (Figura 20). El pGEM-T es un vector linealizado con una sola timidina 3'-terminal en ambos extremos. Este sistema mejora la eficacia de ligación y evita la recircularización del vector, proporcionando unos salientes compatibles con la unión de productos de PCR.

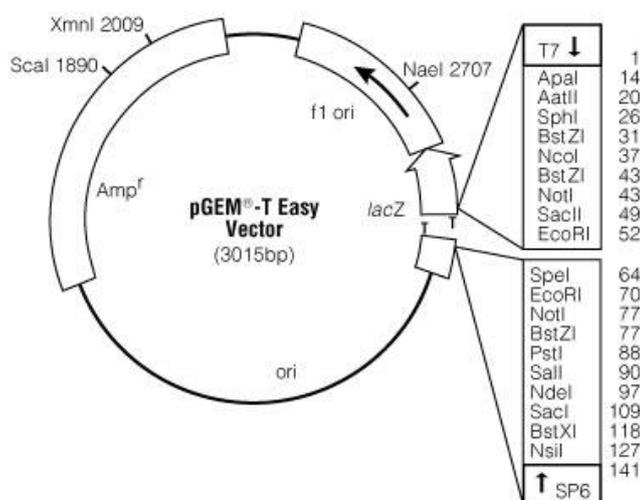


Figura 20. Esquema del vector pGEM-T-Easy (*Promega*).

Siguiendo el protocolo de *Promega* se emplearon 2  $\mu$ l de cada muestra purificada, a los que se añadió 5,4  $\mu$ l de *Master mix*. Los componentes de la *Master mix* por muestra se recogen en la Tabla 23.

Tabla 23. Componentes de la *Master mix* de ligación.

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
VECTOR pGEM-T	0,75 $\mu$ l
T4 LIGASA	0,75 $\mu$ l
BUFFER 2X	4 $\mu$ l

Para maximizar el número de colonias en la posterior transformación bacteriana, se incubó la ligación durante toda la noche a 4 °C.

### III.10.8. PREPARACIÓN DE PLACAS DE AGAR CON IPTG Y XGAL

Para distinguir entre las colonias que habían introducido el vector con el inserto y las colonias que habían introducido el vector vacío, se prepararon placas recubiertas por la mezcla de IPTG y XGAL. El X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido) es un sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa que, al ser hidrolizado, produce un compuesto (indoxil) que en contacto con el aire se transforma en índigo insoluble, el cual presenta un intenso color azul. El IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido) suele utilizarse como inductor artificial del operón *lac*, ya que es capaz de unirse al represor LacI, pero no es un sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa y no puede ser metabolizado por la bacteria. El vector pGEM-T contiene promotores de la ARN polimerasa T7 y SP6 que flanquean una región de clonación múltiple, dentro de la cual está la secuencia de LacZ que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa. La enzima  $\beta$ -galactosidasa inducida por la presencia del IPTG, cataliza la reacción de hidrólisis del XGAL presente en la placa, dando a la colonia una coloración azul. La inactivación de esta región producida por la inserción de la secuencia de estudio, permite distinguir entre colonias blancas, que han introducido el fragmento, o azules, donde el vector se ha recircularizado. Una vez preparadas las placas de agar con ampicilina se añadieron 40  $\mu$ l de la mezcla volumen/volumen de IPTG y XGAL y se dejaron 5 min para permitir que se absorbiese la mezcla en el agar.

### III.10.9. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

Para clonar los genes de interés, se transformaron bacterias *Escherichia coli* competentes de la cepa DH5 $\alpha$  resistente a ampicilina (*Termo Fisher*), con el producto de la ligación. Para ello se siguieron las indicaciones del fabricante. Brevemente:

- (i) Se añadieron 80  $\mu$ l de bacterias por producto de ligación y se mantuvo la mezcla 30 min en hielo.
- (ii) Se dió un choque térmico de 1 min a 42 °C y se dejó 3 min en hielo.
- (iii) Se añadieron 800  $\mu$ l de LB sin ampicilina y se mantuvo después en agitación 1 h a 37 °C.
- (iv) Se centrifugó a 5.000 rpm durante 1 min y tras tirar la mayoría del sobrenadante, se dejó un pequeño volumen en la base de los eppendorf.

- (v) El *pellet* con el LB restante fue resuspendido, teniendo cuidado de no repipetear mucho para no dañar las bacterias.
- (vi) Se vertió en placas de agar con ampicilina (50 mg/ ml) preparadas con IPTG y XGAL (proporción 1:1) y después de repartir bien por toda la superficie, se rotuló cada placa en su base.
- (vii) Las placas se mantuvieron toda la noche a 37 °C boca abajo.

Sólo sobrevivieron las bacterias que habían introducido el vector, puesto que eso las hizo resistentes a la ampicilina presente en el agar de la placa.

### III.10.10 RECOGIDA DE COLONIAS Y MINIPREP

Cuando las colonias alcanzaron un tamaño suficiente, pasadas aproximadamente 24 horas, fueron recogidas con una punta de pipeta esteril de 100 µl y sembradas en un 1 ml de medio LB con ampicilina. Se recogieron doce colonias blancas por placa, para asegurar al menos un mínimo de 8 colonias recombinantes por muestra y gen. La placa de cultivo se guardó a 37 °C y en agitación toda la noche, para asegurar un crecimiento bacteriano suficiente para hacer una miniprep. A la mañana siguiente se centrifugó a 1.000 g durante 10 min. A continuación, se llevó a cabo la extracción utilizando el kit *Plasmid DNA purification (Macherey-Nagel)*.

- (i) Se resuspendieron las bacterias en 200 µl de *buffer* A1 y se vorteoó la placa hasta que los *pellet* dejaron de estar adheridos a la base de los pocillos.
- (ii) Se añadieron 200 µl del *buffer* A2 para lisar las bacterias y se dejó la placa 3 min a temperatura ambiente antes de vortearla de nuevo.
- (iii) Se cargaron 300 µl del *buffer* de neutralización A3 por pocillo y se vorteoó la placa, asegurándose de que la solución pasaba del color azul del *buffer* A2 al blanco una vez neutralizada.
- (iv) Se transfirieron las muestras a la *NucleoSpin Plasmid Filter Plate* que retuvo los restos proteicos y de membranas celulares al aplicar 0,2 - 0,4 bares de vacío durante 1 min, eluyendo el resto de componentes celulares a la *Binding Plate*.
- (v) Se eliminó la placa con los restos proteicos y volvió a aplicarse vacío a la *Binding Plate* durante 1 min.

- (vi) Se lavó la membrana con 600 µl del *buffer* AW y a continuación con 900 µl del *buffer* A4 dos veces, haciendo vacío entre cada uno de los lavados.
- (vii) Se centrifugó la placa en vacío durante 1 min a máxima velocidad para garantizar que se habían evaporado los restos de las soluciones de lavado.
- (viii) Para eluir los ácidos nucleicos, se dispuso la placa de elución bajo la *Binding Plate*, se añadieron 120 µl del *buffer* de elución AE, se incubó durante 2 min y se realizó el vacío durante 1 min.

### III.10.11. PURIFICACIÓN DE MINIPREP

Para aumentar la eficacia de la secuenciación, se purificó la miniprep siguiendo el siguiente protocolo:

- (i) Se añadieron 10 µl del eluido de la miniprep más 100 µl de solución de purificación (etanol 100% y ácido sódico 3M) en una placa de secuenciación.
- (ii) Se centrifugó la placa 30 min a máxima velocidad y 4 °C.
- (iii) Se eliminó el sobrenadante por inversión y se añadieron 100 µl de etanol al 70% por pocillo.
- (iv) Para terminar, se centrifugó la placa durante 20 min a máxima velocidad y 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en agua bidestilada.

### III.10.12. PCR DE SECUENCIACIÓN

La PCR de secuenciación se llevó a cabo en la misma placa de 96 pocillos donde se purificó la miniprep. Para ello se añadieron 5 µl de agua pura libre de RNasas y 5 µl de la *Master mix* a cada pocillo (*Tabla 24*).

Tabla 24. Reactivos de la PCR de secuenciación.

Reactivos	Cantidad
MIX BIQ DYE	74,5 $\mu$ l
BUFFER 5X	137,8 $\mu$ l
PRIMER T7	159 $\mu$ l
AGUA BIDEUTILADA	159 $\mu$ l

Tabla 25. Ciclos de la PCR de secuenciación.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
96 °C	1'	1
96 °C	10''	30
50 °C	5''	30
55 °C	4'	30
4 °C	7'	1
15 °C	Infinito	1

### III.10.13. PURIFICACIÓN DE LA PCR DE SECUENCIACIÓN

Para maximizar la eficacia de la secuenciación se purificaron los productos de la PCR de secuenciación con el kit *BigDye XTerminator Purification* (Thermo Fisher). La solución *XTerminator* del kit, elimina los restos de sal de la reacción, mientras que la solución *SAM* favorece la acción del *XTerminator* y estabilizada el resultado de la purificación. La proporción de ambos ingredientes fue 1:4.

- (i) Se añadieron 40  $\mu$ l de la *Master mix* por pocillo.
- (ii) Se mantuvo la placa 30 min en agitación a 1.500 rpm.
- (iii) Se centrifugó 2 min a 1.000 rpm para precipitar el *XTerminator*.
- (iv) La placa se mantuvo a 4 °C hasta su secuenciación.

### III.10.14. SECUENCIACIÓN SANGER

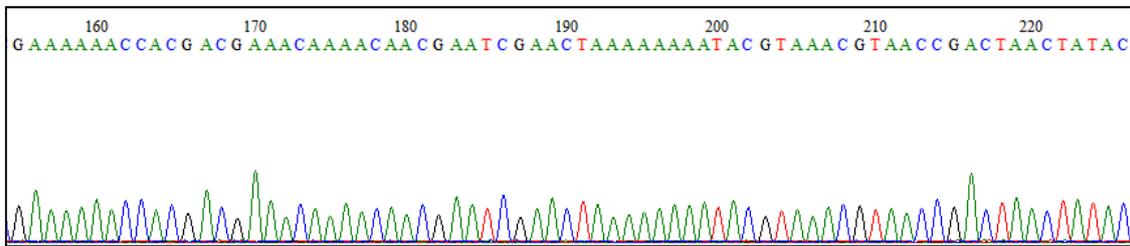
Para la secuenciación de las muestras se empleó la técnica de Sanger automatizada, que está basada en el uso de didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) que carecen del carbono 3'. Esto hace que cese el crecimiento de la hebra de ADN durante la replicación, puesto que la polimerasa es incapaz de seguir uniendo nucleótidos sin un extremo terminal

3'-OH. En esta secuenciación se utiliza una sola hebra de ADN que comienza a elongarse en presencia de un *primer* que le suministra el extremo 3'-OH. Cada muestra debe elongarse en presencia de cuatro ddNTPs distintos, marcados de forma fluorescente con cuatro fluoróforos diferentes; ddATP (adenina), ddTTP (timina), ddGTP (guanina) y ddCTP (citosina). Esto da lugar a cadenas de ADN de distintas longitudes y todas ellas acaban en el lugar donde se incorporó el ddNTP marcado sin extremo 3'-OH. En conjunto se obtienen fragmentos que difieren en una base de longitud. Posteriormente, cada fragmento marcado se separará por tamaño mediante electroforesis capilar, lo que permite la detección automatizada de los fragmentos de ADN marcados, proporcionando la secuencia ordenada de éstos en cromatogramas. La secuencia de la muestra de ADN original se deduce gracias al análisis bioinformático de las secuencias solapadas de los fragmentos.

#### III.10.15. ANÁLISIS DE LOS DATOS BIOINFORMÁTICOS DE SECUENCIACIÓN

Es necesario analizar los datos bioinformáticos que nos proporciona el secuenciador, para estudiar el grado de metilación de las zonas CpG. Para ello se emplearon los programas *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Tom Hall) y el *StarBSMa*, éste último desarrollado en el PEBC (*Cancer Epigenetics and Biology Program*) del Hospital de Bellvitge (Barcelona). Se analizaron conjuntamente las doce réplicas de cada muestra, que provenían de las doce colonias recogidas por placa (*Figura 21-A*). Todas ellas se compararon con la secuencia del gen de estudio tras la modificación por bisulfito y el producto de la PCR. En el análisis informático del producto de la PCR del bisulfito, las citosinas (C) fueron nombradas como Y, salvo aquellas que estaban metiladas. La *Figura 21* es un ejemplo de este tipo de análisis. Si alguna de las muestras secuenciadas no se correspondía con el gen estudiado fue eliminada, siendo ocho el número mínimo de réplicas necesario para que el resultado fuese significativo. Al finalizar el análisis, se obtuvo una gráfica con el porcentaje de metilación de la muestra. Cada una de las columnas de cuadros de la gráfica correspondía a una isla CpG, habiendo ocho filas de cuadros correspondientes al número de muestras que se consideraron. Los cuadros negros representaban las islas metiladas y los blancos las desmetiladas (*Figura 21-F*).

A. RESULTADO DE LA SECUENCIACIÓN DE UNA MUESTRA MODELO



B. SECUENCIA INICIAL DEL GEN Hoxa-5

TCAAAAACAAATGAGCTCTTATTTTGTAAGTCAATTTTGC<sup>CG</sup>GTCTGCTATCCAAATGGCCCGGACTA  
 CCAGTTGCATAATTATGGAGATCATAGTTCCGTGAGCGAGCAATTCAGGGACTCGGCGAGCATGCACTCCGGC  
 AGGTACGGCTACGGCTACAATGGCATGGATCTCAGCGTCGGCCGCTCGGGCTCCGGCCACTTTGGCTCCGGAG  
 AGCGCGCCCGCAGCTACGCTGCCAGCGCCAGCGCGCCGCGCCGAGCCAGGTACAGCCAGCCGGCCACGTC  
 CACGCACTCTCTCAGCCGATCCGCTGCCCTGCTCCGCCGTGGCCCCCTCGCCCGGCAGCGACAGCCACCAC  
 GGCGGAAAAACTCCCTAAGCAACTCCAGCGGCGCTCGGCCAGCCGGCAGCACCCACATCAGCAGCAG  
 AGAGGGGGTTGGC

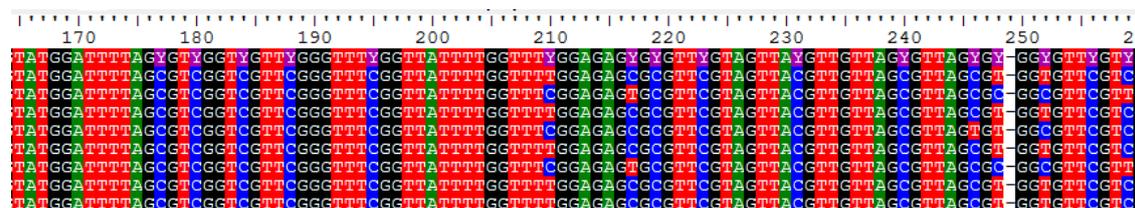
C. SECUENCIA DEL GEN Hoxa-5 TRAS LA MODIFICACIÓN CON BISULFITO

TTAAAAATAAATGAGTTTTTATTTTGTAAGTCAATTTTGC<sup>CG</sup>GTCTGCTATTTAAATGGTTCCGGATTA  
 TTAGTTGTATAATTATGGAGATTATAGTTTCGTGAGCGAGTAATTTAGGGATTCGGCGAGTATGTATTTCCGGT  
 AGGTACGGTTACGGTTATAATGGTATGGATTTTAGCGTCGGTCTGTTCCGGTTTCGGTTATTTTGGTTTCCGGAG  
 AGCGCGTTTCGTAGTTACGTTGTTAGCGTTAGCGCGGCTTCGTCGAGTTTAGGTATAGTTAGTCGGTTACGTT  
 TACGTATTTTTTTTAGTTTCGATTCGTTGTTTGTTCGTCGTTGTTTTTTCGTTCCGGTAGCGATAGTTATTAC  
 GGCGGAAAAATTTTTTAAGTAATTTTAGCGGCGTTTCGGTTCGACGTCGGTAGTATTTATATAGTAGTAG  
 AGAGGGGGTTGGT

D. SECUENCIA DEL PRODUCTO DE PCR

5' TAAAAATAAATGAGTTTTTATTTTGTAAGTCAATTTTGYGGTYGTTATTTAAATGGTTYGGATTATTAG  
 TTGTATAATTATGGAGATTATAGTTTYGTGAGYAGTAATTTAGGGATTYGGYAGTATGTATTTYGGTAGGT  
 AYGGTTAYGGTTATAATGGTATGGATTTTAGYGTYGGTYGTTYGGGTTTYGGTTATTTTGGTTTYGGAGAGY  
 YGTTYGTAGTTAYGTTGTTAGYGTAGYGGYGTTYGTYGAGTTTAGGTATAGTTAGTYGGTTAYGTTTAYG  
 TATTTTTTTTAGTTYGATTYGTTGTTTTGTTTYGTGTTGTTTTTYGTTYGGTAGYGATAGTTATTAYGGY  
 GGAAAAATTTTTTAAGTAATTTTAGYGGYGTTYGGTYGAYGTYGGTAGTATTTATATTAGTAGTAGAGAGG  
 GGTTGGT 3'

E. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS RÉPLICAS DE UNA MUESTRA



F. RESULTADO DEL ANÁLISIS DE METILACIÓN DE UNA MUESTRA

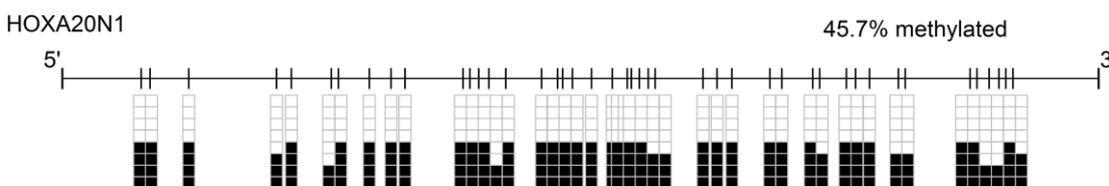


Figura 21. Ejemplo de análisis bioinformático de una secuenciación.

Resultado informático de la secuenciación de una muestra modelo (A), secuencia del gen HOXA 5 original con las zonas de restricción señaladas (B), el mismo gen tras la modificación por bisulfito (C), tras la PCR (D), resultado informatizado de su secuenciación y análisis bioinformático de las distintas réplicas con el programa BioEdit (E), y gráfica final donde se indica el porcentaje de metilación de las islas CpG del gen aportada por el programa StarBSMap (F).

### III.10.16. REAL TIME PCR PARA CORROBORAR EL ESTADO DE METILACIÓN

Para estudiar la significación funcional de la metilación, se midieron los niveles de ARNm de los siete genes candidatos usando *Real Time PCR*. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

#### Diseño de primer para la Real Time PCR

Se empleó el programa *Methyl Primer Express V.1.* en el diseño de los *primers* para el estudio de los genes candidatos, especificados en la *Tabla 26*.

Tabla 26. *Primers* diseñados para las *Real Time PCR* de los genes candidatos.

Gen hipometilado		Secuencia	Tm
FGFR1	Sentido	5'-TGGAGTATCTGGCCTCCAAG-3'	64,1
	Antisentido	5'-GGCCGTTGGTTGTCTTTTAA-3'	63,6
GRM4	Sentido	5'-CGTGCCCTCAAGTGGAAC-3'	65,1
	Antisentido	5'-GGCGGATGATCTTGTCGAAC-3'	66,8
Hoxa-5	Sentido	5'-CAACCCAGATCTACCCCTG-3'	65,5
	Antisentido	5'-GAACTCCTTCTCCAGCTCCA-3'	63,5

<b>Gen hipermetilado</b>		<b>Secuencia</b>	<b>Tm</b>
EN1	Sentido	5'-GTCAAACTGACTCGCAGCA-3'	64,3
	Antisentido	5' -CTCGTTGAGGCTGAGTTCCT-3'	63,5
METRN	Sentido	5'-CTTTGAGCTGCGCGAGGA -3'	68,1
	Antisentido	5'-CCACAGTGATGACAGACTCCT-3'	61,9
Pax-9	Sentido	5'-GAACGGGTTGGAGAAGGGAG-3	67,0
	Antisentido	5'-AGCAGCACTGTAGGTCATGT-3'	60,0
RETL1	Sentido	5'- CGAGGAGGGAGGAAGAAGATC-3'	65,3
	Antisentido	5'-TTCTTGGGGTCCTCAGCAA-3'	66,8

### *Real Time PCR de los genes candidatos*

Se realizaron las *Real Time PCR* de los siete genes candidatos, llevando a cabo en primer lugar una PCR control con distintas concentraciones de muestra a fin de conseguir buenas curvas de *melting* que garanticen la calidad de los *primers*.

## **III.11. INGENIERÍA GENÉTICA. ESTUDIOS FUNCIONALES**

Como las hASCs muestran un perfil hipometilado para el gen *Hoxa-5* una vez inducidas a linaje neuronal, se propuso sobreexpresarlo para estudiar su importancia. Se clonó en bacterias este gen y un control no funcional, antes de introducirlo en las hASCs empleando dos metodologías: transfección con lentivirus y un sistema CRISPR/dCas9.

### **III.11.1. CREACIÓN DE SISTEMAS DE TRANSFECCIÓN**

#### *A. Creación del plásmido que contiene la secuencia de *Hoxa-5* completa*

La primera de las dos construcciones del sistema de transfección con lentivirus contenía la secuencia del gen *Hoxa-5* sin intrones y las secuencias de las enzimas de restricción (*Figura 22*). Los pasos seguidos para su construcción fueron los siguientes:

**(i) Amplificación del gen Hoxa-5**

Tomando como molde el gen Hoxa-5 (1.773 pb) de una línea de linfocitos humanos inmortalizados con el virus de Epstein-Barr, se amplificaron por PCR los dos fragmentos que lo forman, excluyendo el intrón intermedio, y agregando en los extremos la secuencia de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI. Los *primers* diseñados para este fin se recogen en la *Tabla 27*.

*Tabla 27. Primers usados en la construcción del gen Hoxa-5 sin intrones.*

<b>Nombre del primer</b>		<b>Secuencia</b>	<b>T<sub>m</sub></b>
Hoxa-5-EcoRI-s	Sentido	5'-AAAAAAGAATTCGCCGCCACCATGAG CTCTTATTTTGTAAGCTCATTTTGC GGTC-3'	64,1
Hoxa-5-BamHI-as	Antisentido	5'-AAAAAAGGATCCTCAGGGACGG AAGGCCCTCCTG-3'	63,6
Hoxa-5-joint exons- s	Sentido	5'-CACATAAGTCATGACAACATAG GCGGCCCGGAAGGC-3'	83,5
Hoxa-5-joint exons-as	Antisentido	5-GCCTATGTTGTCATGACTTATGT GCAGCTTGCGCATCCA-3'	83,5

*Tabla 28. Componentes de la PCR para la construcción de Hoxa-5 sin intrones.*

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
H <sub>2</sub> O	24,8 µl
BUFFER GC 5X	10 µl
dNTPs (10 nM)	1 µl
PRIMERS (10 nM)	2,5 µl de cada
ADN (500 ng)	7,2 µl
DMSO	1,5 µl
POLIMERASA	0,5 µl
VOLUMEN FINAL	50 µl

Tabla 29. Master mix y ciclos para amplificar los dos fragmentos de Hoxa-5.

<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Ciclos</i>
98 °C	30''	1
98 °C	10''	20X
65 °C	30''	20X
72 °C	30''	20X
98 °C	10''	20X
65 °C	30''	20X
72 °C	40''	20X
98 °C	10''	20X
65 °C	30''	20X
72 °C	1'	1
72 °C	10'	1
4 °C	Infinito	1

## (ii) Purificación del producto de PCR

El producto de la PCR se corrió en un gel de agarosa al 1,5 % a 80 V durante 1 h. Las bandas se cortaron y se purificaron empleando el kit *PCR clean-up Gel extraction (Macherey-Nagel)* siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Resumidamente:

- Se calentó a 37 °C la solución de elución.
- Se añadieron dos volúmenes de *Binding Buffer* y se centrifugó 1 min a 10.000 rpm, pasando a continuación la muestra a la columna de elución.
- Se lavó con tampón de lavado (NT3), añadiendo 700 µl por columna.
- Se centrifugó 1 min a 10.000 rpm, descartando el eluato a continuación, para repetir de nuevo el lavado.
- Se centrifugó 2 min a 10.000 para evaporar los restos de solución de lavado.
- Se eluyó el ADN con 20 µl de solución de elución, incubando después 2 min a 37 °C, antes de centrifugar 1 min a máxima velocidad.

**(iii) Fusión de fragmentos.**

Se cuantificó la concentración de los fragmentos del gen Hoxa-5 (fragmentos a y b) y se hizo una PCR para fusionarlos usando los *primers* descritos en la *Tabla 30*.

*Tabla 30. Primers usados en el paso 3 de la construcción del gen Hoxa-5 sin intrones.*

Nombre del primer		Secuencia	Tm
Hoxa-5-EcoRI-s	Sentido	5'-AAAAAAGAATTCGCCGCCACCATGAG	64,1
		CTCTTATTTTGTAAACTCATTTTGC GGTC-3'	
Hoxa-5-BamHI-as	Antisentido	5' – AAAAAAGGATCCTCAGGGACGGAAGG CCCCTCCTG -3'	63,6

*Tabla 32. Master mix y ciclos para fusionar los dos fragmentos del gen Hoxa-5.*

Reactivos master mix	Cantidad
H <sub>2</sub> O	24,8 µl
BUFFER GC 5X	10 µl
dNTPs (10 nM)	1 µl
PRIMERS (10 nM)	2,5 µl de cada
ADN (500 ng)	7,2 µl
DMSO	1,5 µl
POLIMERASA	0,5 µl
VOLUMEN FINAL	50 µl

*Tabla 31. Temperaturas y ciclos empleados en la fusión de los fragmentos de Hoxa-5.*

Temperatura	Tiempo	Ciclos
98 °C	30''	1
98 °C	10''	20X
60 °C	30''	20X
72 °C	30''	20X
98 °C	10''	20X
60 °C	30''	20X
72 °C	45''	20X
98 °C	10''	20X
60 °C	30''	20X
72 °C	1'	1
72 °C	10'	1
4 °C	Infinito	1

**(iv) Digestión**

Se cuantificó la concentración del fragmento resultante y se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* durante 1 h a 37 °C. El vector pLVX-irex-Zsgreen al que se ligó el fragmento, también se digirió en las mismas condiciones.

Tabla 33. Digestiones de los fragmentos a y b, y el vector pLVX-irex-Zsgreen.

<b>Digestion fragmentos a y b</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Digestion vector pLVX-irex-Zsgreen</b>	<b>Cantidad</b>
ADN (325 ng/ $\mu$ l)	15 $\mu$ l	ADN (1.871 ng/ $\mu$ l)	1,8 $\mu$ l
ENZIMA EcoRI	1 $\mu$ l	ENZIMA EcoRI	1,8 $\mu$ l
ENZIMA BamHI	1 $\mu$ l	ENZIMA BamHI	1,8 $\mu$ l
BUFFER 10X	2 $\mu$ l	BUFFER 10X	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	1 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O	12,6 $\mu$ l

**(v) Purificación de la digestión**

Se corrió el producto de la digestión del vector en un gel al 0,7 % de agarosa a 80V durante 1 h, para eliminar el fragmento digerido pequeño del vector de 30 pb, que migró mucho más rápidamente. Se cortó y purificó el fragmento grande con el kit *DNA, RNA and protein purification (Machery Nagel)* siguiendo las indicaciones del fabricante.

**(vi) Ligación**

Se mantuvo la ligación del fragmento y el vector durante toda la noche a 4 °C. La ligasa T4 se agregó en el último momento y la proporción vector-inserto empleada fue de 1:3. Se hizo otra ligación sin inserto como control negativo.

**(vii) Transformación bacteriana**

Se transformaron dos placas de *E. coli* DH5 $\alpha$  con los productos de la ligación como se explicó anteriormente (*Apartado III.10.9. Transformación de bacterias*), una para el vector con el gen Hoxa-5 sin intrones y otra para el control negativo. Las colonias que aparecieron en la placa control nos permitieron saber con qué frecuencia se recircularizaba el plásmido sin inserto.

**(viii) Recogida y crecimiento de bacterias**

Se picaron doce colonias de la placa con el gen Hoxa-5 y se pusieron a crecer viales con 7 ml de LB con ampicilina durante toda la noche a 37 °C.

**(ix) Extracción y secuenciación del plásmido**

Se hizo una miniprep de los cultivos bacterianos como se explicó anteriormente (*Apartado III.10.10. Recogida de colonias y miniprep*), se cuantificó y se llevó a cabo la secuenciación por el método de Sanger de las colonias, para ver si alguna tenía inserta la secuencia de interés. Se hicieron PCRs de secuenciación con un *primer sense*, que comenzó a amplificar en una región cercana al inicio del inserto, e independientemente con un *primer antisense* que comenzó a amplificar en una región cercana al fin del inserto. De este modo, pudo corroborarse el resultado de la secuenciación doblemente.

**(x) Congelación de las colonias de interés en glicerol**

Las bacterias que habían incorporado los plásmidos de interés se conservaron a -80 °C en una solución de 700 µl de Glicerol al 50% y 300 µl de LB.

*Tabla 34. Composición del medio de congelación de bacterias.*

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
LB QUE CONTIENE LAS BACTERIAS	300 µl
GLICEROL AL 50 %	700 µl

**(xi) Maxiprep**

Una vez que obtuvieron las construcciones, se llevó a cabo una maxiprep con el kit *HiPure Plasmid Maxiprep (Invitrogen)* para obtener la cantidad suficiente de plásmido con la que llevar a cabo las transfecciones. Resumidamente:

- Se añadieron 20 µl del glicerol-LB que contenía las bacterias de interés a 200 µl de medio LB tibio en condiciones de esterilidad y se mantuvo toda la noche en agitación.
- Se añadieron 30 ml del *Equilibration Buffer* a las columnas del kit y se dejó que eluyesen poco a poco.
- Se precipitaron las bacterias centrifugando 10 min a 4.000 rpm y eliminando el sobrenadante.
- Las bacterias se resuspendieron en 10 ml del *Resuspension Buffer* que contenía RNasaA.

- Se lisaron las células añadiendo 10 ml del *Lysis Buffery* dejando 5 min a temperatura ambiente.
- Se añadieron 10 ml de *Precipitation Buffer* y se mezcló hasta que se homogenizó.
- Se transfirió la mezcla a la columna del kit y se dejó que eluyese para tirar después la columna de filtrado que había retenido todas las impurezas.
- Se realizó un lavado añadiendo 50 ml del *Wash Buffer* y dejando que precipitase.
- Se puso un nuevo tubo de 50 ml bajo la columna y se eluyó la muestra añadiendo 15 ml de *Elution Buffer*.
- Se precipitó el ADN agregando 10,5 ml de isopropanol al eluato y centrifugando el tubo durante 15 min a 4.000 rpm y 4 °C.
- Se descartó el sobrenadante, se pasó el contenido a un tubo de 1,5 ml y se lavó añadiendo 1 ml de etanol al 70% para volver a centrifugar de igual manera.
- Se descartó de nuevo el sobrenadante y se dejó secar el *pellet* en el tubo abierto durante 10 min a temperatura ambiente.
- Se añadieron 300 µl de agua Milli-Q, se resuspendió bien y se midió la concentración empleando el NanoDrop.

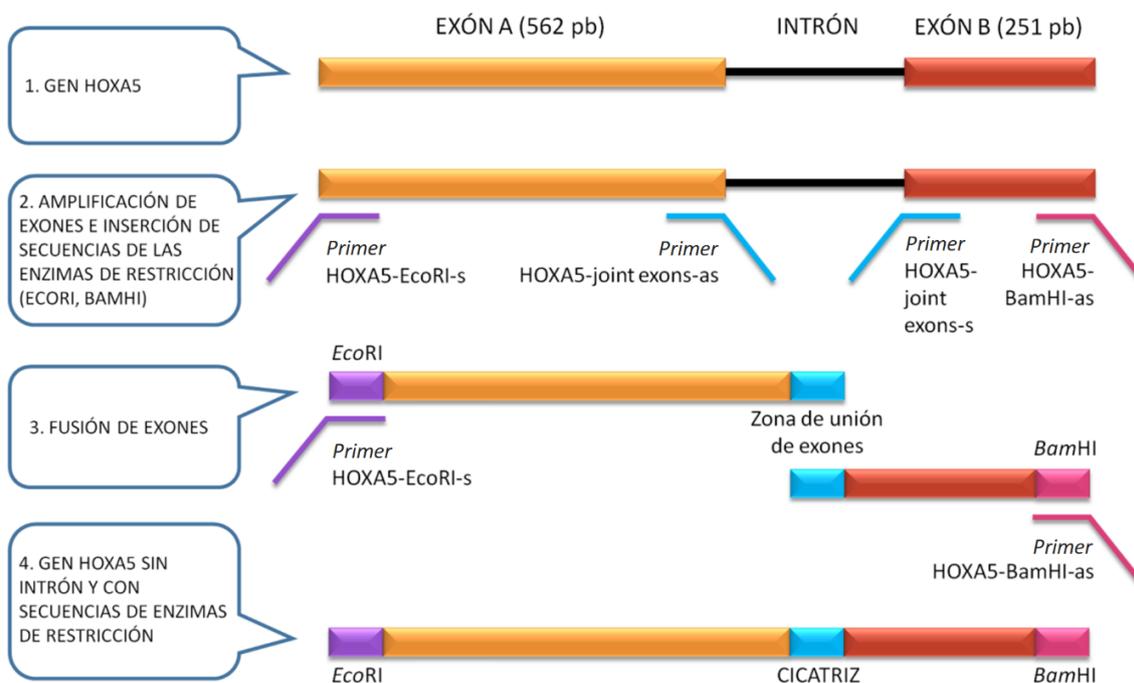


Figura 22. Construcción del plásmido con el gen *Hoxa-5* sin intrones.  
Figura diseñada empleando el programa Power Point.

### B. Creación del plásmido que contiene la secuencia control

Para tener un control de la transfección celular se diseñó una segunda construcción del gen *Hoxa-5* a la que le faltan 180 pb, lo que hace que la proteína resultante sea disfuncional.

#### Secuencia de aminoácidos de *Hoxa-5*:

MSSYFVNSFCGRYPNGPDYQLHNYGDHSSVSEQFRDSASMHSGRYGYGYNGMDLSVGRSGSGHFG  
 SGERARSYAASASAAPAEPRYSQPATSTHSPQPDPLPCSAVAPSPGSDSHHGGKNSLSNSSGASADAG  
 STHISSREGVGTASGAEEDAPASSEQASAQSESPAPPAQPQIYPWMRKLHISHDNIGG **PEGKRARTAY**  
**TRYQTLLEKEFHFNRYLTRRRRIEIAHALCLSERQIKIWFQNRMRMKWKK**DNKLSMSMAAAGGAFRP

#### Secuencia de aminoácidos de la proteína truncada:

MSSYFVNSFCGRYPNGPDYQLHNYGDHSSVSEQFRDSASMHSGRYGYGYNGMDLSVGRSGSGHFG  
 SGERARSYAASASAAPAEPRYSQPATSTHSPQPDPLPCSAVAPSPGSDSHHGGKNSLSNSSGASADAG  
 STHISSREGVGTASGAEEDAPASSEQASAQSESPAPPAQPQIYPWMRKLHISHDNIGGDNKLSMS  
 MAAAGGAFRP

Figura 23. Secuencia de la proteína *Hoxa-5* y de la proteína truncada 60 aa más corta.  
 El color verde indica los aminoácidos que se escinden de la secuencia original.

#### (i) Amplificación del fragmento inicial y final de *Hoxa-5*

Partiendo de la secuencia resultante de la anterior construcción, se amplificó su fragmento inicial y final (fragmentos c y d), descartando las 180 pb intermedias, e introduciendo las secuencias de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI en los extremos. Los *primers* empleados se especifican en la *Tabla 35*.

Tabla 35. *Primers* usados en la construcción de la proteína truncada.

Nombre del primer		Secuencia	T <sub>m</sub>
Hoxa-5-EcoRI-s	Sentido	5'-AAAAAGAATTTCGCCGCCACCATGAG CTCTATTTTGTAAACTCATTTGCGGTC-3'	64,1 °C
Hoxa-5-BamHI-as	Antisentido	5' – AAAAAGGATCCTCAGGGACGG AAGGCCCTCCTG -3'	63,6 °C
Hoxa-5-TRUNCADO- s	Sentido	5'-CACATAAGTCATGACAACATAGGCGGC CCGGAAGGC-3'	83,4 °C
Hoxa-5-TRUNCADO as	Antisentido	5'-GCCTATGTTGTCATGACTTATGTGCAGC TTGCGCATCCA-3'	77,9 °C

Tabla 37. Master mix y ciclos para amplificar los dos fragmentos del gen *Hoxa-5*.

Reactivos master mix	Cantidad
H <sub>2</sub> O	24,8 µl
BUFFER GC 5X	10 µl
dNTPs (10 nM)	1 µl
PRIMERS (10 nM)	2,5 µl de cada
ADN (500 ng)	7,2 µl
DMSO	1,5 µl
POLIMERASA	0,5 µl
VOLUMEN FINAL	50 µl

Tabla 36. Temperaturas y ciclos usados para amplificar los dos fragmentos de *Hoxa-5*.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
98 °C	30''	1
98 °C	10''	
65 °C	30''	20X
72 °C	30''	
98 °C	10''	
65 °C	30''	20X
72 °C	45''	
98 °C	10''	
65 °C	30''	20X
72 °C	1'	
72 °C	10'	1
4 °C	Infinito	

## (ii) Purificación del producto de PCR

El producto de la PCR se corrió en un gel de agarosa al 1,5% a 80 V durante 1 h, se cortaron las bandas y se purificaron empleando el kit *PCR clean-up Gel extraction (Macherey-Nagel)* siguiendo las recomendaciones del fabricante.

## (iii) Fusión de fragmentos

Se cuantificó la concentración de ambos fragmentos del gen *Hoxa-5* y se hizo la PCR para fusionarlos usando los primers *Hoxa-5-EcoRI-s* (5'-AAAAAAGAATT CGCCGCCACCATGAGCTCTTATTTTGTAACCTCATTTTGCGGTC-3') cuya T<sub>m</sub> era 64,1 °C, y el primer *Hoxa-5-BamHI-as* (5'-AAAAAAGGATCCTCAG GGACGGAAGCCCCTCCTG-3') cuya T<sub>m</sub> era 63,6 °C. Los componentes de la master mix fueron los mismos que los descritos en la *Tabla 36* y se siguió la misma metodología que la descrita en la *Tabla 37* adaptada a la T<sub>m</sub> de los primers.

**(iv) Digestión**

Se cuantificó la concentración del fragmento resultante y se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* durante 1 h a 37 °C. El vector pLVX-irex-tdTomato al que se ligó el fragmento también se digirió en las mismas condiciones.

Tabla 38. Digestiones del fragmento y del vector pLVX-irex-tdTomato.

<i>Digestión</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Digestión vector pLVX-irex-tdTomato</i>	<i>Cantidad</i>
ADN (1 mg)	3,2 µl	ADN (1 mg)	0,5 µl
ENZIMA <i>EcoRI</i>	1 µl	ENZIMA <i>EcoRI</i>	1 µl
ENZIMA <i>BamHI</i>	1 µl	ENZIMA <i>BamHI</i>	1 µl
<i>BUFFER 10X</i>	2 µl	<i>BUFFER 10X</i>	2 µl
H <sub>2</sub> O	13 µl	H <sub>2</sub> O	16 µl

**(v) Purificación de la digestión**

Se corrió el producto de la digestión del vector en un gel al 0,7% de agarosa a 80V durante 1 h, para eliminar el fragmento digerido pequeño del vector de 30 pb. Se cortó y purificó el fragmento de mayor tamaño con el kit *DNA, RNA and protein purification (Machery Nagel)* siguiendo las indicaciones del fabricante.

**(vi) Ligación**

Se llevó a cabo la ligación del fragmento y el vector toda la noche a 4 °C, siendo la proporción vector-inserto 1:3, y se hizo otra ligación sin inserto como control negativo.

**(vii) Transformación**

Se transformaron dos placas de *E. coli* DH5α con los productos de la ligación como se explicó en anteriores apartados (*Apartado III.10.9. Transformación de bacterias*), una para el vector con el gen de Hoxa-5 truncado y otra para el control negativo.

**(viii) Picado y crecimiento de bacterias**

Se recogieron doce colonias de la placa con el gen Hoxa-5 y se crecieron en viales con 7 ml de LB con ampicilina toda la noche a 37 °C.

**(ix) Extracción y secuenciación del plásmido**

Se hizo una miniprep de los cultivos bacterianos como se explicó en apartados anteriores (*Apartado III.10.10. Recogida de colonias y miniprep*), se cuantificó, se amplificó y se hizo la secuenciación por el método de Sanger de las colonias, para ver si alguna había incorporado en el plásmido la secuencia de interés. Se congelaron bacterias con la construcción de interés en glicerol y LB a -80 °C (*Tabla 34*) para su uso posterior, y se realizaron maxiprep para obtener grandes cantidades del plásmido, como se explicó en el *Apartado III.11.1. Creación de sistemas de transfección*.

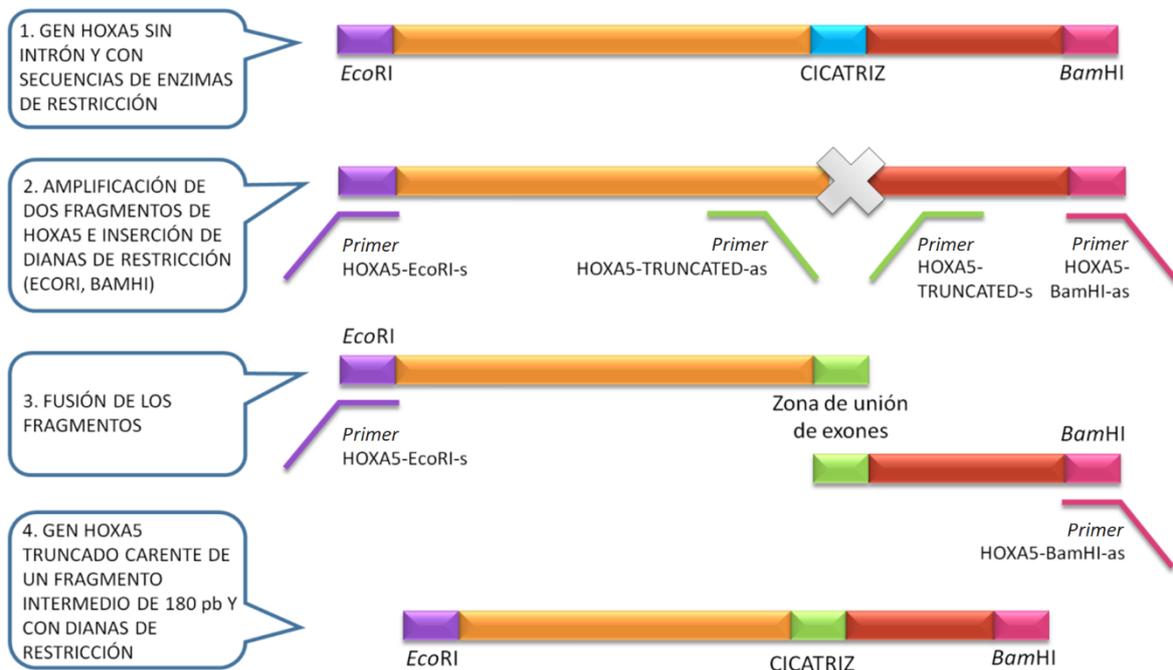


Figura 24. Pasos seguidos en la construcción de la proteína truncada.  
Figura diseñada empleando el programa Power point.

### III.11.2. SOBREENPRESIÓN DE HOXA-5 TRANSFECTANDO CON LENTIVIRUS

Se emplearon lentivirus para la transfección celular. Los lentivirus son retrovirus no oncogénicos caracterizados por tiempos de incubación e infección prolongados, que permiten la inserción de secuencias de tamaño medio en el genoma del hospedador de forma estable. Son ampliamente utilizados en investigación puesto que no producen una respuesta inmunitaria significativa.

Una vez que se obtuvieron las construcciones, se realizó la transfección de una línea celular hospedadora para que generase los lentivirus con la secuencia de interés. La línea empleada fue la HEK-293T de células embrionarias de riñón humano. Esta línea es muy sencilla de cultivar y transfectar, por lo que es ampliamente empleada como hospedadora en terapia génica para la producción de virus.

La variante HEK-293T que se usó, contenía el antígeno-T largo del virus SV40, lo que permite la replicación episomal de plásmidos transfectados que contengan el origen de replicación del SV40. Este tipo de células crecen en condiciones estándar de cultivo: 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% humedad, en medio DMEM completo. Se sembró una placa de HEK-293T por cada plásmido que se necesitaba transfectar. Los componentes del sistema para la producción de lentivirus fueron los siguientes:

**(i) Plásmido de transferencia lentiviral que codifica el inserto de interés**

Es la suma del vector plasmídico (en este caso pLVX-irex-ZsGreen o pLVX-irex-tdTomato) y el transgén (Hoxa-5 o proteína truncada). La secuencia del transgén está flanqueada por secuencias de repetición terminal largas (LTR), que facilitan la integración de las secuencias del plásmido de transferencia en el genoma del huésped. Muchos plásmidos de transferencia lentiviral se basan en el virus VIH-1. Por razones de seguridad, los plásmidos de transferencia son incompetentes en su replicación y pueden contener una supresión adicional en el 3'-LTR, haciendo que el virus se autoinactive después de la integración.

(ii) **Plásmidos auxiliares**

- *Envelope plasmid* (pMD2.G) (*Addgene*): tiene la información genética necesaria para la síntesis de las proteínas víricas de la cápsida (*Figura 25*).
- *Packaging plasmid* (psPAX2) (*Addgene*): tiene la información genética necesaria para las enzimas que necesita el virus (*Figura 26*).

(iii) **Línea celular hospedadora que actúa como fábrica de lentivirus**

En este caso, como se ha mencionado, fue la línea HEK-293T, dentro de la cual se activó la maquinaria de los lentivirus y se generaron miles de copias.

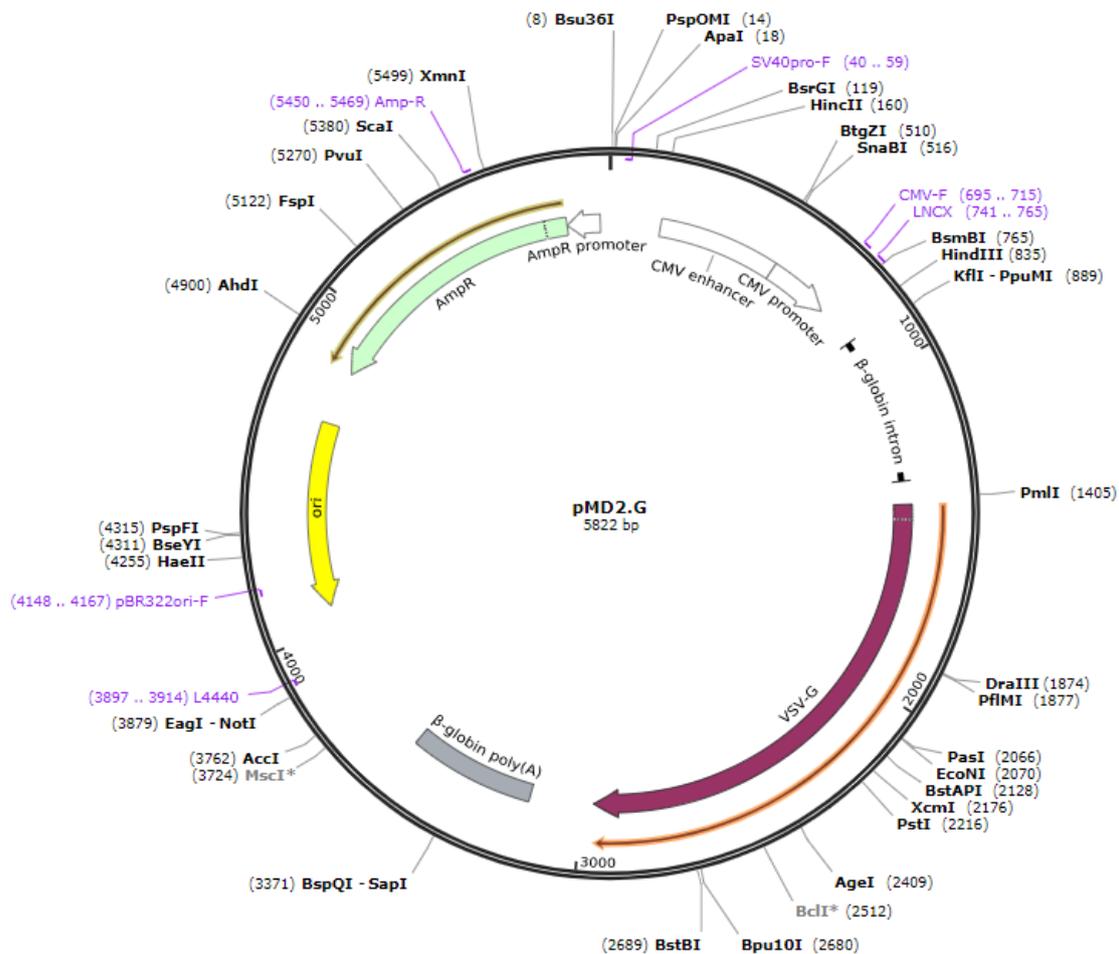


Figura 25. Esquema del envelope plasmid (pMD2.G) de Addgene.

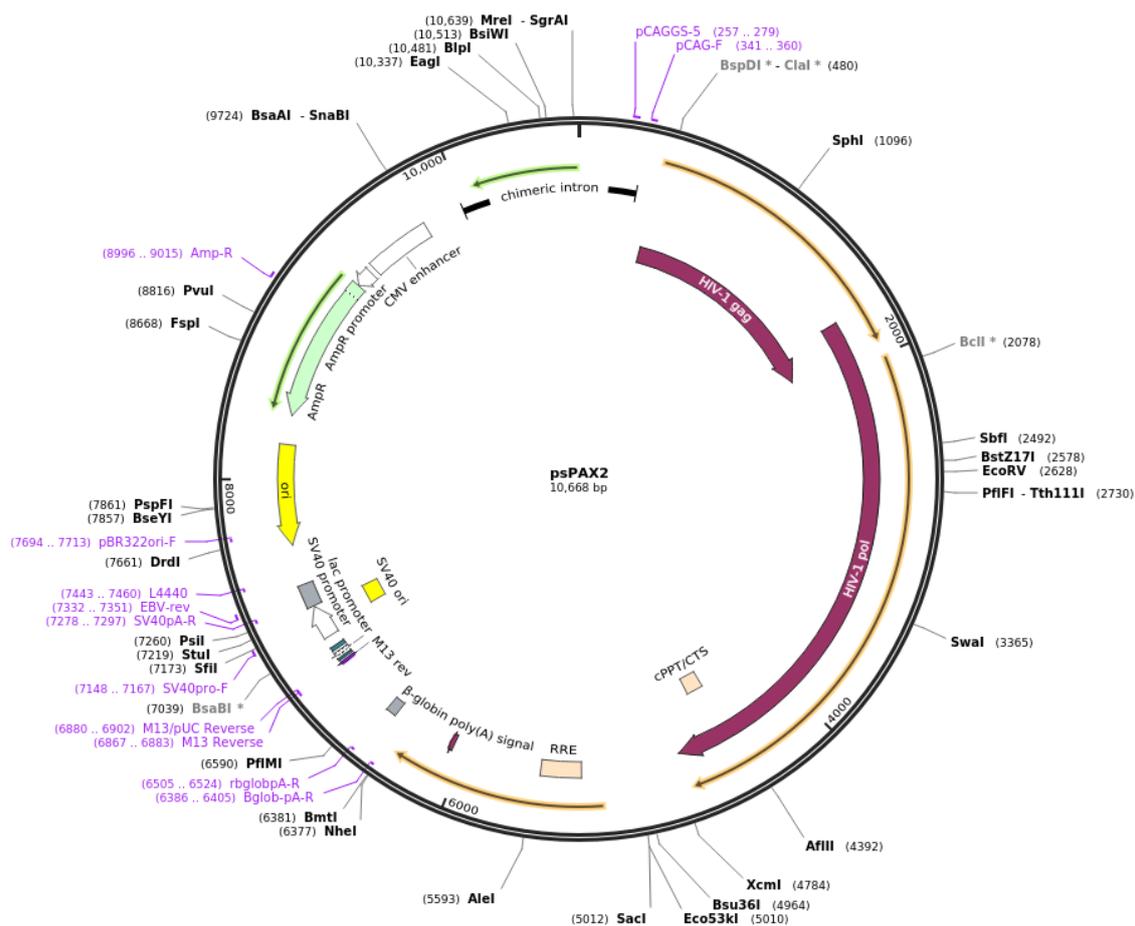


Figura 26. Esquema del packaging plasmid (psPAX2) de Addgene.

Cuando las placas de HEK-293T alcanzaron una confluencia del 80%, las células se transfectaron con los plásmidos pMD2.G y psPAX2. Concretamente, se añadieron 2,5 µg del plásmido pMD2.G, 7,5 µg del psPAX2 y 10 µg del plásmido de estudio. Finalmente se obtuvieron cuatro infecciones distintas (Tabla 39):

Tabla 39. Plásmidos empleados en la transfección de células hospedadoras HEK-293T.

Hoxa-5	Truncado	Green	Tomato
Plásmido que contiene el gen Hoxa-5 sin intrones introducido en el vector pLVX-irex-ZsGreen	Plásmido que contiene el gen Hoxa-5 truncado introducido en el vector pLVX-irex-tdTomato	Plásmido pLVX-irex-ZsGreen vacío como control	Plásmido pLVX-irex-tdTomato vacío como control

La secuencia de transfección siguió los siguientes pasos:

- (i) Se hizo la mezcla de los dos plásmidos, 2,5 µg de pMD2.Gy 7,5 µg de psPAX2, en un tubo de 1,5 ml, por cada placa que se transfectó.
- (ii) Se añadió a cada tubo 10 µg del plásmido de estudio y 1 ml de *bufferJetPrime*.
- (iii) Se mezcló en vortex suavemente durante 10 segundos y se dio un ligero *spin*.
- (iv) Se añadieron 50 µl del *JetPrime reagent* y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente.
- (v) Se añadió a la mezcla 10 ml de medio DMEM completo y se vertió en las placas, previa retirada del medio anterior.
- (vi) Pasadas 4 h, se reemplazó el medio de transfección por medio completo normal.
- (vii) Se incubó durante 72 h para que la concentración de lentivirus en el medio fuese máxima y al mismo tiempo se sembraron cuatro placas de hASCs que deberían estar al 90% de confluencia antes de ser infectadas con lentivirus.

#### *Generación de lentivirus y transfección de hASCs*

---

Al cabo de tres días, se recogió el medio de las placas donde crecían las HEK-293T infectadas con los lentivirus y se centrifugaron a máxima velocidad durante 1 min. Seguidamente se pasó el sobrenadante a través de un filtro de 0,45 µm y se le añadió polibreno (bromuro de hexadimetrina) a una concentración de 8 µg/ ml. El polibreno es un polímero catiónico utilizado para aumentar la eficacia de transducción de ciertos cultivos celulares con virus (Davis, Morgan et al. 2002).

Se vertió entonces a las placas de hASCs, a las que previamente se les había retirado el medio de cultivo. Para maximizar la infección vírica se incubaron las placas durante 24 h. Pasado este tiempo, se cultivaron las células en un medio DMEM estándar durante el tiempo necesario para realizar 4 pases. A continuación, se realizó un *cell sorter* empleando el citómetro separador *MoFlo Astrios (Beckman Coulter)*, para seleccionar solo las células que emitían fluorescencia fruto de la transfección con el plásmido pLVX-irex-Zsgreen (en color verde) o el pLVX-irex-tomato (color rojo) y descartar el resto. Los pasos fueron los siguientes:

- (i) Se despegaron las células con tripsina hasta su completa individualización.
- (ii) Se resuspendieron en el doble de volumen de PBS.
- (iii) Se pasaron por un filtro de 0,4  $\mu\text{m}$  para evitar agregados celulares.
- (iv) A la salida del *sorter*, las células se mezclaron con medio DMEM atemperado y enriquecido con FBS al 20% y se sembraron en placas de 24 pocillos.

### *Ensayos complementarios*

---

Para asegurarnos de la presencia de la proteína Hoxa-5 normal y la truncada en los cultivos infectados, así como para estudiar la localización celular de éstas, se realizaron dos ensayos complementarios con las cuatro líneas celulares estables aisladas, western blot de extractos celulares e inmunofluorescencia de placas fijadas.

Para ello, se añadió 1 ml de *buffer* Laemli 1X al 3% por cada 10 millones de células, y se resuspendió varias veces con una pipeta. Este *buffer* contiene un 2% de SDS, que desnaturaliza las proteínas, y un 0,1% de  $\beta$ -mercaptoetanol que rompe puentes bisulfuro.

Posteriormente, las muestras se llevaron a ebullición durante 10 min a 100 °C, y se sonicaron 10 min a máxima potencia en un baño de hielo para conservarse a -20 °C. Se realizó western blot para detectar la proteína Hoxa-5, empleando el anticuerpo HOXA-5 ab180229 (*Abcam*) y cargando 50  $\mu\text{g}$  de cada extracto celular por pocillo, siguiendo la misma metodología que la explicada anteriormente (*Apartado III.5. Estudio de marcadores neuronales por western blot*). También se realizaron inmunofluorescencias empleando el anticuerpo anti-HOXA-5 ab82645 (*Abcam*) tras fijar las placas con paraformaldehído y permeabilizar con tritón siguiendo la misma metodología descrita anteriormente (*Apartado III.6. Análisis de marcadores proteicos mediante inmunofluorescencia*).

El último paso que se realizó fue la inducción neuronal con Neu1 (*Apartado III.3.1. Medios Neu1, Neu2 y Neu3*) de estas líneas estables, a fin de estudiar la importancia de Hoxa-5 en el proceso de diferenciación. A continuación, se llevaron a cabo *Real Time PCR* de los marcadores neuronales anteriormente estudiados en los cuatro cultivos, siguiendo la metodología ya descrita (*Apartado III.7. Estudio de expresión de genes mediante Real Time PCR*).

### III.11.3. SOBREEXPRESIÓN DE HOXA-5 CON UN SISTEMA CRISPR

#### *Creación de los sistemas CRISPR/dCas9-VP64 y CRISPR/dCas9-NEF*

Para completar los estudios funcionales se empleó un sistema de transfección CRISPR/dCas9. En este sistema la endonucleasa Cas9 está inactivada pasando a llamarse dCas9 (*Catalytically inactive or dead Cas9*) y se une a un dominio efector.

En este caso, el dominio empleado fue el VP64, con función de activador transcripcional y compuesto por cuatro copias de la proteína VP16 del virus del herpes simple, con 437- 447 aminoácidos ensamblados por uniones glicina-serina. Este sistema es capaz de situarse cerca del promotor de un gen, en este caso Hoxa-5, y actuar como un potente activador transcripcional.

Para el reconocimiento del promotor de Hoxa-5 se diseñaron en el laboratorio dos secuencias de ARN guía (ARNg), llamadas Hox1 y Hox2 de 20 nucleótidos, para crear oligonucleótidos de ADN de doble cadena con extremos de 4 pb.

*Tabla 40. ARNg diseñados para la formación del sistema CRISPR/dCas9.*

<b>Nombre del primer</b>		<b>Secuencia</b>
Hox-1	Sentido	5'-ACACCGTTCCGTGAGCGAGCAATTCG-3'
	Antisentido	5'-AAAACGAATTGCTCGCTCACGGAACG-3'
Hox-2	Sentido	5'-ACACCCGAAGTCGTACCCCATATTTG-3'
	Antisentido	5'-AAAACAAATATGGGGTACGACTTCGG-3'

El primer paso fue una PCR para la alineación de los oligos cuyas características se especifican en las *Tablas 41 y 42*.

Tabla 41. Master mix y ciclos para la alineación de los oligonucleótidos.

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
95 °C	5'	1
25 °C	2'	20
15 °C	2'	20
5 °C	1'	20
4 °C	infinito	-

Tabla 42. Componentes de la Master mix para la alineación de los oligonucleótidos.

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
OLIGO SENTIDO (100 mM)	5 µl
OLIGO ANTISENTIDO (100 mM)	5 µl
<i>BUFFER NEB</i>	2 µl
H <sub>2</sub> O	8 µl

Una vez que los ARNg hibridaron juntos para generar fragmentos cortos de ADN de doble cadena, se ligaron en el plásmido MLM3636 (43860, Addgene) (Apartado III.11.1. Creación de sistemas de transfección) para su multiplicación. Las construcciones se clonaron en bacterias competentes de *E. coli* DH5α y se confirmó su presencia mediante secuenciación del ADN bacteriano. Los experimentos de edición de CRISPR/dCas9 requieren el uso de un control negativo para distinguir con precisión los efectos biológicos de la edición del gen, de los efectos no específicos, que son debidos a la introducción en el núcleo celular de un gran complejo proteico. El sistema NEF se utilizó como control negativo. El plásmido pMLM3705, portador del dominio dCas9-VP64 y el MLM3636, donde se insertan las secuencias ARNg (Addgene 47754 y 43860), fueron amablemente cedidos por Keith Joung. El plásmido pdCAS9-NED, portador del dominio control NEF, fue donado por el Profesor Rots del Centro Universitario Médico de Groningen (Cano-Rodriguez, Gjaltema et al. 2016).

Para obtener grandes cantidades de estos plásmidos, se realizaron maxipreps (Qiagen) (Apartado III.11.1. Creación de sistemas de transfección) de bacterias cultivadas en medio LB suplementado con ampicilina, a una concentración de 50 µg/µl.

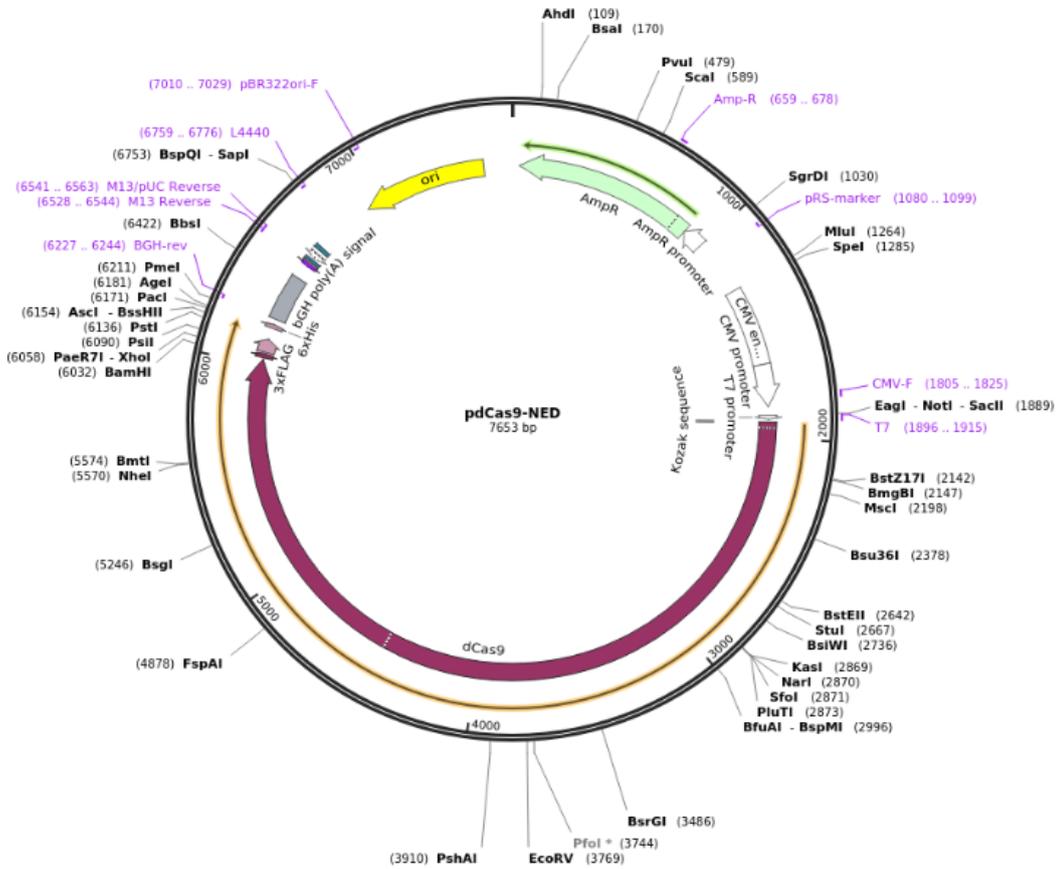


Figura 27. Representación del plásmido pdCas9-NED con la secuencia NEF (Addgene).

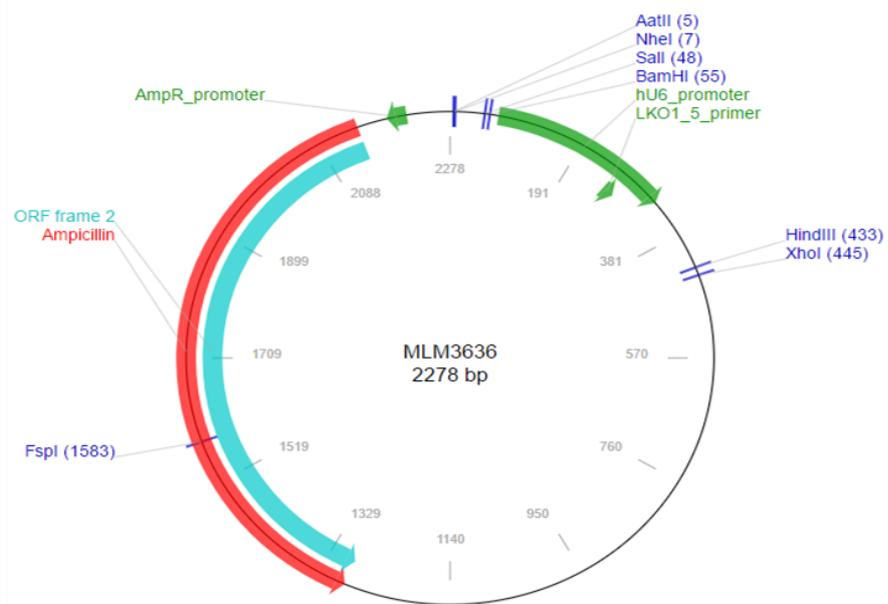


Figura 28. Representación del plásmido MLM3636 que integra losARNg (Addgene).

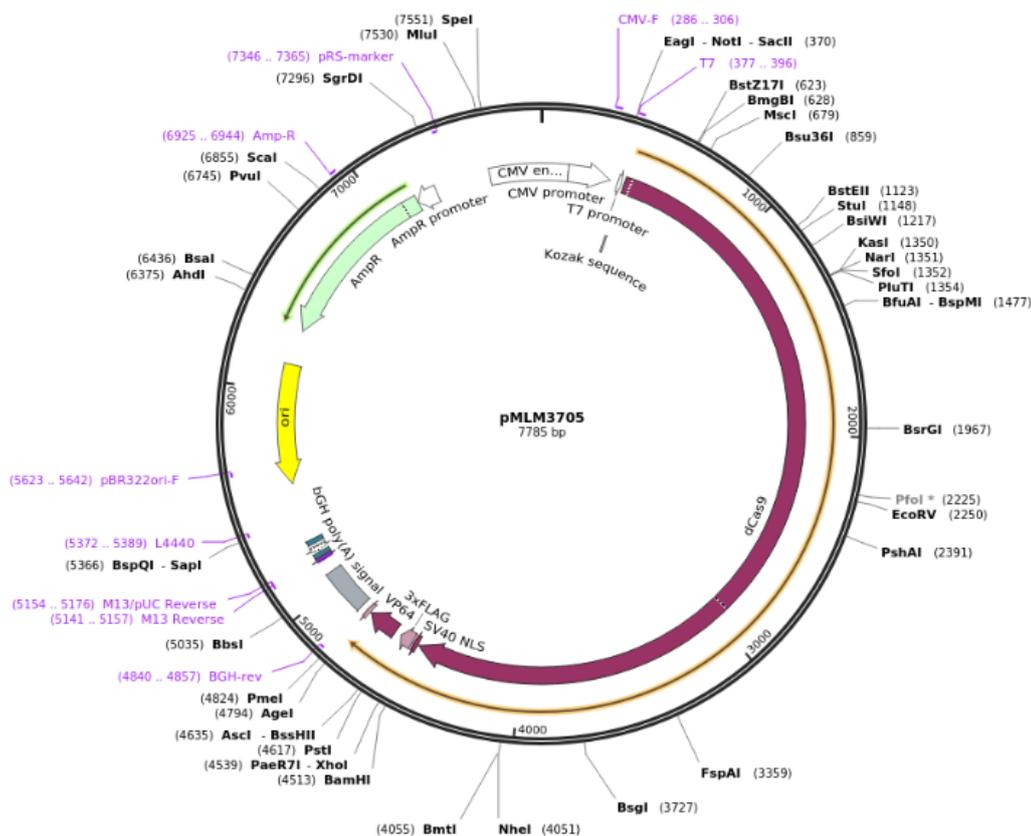


Figura 29. Representación del plásmido pMLM3705 con dCas9-VP64 (Addgene).

### Transfección con los sistemas CRISPR/dCas9-VP64 y CRISPR/dCas9-NEF

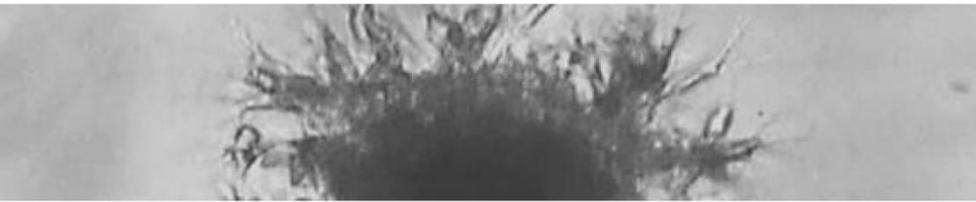
Para determinar la efectividad del sistema CRISPR/dCas9 creado, se llevaron a cabo transfecciones combinadas con Hox1, Hox2, el dominio VPS4 y NEF. Las cotransfecciones de las secuencias CRISPR (ADNg) y el plásmido con dCas9-VP64 o dCas9-NEF, se llevaron a cabo utilizando lipofectamina (*Invitrogen*) en una proporción de 1:1:2 (ADN: plásmido: lipofectamina), con 0,5  $\mu\text{g}$  de la concentración total de ADN plasmídico por pocillo, en una placa de 24 pocillos y 90% de confluencia. El medio de transfección se retiró y se reemplazó con medio DMEM complementado con FBS al 10% después de 4 horas y las células se recogieron dos días después de la transfección. El ARN total se aisló (*Apartado III.7.1. Extracción y cuantificación del ARN celular*) y los niveles de ARNm se estudiaron mediante *Real Time PCR* utilizando el procedimiento descrito anteriormente (*Apartado III.7. Estudio de expresión de genes mediante Real Time PCR*).

*Estudio del papel de la proteína Hoxa-5 en el proceso de diferenciación neuronal*

---

A continuación se realizó la inducción neuronal de estas células transfectadas (*Apartado III.3.1. Medios Neu1, Neu2 y Neu3*) con el fin de comprobar la importancia de Hoxa-5 en la diferenciación de hASCs a células del sistema nervioso y a continuación, se estudió la expresión de marcadores proteicos mediante *Real Time PCR* (*Apartado III.7. Estudio de expresión de genes mediante Real Time PCR*) y western blot (*Apartado III.5. Estudio de marcadores neuronales por western blot*). Cada dos días a partir del sexto, se tomaron muestras de ARN para realizar las PCRs y de proteína para los western blot, hasta un total de 14 días. Los western blot se cuantificaron por densitometría de bandas empleando el programa *Imagej*.





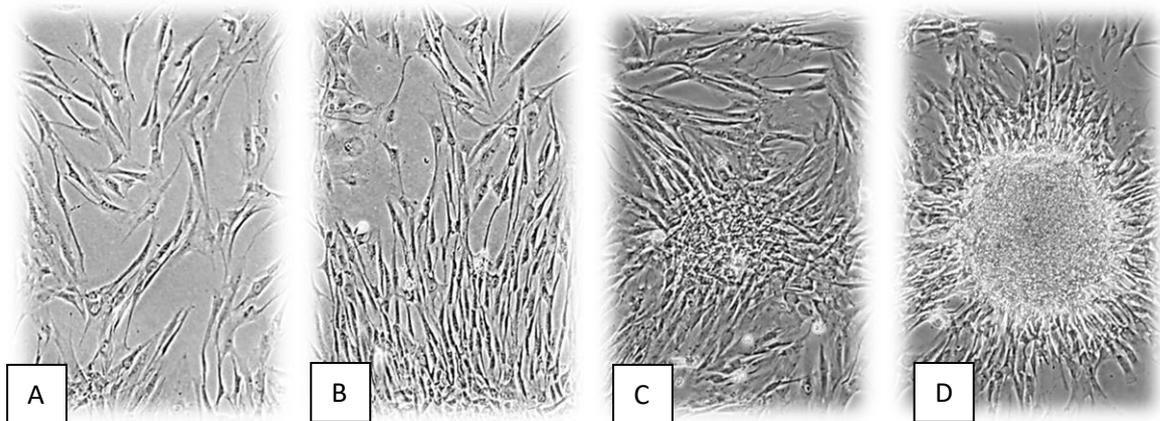
## 4. RESULTADOS



## IV. RESULTADOS

### IV.1. AISLAMIENTO DE LAS hASCs A PARTIR DE TEJIDO ADIPOSO

A partir de la primera semana de cultivo de las hASCs aisladas de tejido adiposo, la mayoría de células presentes mostraban morfología fusiforme, un aspecto fibroblástico (*Figura 30-A*), con núcleos redondeados voluminosos y escaso retículo endoplasmático rugoso, que proliferaban y podían formar colonias con un núcleo más denso (*cell clump*, *Figura 30-D*) durante las primeras etapas del cultivo.



*Figura 30. Microscopia óptica de las hASCs durante las primeras tres semanas. Aspecto que presenta el cultivo de hASCs una vez eliminadas las células sanguíneas en suspensión a los (A) 10 días en cultivo, (B) 13 días, (C) 16 días y (D) a los 19 días cuando comienzan a formarse cell clump (Imágenes tomadas a 10X).*

### IV. 2. CARACTERIZACIÓN DE LAS hASCs POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Con objeto de caracterizar las hASCs, se realizó un estudio inmunofenotípico a los 21 días de las células en cultivo tras el procesamiento del lipoaspirado. Los resultados obtenidos mostraron un elevado porcentaje de los marcadores mesenquimales (*Figura 31*): sCD73-PE (98,1%), CD105-APC (99,9%), CD90-FITC (99,6%) y la casi inexistencia de marcadores hematopoyéticos: CD45-FITC (2,4%), CD34-FITC (2,4%), y CD133-FITC (1,7%). A partir de estos resultados pudimos concluir que el 99% de las células eran mesenquimales, cumpliendo por tanto los criterios propuestos por la ISCT para el reconocimiento de este tipo de células.

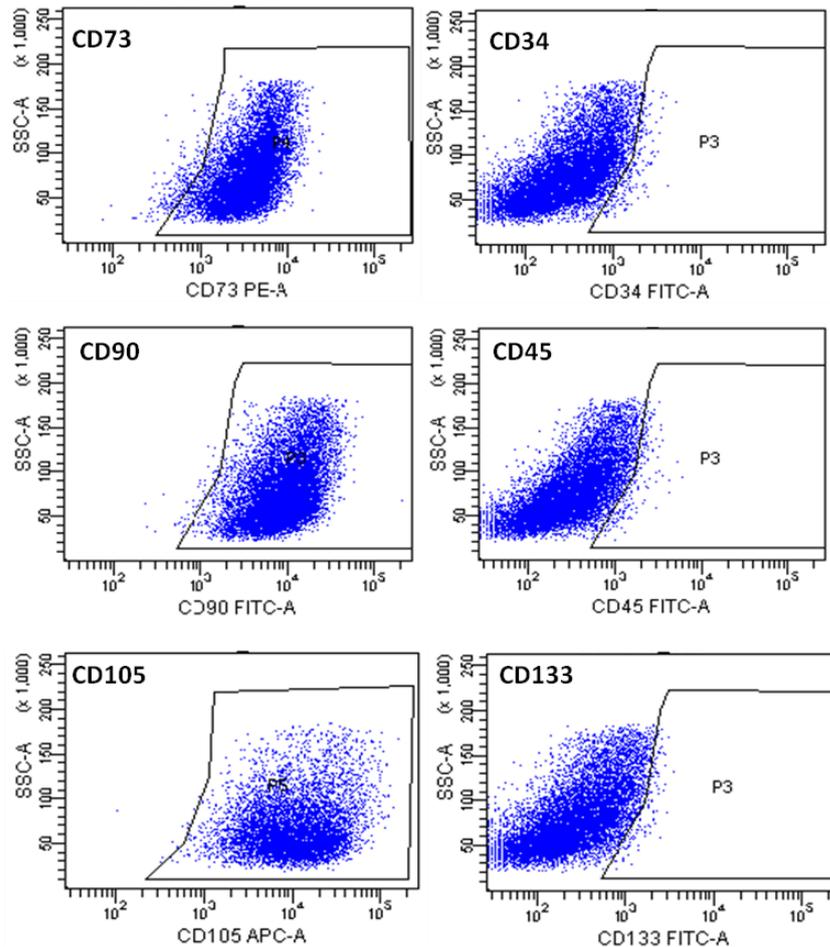


Figura 31. Caracterización inmunofenotípica de las hASCs por FACScan. Se muestran altos niveles de expresión para los marcadores propios de células madre mesenquimales CD73, CD90 y CD105, y bajos para marcadores de linaje hematopoyético como CD34, CD45 y CD133.

### IV.3. DIFERENCIACIÓN Y DESDIFERENCIACIÓN NEURONAL DE hASCs: MODIFICACIONES MORFOLÓGICAS

#### A. Diferenciación neuronal

Los diferentes medios de inducción utilizados (ver Material y Métodos *III. 3.1. MEDIOS NEU1, NEU2 Y NEU3*) produjeron modificaciones morfológicas dependientes del tipo de medio, que se mantuvieron en todos los casos hasta el final del proceso de diferenciación. El análisis morfológico por microscopía óptica se realizó diariamente durante todo el proceso de inducción.

Las principales modificaciones observadas con cada uno de los medios de inducción fueron:

- **Neu1:** La morfología fibroblástica propia de las hASCs cambió rápidamente para adquirir una apariencia neuronal típica, produciéndose la retracción del citoplasma hacia el núcleo y mostrando un cuerpo celular esférico. Siete días después del comienzo de la inducción, aparecieron las primeras ramificaciones dendríticas, dando lugar a interacciones intercelulares (*Figura 32*).
- **Neu2:** El cambio morfológico se produjo con mayor lentitud que en la diferenciación inducida con el medio Neu1, no evidenciándose hasta los 10 días, en los que pudo apreciarse una semejanza con el linaje neuronal, largas prolongaciones citoplasmáticas y algunas interacciones intercelulares (*Figura 33*).
- **Neu3:** Por último, la inducción con Neu3 provocó los cambios morfológicos menos evidentes, aunque al final del período de diferenciación podían apreciarse extensiones citoplasmáticas similares a dendritas (*Figura 34*).

Figura 32. Cambios morfológicos apreciados en la diferenciación neuronal con Neu1.

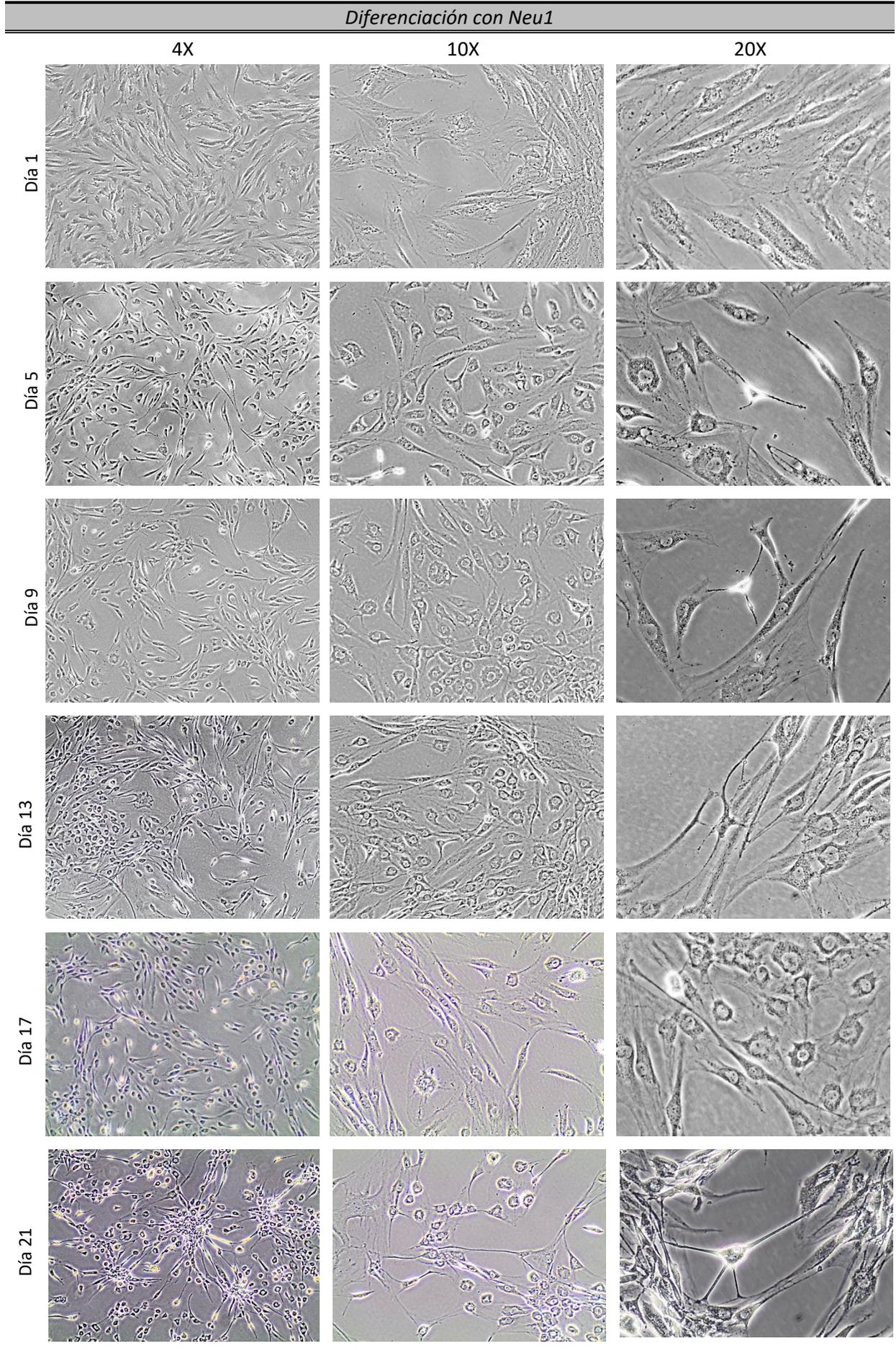


Figura 33. Cambios morfológicos apreciados en la diferenciación neuronal con Neu2.

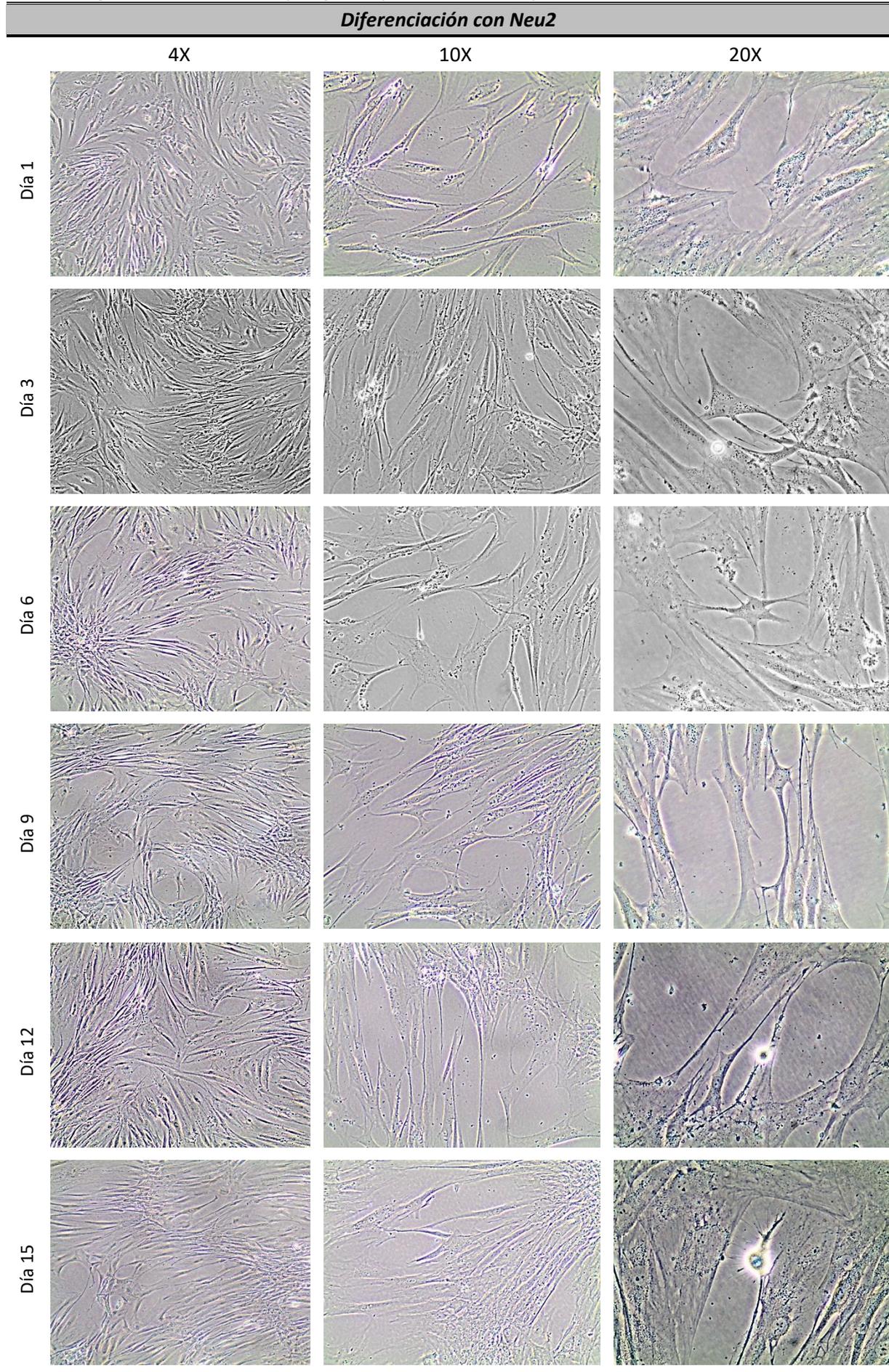
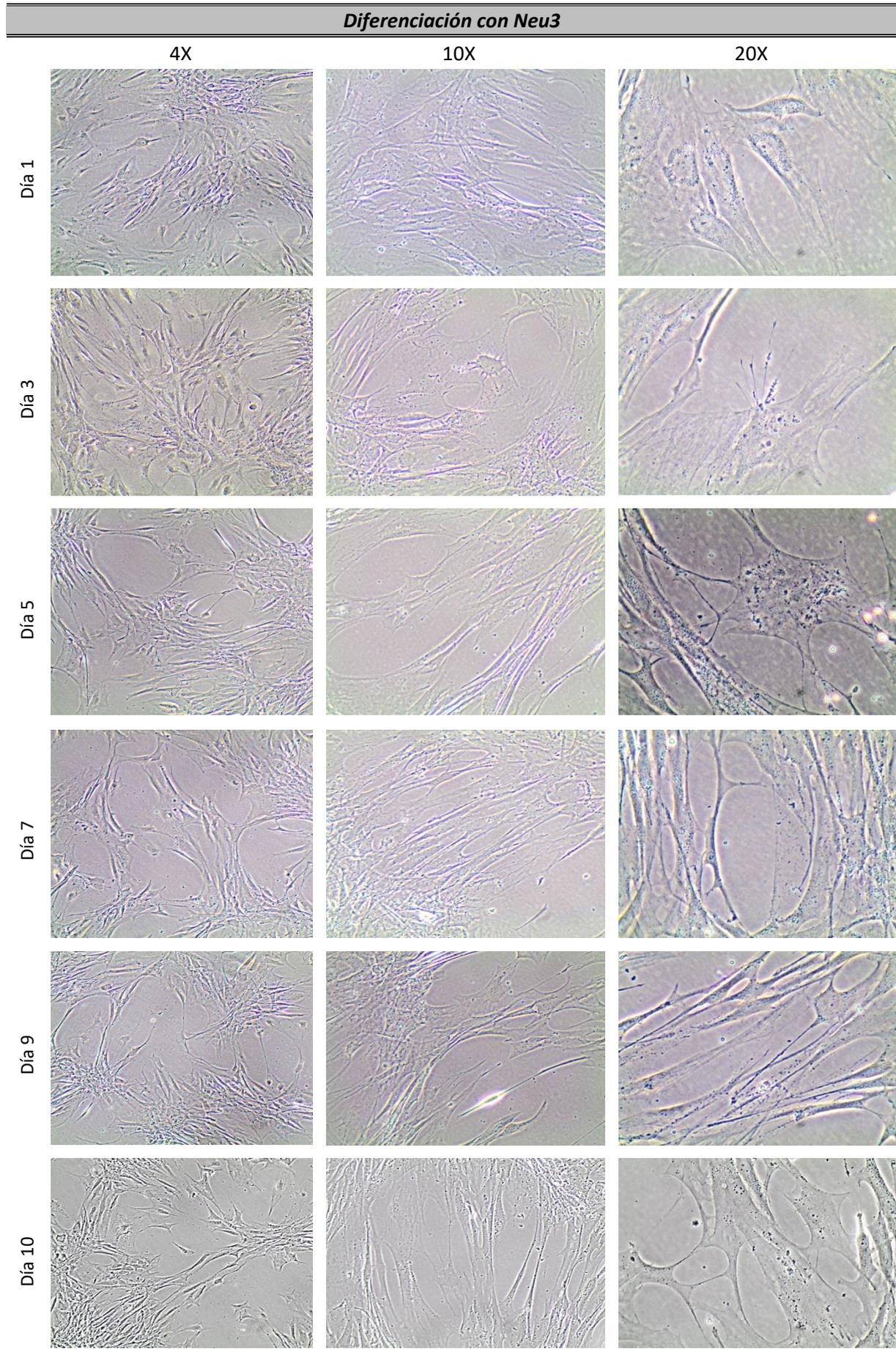


Figura 34. Cambios morfológicos apreciados en la diferenciación neuronal con Neu3.



### B. Desdiferenciación neuronal

La retirada de los medios de diferenciación durante un periodo de tiempo equivalente a la mitad del periodo de inducción mostró en general un retorno a la morfología inicial, alcanzando de nuevo la morfología fibroblástica típica de las hASCs, proceso que fue más pronunciado en el caso de Neu1 (*Figura 35-37*). También se observó hacia el final de la desdiferenciación abundantes puentes citoplasmáticos intercelulares más abundantes en el caso de Neu2.

*Figura 35. Cambios morfológicos en la desdiferenciación de hASCs inducidas con Neu1.*

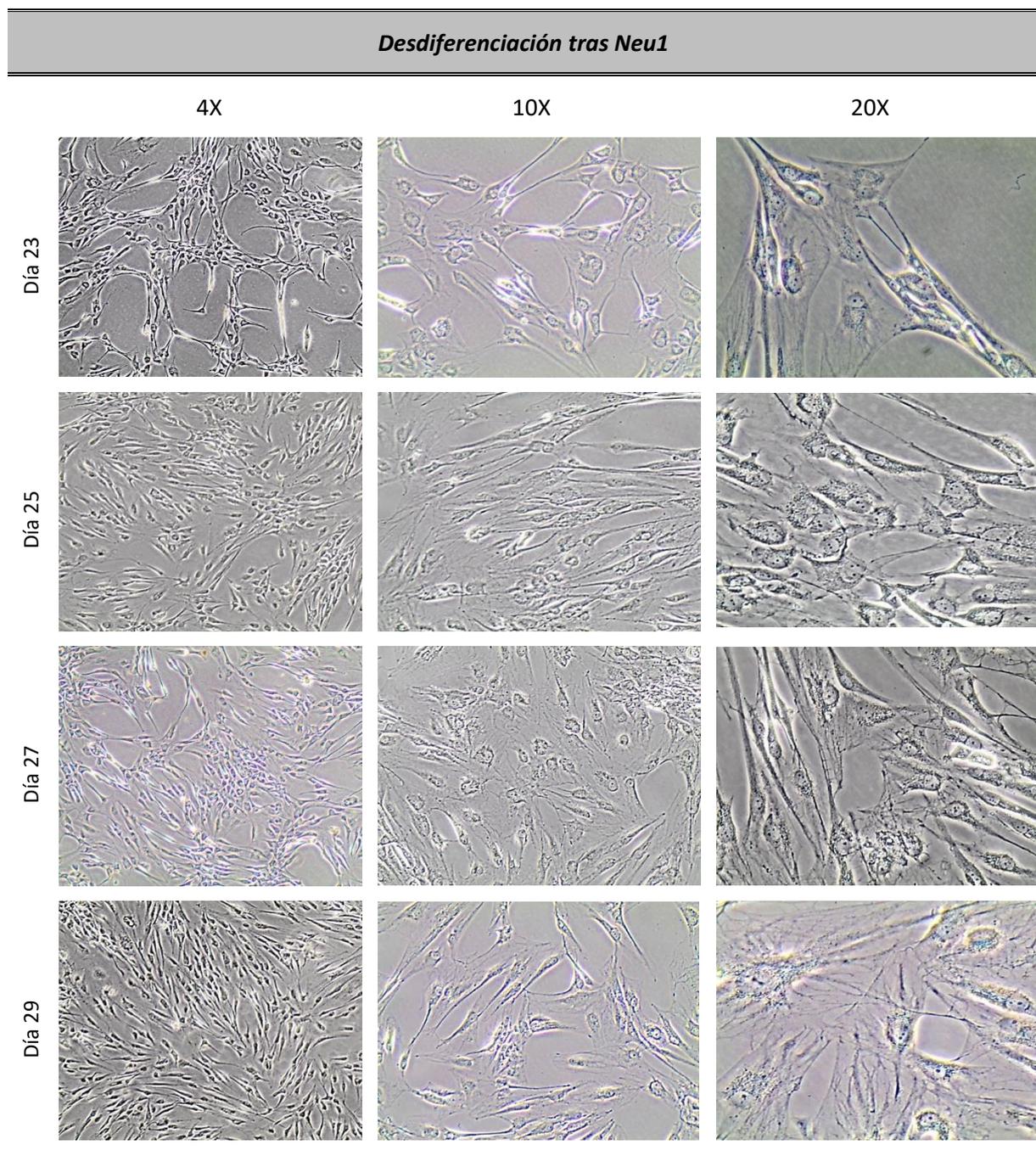


Figura 36. Cambios morfológicos en la desdiferenciación de hASCs inducidas con Neu2.

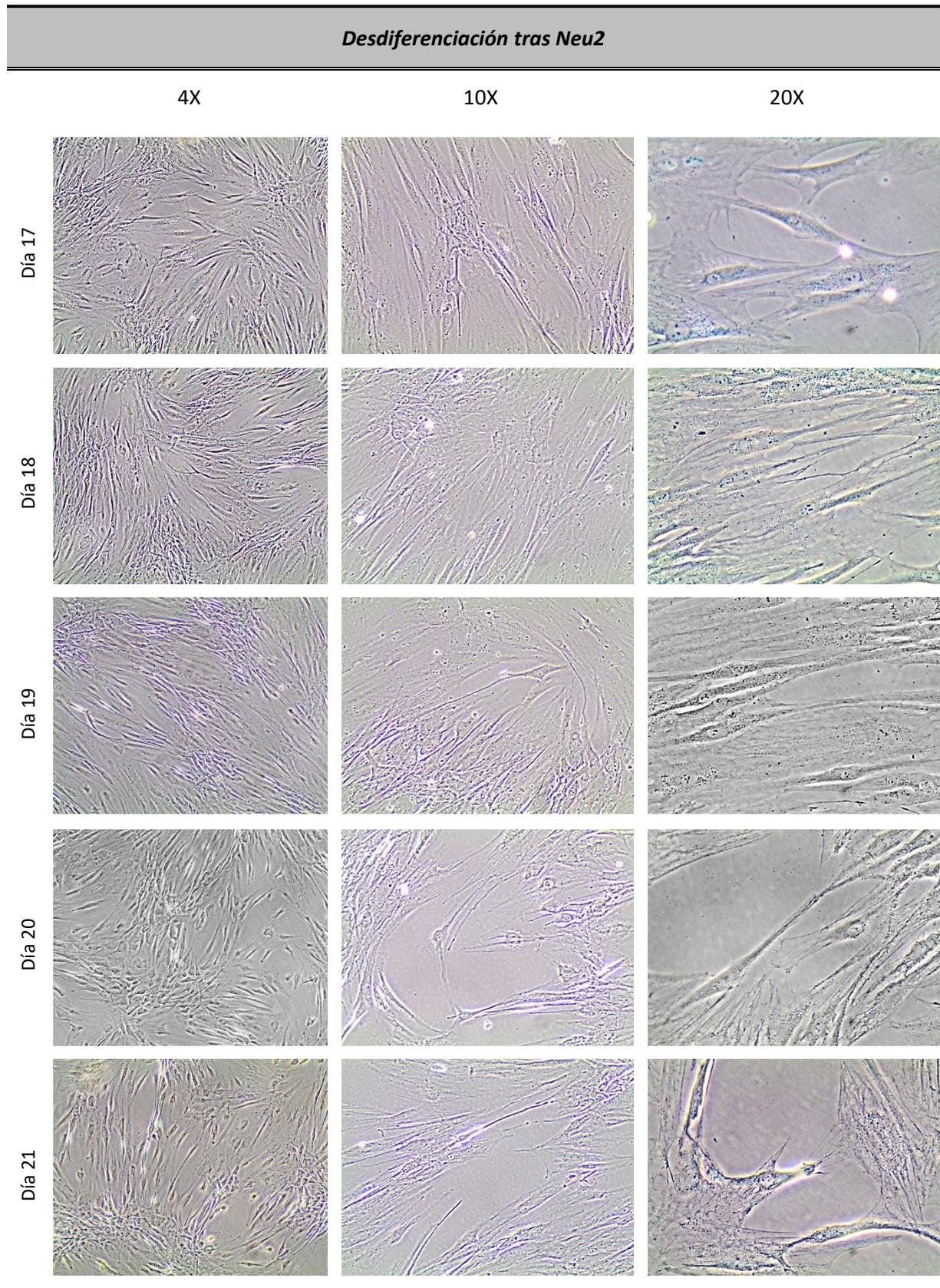
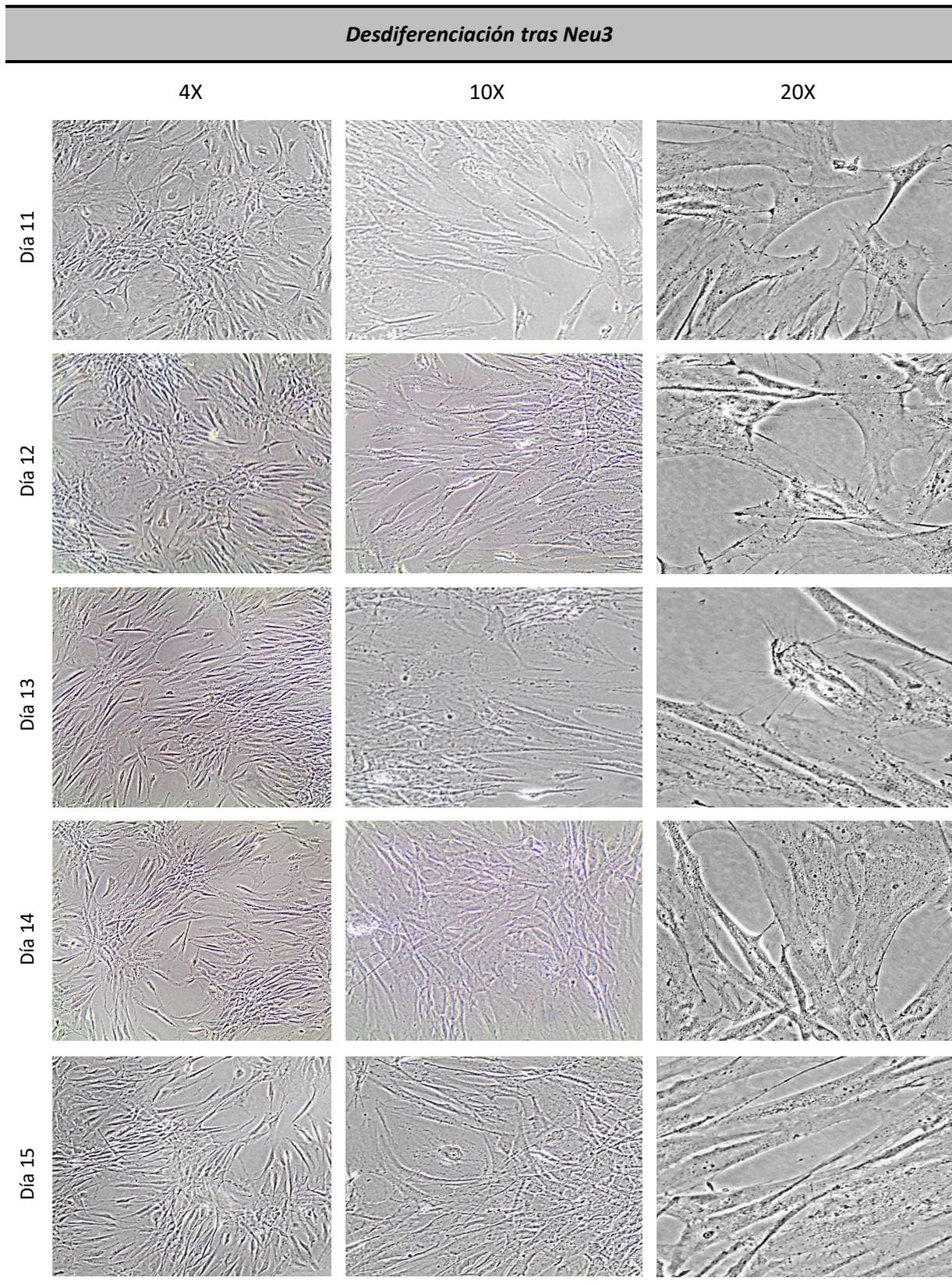


Figura 37. Cambios morfológicos en la desdiferenciación de hASCs inducidas con Neu3.



## IV.4. ESTUDIO DE MARCADORES PROTEICOS POR WESTERN BLOT

---

### A. Diferenciación neuronal

Los resultados obtenidos en el análisis por western blot de las proteínas extraídas a las células inducidas a linaje neuronal con los medios Neu1, Neu2 y Neu3 (*Figura 38*), demostraron que las células presentaban una expresión diferencial de marcadores de linaje neuronal frente a las hASCs control. Empleando el medio de diferenciación Neu1, se detectó un aumento de marcadores neuronales tempranos como Tubulina-III ( $\approx 2$  folds), marcadores de neuronas maduras como TAU ( $\approx 4$  folds) y TH ( $\approx 14$  folds), marcadores gliales como GFAP ( $\approx 8$  folds), así como marcadores funcionales como SNAP25 ( $\approx 12$  folds). Sin embargo, se produjo un descenso en la expresión de FOXO4. Por su parte, los medios Neu2 y Neu3 provocaron un aumento en la expresión de los marcadores Tubulina-III, TH ( $\approx 2$  folds en Neu2 y  $\approx 5$  en Neu3) y SNAP25 ( $\approx 3$  y  $2$  folds respectivamente) aunque algo menor que el provocado por Neu1. Por otra parte, la expresión de TAU no pareció variar y la Enolasa disminuyó su expresión. En conjunto, podemos decir que el medio Neu1 fue el que ocasionó los cambios más significativos y por tanto, el que parece inducir una mayor diferenciación neuronal.

### B. Desdiferenciación neuronal

Los mismos marcadores y metodología fueron empleados para el análisis de las muestras tras el proceso de desdiferenciación. Los resultados de western blot demostraron que la desdiferenciación tras la exposición a Neu1, induce una pérdida de la expresión de marcadores de neuronas maduras como MAP2 y Enolasa, así como de marcadores funcionales como CHAT y SNAP25, volviendo la célula a un estado más indiferenciado. Por otra parte, el proceso de desdiferenciación tras la exposición a Neu2 y Neu3 provocó una reducción significativa de la expresión de MAP2 y FOXO4 (*Figura 38*).

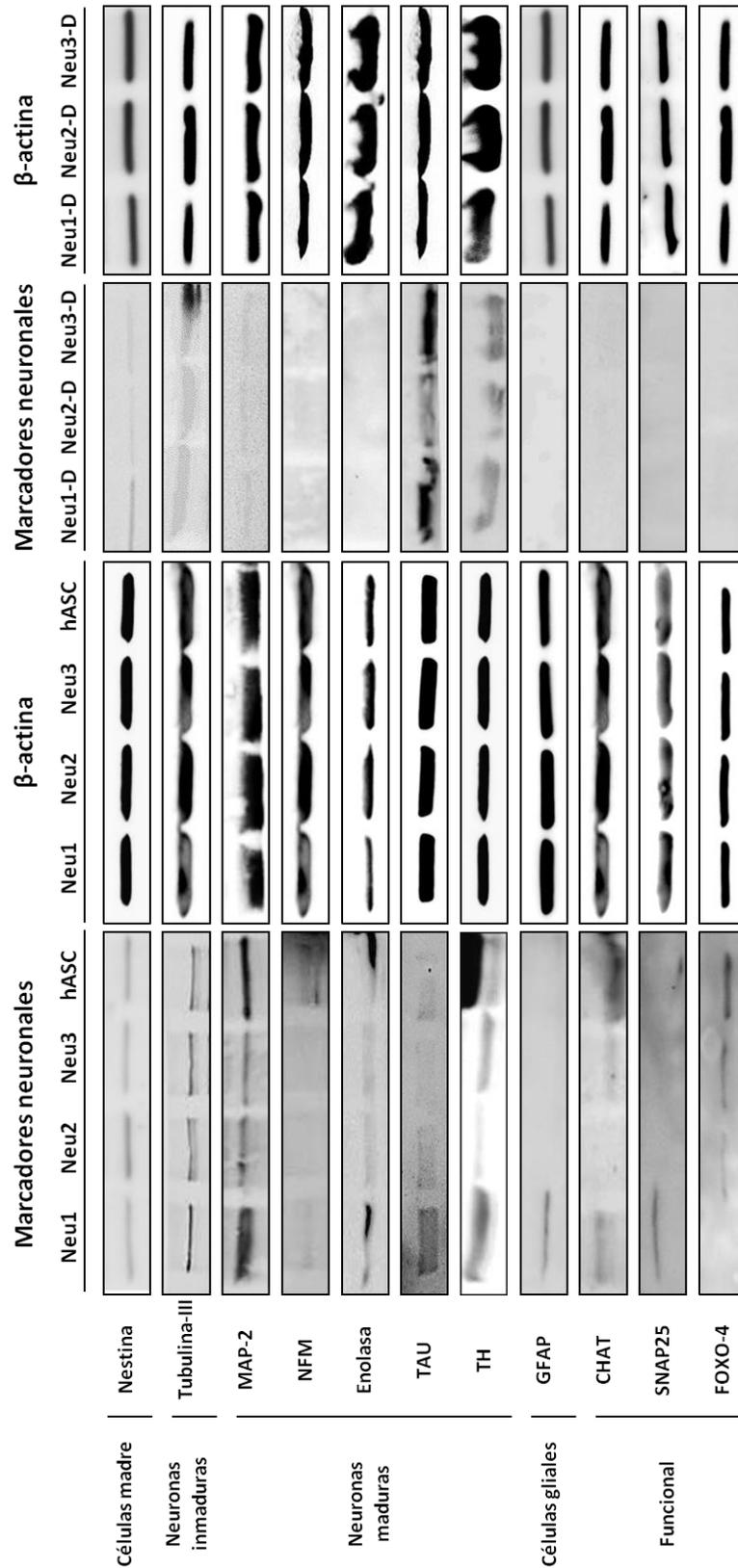


Figura 38. Resultados de los análisis de marcadores neuronales por western blot. Las muestras fueron tratadas con los medios de diferenciación neuronal Neu1, Neu2 y Neu3, y a continuación se las sometió a un proceso de desdiferenciación (Neu1-D, Neu2-D, Neu3-D). Como control se utilizó hASCs no tratadas.

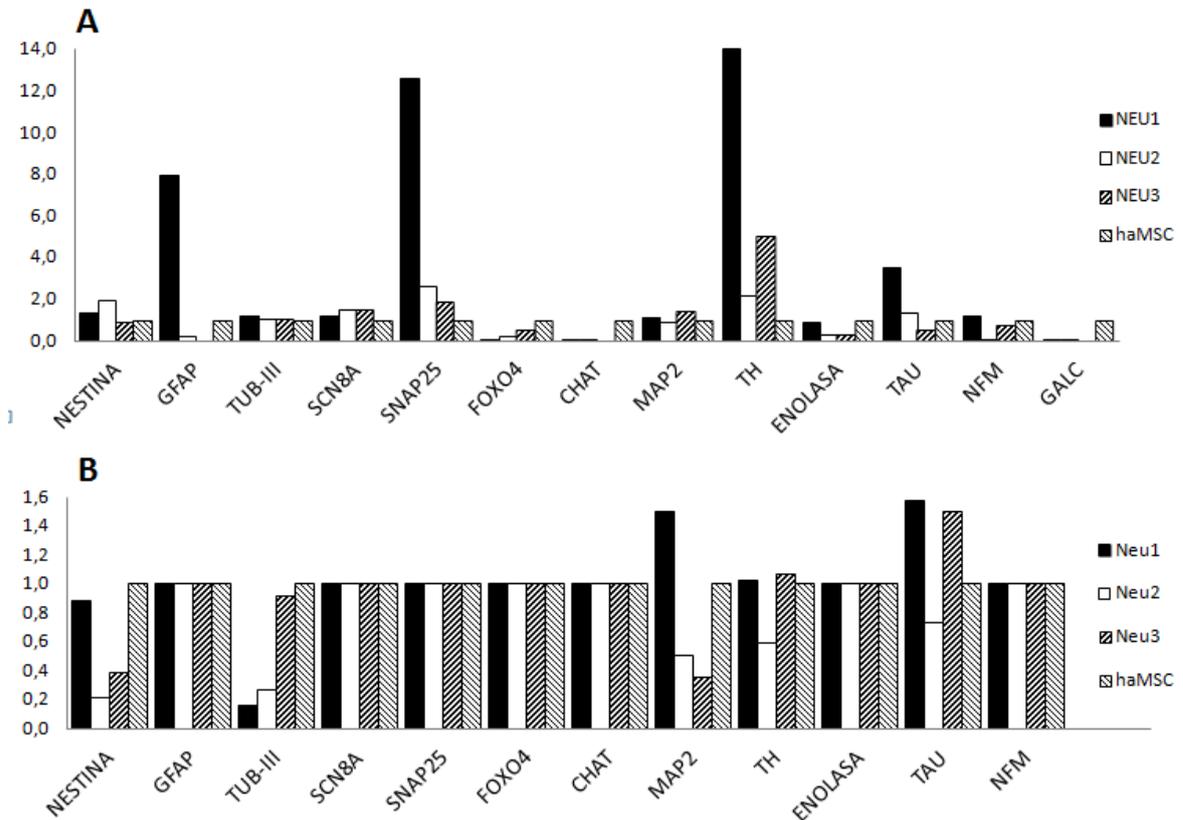


Figura 39. Cuantificación por densitometría de bandas de los resultados de western blot. A. Células diferenciadas; B. Células desdiferenciadas.

#### IV. 5. ESTUDIO DE MARCADORES PROTEICOS POR INMUNOFLUORESCENCIA

Como se muestra en la *Figura 40*, las hASCs sembradas en monocapa y expuestas a Neu1 mostraron un aumento significativo en la expresión de marcadores neuronales específicos como Nestina, TUB-III (marcador de neuronas jóvenes), TAU y TH (marcadores de neuronas maduras), y finalmente SNAP25, CHAT y FOXO4 (marcadores funcionales). Se observaron pequeños cambios con respecto a los medios Neu2 y Neu3, con una menor expresión de marcadores funcionales como SNAP25, CHAT y FOXO4. Los mismos marcadores neuronales y metodología se emplearon para el análisis de las muestras desdiferenciadas. Las inmunofluorescencias mostraron que la expresión de la mayoría de los marcadores disminuía tras la desdiferenciación (Neu1-D, Neu2-D y Neu3-D). Como se muestra en la *Figura 40*, esta disminución fue especialmente significativa en los marcadores de neuronas maduras TAU y TH, así como en los marcadores funcionales CHAT, FOXO4 y SNAP25.

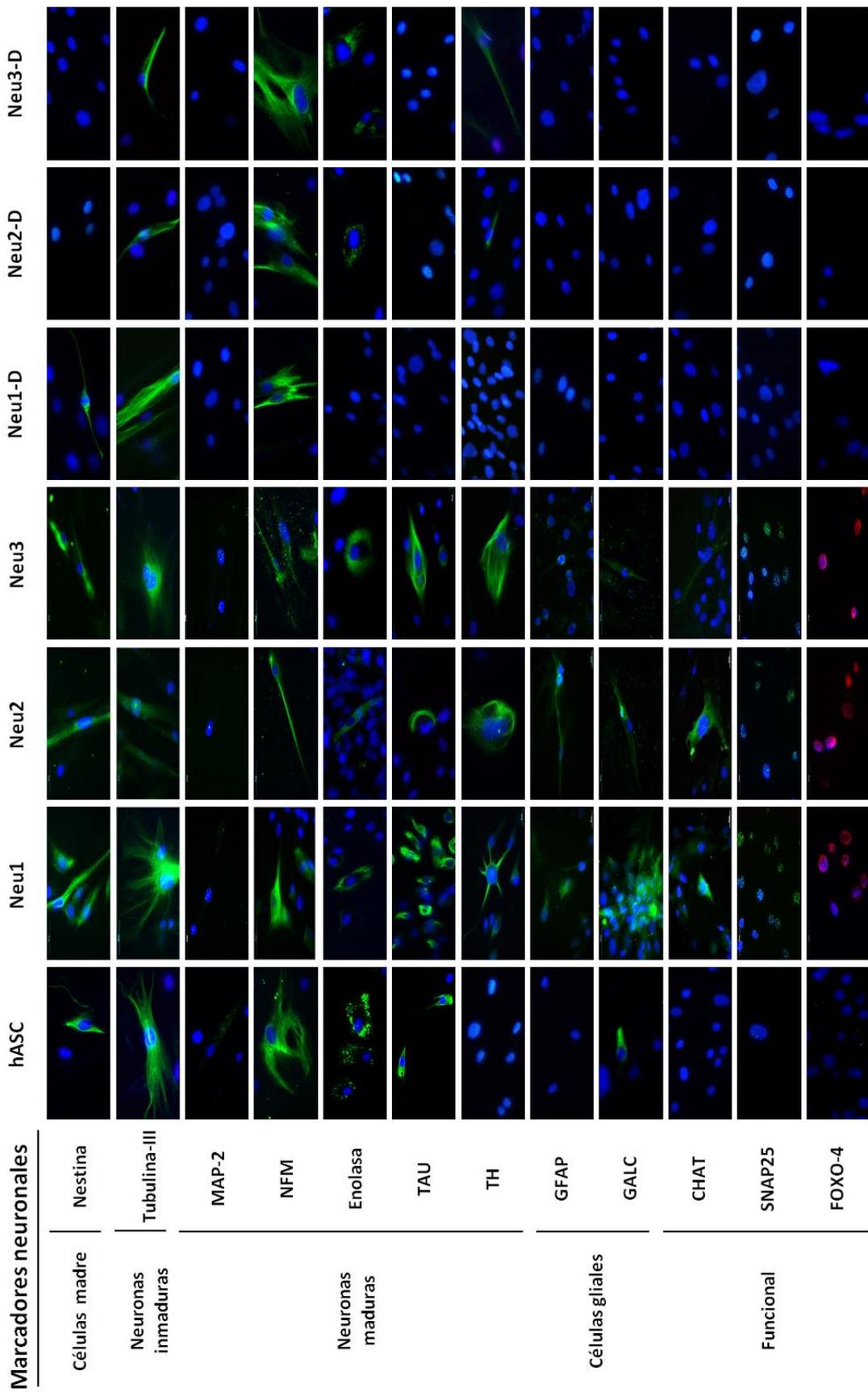


Figura 40. Análisis de expresión de proteínas neuronales mediante inmunofluorescencia. Análisis de las células inducidas con los tres medios de diferenciación y de las células desdiferenciadas. Como control se han utilizado hASCs no tratadas.

#### IV.6. ESTUDIO DE MARCADORES PROTEICOS POR *REAL TIME PCR*

---

Los resultados obtenidos mediante *Real Time PCR* del análisis de expresión de marcadores neuronales de las muestras celulares diferenciadas, mostraron, al igual que los estudios de western Blot e inmunofluorescencia, que el medio de inducción Neu1 es el que provocaba los cambios más significativos (*Figura 41*). Este medio produjo un aumento de 7,6 *fold*s de expresión en la proteína Nestina, MAP2 aumentó hasta 25,92 *fold*s, SNAP25 17,84 *fold*s, CHAT 35,22 *fold*s y FOXO4 10,64 *fold*s. Sin embargo, el cambio más significativo fue el de la proteína SCN9A, relacionada con un canal de sodio dependiente de voltaje, que aumentó su expresión hasta 79,12 *fold*s. Por otra parte, el medio Neu2 no pareció alterar la expresión de Nestina y causó un incremento menor de la expresión de NFM, MAP2 y SNAP25. Finalmente, el medio de inducción Neu3 produjo un gran aumento en la expresión de marcadores propios de astrocitos como GFAP, con 87,44 *fold*s de expresión, y marcadores neuronales como FOXO4, con hasta 32,36 *fold*s respecto al control no tratado.

Al igual que en los estudios previos, el proceso de desdiferenciación provocó en general una disminución de los marcadores neuronales. En el caso de la desdiferenciación de Neu1 (N1D) (*Figura 42*), se pudo observar una disminución de la expresión de Nestina de 8,4 *fold*s, acompañada por una reducción en los niveles de marcadores de neuronas maduras, MAP2 y NFM con 4,2 y 3,1 *fold*s respectivamente, y especialmente en los marcadores funcionales SNAP25 y SCN9A, con 16,9 y 22,4 *fold*s respectivamente. La desdiferenciación de hASCs inducidas previamente con Neu2 y Neu3 (N2D y N3D), mostró una reducción en marcadores funcionales como CHAT, SNAP25 y FOXO4.

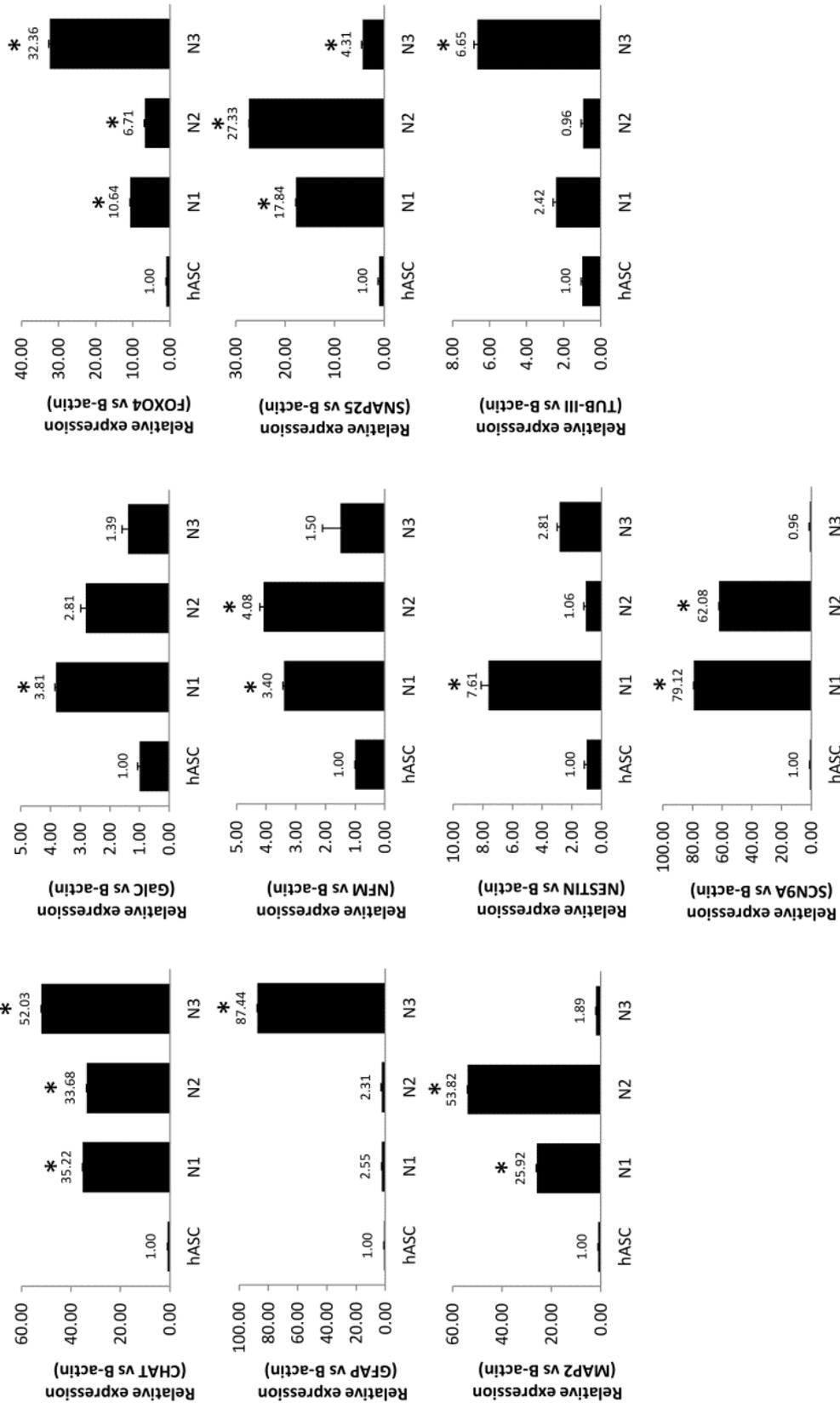


Figura 41. Análisis cuantitativo por RT-PCR de marcadores en hASC diferenciadas. La expresión de los marcadores neuronales se analizó en el control no tratado y en hASC inducidas con los tres medios de inducción: N1 (21 días), N2 (15 días) y N3 (10 días). Diferencias estadísticamente significativas (prueba t de Student) (\*) con respecto al control ( $p \leq 0.05$ ).

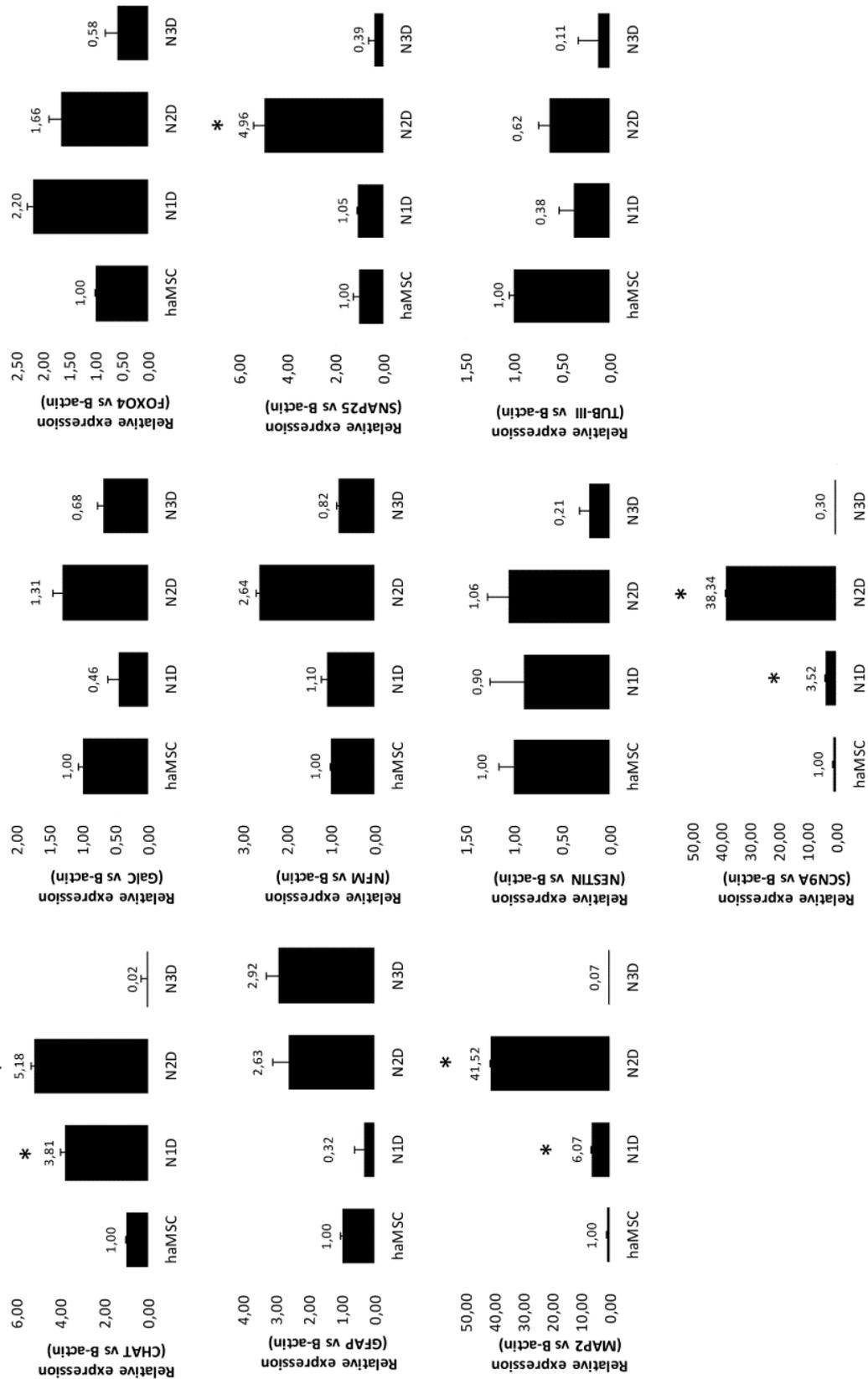
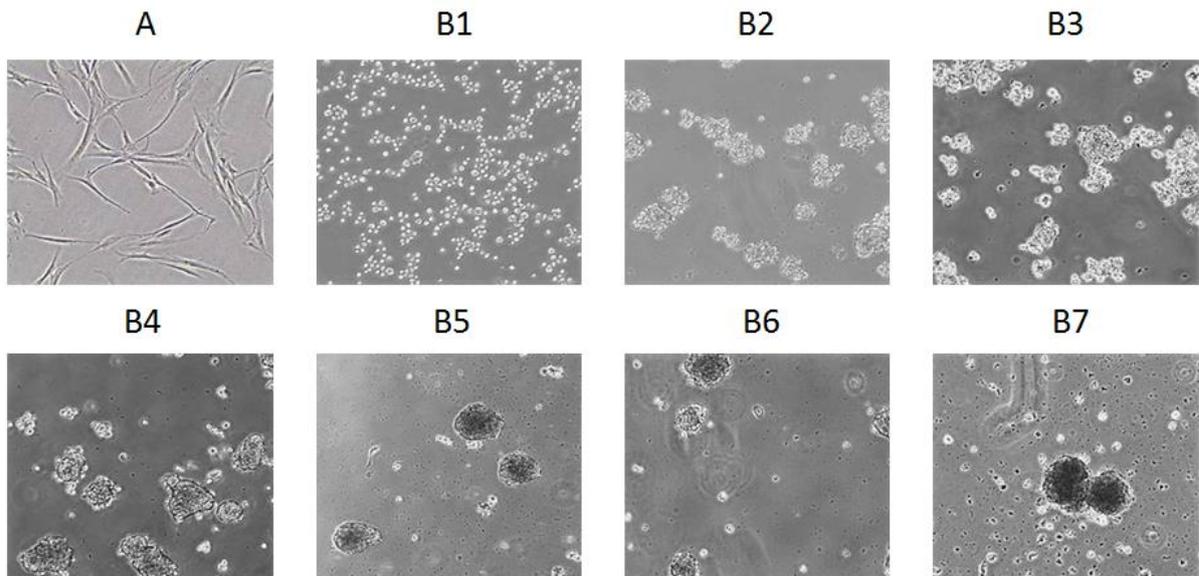


Figura 42. Análisis cuantitativo por RT-PCR de marcadores en hASC desdiferenciadas. La expresión de los marcadores neuronales se analizó en el control no tratado y en hASC desdiferenciadas tras ser tratadas con los tres medios de inducción: N1D (con Neu1), N2D (con Neu2) y N3d (con Neu3). Diferencias estadísticamente significativas (prueba t de Student) (\*) con respecto al control ( $p \leq 0.05$ ).

## IV. 7. FORMACIÓN DE NEUROESFERAS

---

Como puede observarse en la *Figura 43-B1*, las hASCs mantenidas en un medio DMEM/F12 suplementado con B27, perdieron su adherencia al frasco de cultivo y comenzaron a agregarse y formar esferas celulares en suspensión de manera espontánea a los 7 días de inducción (*Figuras 43-B2-7*).



*Figura 43. Formación de neuroesferas.*

*(A) hASCs sembradas en medio DMEM completo con la típica morfología fibroblástica y (B) suspendidas en medio DMEM/F12 suplementado con B27 (día 1- B1; día 2- B2; día 3-B3; día 4-B4; día 5-B5; día 6-B6 y día 7-B7) (Imágenes tomadas a 4X).*

## IV. 8. DIFERENCIACIÓN Y DESDIFERENCIACIÓN NEURONAL DE NEUROESFERAS

---

### A. Diferenciación neuronal

En base a los resultados positivos obtenidos con el medio de diferenciación Neu1, que provocó los cambios más significativos en la expresión de marcadores neuronales, se decidió realizar un estudio complementario con neuroesferas. La generación de neuroesferas permitió estudiar el comportamiento de las hASCs tridimensionalmente y evaluar su habilidad para diferenciarse y expresar marcadores propios de linaje neuronal, simulando su comportamiento en un entorno similar al que encontrarían una vez trasplantadas en el paciente.

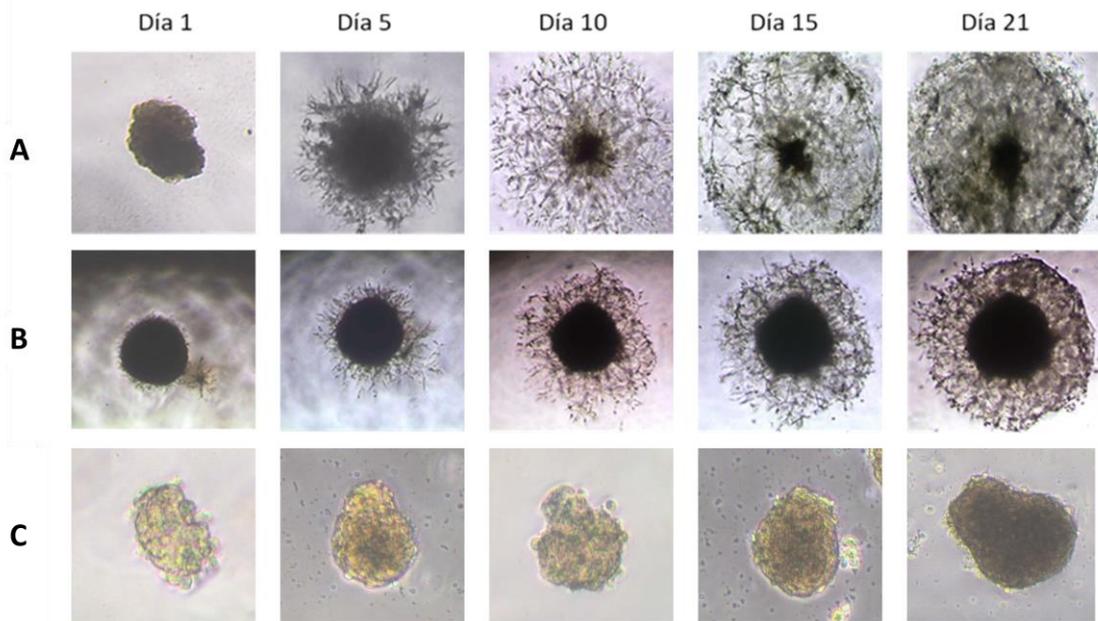


Figura 44. Inducción neuronal de neuroesferas. Se empleó el medio Neu1 durante 21 días (ejemplos A y B) frente al control sin tratar (C).

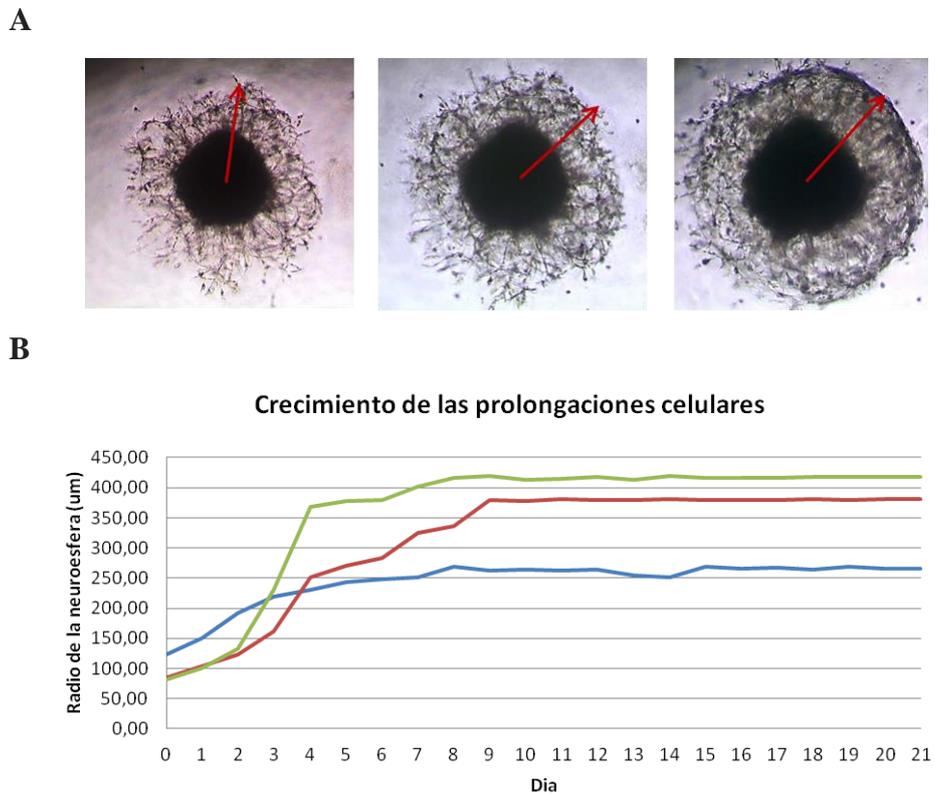
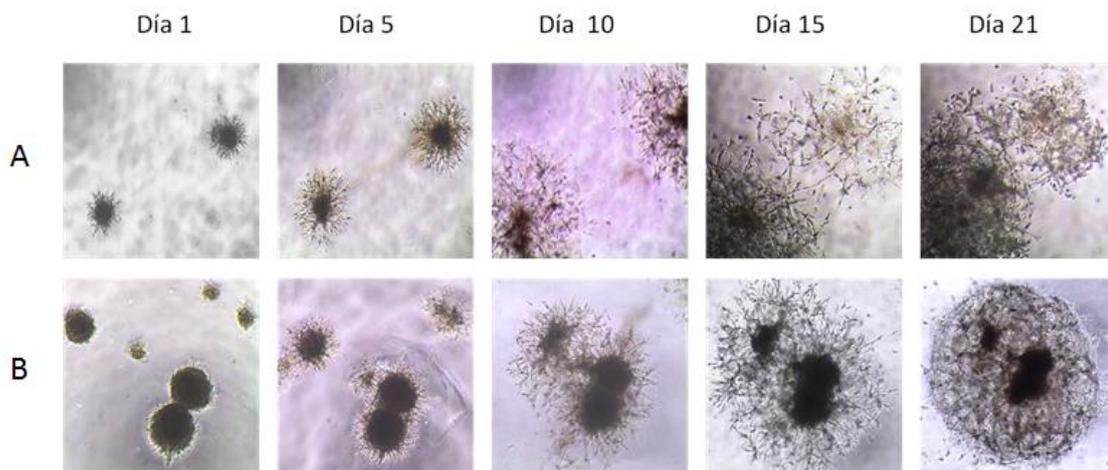


Figura 45. Progresión de las prolongaciones celulares emitidas por neuroesferas. A. Imagen representativa de las neuroesferas; B. Radio de la neuroesfera medida desde el centro hasta el extremo de sus ramificaciones tras 21 días de diferenciación con el medio Neu1.

Las neuroesferas mantenidas en el medio Neu1, crecieron desarrollando largas extensiones celulares a modo de dendritas, alcanzando un radio aproximado de 250-350  $\mu\text{m}$  a los 21 días de cultivo (*Figura 45-A*). Esta longitud coincide con la distancia máxima de difusión del oxígeno desde el soma neuronal (McMurtrey 2016) (*Figura 45-B*).

Además, como se puede apreciar en la *Figura 46*, se observó que las neuroesferas inducidas emiten largas prolongaciones que llegan a interconectar neuroesferas diferentes e incluso a fusionarlas formando una única neuroesfera.



*Figura 46. Interconexión entre neuroesferas, ejemplos A y B.*

El estudio de los marcadores neuronales mostró un aumento en su expresión, más intensa que la encontrada en las hASCs en monocapa inducidas a linaje neuronal con los medios Neu1, Neu2 y Neu3, incluyendo marcadores de neuronas inmaduras como TUB-III y maduras como TAU, NFM y TH. Sin embargo, no se observó un aumento en marcadores funcionales como SNAP25 (*Figura 47*). Además, se llevaron a cabo estudios para determinar la modulación en la expresión de Vimentina y N-cadherina, dos moléculas de adhesión celular, relacionadas con la diferenciación neuronal.

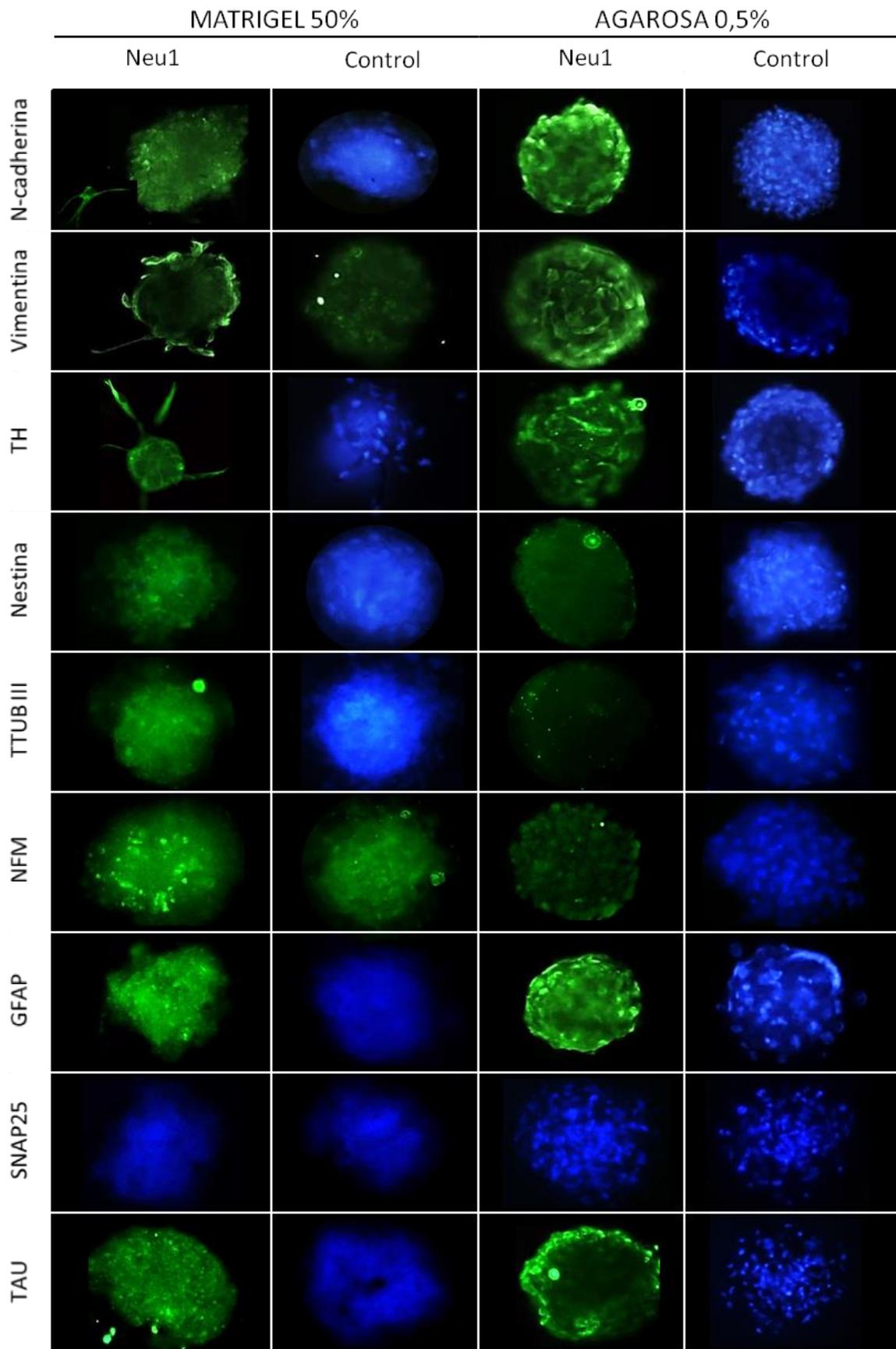
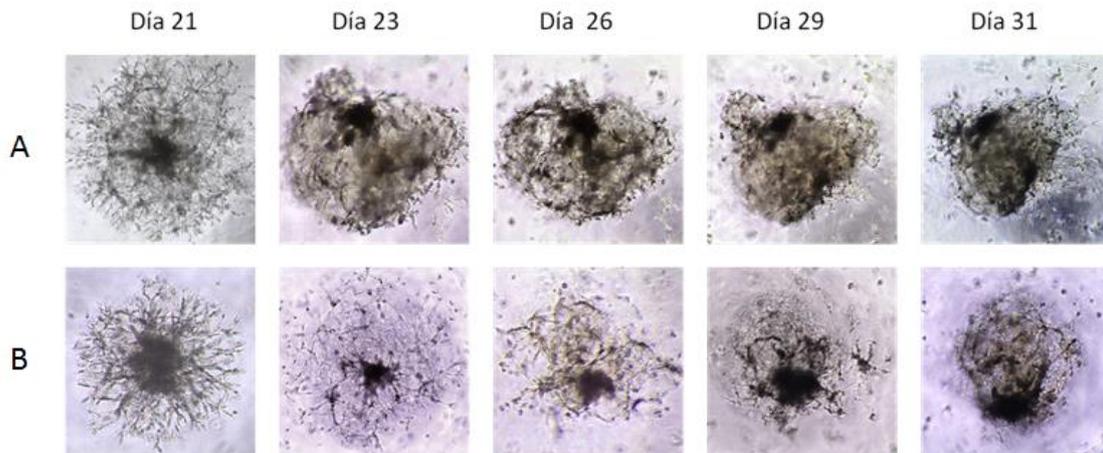


Figura 47. Estudio de marcadores de diferenciación neuronal por inmunofluorescencia. Se realizaron a neuroesferas de hASCs y los controles se obtuvieron de neuroesferas no tratadas.

## B. Desdiferenciación neuronal

Un análisis de la desdiferenciación de las neuroesferas una vez sustituido el medio Neu1 por un medio estándar durante 10 días (día 31 de cultivo), demostró que las neuroesferas colapsaban y adquirían una morfología irregular, al replegarse las extensiones celulares formadas durante la diferenciación neuronal (*Figura 48*).



*Figura 48. Cambios morfológicos durante la desdiferenciación de neuroesferas. Ejemplos A y B. Imágenes tomadas a 4X durante 10 días.*

## IV. 9. CAPACIDAD DE MIGRACIÓN CELULAR

---

Se sabe que las MSCs son capaces de migrar hacia los tejidos dañados para favorecer su regeneración. Para estudiar esta capacidad en el tejido nervioso dañado, se realizó un ensayo de migración de hASCs cocultivadas con células SH-SY5Y de neuroblastoma. Se emplearon células hASCs sembradas en monocapa y en neuroesferas, todas ellas diferenciadas con el medio Neu1, determinando su capacidad de migración en un medio rico en glucosa (*Figura 50*) frente a un medio sin glucosa (*Figura 51*).

Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que la capacidad de migración fue mayor cuando se utilizó medio sin glucosa y neuroesferas diferenciadas. En este caso, la capacidad de migración fue nueve veces superior a la de las hASCs diferenciadas con Neu1. El análisis cuantitativo de la migración celular se realizó con el programa *Imagej* y puede verse en la *Figura 49*.

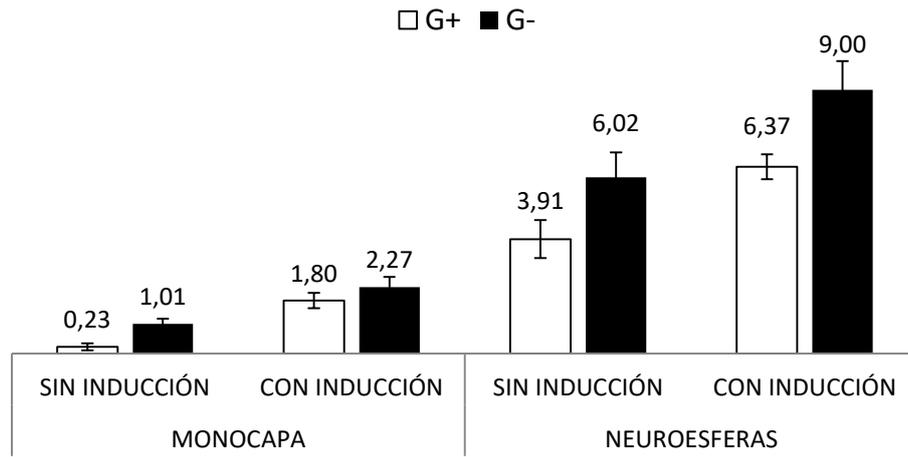


Figura 49. Capacidad de migración de hASCs y neuroesferas inducidas con Neu1. Los resultados son la media  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas experimentales,

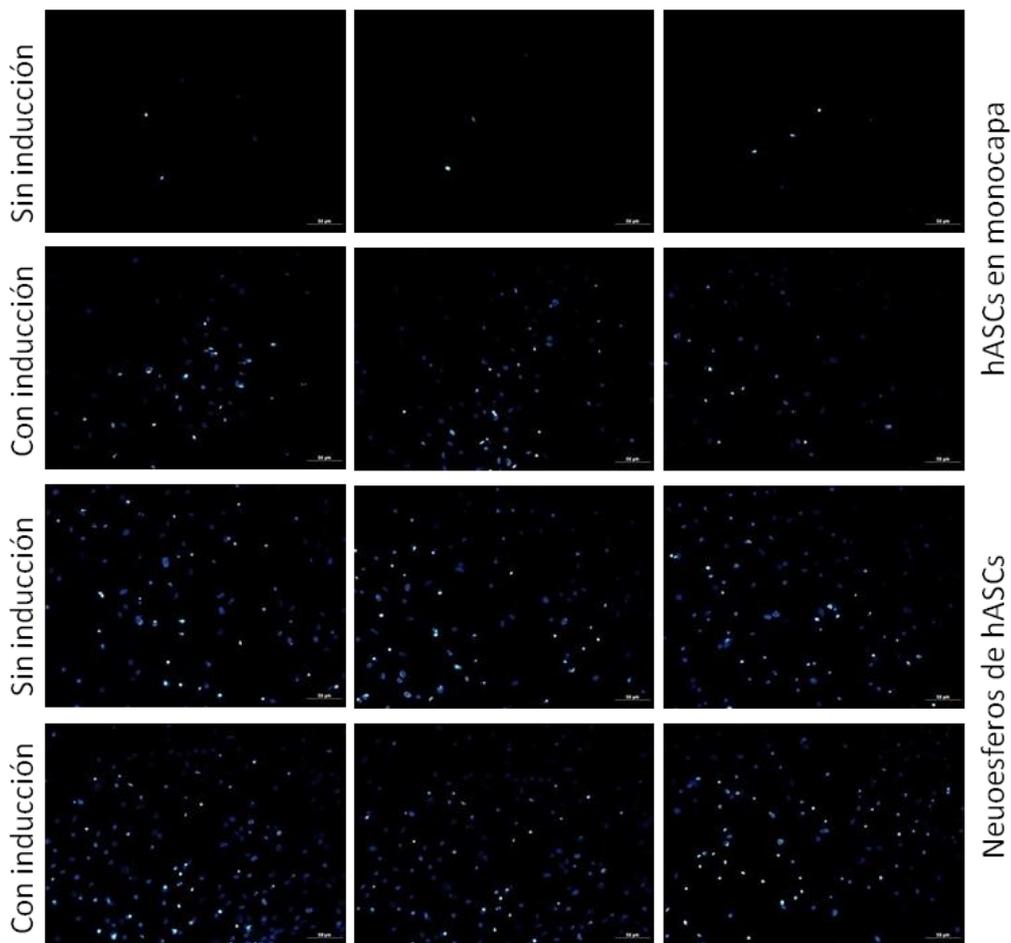


Figura 50. Imágenes representativas de la migración en un medio rico en glucosa.



Figura 51. Imágenes representativas de la migración en un medio pobre en glucosa.

#### IV. 10. ENSAYO DE INTERACCIÓN CON EL ENDOTELIO

En el experimento realizado con células endoteliales HUVECs, para comprobar si su presencia influye en el proceso de diferenciación neuronal, se observó un importante cambio morfológico entre las hASCs diferenciadas en presencia de medio de HUVECs y las que se mantuvieron en medio Neu1 únicamente. Las que se diferenciaron en presencia de medio de HUVECs, mantuvieron una tasa alta de proliferación y su clásica morfología fibroblástica hasta el octavo día, en el que fueron fijadas. Por su parte, las células que se diferenciaron en medio Neu1 normal presentaron los cambios morfológicos explicados anteriormente en el *Apartado IV.3. Diferenciación y dediferenciación neuronal de hASCs: modificaciones morfológicas*, retrayendo el citoplasma hacia el núcleo y desarrollando una morfología propia de células de linaje neuronal a los ocho días (*Figura 52*).

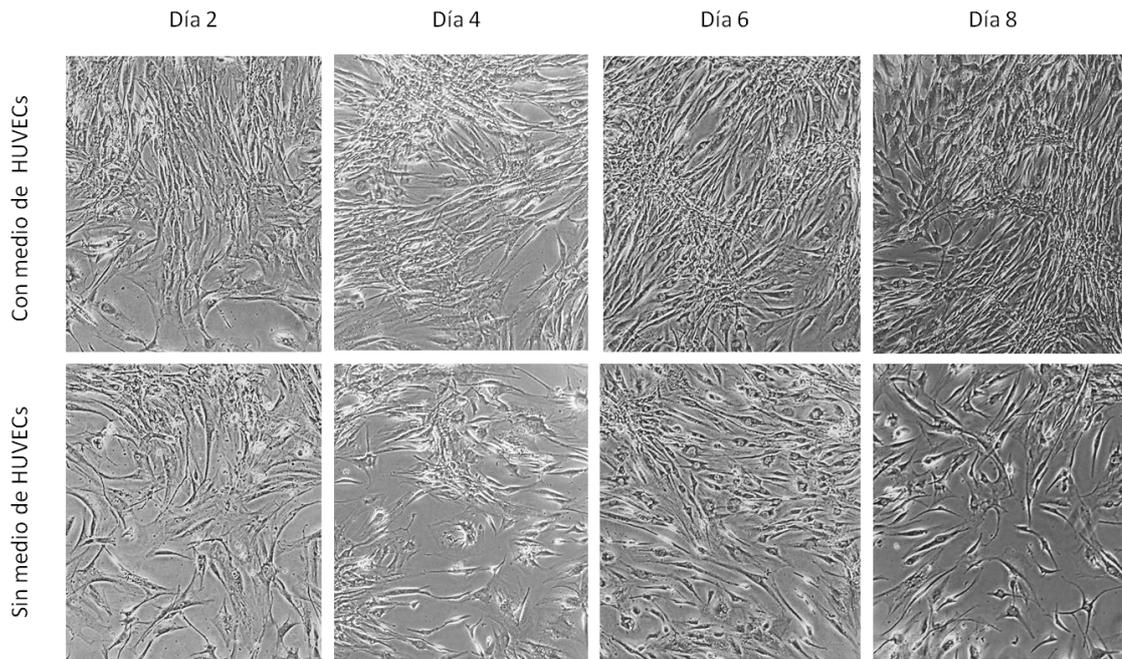


Figura 52. Cambios morfológicos observados en presencia de Neu1 y medio de HUVECs.

Por otra parte, las células a las que se mantuvo con medio Neu1 después de retirarles el medio de HUVECs el octavo día, comenzaron a adquirir la clásica morfología neuronal ya descrita. Al finalizar el experimento mostraron prácticamente el mismo aspecto que las células que se habían mantenido con el medio Neu1 desde el comienzo del mismo (Figura 53).

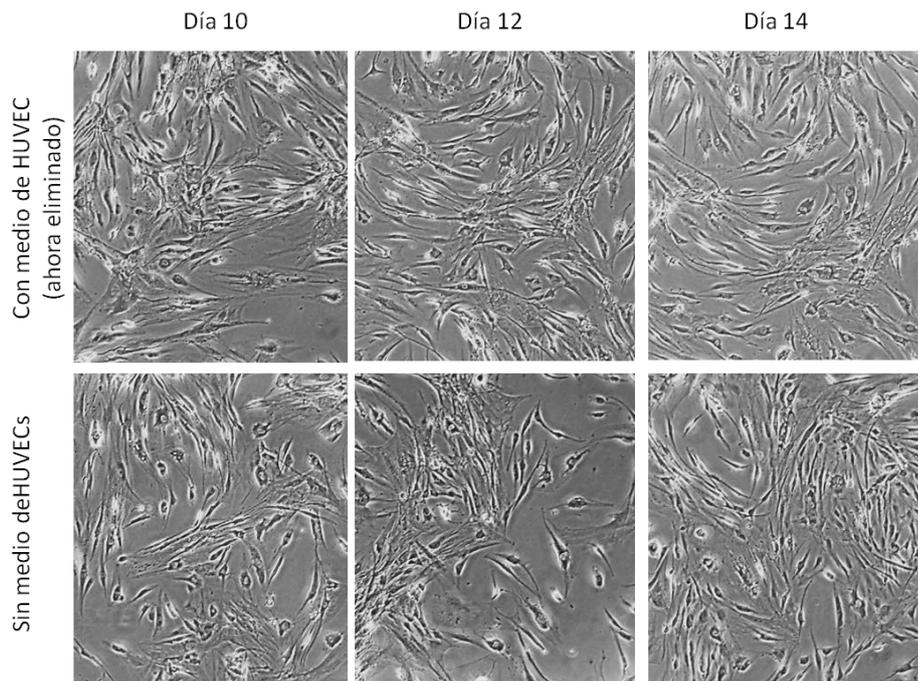


Figura 53. Cambios morfológicos en presencia de Neu1 sin el medio de HUVECs.

Estos resultados parecen mostrar que, en presencia de células endoteliales, se favorece la proliferación de progenitores neuronales, pero se inhibe la diferenciación neuronal. Para confirmarlo se realizaron inmunofluorescencias siguiendo la metodología descrita anteriormente en el *Apartado III.6. Análisis de marcadores proteicos mediante inmunofluorescencia*, de marcadores neuronales y de marcadores relacionados con la adhesión celular y la interacción con el endotelio. Como puede verse en la *Figura 54*, cuando las células se diferenciaron en presencia de medio de HUVECs, la expresión de marcadores neuronales maduros fue menor que en células que se diferenciaron en presencia de Neu1 normal durante la primera semana. Otros marcadores inmaduros como Nestina o de expresión basal alta como NFM, no mostraron diferencias entre los dos tratamientos. Los marcadores tardíos como la proteína TAU o GFAP no se expresaron en ninguno de los tratamientos. Todas las células mostraron una alta expresión de Vimentina, y de N-cadherina, marcadores relacionados con la adhesión celular. La N-cadherina aumentó su concentración notablemente cuando se puso en contacto a las hASCs con medio de HUVECs.

Durante la segunda semana, las hASCs a las que se les retiró el medio de HUVECs comenzaron a expresar marcadores como Tubulina y TH, aunque con menor intensidad que las células que estuvieron dos semanas en contacto con el medio Neu1. Además, no expresaron marcadores neuronales tardíos como lo hicieron las hASCs que permanecieron dos semanas diferenciándose con Neu1. En la *Figura 54* se muestran las imágenes de fluorescencia de cada tratamiento.

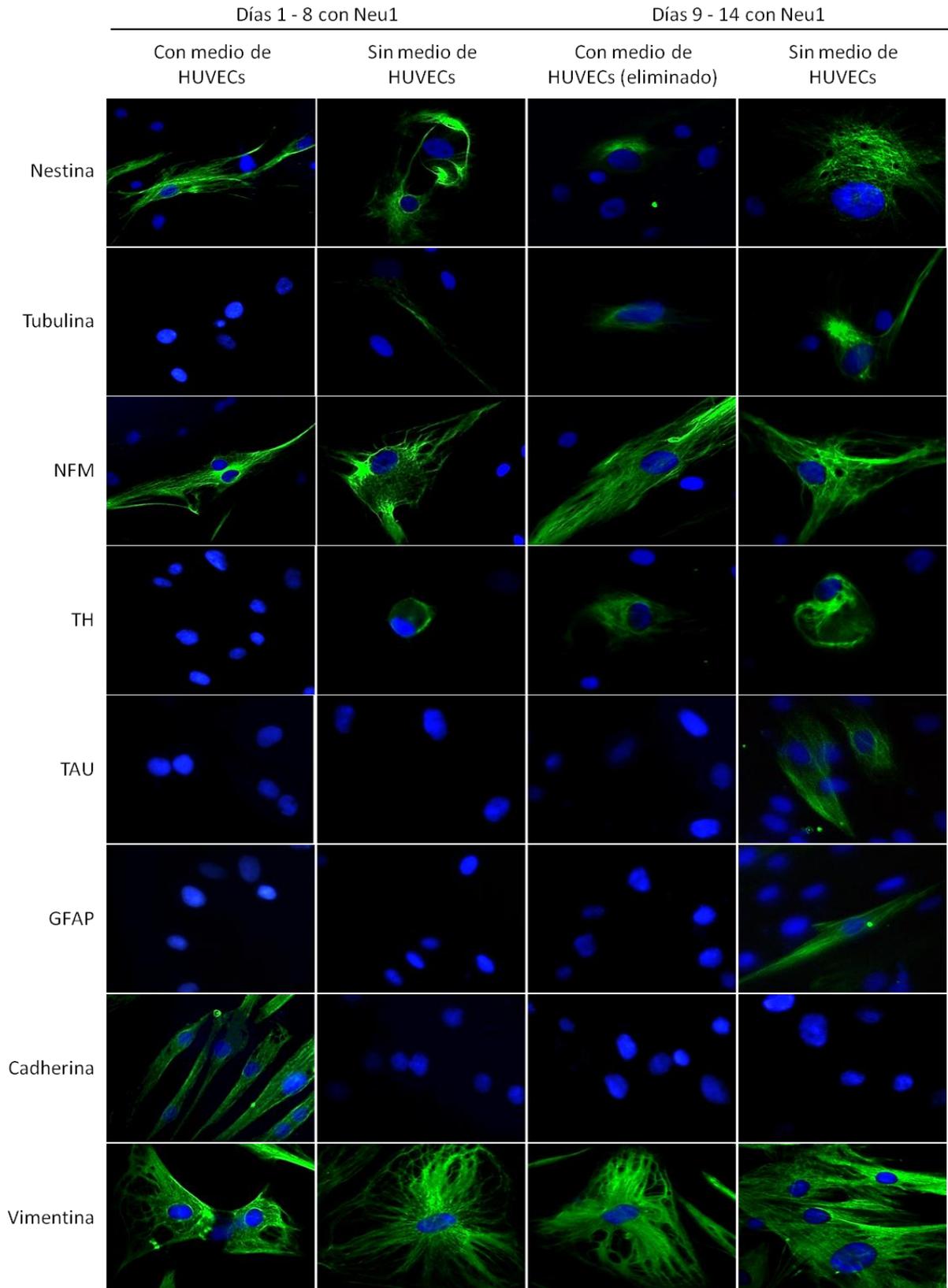


Figura 54. Estudio mediante inmunofluorescencia de los marcadores neuronales estudiados en hASCs en presencia o no de medio endotelial.

## IV. 11. ESTUDIOS EPIGENÉTICOS: ANÁLISIS DEL METILOMA Y EL TRANSCRIPTOMA

### IV.11.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA GLOBAL POR *MICROARRAY*

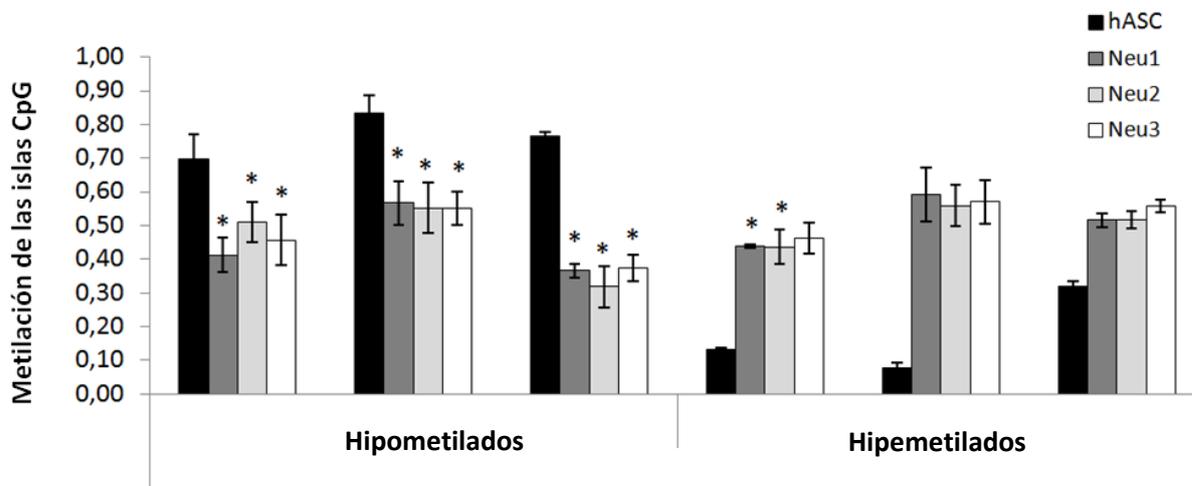
Partiendo de ADN de hASCs extraído al final de las diferenciaciones neuronales con Neu1, Neu2 y Neu3, y tras la desdiferenciación, se analizó el estado de metilación de 27.578 sitios CpG del genoma humano de hASCs obtenidas de diferentes donantes ( $n = 3$ ). Para buscar cambios específicos en el estado de metilación de islas CpG durante el proceso de diferenciación celular, se empleó un método basado en umbrales que utiliza tres réplicas para cada muestra y un valor de corte  $\beta$  de metilación de CpG  $> 20\%$ . A la hora de seleccionar los genes, se tuvo en cuenta también la función que desempeñaban, seleccionándose genes relacionados con el desarrollo embrionario, la neurogénesis o los factores de transcripción.

Tabla 43. Genes candidatos tras analizar los resultados de los arrays de metilación.

<i>Gen</i>	<i>Estado</i>	<i>Proteínas</i>	<i>Actividad</i>	<i>Referencias</i>
Hoxa-5	HIPOMETILADO	HOMEBOX PROTEIN 5	Codifica factores de transcripción y está sobreexpresado en neuronas en cultivo	(Dunn, Simmons et al. 2015)
GRM4		GLUTAMATE METABOTROPIC RECEPTOR 4	Relacionado con las sinapsis de neuronas dopaminérgicas	(Kim, Zhang et al. 2016)
FGFR1		RECEPTOR DEL FGF 1	Indicador de neurogénesis y neuroinflamación	(Woodbury and Ikezu 2014)
RTEL1	HIPERMETILADO	HELICASA 1	Relacionado con la estabilidad, la protección y la elongación de telomerasas	(Li, Jin et al. 2013)
METRNL		METEORINA	Implicado en la diferenciación de células de la glía y formación de axones durante la neurogénesis	(Nishino, Yamashita et al. 2004)
EN1		ENGRAILED HOMEBOX 1	Relacionado con el desarrollo embrionario y marcador neuronal	(Noisa, Raivio et al. 2015)
Pax-9		PAIRED BOX 9	Implicado en el desarrollo fetal y de la cresta neuronal	(Monsoro-Burq 2015)

El análisis comparativo entre las hASCs control y células hASCs diferenciadas con los tres medios de diferenciación, permitió seleccionar siete genes, que mostraron una metilación diferencial tras la diferenciación (tres hipometilados: Hoxa-5, GRM4, FGFR1 y cuatro hipermetilados: RTEL1, METRN, EN1, Pax-9). El papel biológico de estas zonas CpG parecía estar asociado a genes relacionados con tareas de regulación (*Tabla 43*).

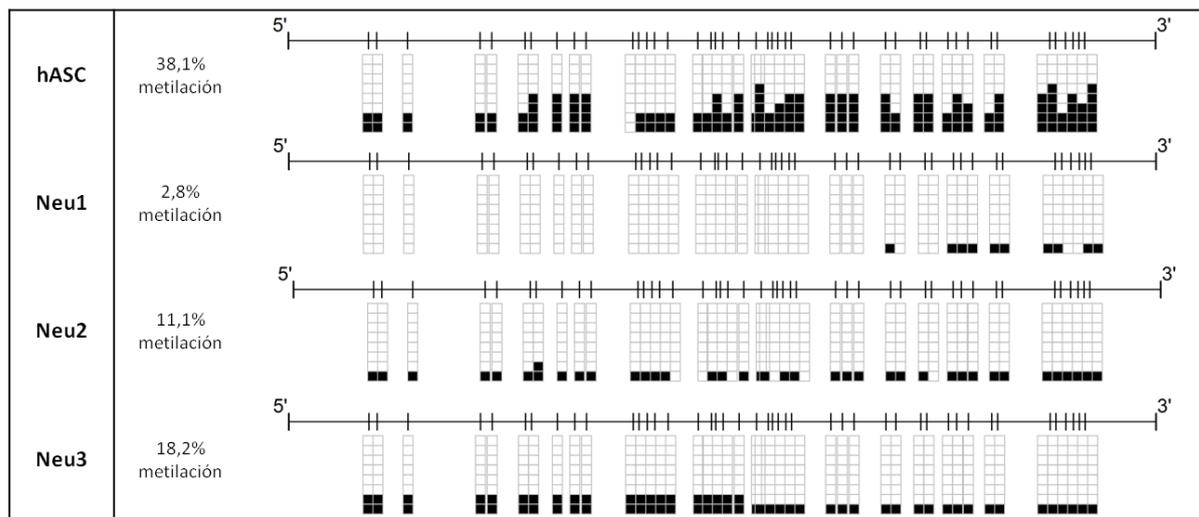
Como podemos observar en la *Figura 55*, encontramos una metilación de Hoxa-5 en las hASCs control ( $\approx 70\%$  de metilación) mientras que en las hASCs diferenciadas con Neu1, Neu2 y Neu3 los niveles de metilación fueron del 40%, 50% y 45% respectivamente. La metilación de GRM4 y FGFR1 representó un 80% en las hASCs control, mientras que en células diferenciadas era de aproximadamente un 55% con los tres protocolos de diferenciación. Por otro lado, se encontró un aumento significativo en el grado de metilación en RTEL1, METRN, EN1 y Pax-9 ( $\approx 50\%$ ,  $60\%$ ,  $65\%$  y  $70\%$  respectivamente) en células hASCs diferenciadas, mientras que en células control se observó una metilación mucho menor ( $\approx 13\%$ ,  $7\%$ ,  $33\%$  y  $38\%$  respectivamente).



*Figura 55. Estado de metilación de los genes candidatos seleccionados. Se mide el grado de modificación tras el proceso de diferenciación neurogénica de las hASCs con los tres medios de inducción*

IV.11.2. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR *MICROARRAY*A. Diferenciación neuronal

Los resultados obtenidos por *microarray* se validaron mediante secuenciación genómica con bisulfito de múltiples clones para los genes candidatos metilados diferencialmente. En las *Figuras 56-67*, cada isla CpG está representada con cortas líneas verticales sobre la secuencia génica en dirección 5'→3', mientras que los cuadros indican el estado de metilación de las citosinas: metilado (negro) o no metilado (blanco). El perfil de metilación de los seis genes se analizó tras la diferenciación neuronal y después de la desdiferenciación, y pudo observarse cómo se adaptó rápidamente a los cambios en el microentorno circundante.



*Figura 56. Secuenciación genómica con bisulfito de las islas CpG del gen Hoxa-5. Se realiza tras la inducción neuronal con los tres medios de inducción y el control utilizado fueron las células hASCs sin tratar.*

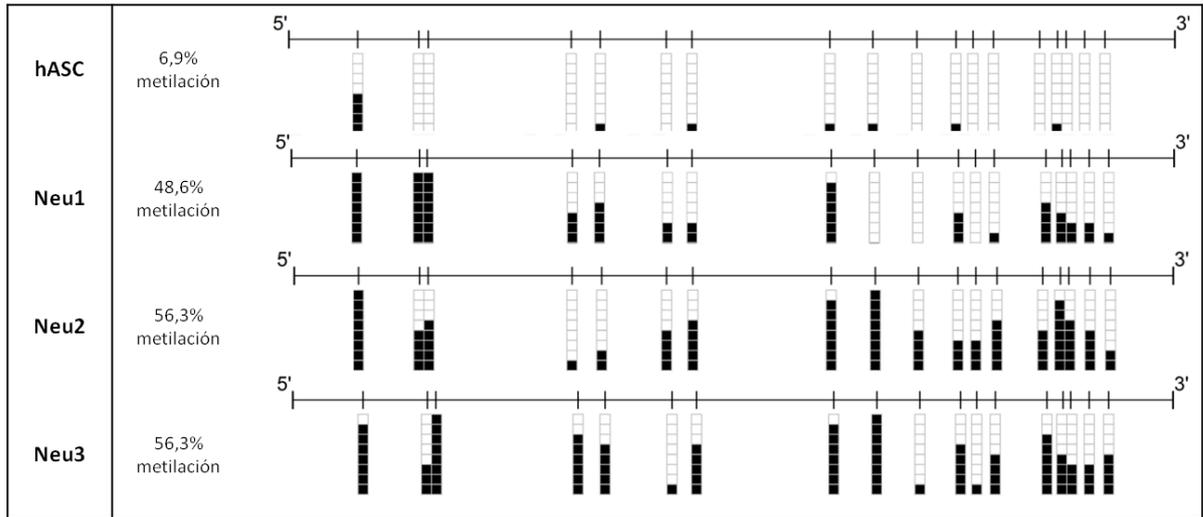


Figura 57. Secuenciación genómica con bisulfito de las islas CpG del gen Pax-. Se realiza tras la inducción neuronal con los tres medios de inducción y el control utilizado fueron las células hASCs sin tratar.

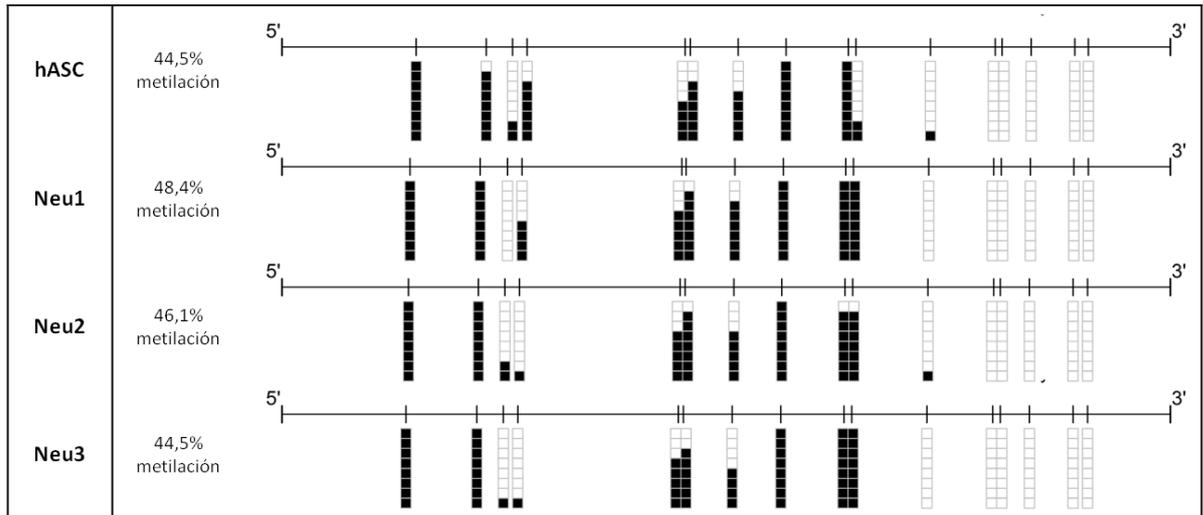


Figura 58. Secuenciación genómica con bisulfito de las islas CpG del gen FGFR1. Se realiza tras la inducción neuronal con los tres medios de inducción y el control utilizado fueron las células hASCs sin tratar.

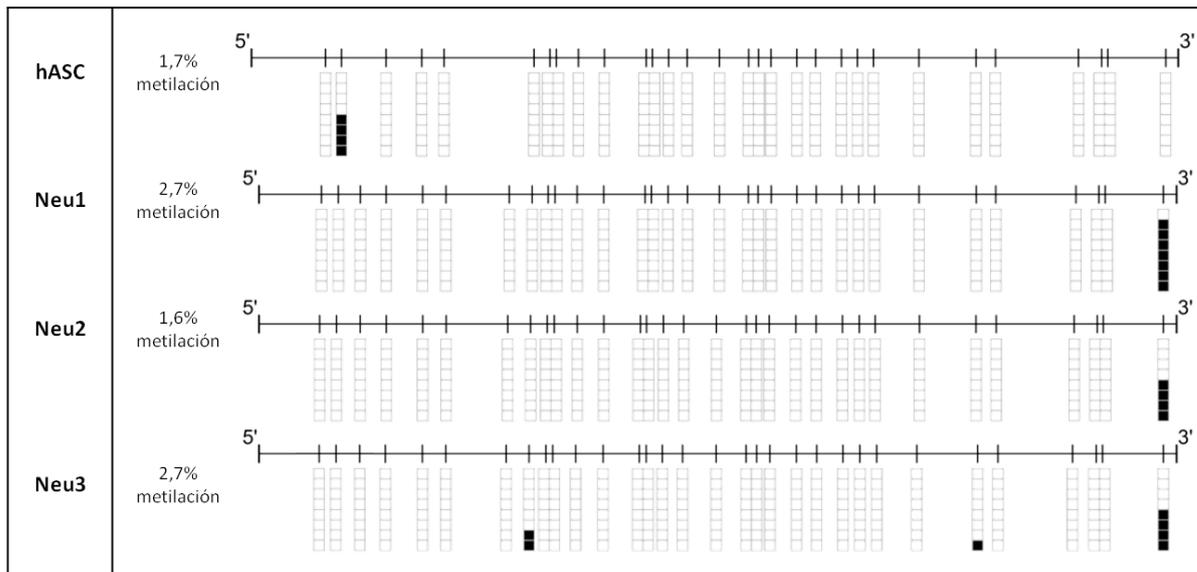


Figura 59. Secuenciación genómica con bisulfito de las islas CpG del gen METRN. Se realiza tras la inducción neuronal con los tres medios de inducción y el control utilizado fueron las células hASCs sin tratar.

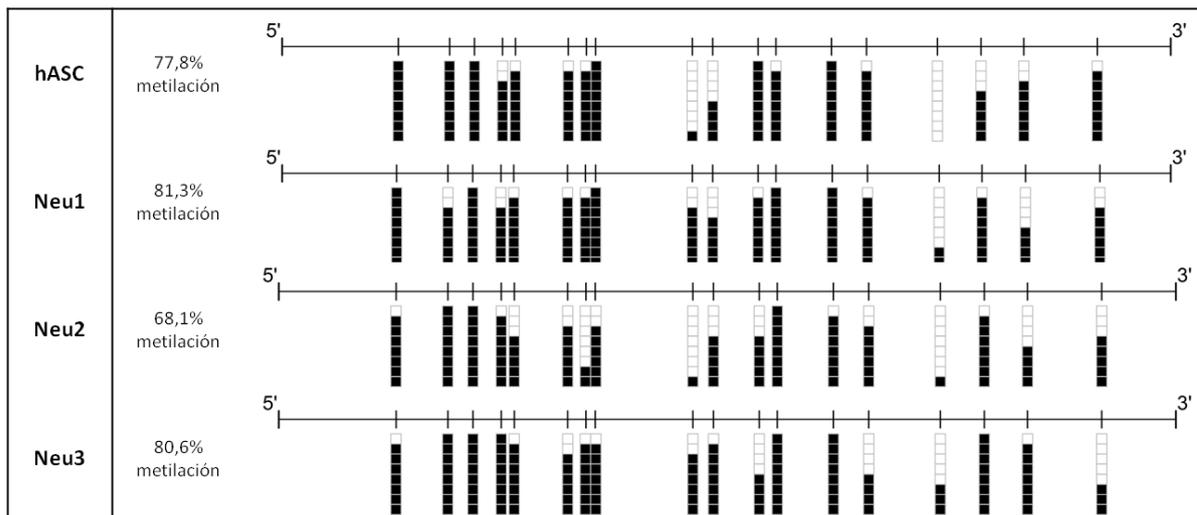


Figura 60. Secuenciación genómica con bisulfito de las islas CpG del gen GRM4. Se realiza tras la inducción neuronal con los tres medios de inducción y el control utilizado fueron las células hASCs sin tratar.

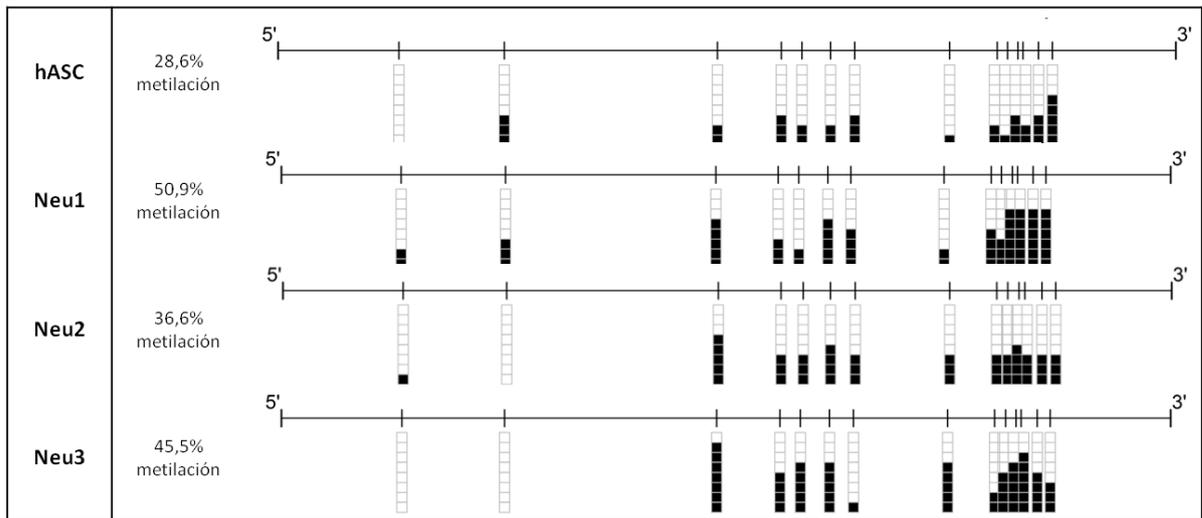


Figura 61. Secuenciación genómica con bisulfito, de las islas CpG del gen RETL1. Se realiza tras la inducción neuronal con los tres medios de inducción y el control utilizado fueron las células hASCs sin tratar.

B. Desdiferenciación neuronal

Las hASCs sin medio de inducción neuronal perdieron las características fenotípicas de linaje neuronal, recuperaron las características morfológicas de las hASCs originales, así como los patrones de metilación de hASCs indiferenciadas. Por ejemplo, el promotor del gen Hoxa-5, hipermetilado en las células sin tratar, adquirió un estado hipometilado tras la diferenciación neuronal, pero volvió a hipermetilarse tras la desdiferenciación.

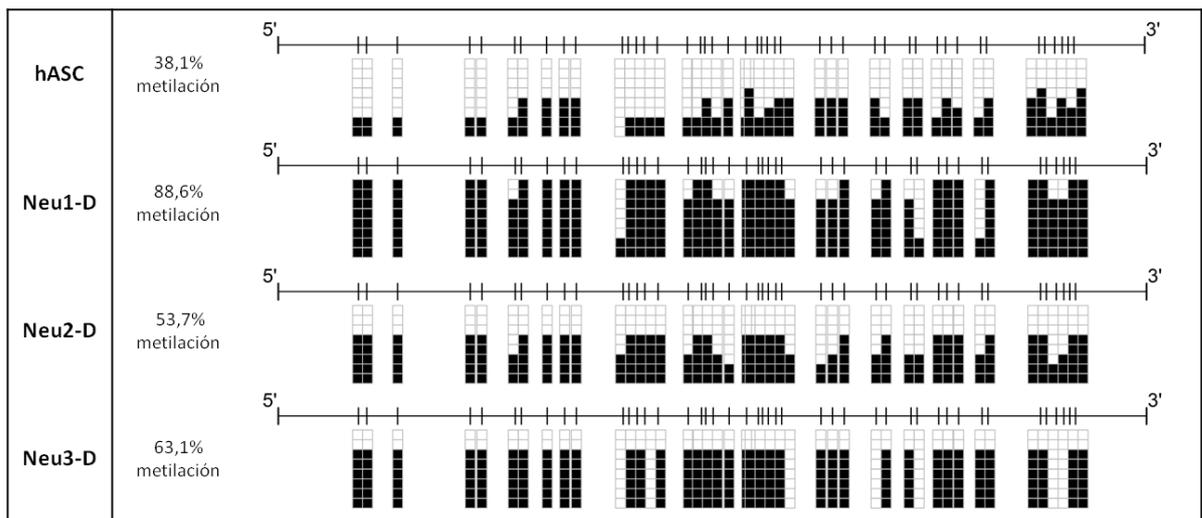


Figura 62. Estado de metilación del promotor del gen Hoxa-5 tras la desdiferenciación. El control utilizado fueron las hASCs sin tratar.

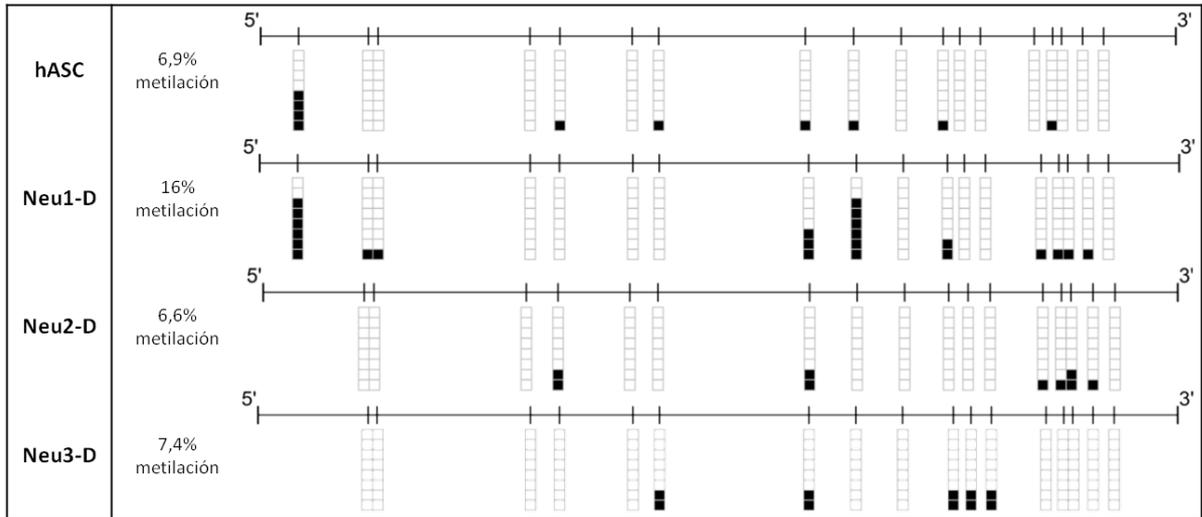


Figura 63. Estado de metilación del promotor del gen Pax-9 tras la dediferenciación. El control utilizado fueron las hASCs sin tratar.

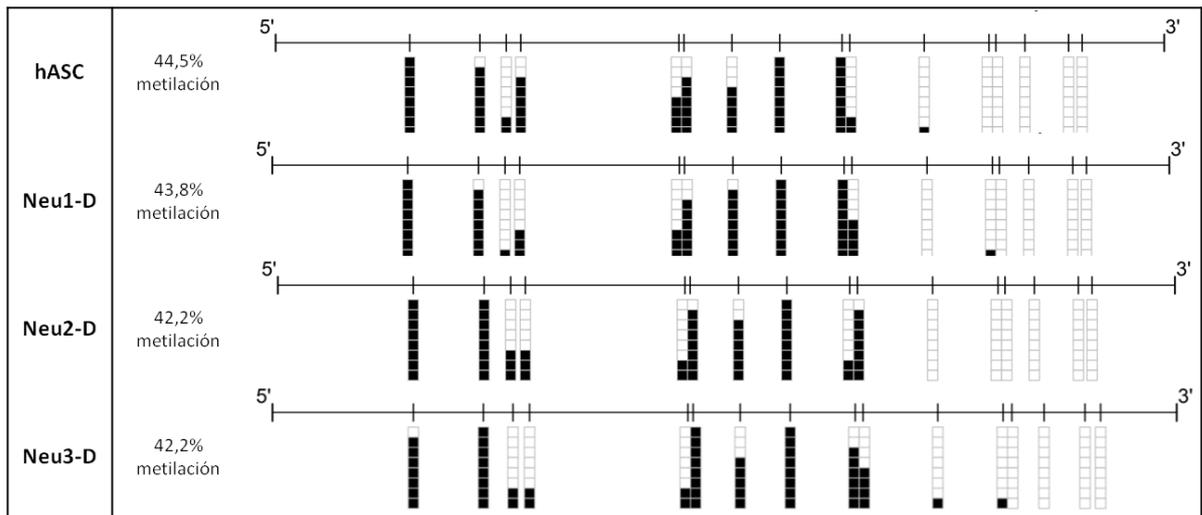


Figura 64. Estado de metilación del promotor del gen FGFR1 tras la dediferenciación. El control utilizado fueron las hASCs sin tratar.

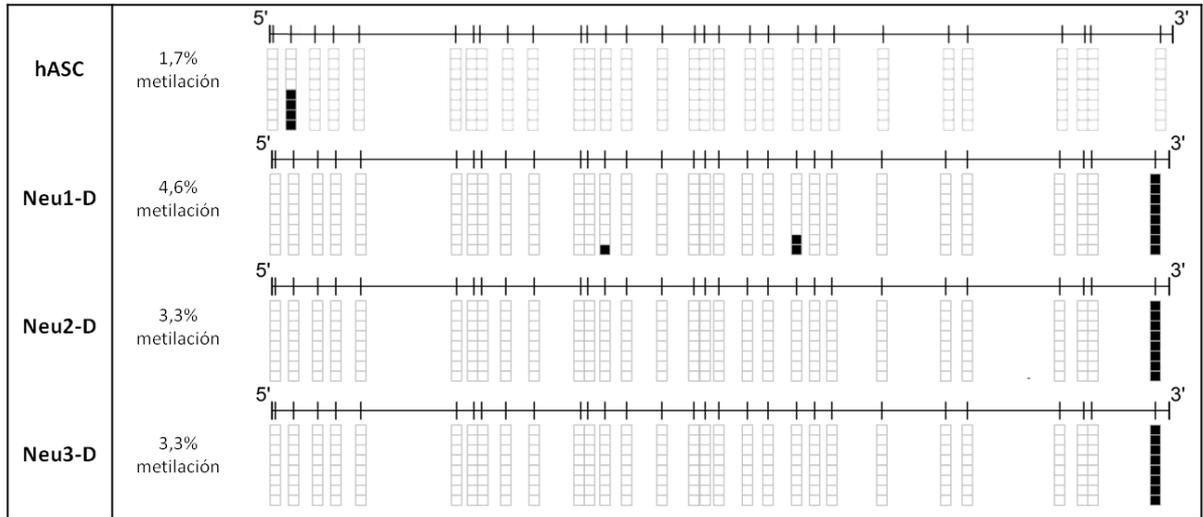


Figura 65. Estado de metilación del promotor del gen METRN tras la desdiferenciación. El control utilizado fueron las hASCs sin tratar.

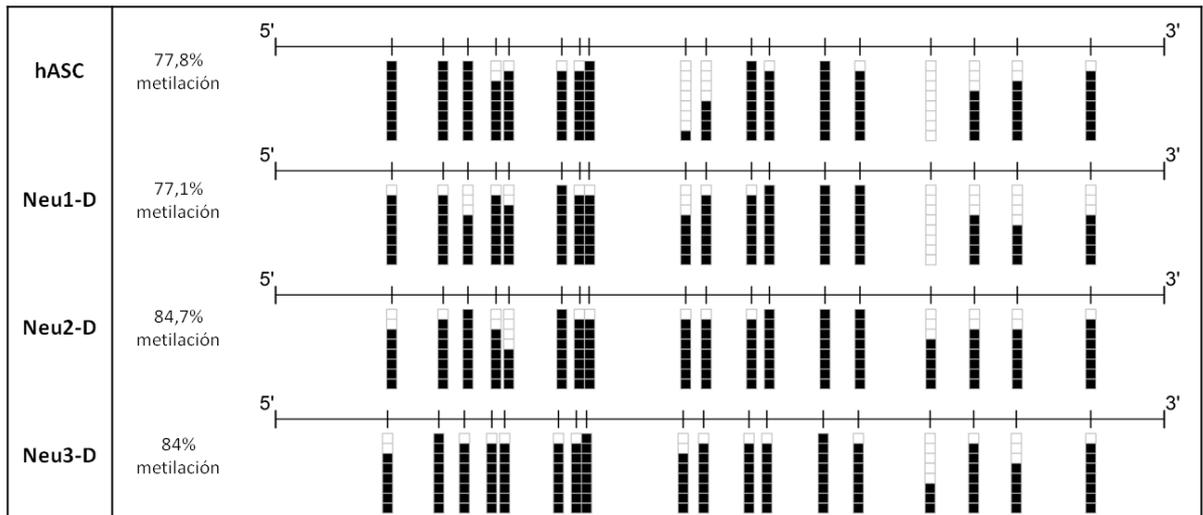


Figura 66. Estado de metilación del promotor del gen GRM4 tras la desdiferenciación. El control utilizado fueron las hASCs sin tratar.

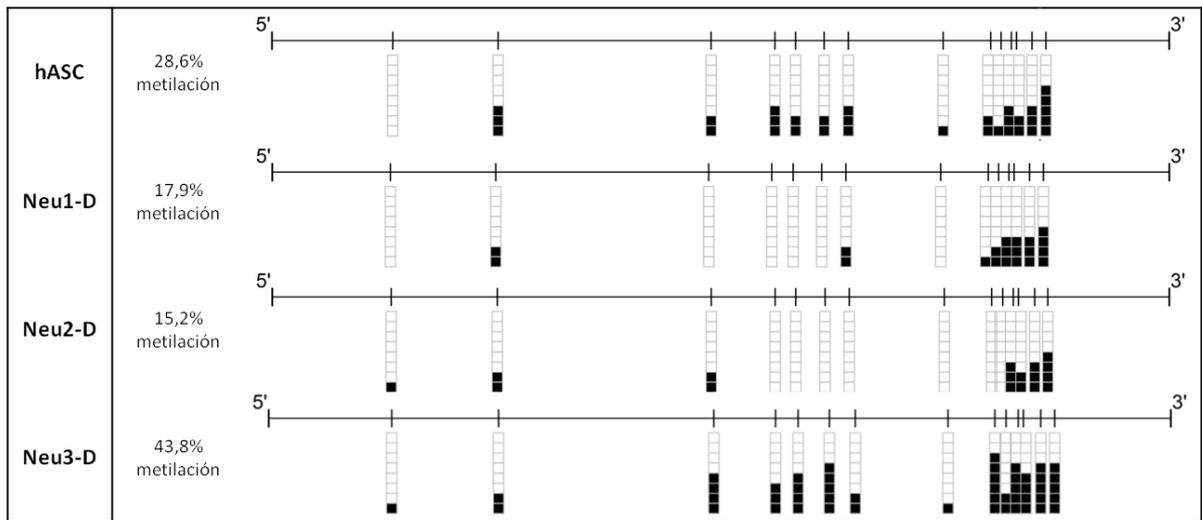


Figura 67. Estado de metilación del promotor del gen RETL1 tras la desdiferenciación. El control utilizado fueron las hASCs sin tratar.

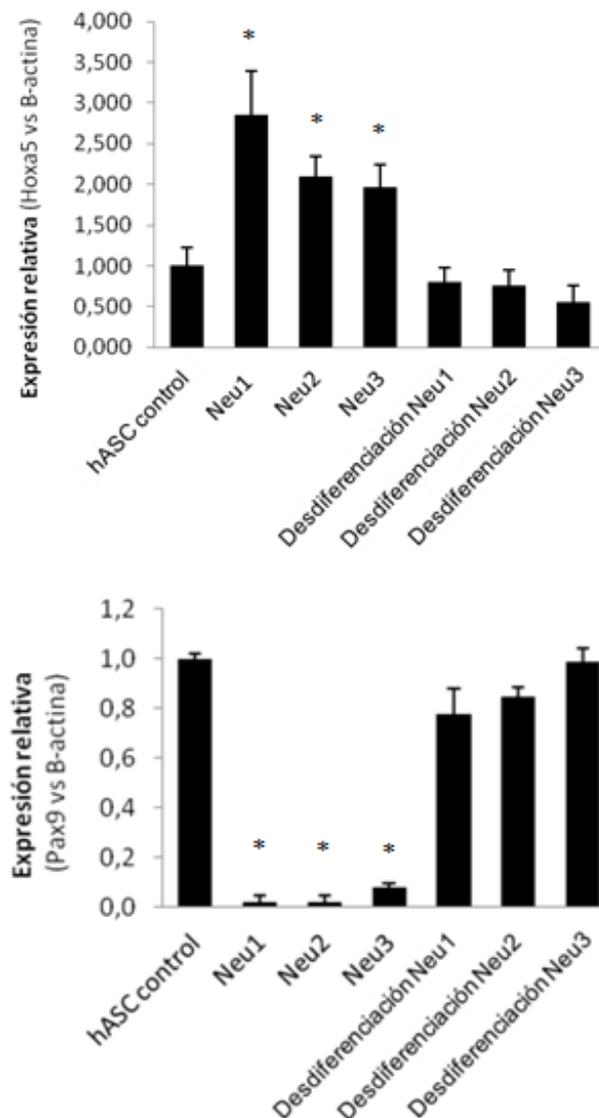


Figura 68. Validación del array mediante Real Time PCR del gen Hoxa-5.

Al finalizar la secuenciación con bisulfito de las muestras, el gen *Hoxa-5* fue seleccionado para continuar con los ensayos funcionales por presentar la mayor alteración en el grado de metilación del promotor en relación al control sin tratar. Alteración que pudo ser validada mediante los estudios de expresión de este gen realizada mediante *Real Time PCR* (Figura 68).

#### IV. 12. ESTUDIOS FUNCIONALES

##### A. Sistema lentiviral para expresar Hoxa-5

Para estudiar la importancia del gen *Hoxa-5* en el proceso de diferenciación neuronal, se generó una línea estable de hASCs que sobreexpresaba este gen, usando primero un sistema lentiviral. Para la multiplicación de los lentivirus se emplearon células hospedadoras de la línea renal HEK-293T. Estas células fueron observadas tras la infección viral con microscopio de fluorescencia para verificar la eficacia de la transfección. Aquellas células transfectadas con el vector *Hoxa-5*-pLVX-irex-ZsGreen y el vector vacío pLVX-irex-ZsGreen, mostraron fluorescencia verde, mientras que las células infectadas con el vector Truncated-*Hoxa-5*-pLVX-irex-tdTomato y el vacío pLVX-irex-tdTomato presentaban fluorescencia roja (Figura 69).

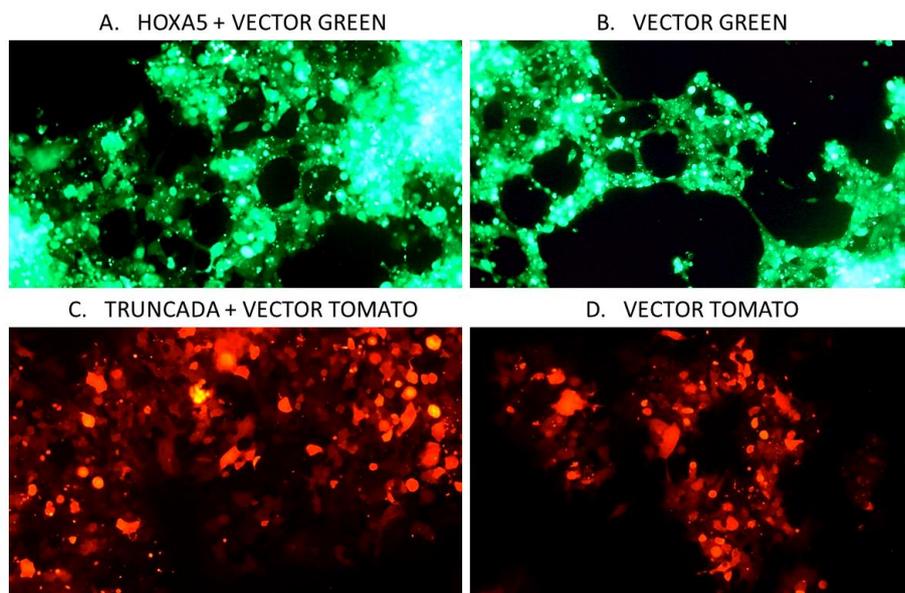
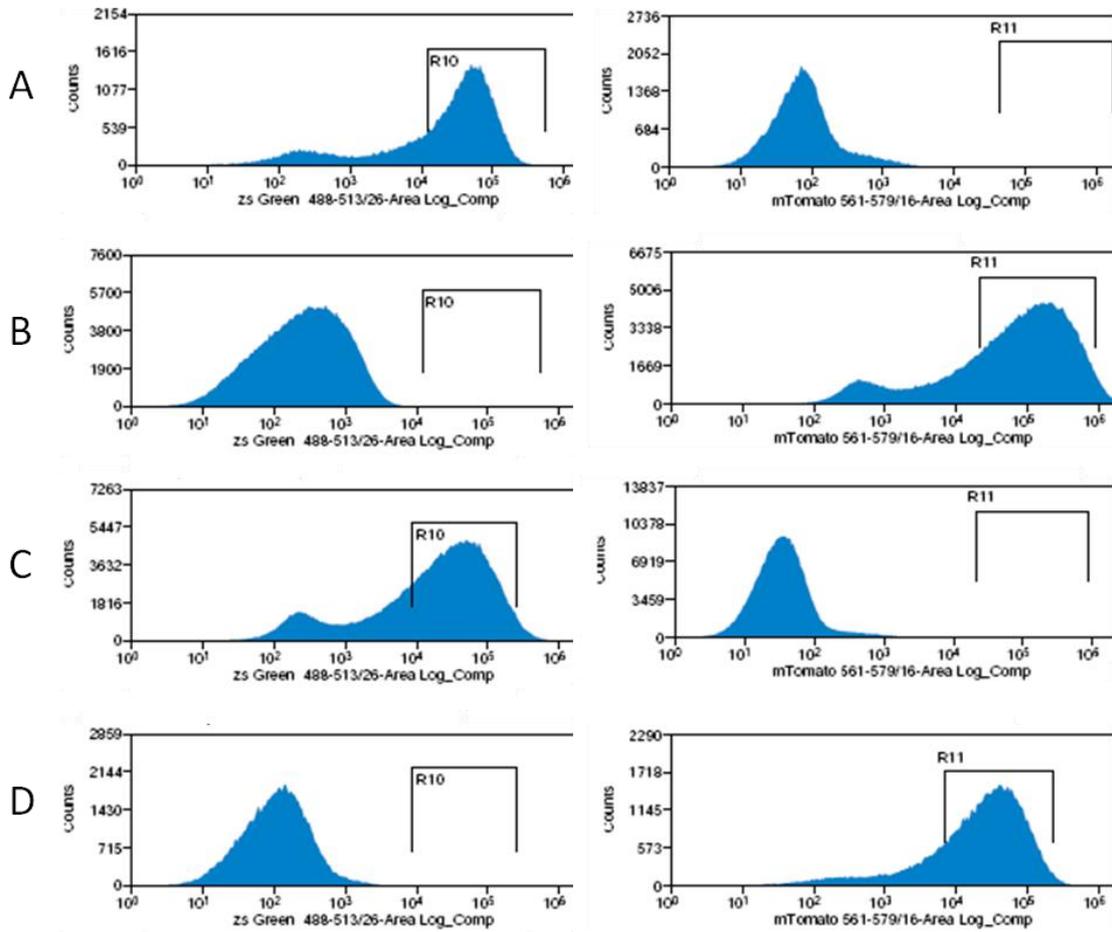


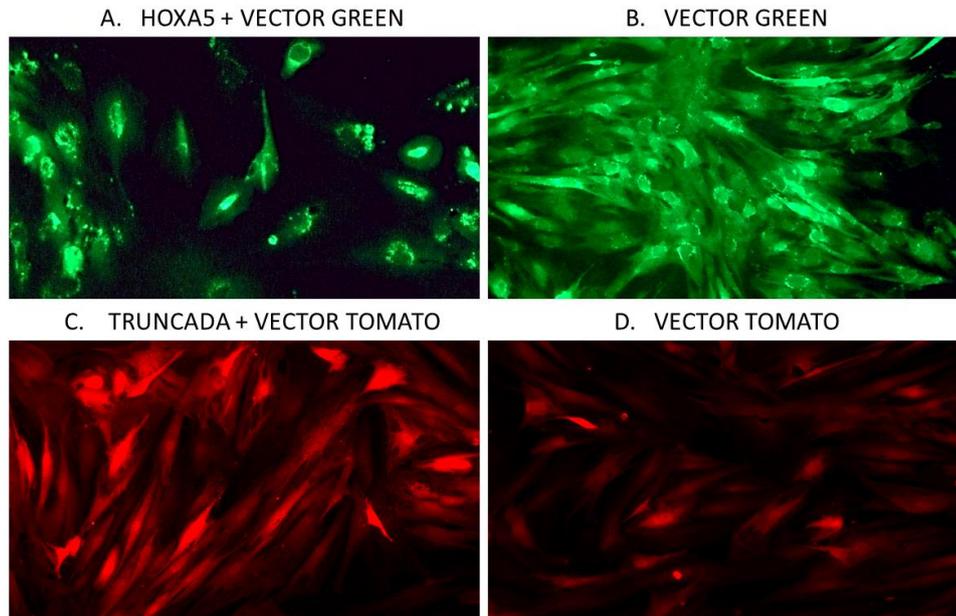
Figura 69. Imágenes de fluorescencia de la línea HEK-293T transfectada con lentivirus. Los plásmidos empleados fueron: (A) *Hoxa-5* wildtype insertado en el vector pLVX-irex-ZsGreen, (B) vector pLVX-irex-ZsGreen vacío, (C) proteína truncada insertada en el vector pLVX-irex-tdTomato y (D) vector pLVX-irex-tdTomato vacío. Microscopio de fluorescencia a 10X.

A continuación se infectaron las hASCs con el sobrenadante de las células HEK-293T infectadas y pasado el tiempo de infección, se realizó un *cell sorter* para seleccionar aquellas células que habían incorporado los plásmidos de interés de forma estable. Los porcentajes de células seleccionadas se situaron en torno al 60%, indicando una buena tasa de infección lentiviral (*Figura 70*).



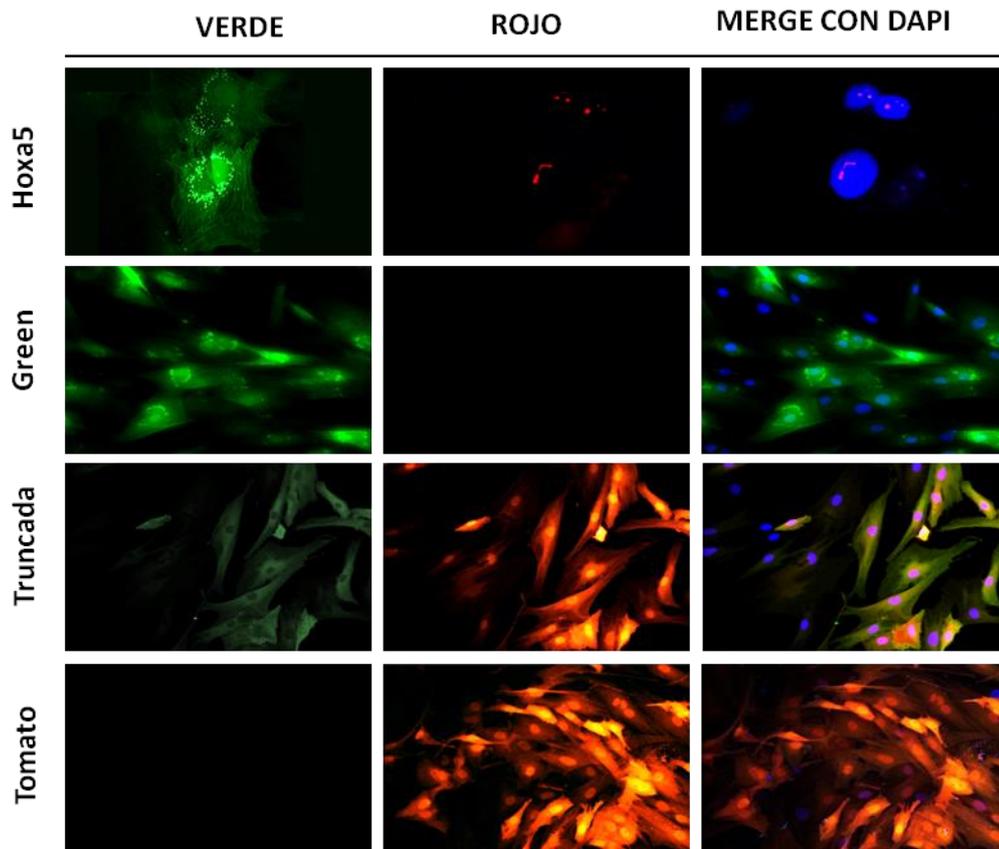
*Figura 70. Resultados del sorter para el aislamiento de las células transfectadas. La columna izquierda muestra la población celular seleccionada que emitía en el espectro del verde y la de la derecha la que emitía en el espectro del rojo. (A) Hoxa-5 wildtype insertado en el vector pLVX-irex-Zsgreen, (B) proteína truncada insertada en el vector pLVX-irex-tdTomato, (C) vector pLVX-irex-Zsgreen vacío y (D) vector pLVX-irex-tdTomato vacío.*

Una vez puestas en cultivo las hASCs seleccionadas en el *sorter*, se comprobó mediante microscopia de fluorescencia la presencia del plásmido pLVX-irex-Zsgreen, que confería fluorescencia verde, y del pLVX-irex-tdTomato, que la confería roja (*Figura 71*).



*Figura 71. Imágenes de fluorescencia de las hASCs infectadas con lentivirus. Las hASCs se infectaron con el sobrenadante de las células hospedadoras de lentivirus que contenían los siguientes plásmidos: (A) Hoxa-5 wildtype insertado en el vector pLVX-irex-Zsgreen, (B) vector pLVX-irex-Zsgreen vacío, (C) proteína truncada insertada en el vector pLVX-irex-tdTomato y (D) vector pLVX-irex-tdTomato vacío.*

Pasado el tiempo necesario para la multiplicación de las células, se verificó la presencia de la proteína Hoxa-5 mediante inmunofluorescencia y western blot. Las inmunofluorescencias para la proteína Hoxa-5, mostraron su presencia en el núcleo de la línea celular hASCs-Hoxa-5-pLVX-irex-Zsgreen, mientras que en la línea celular hASCs-Truncated-pLVX-irex-tdTomato aparece a nivel del citoplasma, lo que indicó que se trataba de una proteína truncada que probablemente había perdido su función original. Las dos líneas celulares control solo mostraban la fluorescencia característica del vector con el que estaban transfectadas (*Figura 72*).



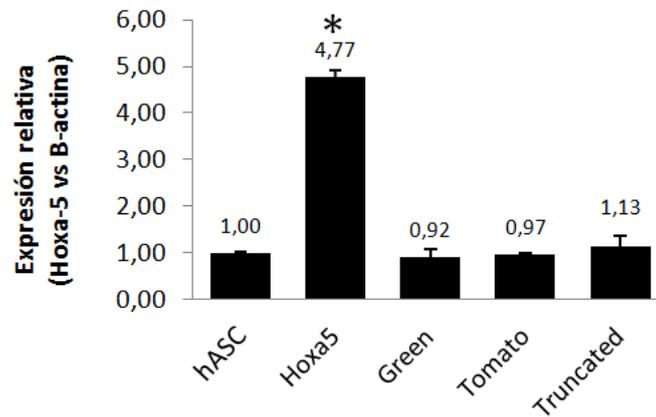
*Figura 72. Imagen de fluorescencia para la localización de la proteína Hoxa-5. Se observó la presencia de la proteína Hoxa-5 en el citoplasma de la línea Truncada (marcaje verde) y en el núcleo de la línea Hoxa-5 (marcaje rojo). También se comprobó la fluorescencia basal verde debida al plásmido pLVX-irex-Zsgreen en las líneas Hoxa-5 y Green, y la fluorescencia basal roja debida al plásmido pLVX-irex-tdTomato en las líneas Tomato y Truncada.*

El estudio de expresión proteica mediante western blot nos permitió demostrar que la línea celular hASCs-Hoxa-5-pLVX-irex-Zsgreen expresaba una proteína Hoxa-5 de 30 kDa normal, mientras que la línea celular hASCs-Truncated-pLVX-irex-tdTomato presentaba una proteína truncada de 22 kDa. Las dos líneas celulares control transfectadas con vectores vacíos no mostraron expresión de Hoxa-5 (*Figura 73*).



*Figura 73. Estudio por western blot de la proteína Hoxa-5 en las hASCs transfectadas. El control utilizado fue la  $\beta$ -actina.*

Finalmente, para confirmar la presencia del vector Hoxa-5, realizamos los estudios de Real Time PCR para detectar la expresión de dicho gen en las líneas transfectadas, demostrando un incremento de expresión en la línea transfectada con el vector de Hoxa-5 (*Figura 74*).



*Figura 74. Expresión de ARNm de Hoxa-5 mediante RT-PCR en las líneas transfectadas. El asterisco (\*) indica diferencias significativas respecto al control ( $p \leq 0.05$ ).*

Para establecer una consecuencia funcional de los cambios en la expresión del gen Hoxa-5 después de la diferenciación, estudiamos la expresión de marcadores neuronales mediante *Real Time PCR* en las líneas transfectadas: hASCs-Hoxa-5-pLVX-irex-Zsgreen, hASCs-Truncated-Hoxa-5-pLVX-irex-tdTomato, y las líneas celulares control hASCs-pLVX-irex-Zsgreen y hASCs-pLVX-irex-tdTomato. Como se muestra en la *Figura 75*, el marcador neuronal específico de células madre MAP2 y los marcadores funcionales SCN9A y CHAT mostraron un aumento significativo de la expresión (18,37, 14,25 y 10,28 *folds* respectivamente) en la línea celular hASCs-Hoxa-5-pLVX-irex-Zsgreen, comparada con el control de hASCs. Sin embargo, algunos marcadores de neuronas inmaduras como Nestina y Tubulina-III, o el marcador glial GFAP mostraron una disminución significativa de su expresión. Los controles con plásmidos vacíos, pLVX-irex-Zsgreen y pLVX-irex-tdTomato, no manifestaron una modulación significativa de la expresión de marcadores neuronales.

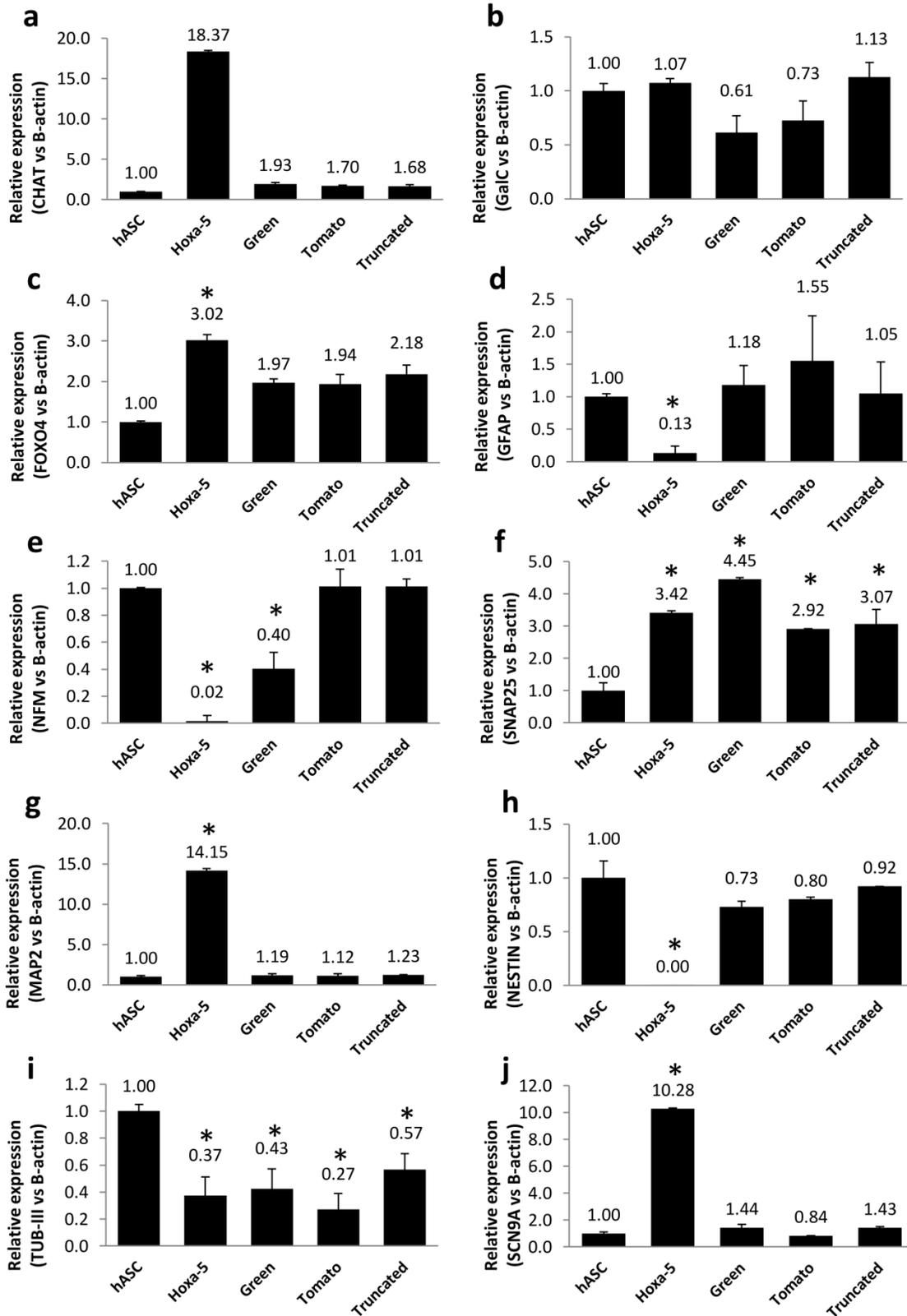


Figura 75. Real Time PCR de marcadores neuronales en las muestras transfectadas. Se emplearon las líneas estables que sobreexpresaban Hoxa -5, células truncadas, transfectadas con el vector control verde (Green) y control rojo (Tomato) y se cuantificaron mediante RT-PCR cuantitativa, para los genes: a) CHAT; b) GalC; c) FOXO4; d) GFAP; e) NFM; f) SNAP25; g) MAP2; h) Nestin; i) TUB-III; j) SCN9A). Se señalan las diferencias estadísticamente significativas (\*) con respecto al control ( $p \leq 0.05$ ).

## B. Expresión de Hoxa-5 mediante el sistema CRISPR/dCas9

Tras estudiar la importancia del gen Hoxa-5 en el proceso de diferenciación neuronal empleando la metodología clásica con lentivirus, se verificó su potencial para mejorar y acelerar este proceso mediante su sobreexpresión en hASCs utilizando un sistema CRISPR/dCas9. Este sistema más novedoso de edición genética, permite obtener resultados más significativos, en menor tiempo y minimizando el daño ocasionado a la célula durante la transfección. La acción de este gen se estudió sola y sumada al efecto del medio de diferenciación neuronal Neu1.

Para este fin, se diseñaron dos secuencias de ARNg llamadas Hox-1 y Hox-2 y se utilizaron dos sistemas proteicos, VP64 con función de activador transcripcional y un sistema control NEF disfuncional, que permitió estudiar los cambios de expresión génica que el simple tamaño de un sistema CRISPR es capaz de ocasionar una vez que se introduce en el núcleo celular.

Se comprobó que el dominio VP64 unido a cada uno de los ARNg aumentaba la expresión de Hoxa-5 con respecto al control de hASCs sin tratar (4 *fold*s en el caso de Hox-1 y 10 *fold*s en el caso de Hox-2), y que la transfección con los dos ARNg de forma conjunta permitía obtener los mejores resultados (15 *fold*s). Por otro lado, los complejos proteicos y los ARNg por separado no parecían aumentar la expresión de este gen, y lo mismo ocurría cuando se transfectaba con los ARNg unidos al sistema control NEF. En todos los tratamientos se produjo un aumento bajo de la expresión de Hoxa-5 (2-3 *fold*s) probablemente debido a las modificaciones que el gran tamaño de los sistemas proteicos empleados causa en la cromatina de la célula transfectada (*Figura 76*).

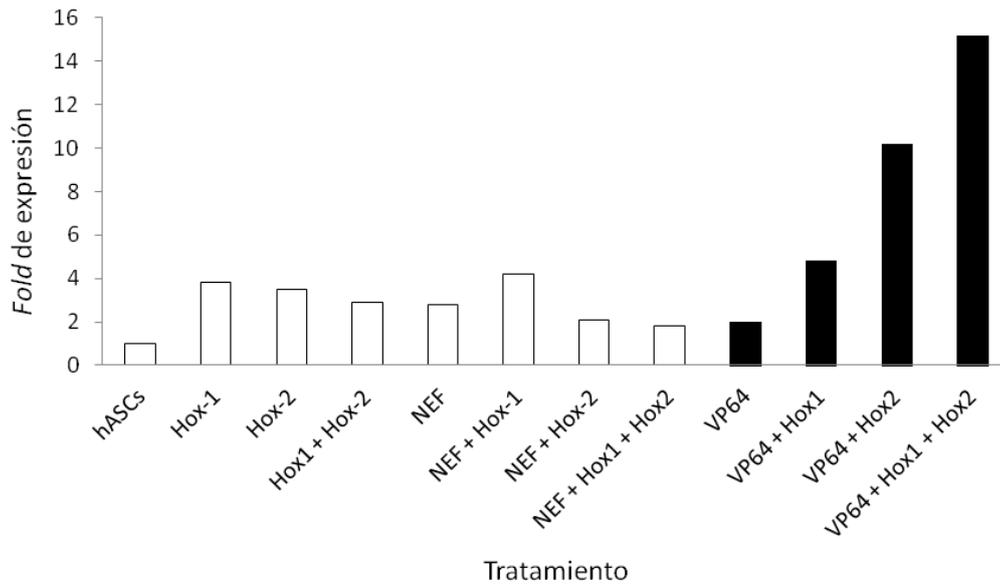


Figura 76. Estudio de la expresión de Hoxa-5 por Real Time PCR en hASCs transfectadas. Se comprobó la eficacia de los ARNg diseñados Hox-1 y Hox-2, una vez transfectados en hASCs individualmente y combinados con los sistemas proteicos VP64 y NEF para formar sistemas CRISPR funcionales. Como puede observarse, solo la combinación de los ARNg y el complejo VP64 modifica la expresión de Hoxa-5 de forma notable.

Tras comprobar la eficacia del sistema CRISPR/dCas9 (VP64-Hoxa-5), se transfectaron hASCs con este sistema sumado al medio de diferenciación Neu1 (Neu1 + VP64-Hoxa-5). Además, los resultados se compararon con los de hASCs tratadas solo con Neu1 y con hASCs inducidas con Neu1 y transfectadas con un sistema CRISPR no funcional (Neu1 + NEF-Hoxa-5). El análisis mediante western blot mostró que tanto las células transfectadas con CRISPR/dCas9 como las células inducidas con Neu1, aumentaron la expresión de Hoxa-5 hasta 8 folds. Sin embargo, el efecto combinado de estos dos tratamientos produjo un efecto sinérgico sobre la expresión de Hoxa-5, que alcanzó un nivel de expresión 20 folds mayor (Figuras 77-78).

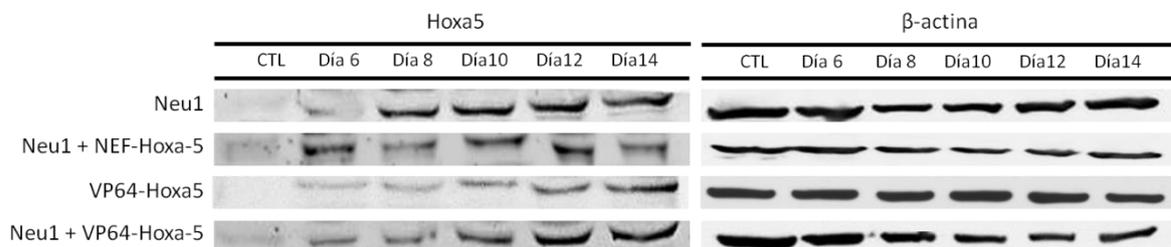


Figura 77. Estudio de la expresión de proteína Hoxa-5 por western blot. Se estudió cada uno de los tratamientos a los que se someten las hASCs: inducción con el medio Neu1 (Neu1), el medio Neu1 sumado a un sistema CRISPR disfuncional (Neu1+NEF-Hoxa-5), solo el sistema CRISPR (VP64-Hoxa-5) y la inducción de Neu1 sumada al sistema CRISPR funcional (Neu1 + VP64-Hoxa-5).

El estudio de ARNm por *Real Time PCR* mostró aumentos de hasta 8,7 *folds* de expresión de Hoxa-5 en hASCs inducidas con Neu1 el día 14 y de 63,3 *folds* en hASCs transfectadas con CRISPR/dCas9 sin inducción con Neu1. También pudimos observar un efecto sinérgico en la expresión de Hoxa-5 en hASCs tratadas con Neu1 y el sistema CRISPR/Cas9 al mismo tiempo, alcanzándose un aumento de 165,8 *folds* (Figura 78).

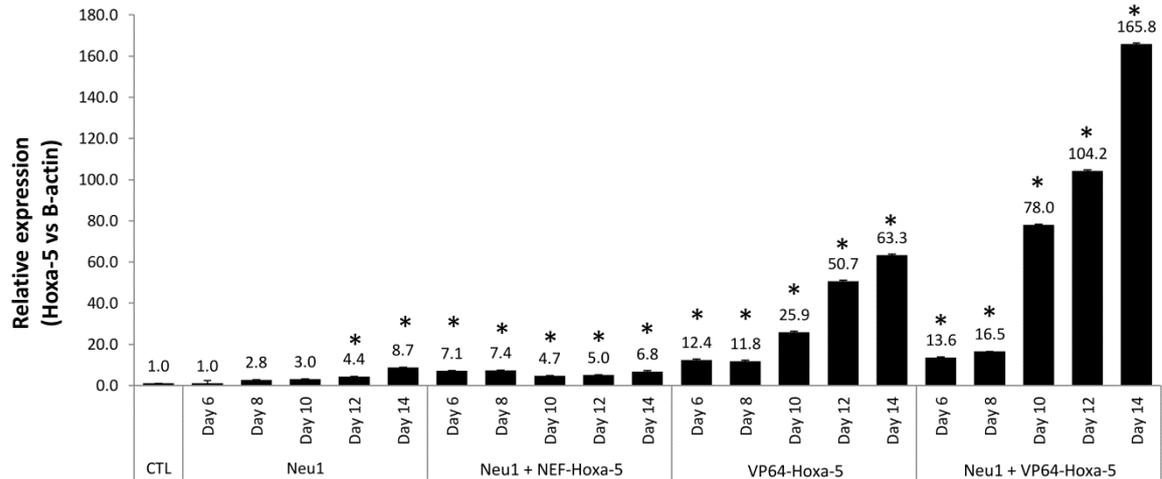


Figura 78. Expresión de Hoxa-5 mediante *Real Time PCR* en hASCs transfectadas.

Para determinar la modulación en la expresión de los marcadores neuronales MAP2, SCN9A y CHAT, se realizó una *Real Time PCR* cada dos días de tratamiento, para todos los tratamientos. Como se muestra en la Figura 79, el aumento de Hoxa-5 mediante CRISPR/dCas9 pareció mejorar los niveles de expresión de marcadores neuronales maduros como MAP2 y marcadores funcionales del sistema nervioso como SCN9A y CHAT. Estos aumentos fueron mayores en las células transfectadas con CRISPR/dCas9 de  $\approx 91$  *folds* para SCN9A y CHAT y  $\approx 31$  *folds* para MAP2 el día 14, que en células inducidas solo con Neu1 fue de  $\approx 27$  *folds* para SCN9A,  $\approx 11$  para CHAT y  $\approx 48$  para MAP2 el día 14. Cuando se combinaron ambos tratamientos, se observó un efecto sinérgico en la expresión de marcadores funcionales que alcanzaron un aumento de 142,7 *folds* para SCN9A, 165 *folds* para CHAT y 59,3 *folds* para MAP2 el día 14. Todos los resultados fueron estadísticamente significativos ( $p = 0,05$ ).

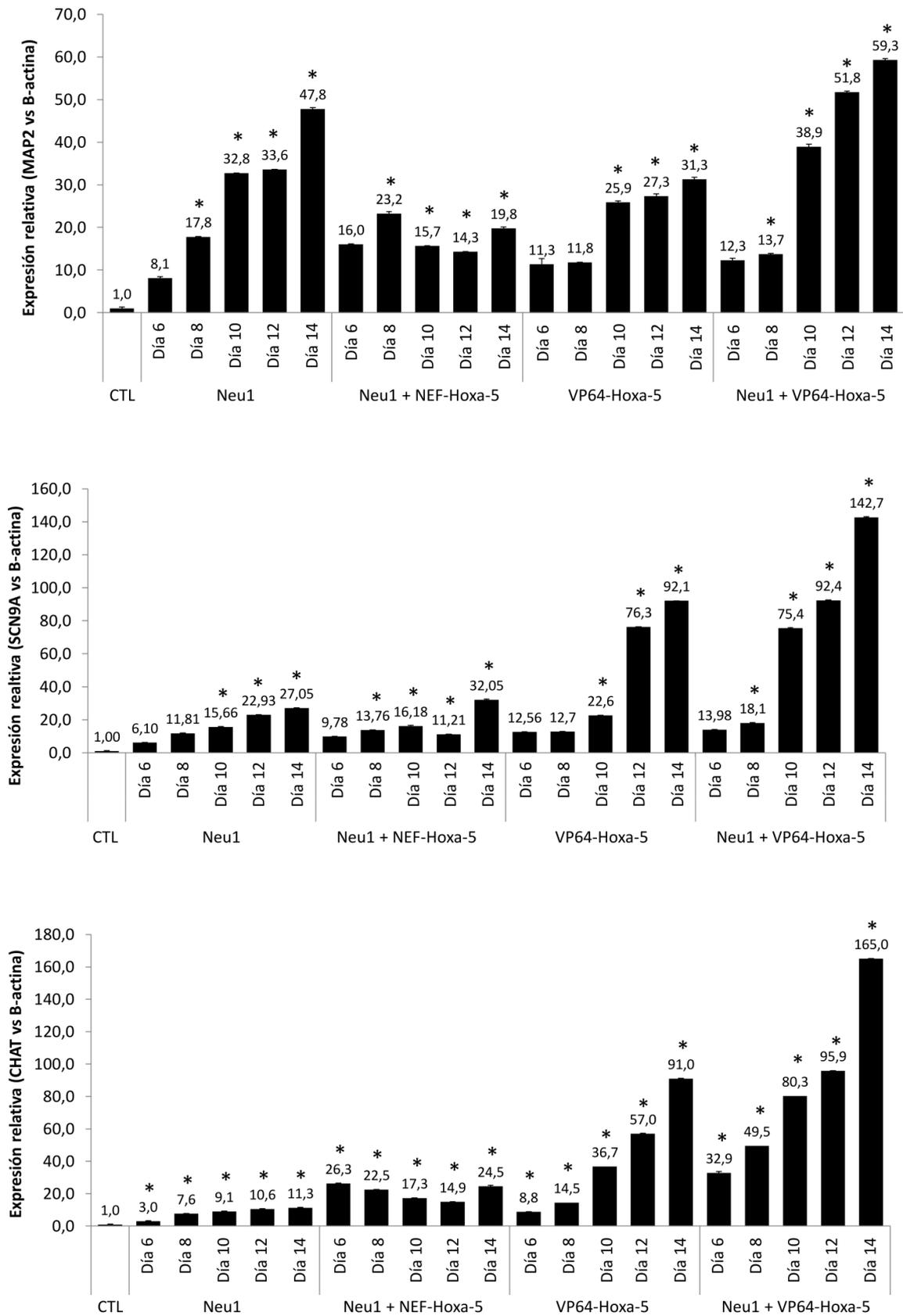
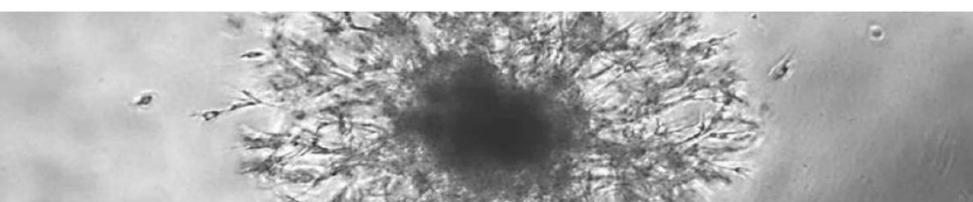


Figura 79. Modulación de la expresión de Hoxa-5 en hASC generadas por el sistema CRISPR/dCas9. Se utilizaron células NEF-Hoxa-5 (obtenidas con un sistema CRISPR no funcional) y hASC como controles. Todas las células se expusieron a Neu-1 (6, 8, 10, 12 y 14 días) para analizar el efecto de potenciación sobre la expresión de Hoxa-5. El análisis de la expresión de Hoxa-5 se llevó a cabo mediante RT-PCR. Diferencias estadísticamente significativas (\*) con respecto al control ( $p \leq 0.05$ ).





## 5. DISCUSIÓN



## V. DISCUSIÓN

Ante la ausencia de un tratamiento eficaz frente a enfermedades neurodegenerativas y lesiones en el sistema nervioso, la medicina regenerativa se presenta como una importante alternativa para la recuperación de los tejidos dañados. La regeneración es la reactivación del desarrollo en la etapa post-embionaria para restaurar los tejidos dañados o perdidos del organismo. Se ha demostrado que las células madre adultas muestran un potencial de diferenciación más amplio que el previsto y pueden contribuir a la regeneración de tejidos transdiferenciándose en otros tipos celulares (Li, Kamei et al. 2021, Urban and Cheung 2021). Además, contrariamente a los tratamientos basados en fármacos, las terapias que emplean células vivas tienen la ventaja de responder dinámicamente a un entorno que cambia en el tiempo, en lugar de centrarse en un único mecanismo de acción (Kalladka and Muir 2014).

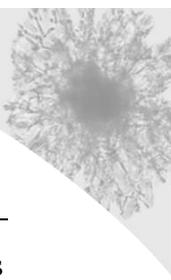
Durante las pasadas dos décadas, la investigación con células madre ha prometido buenos resultados en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas (Erba, Terenghi et al. 2010, Colpo, Ascoli et al. 2015, Gong, Cao et al. 2018, Li, Kamei et al. 2021), en particular las células madre mesenquimales (MSCs) humanas, que son consideradas una herramienta abundante y fiable de la medicina regenerativa. Su uso, además, no genera problemas éticos como lo hacen las células madre embrionarias, tienen una alta plasticidad de diferenciación, se obtienen de forma poco invasiva y, aunque su potencialidad es más limitada, presentan algunas ventajas en comparación con otros tipos de células madre, como su incapacidad para formar teratomas (Wakao, Kuroda et al. 2012, Laroni, de Rosbo et al. 2015, Frese, Dijkman et al. 2016). Por otra parte, y a pesar de tener propiedades comunes, este tipo de células presenta características propias según la fuente de la que procedan, como la tasa de diferenciación, la secreción de factores o un comportamiento variable en entornos patológicos (Kalladka and Muir 2014).

Dentro de las MSCs, las derivadas de tejido adiposo (hASCs) aparecen como un recurso abundante, autólogo y de fácil mantenimiento. Estas células pueden ser obtenidas del propio paciente, evitando el riesgo de rechazo y la necesidad de fármacos inmunosupresores (Sumarwoto, Suroto et al. 2021), y expandidas en cultivo para obtener grandes cantidades. Además, su aislamiento se realiza de manera fácil y poco invasiva y tienen poco potencial antigénico (Huaman, Bahamonde et al. 2019). Normalmente, las hASCs trasplantadas se reprograman previamente *in vitro* con el fin de conseguir una

mayor supervivencia y acelerar su diferenciación (Lu, Li et al. 2001). Además, presentan una gran plasticidad que les permite diferenciarse a diferentes tipos celulares incluidos aquellos que están fuera de su linaje de origen, como es el caso del linaje neuronal (Ashjian, Elbarbary et al. 2003, Kokai, Rubin et al. 2005, Franco Lambert, Fraga Zandonai et al. 2009, Erba, Terenghi et al. 2010, Zavan, Vindigni et al. 2010, Yu, Bunnell et al. 2011, Salehi, Amirpour et al. 2016, Sumarwoto, Suroto et al. 2021).

Sin embargo, pese a la gran cantidad de publicaciones y ensayos clínicos que avalan su seguridad y eficacia a corto plazo tras el trasplante, tanto en huéspedes autólogos como alogénicos, son pocas las aplicaciones clínicas de este tipo de células. Esto se debe a la ausencia de protocolos estandarizados de diferenciación hacia un linaje celular concreto y a la incapacidad actual para garantizar la bioseguridad a largo plazo de un trasplante de hASCs diferenciadas previamente. Para solventar estos inconvenientes, es de vital importancia conocer los eventos moleculares que tienen lugar durante el proceso de diferenciación a varios niveles, tanto previos a la transcripción génica como posteriores a ella. No solo es importante conocer qué genes son los implicados en este evento, sino también averiguar qué procesos genéticos están activos y cuáles no. En la actualidad, se sabe que la metilación de determinados promotores génicos es la encargada de controlar la expresión de ciertos grupos de genes, que en última instancia provocaran un cambio en el linaje celular (Teven, Liu et al. 2011, Herlofsen, Bryne et al. 2013, Acton, Yuan et al. 2021). La exposición de MSCs a modificadores epigenéticos las convierte en células diferenciadas, de forma similar a como lo hacen los medios de diferenciación (Alexanian 2015), lo que sugiere que la plasticidad celular puede manejarse mediante la combinación de enzimas moduladoras epigenéticas y vías de señalización específicas.

Una de sus aplicaciones más prometedoras en medicina regenerativa, es la posibilidad de diferenciarse hacia células de linaje neuronal y poder así sustituir el tejido nervioso dañado. En la diferenciación neuronal de las hASCs, el genoma no solo debe conservarse, sino que el patrón epigenético debe tenerse muy en cuenta para certificar la identidad de las células después de la diferenciación. Boulland incluso sugirió que las hASCs están preparadas epigenéticamente para diferenciarse hacia linaje neuronal (Boulland, Mastrangelopoulou et al. 2013). Por tanto, es imprescindible conocer cuál es la firma epigenética de las hASCs con el fin de garantizar su compromiso de linaje, así como su bioseguridad a largo plazo.



### V.1. Aislamiento y caracterización de las hASCs

---

El presente trabajo ha utilizado hASCs obtenidas de tejido adiposo, y más concretamente de muestras de lipoaspirados. Partiendo de una gran cantidad de tejido inicial, sin ninguna otra utilidad potencial, se obtuvo un rendimiento muy alto en comparación con otras fuentes como la médula ósea (Fernandes, Valente et al. 2018) o el cordón umbilical (Choudhery, Badowski et al. 2013). Sólo la resección de tejido adiposo parece dar resultados similares a los obtenidos con lipoaspirados (Duscher, Luan et al. 2016). Los lipoaspirados fueron sometidos a un proceso de aislamiento de hASCs estándar, que nos permitió obtener, con un alto rendimiento, una población pura de este tipo celular al igual que muestran otros estudios.

La pureza de la población obtenida fue contrastada mediante estudios de citometría con marcadores específicos de células mesenquimales, demostrando que un porcentaje superior al 90% de las células expresaban dichos marcadores mientras que menos del 5% de la población expresaba marcadores hematopoyéticos, dando resultados similares a los publicados por otros autores. (Dominici, Le Blanc et al. 2006, Razavi, Mardani et al. 2013, Salehi, Amirpour et al. 2016). Este trabajo también demostró la capacidad de las hASCs para formar neuroesferas *in vitro*, análogas a las células extraídas de tejido cerebral embrionario de acuerdo con el estudio de Anghileri y cols. (Anghileri, Marconi et al. 2008, Stricker, de Souza Dobuchak et al. 2021).

### V.2. Inducción de la diferenciación neuronal de las hASCs

---

A continuación, las células ya caracterizadas se sometieron a un proceso de diferenciación neuronal empleando tres medios distintos llamados Neu1, Neu2 y Neu3 con una duración de 21, 15 y 10 días respectivamente. La composición de estos medios se propuso en base a la bibliografía consultada, combinando los ingredientes y los intervalos de tiempo que más parecían favorecer el proceso de neurogénesis (Monaghan, Pou et al. 2008, Rafieemehr, Kheyrandish et al. 2015, Salehinejad, Alitheen et al. 2015). La exposición de las células hASCs en pase bajo a estas soluciones, provocó el cambio del aspecto fibroblástico típico de las MSCs por uno propio del tejido nervioso, como pudo observarse a diario mediante microscopía óptica a pocos aumentos.

Después de cinco días de cultivo con el medio Neu1, la gran mayoría de las hASCs adquirieron el aspecto de células nerviosas, con grandes núcleos esféricos, cuerpo ahusado,

baja tasa de proliferación y extensiones celulares similares a dendritas. Estos hallazgos fueron consistentes con los de Garcez y cols. (Garcez, Teixeira et al. 2009) que demostraron que, de entre los componentes de los medios empleados, el EGF induce la diferenciación de hASCs a un fenotipo neuronal, mientras que el FGF induce mayoritariamente un fenotipo glial. El FGF también ha mostrado mejorar la nutrición de las células progenitoras neuronales y su función neuroprotectora está más que demostrada (Cao, Wei et al. 2016). Multitud de autores confirman la importancia de LIF en los procesos de diferenciación y maduración de las neuronas (Xu, Long et al. 2018), y la capacidad del EGF para aumentar la supervivencia neuronal (Rafieemehr, Kheirandish et al. 2015). En los últimos días de la diferenciación, las células tendieron a crear prolongaciones a modo de dendritas y puentes citoplasmáticos que las comunicaban. Este proceso fue especialmente apreciable en los cultivos de neuroesferas tratados con Neu1, donde pudo observarse particularmente bien el desarrollo de estas prolongaciones celulares de rápido crecimiento en tres dimensiones. En el plazo de 7 días, las prolongaciones alcanzaron un radio de aproximadamente 250 a 350  $\mu\text{m}$ , que coincide con la distancia máxima de difusión del oxígeno estudiada previamente por otros autores (Zavan, Michelotto et al. 2010).

Los medios Neu2 y Neu3 causaron un cambio morfológico menor, casi ausente en el caso de Neu3, aunque las hASCs tratadas con Neu2 presentaron un gran número de uniones intercelulares después de dos semanas. El medio Neu2 estaba compuesto por HGF, que es un factor neurotrófico y desempeña un papel importante en la capacidad de supervivencia de las neuronas en el cerebro (Honda, Kagoshima et al. 1995), VEGF y EGF que estimulan la proliferación de tejido neuronal derivado de tejido cerebral (Bae, Park et al. 2011). Neu3 contenía AMPc, NGF, insulina e IBMX. El AMPc parece aumentar los marcadores neuronales de expresión como GFAP (Deng, Petersen et al. 2006), mientras que la presencia de IBMX eleva los niveles de AMPc celular, que a su vez activa la proteína quinasa K, un mediador crucial en la diferenciación neuronal de MSCs (Wang, Tio et al. 2007). El NGF y la insulina se han utilizado frecuentemente en la inducción neuronal para mejorar la proliferación y reducir la apoptosis durante el proceso de diferenciación (Rafieemehr, Kheirandish et al. 2015, Fesharaki, Razavi et al. 2018, Srivastava, Singh et al. 2018). Por su parte, la insulina y su receptor son altamente expresados en cerebros adultos, y tanto ésta como su proinsulina precursora, parecen estimular la progresión del desarrollo neuronal (Rhee, Choi et al. 2013).

Tras la observación al microscopio de los cambios morfológicos causados por los medios Neu1, Neu2 y Neu3, se propuso confirmar la diferenciación neuronal a nivel molecular estudiando la expresión de proteínas neuronales mediante inmunofluorescencia y western blot. Al término de las diferenciaciones neuronales, los tres tratamientos aumentaron significativamente la expresión de proteínas de linaje neuronal en comparación con el control de hASCs no tratadas. La expresión dinámica de estos genes se comprobó mediante el estudio del ARNm por *Real Time PCR*.

La Nestina es un filamento intermedio que aumenta durante las primeras etapas de desarrollo en el sistema nervioso central y periférico (Lo Furno, Mannino et al. 2018, Marei, El-Gamal et al. 2018, Moon, Kim et al. 2018), considerándose un marcador de células madre neuronales inmaduras, que disminuye su expresión en fases más avanzadas de la diferenciación neurogénica (Boulland, Mastrangelopoulou et al. 2013). MAP2 y TAU por su parte, se consideran marcadores neuronales maduros y forman parte de las proteínas del citoesqueleto neuronal (Fesharaki, Razavi et al. 2018). TH es una enzima limitante en la síntesis de dopamina (Turac, Duruksu et al. 2018), SNAP25 es un marcador de sinapsis (Jang, Cho et al. 2010) y CHAT es un marcador colinérgico (Marei, El-Gamal et al. 2018). FOXO4 es necesario para el desarrollo neuronal embrionario y es especialmente crítico para la diferenciación de células madre en células neuronales (Vilchez, Boyer et al. 2013). SCN9A es un canal de sodio controlado por voltaje y desempeña un papel crucial en la generación y conducción de potenciales de acción (Kawaguchi, Asano et al. 2007). GFAP se expresa en astrocitos y está involucrado en la comunicación celular y el funcionamiento de la barrera hematoencefálica (Zarrinpour, Hajebrahimi et al. 2017). Por último, GALC es un marcador de progenitores de oligodendrocitos (Fila-Danilow, Borkowska et al. 2017).

Las neuroesferas tratadas con el medio Neu1 mostraron la misma expresión de marcadores neuronales por inmunofluorescencia que la detectada previamente en células en monocapa, pero de forma más rápida, y este hallazgo concuerda con estudios de otros autores (Anghileri, Marconi et al. 2008, Ahmadi, Razavi et al. 2012). Además, se estudió la expresión de las proteínas N-cadherina y Vimentina. La Vimentina es un marcador de progenitores neuronales relacionado con el crecimiento axonal, expresado especialmente en las extensiones de las neuroesferas (Ashjian, Elbarbary et al. 2003, Shigyo, Kuboyama et al. 2015), mientras que la N-cadherina es una molécula de adhesión célula-célula que se expresa principalmente en la periferia de la neuroesfera, bordeando el lumen, como ya han visto otros autores (Ladiwala, Basu et al. 2012, Darabi, Tiraihi et al. 2013). Se encontró que la expresión de Vimentina mejoró en las neuroesferas, lo que sugiere un contacto

preliminar entre células generalmente a través de interacciones dependientes de calcio, que llevan a las células a autoensamblarse en agregados, lo que se relaciona con el potencial de diferenciación neural. Ashjian demostró que, después de ser inducidas por un protocolo químico, las células madre humanas derivadas de tejido adiposo adquirirían características morfológicas neuronales típicas y aumentaban la expresión de Enolasa neuronal y Vimentina (Ashjian, Elbarbary et al. 2003). Por su parte, la N-cadherina juega un papel importante en la formación de agrupaciones celulares y en la regulación de la diferenciación celular (Ladiwala, Basu et al. 2012). Además, la formación de neuroesferas se inhibe mediante la supresión de la función de la N-cadherina y se ha demostrado que la expresión de esta proteína disminuye después de la inducción de la diferenciación de la neuroesfera (Yagita, Sakurai et al. 2009).

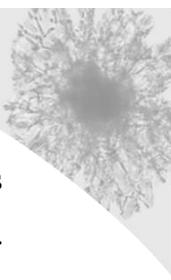
Algunos estudios demuestran que el modelo de formación de neuroesferas es un enfoque más eficiente para conseguir una correcta diferenciación neuronal que el modelo adherente. Probablemente se deba a la producción de una gran cantidad de células neuronales maduras, la reducida muerte celular a largo plazo y los cambios neuronales estables en el tiempo (Qian, Zhang et al. 2010, Salehi, Amirpour et al. 2016). Los resultados demostraron que estos medios de diferenciación promovían la morfología neuronal, desarrollando estructuras tipo axón o dendritas, y aumentando el nivel de expresión de marcadores neuronales.

También mostraron un aumento del nivel de expresión de marcadores funcionales, lo que indica una diferenciación neuronal correcta. Como conclusión, parece que el medio Neu1 es más efectivo que Neu2 y Neu3, causando un mayor cambio morfológico hacia linaje neuronal y promoviendo la expresión de más genes relacionados con el tejido nervioso. Además, se puede utilizar como inductor de neuronas colinérgicas y dopaminérgicas, siendo CHAT un marcador colinérgico y TH uno dopaminérgico. Tomados en conjunto, se llegó a la conclusión de que la combinación de EGF, FGF y LIF en un medio de cultivo (Neu1), aplicados a las células durante 21 días, resultó ser el mejor protocolo de los testados para la obtención de células de linaje neuronal a partir de hASCs.

### *V.3. Capacidad de migración*

---

Dado que las neuroesferas expresaron mayor cantidad de marcadores neuronales en un periodo menor de tiempo, su uso potencial en clínica parece más prometedor que el de



los cultivos diferenciados en monocapa, lo que está avalado por muchos otros trabajos (Vindigni, Michelotto et al. 2009, Chung, Fujita et al. 2013, Chung, Wong et al. 2014). Uno de los comportamientos esperados de una hASCs trasplantada es su capacidad para migrar hacia la zona dañada y favorecer la recuperación del tejido. Para comparar esta capacidad tanto en hASCs diferenciadas en monocapa como en neuroesferas, se llevó a cabo un ensayo de migración en cocultivo con células SH-SY5Y de neuroblastoma, que imitaban el tejido nervioso dañado. Los resultados obtenidos permitieron determinar que las células diferenciadas migraban más en todos los casos que las hASCs control y que las neuroesferas lo hacían de forma más evidente que las sembradas en monocapa.

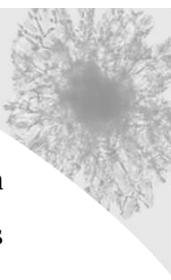
Se utilizó también un medio pobre en glucosa que imitaba el tejido neuronal dañado por isquemia como ya hicieron Czubowicz y cols. (Czubowicz, Cieslik et al. 2015). Como se esperaba, los resultados mostraron que las hASCs diferenciadas migraban más en ausencia de glucosa, comparadas con aquellas sembradas en un medio estándar. Lambert y cols. (Lambert, Clark et al. 2004) constataron que este hecho se debía a la liberación de neurotrofinas como NGF, BDNF o neurotrofina-3 por parte del tejido nervioso en isquemia, que actúan como sustancias quimioatrayentes de las células reparadoras del tejido. A su vez, Scheibe (Scheibe, Klein et al. 2012) informó sobre ciertos factores paracrinicos que liberan las MSCs para proteger a las células nerviosas frente a la muerte celular apoptótica en tejidos isquémicos. El estudio de Zhang y cols. corrobora estos datos, demostrando que los microambientes con alto contenido en glucosa inhiben la proliferación y la migración de las MSCs al activar la glicógeno-sintasa quinasa-3 $\beta$  (Zhang, Liu et al. 2016). Cheng y cols. (Cheng, Hsieh et al. 2016) consideran que las causantes de esta migración son las especies reactivas del oxígeno que se generan en ambientes isquémicos. Muchos otros estudios concluyen que un microambiente bajo en glucosa y en hipoxia favorece la diferenciación y la capacidad para migrar de las neuroesferas (Chung, Wong et al. 2014). En conclusión, la formación de neuroesferas favorece la diferenciación neuronal y la migración celular hacia el tejido neuronal dañado frente a un cultivo en monocapa. Por tanto, las neuroesferas de hASCs diferenciadas y a continuación disociadas parecen ser la mejor alternativa para el trasplante en pacientes que lo requieran, y un ambiente hipóxico y con baja concentración en glucosa, como el que encontrarían en la zona dañada, parece favorecer su supervivencia y capacidad regenerativa.

#### V.4. Cambios epigenéticos y compromiso con el linaje celular

---

La principal barrera para el uso de hASCs diferenciadas en el tratamiento de patologías del sistema nervioso consiste en la imposibilidad de garantizar su estabilidad a largo plazo una vez trasplantadas. Esto se debe a que el mecanismo genético preciso por el cual estas células se diferencian en linajes específicos aún no se conoce completamente, y además, está muy influenciado por el microambiente donde se implantan. Modificar genéticamente las hASCs podría acercarnos a la obtención de una línea diferenciada más fácilmente controlable y estable en el tiempo. En este sentido las MSCs ya han demostrado su utilidad en el tratamiento de ciertas enfermedades nerviosas. Se ha visto que MSCs modificadas genéticamente para sobreexpresar factor neurotrófico (BDNF), ayudan a regular los niveles de esta sustancia en pacientes con enfermedad de Huntington (Crane, Rossignol et al. 2014). De forma semejante, MSCs modificadas genéticamente para sobreexpresar NGF alivian el déficit de memoria de enfermos de Alzheimer (Wyse, Dunbar et al. 2014). Pero para optimizar la eficacia terapéutica de este tipo de células, es necesario el conocimiento exhaustivo de los procesos endógenos que tienen lugar en el núcleo celular.

Se sabe que las MSCs poseen un complejo mecanismo epigenético que controla su comportamiento tanto en fases adultas como embrionarias (Lunyak and Rosenfeld 2008, Mohamed Ariff, Mitra et al. 2012, Schmidt and Plath 2012) y la alteración de las marcas epigenéticas nos permite modificar la plasticidad y el destino de estas células (Kim, Jeong et al. 2016, Fila-Danilow, Borkowska et al. 2017). Existen estudios que muestran cambios en el estado de metilación de las células madre mesenquimales diferenciadas de hasta un 83% con respecto a una MSC sin diferenciar (Shao, Zhang et al. 2014). Gasiunienė y cols. (Gasiunienė, Zentelyte et al. 2019) afirmaron que tanto la diferenciación hacia linaje neural como hacia linaje miogénico están controladas por procesos epigenéticos bastantes similares y Fila-Danilow y cols. (Fila-Danilow, Borkowska et al. 2017) mostraron la influencia de dos inhibidores de la desacetilasa de histonas en la expresión de proteínas neuronales tempranas y la formación de neuroesferas. Duan y cols. (Duan, Zhang et al. 2012) encontraron que la metilación de regiones promotoras de genes relacionados con las células nerviosas, como Enolasa, Oct4 y TAU, regulan la expresión de las MSCs hacia linaje neuronal. Los componentes clave de esta maquinaria incluyen la metilación de las islas CpG, el ARN no codificante, los complejos remodeladores de la cromatina y las enzimas modificadoras de histonas. La comprensión de estos mecanismos, que subyacen a los cambios en el fenotipo, podría acelerar y contribuir en el proceso de diferenciación



neuronal y ayudar a conocer cuál será el comportamiento de las hASCs a largo plazo, con el objetivo de diseñar tratamientos seguros en un futuro cercano (Mancarella and Plass 2021).

Para este propósito, se llevaron a cabo estudios completos de metilación del genoma para definir qué genes sufren modificaciones epigenéticas durante el proceso de diferenciación neuronal (Berdasco, Melguizo et al. 2012). El análisis de 14.495 genes permitió estudiar el estado de metilación de 27.578 islas CpG, encontrando que de todos ellos 16 presentaron regulación positiva, lo que equivale a un incremento de la expresión, mientras que 82 presentaron regulación negativa y por tanto una disminución de la expresión, considerándose una muestra hipo- o hipermetilada si su valor beta difería 0,25 unidades con respecto al control no tratado. Los tres medios de diferenciación mostraron un patrón de metilación similar, siendo, en general, los cambios frente al control más notables con el medio Neu1. De los genes diferencialmente metilados, se identificaron 7 relacionados con procesos de neurogénesis, regulación de señales y diferenciación celular, tres de estos genes se encontraban hipometilados (*Hoxa-5*, *GRM4* y *FGFR1*) y los cuatro restantes hipermetilados (*RTEL1*, *METRN*, *EN1* y *Pax-9*). El gen *Hoxa-5* codifica para factores de transcripción y se sobreexpresa en neuronas en cultivo (Dunn, Simmons et al. 2015), *GRM4* se relaciona con las sinapsis de neuronas glutaminérgicas (Kim, Zhang et al. 2016) y *FGFR1* es el receptor del FGF y actúa como indicador de neurogénesis y neuroinflamación (Woodbury and Ikezu 2014). Por su parte *RTEL1* está asociado con el desarrollo glial (Li, Jin et al. 2013), *METRN* promueve la formación del axón durante la neurogénesis (Nishino, Yamashita et al. 2004), *EN1* tiene un papel regulador en el desarrollo neuronal (Noisa, Raivio et al. 2015) y *Pax-9* está implicado en el desarrollo de la cresta neural (Monsoro-Burq 2015). El gen *SOX2*, relacionado con la pluripotencialidad, mostraba un estado hipermetilado en las células diferenciadas, fenómeno que se vincula con una menor expresión en estas células, lo que se corrobora con estudios previos (Divya, Roshin et al. 2012). Finalmente, y después de corroborar los resultados de los *arrays* mediante secuenciación con bisulfito de múltiples clones y *Real Time PCR*, se seleccionó el gen *Hoxa-5*, hipometilado tras la diferenciación, para llevar a cabo el estudio funcional.

La familia de genes *hox*, presente en todas las especies animales, es un grupo de genes relacionados, que codifica importantes factores de transcripción involucrados en la formación del sistema nervioso durante el desarrollo embrionario y fetal. Esta familia de proteínas también contribuye a determinar el destino neuronal y la conectividad muscular, mediante el control de la expresión de receptores de superficie celular en las neuronas

motoras (Catela, Shin et al. 2016). Los genes *hox* tienen una expresión dinámica en el tiempo y el espacio. En las especies de *C. elegans*, las proteínas Hox aseguran una expresión génica precisa durante la diferenciación neuronal terminal (Zheng, Jin et al. 2015). Durante la etapa embrionaria, el gen *Hoxa-5* promueve la neurulación y proporciona identidad segmentaria a los progenitores neuronales en proliferación (Di Bonito, Narita et al. 2013). Una prueba de su importancia es que los ratones mutantes *Hoxa-5* mueren durante los primeros cuatro días después del nacimiento (Aubin, Lemieux et al. 1997). Sin embargo, recientemente se demostró que *Hoxa-5* no solo se expresa en las primeras etapas de desarrollo, sino que también permanece durante la edad adulta (Rezsohazy, Saurin et al. 2015). Las proteínas *Hoxa-5* permanecen en la médula oblonga, el puente y en numerosos núcleos involucrados en el control de la función autónoma, estando presentes solo en las neuronas, principalmente las GABAérgicas (que producen ácido  $\gamma$ -aminobutírico o GABA) y catecolaminérgicas (Lizen, Hutlet et al. 2017). Se sabe que su presencia es necesaria para la supervivencia de las neuronas, la proyección axonal y la migración neuronal entre otras funciones (Bechara, Laumonnerie et al. 2015). También se ha demostrado que *Hoxa-5* y *Hoxc-5* cooperan para controlar el desarrollo de la columna motriz frénica (Philippidou, Walsh et al. 2012), lo que compromete la guía de los axones y la supervivencia de los ratones mutantes *Hoxa-5*. Este gen regula directamente algunas moléculas efectoras como el factor trófico pleiotrofina, por lo que no solo actúa como factor de transcripción (Chen, Rubin et al. 2005). Además, se sabe que este gen desempeña un papel crítico en los pasos sucesivos de la formación del sistema nervioso central durante el desarrollo embrionario y fetal, y el establecimiento y la plasticidad de los circuitos precerebelosos durante la vida postnatal y adulta (Lizen, Hutlet et al. 2017).

#### *V.5. El gen Hoxa-5 en el proceso de diferenciación neuronal*

---

Por último y para evaluar el impacto funcional que la pérdida o ganancia de este gen tendría en el proceso de diferenciación neuronal, se procedió a realizar un estudio funcional. Para ello se indujo la sobreexpresión del gen *Hoxa-5* de forma estable y se evaluaron los cambios en la expresión de proteínas propias de linaje neuronal. Para la creación de una línea de hASCs estable que sobreexpresara el gen *Hoxa-5*, se utilizaron dos metodologías distintas, una infección con lentivirus y un sistema CRISPR/dCas9. Frente a la inserción clásica con lentivirus en la que se desconoce el sitio de inserción del



material genético, pudiendo ocasionar mutaciones con efectos perjudiciales para la célula, el sistema CRISPR es mucho más preciso.

El sistema CRISPR ha logrado una gran mejora en la edición del genoma en la última década (Sander and Joung 2014). Usando una única proteína combinada con un pequeño ARN guía, es posible obtener modificaciones de genes con alta precisión y eficiencia (Ben Jehuda, Shemer et al. 2018). Cas9 es la proteína involucrada en el sistema CRISPR que actúa como endonucleasa dirigida por secuencia, que además puede estar inactiva (dCas9), pasando a incorporar dominios proteicos con distintas funciones, activadores, inhibidores o detectores de ciertos genes (Gjaltema and Schulz 2018). En este estudio se empleó un sistema CRISPR/dCas9 unido al dominio VP64 con función de activador transcripcional, que reconoce al promotor del gen *Hoxa-5* e induce su expresión.

Tras comprobar la efectividad de la transfección con este sistema y con el lentiviral, se estudió la expresión de marcadores neuronales en hASCs que sobreexpresan el gen *Hoxa-5* para establecer una consecuencia funcional de los cambios en la metilación de este gen. Algunos marcadores neuronales como CHAT, FOXO4, MAP2 y SCN9A mostraron un aumento de la expresión sin ningún otro tipo de inducción neuronal, lo que indica que el gen *Hoxa-5* es capaz de iniciar parcialmente el proceso de diferenciación neuronal por sí solo, como ya se comprobó en otros estudios (Philippidou, Walsh et al. 2012, Catela, Shin et al. 2016, Lizen, Hutlet et al. 2017). Además, la expresión de Nestina bajó en los cultivos que sobreexpresaban *Hoxa-5*, lo que corrobora el estudio de Bouland (Bouland, Mastrangelopoulou et al. 2013), que afirmaba que las hASCs están preparadas epigenéticamente para diferenciarse a linaje neuronal, reprimiendo la expresión de Nestina durante la diferenciación neurogénica. Dichos resultados apoyaron la hipótesis de que durante la reprogramación celular se producen modificaciones epigenéticas en las células, mediante mecanismos de metilación del ADN, y que estos cambios contribuyen a la expresión de genes propios de un linaje celular y por tanto, a la diferenciación hacia un tipo celular concreto. Al combinar el medio de diferenciación Neu1 con el sistema CRISPR/dCas9, la expresión de los marcadores neuronales fue mucho más alta, y por consiguiente, se pudo concluir que Neu1 es eficaz induciendo la diferenciación neuronal de hASCs y que se puede lograr una diferenciación más rápida y estable combinándolo con el sistema CRISPR/dCas9 diseñado, al tener juntos un efecto sinérgico.

### V.6. Reversión del proceso de diferenciación neuronal

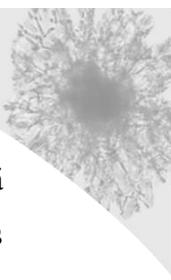
---

Las células son capaces de adaptarse rápidamente al microambiente circundante (Faulk and Dolinoy 2011), pero no hay estudios concluyentes de la estabilidad del compromiso de linaje neuronal adquirido por las hASCs una vez trasplantadas al paciente. En este estudio se analizaron los cambios, tanto morfológicos como moleculares, que sufrían estas células tras la retirada del medio de inducción neuronal y su cultivo en un medio estándar. La privación de los medios de inducción Neu1, Neu2 y Neu3 se mantuvo durante la mitad del tiempo que duró cada diferenciación celular. Pudo comprobarse que los cambios promovidos por la diferenciación se revertían en los tres casos cuando el medio de diferenciación era retirado y sustituido por uno estándar. En todos los casos la morfología celular retornaba a un aspecto fibroblástico, similar al observado al comienzo del experimento. Este hecho fue especialmente vistoso en el cultivo de las hASCs como neuroesferas tridimensionales en matrigel y agarosa, que intentaron retraer sus prolongaciones en ausencia del medio de diferenciación, obteniéndose finalmente un agregado celular informe. La alteración del perfil epigenético de las hASCs que tuvo lugar durante el proceso de diferenciación neuronal se restituyó a su estado original tras la desdiferenciación, volviéndose a una metilación más parecida a la de las hASCs control.

### V.7. Ensayo de cocultivo con células endoteliales

---

En la adaptación de las hASCs diferenciadas *in vitro* al microambiente del paciente una vez trasplantadas, es vital su interacción con otros tipos celulares. Las interacciones celulares afectan a la autorrenovación, la diferenciación, la transducción de señales y la división celular entre otros procesos (Jiao and Chen 2008). Por tanto, el potencial neurogénico no solo depende de las propiedades intrínsecas de los progenitores neuronales, sino también del entorno en el que residen. En individuos adultos, la neurogénesis tiene lugar cerca de vasos sanguíneos y las MSCs trabajan estrechamente asociadas con las células endoteliales. Este fenómeno se ha estudiado tanto en el hipocampo como en la zona subventricular, que presentan neurogénesis hasta en la edad adulta (Palmer, Willhoite et al. 2000, da Silva, Benton et al. 2012). Shen incluso sugirió que las células endoteliales jugaban un papel esencial en la proliferación de las células madre neuronales (Shen, Goderie et al. 2004). Como se vio anteriormente, el VEGF es un factor neurotrófico que activa a las células progenitoras neuronales inmaduras (Jin, Zhu et al. 2002, Zhang, Vutskits et al. 2003). Este factor es principalmente secretado por las células endoteliales, sobretudo en ambientes hipóxicos, y promueve la angiogénesis, siendo el factor más



importante en la neovascularización (Xie, Wei et al. 2004). Debido a que el VEGF está asociado con la angiogénesis y la neurogénesis, se quiso estudiar si las células endoteliales favorecían la diferenciación neuronal, o si por el contrario, la vascularización prematura tras una lesión en el sistema nervioso interrumpiría el proceso de diferenciación neuronal como ya propusieron Wild y cols. (Wild, Klems et al. 2017). Para ello se creó un sistema modelo en el que las hASCs se diferenciaron en presencia de medio de HUVECs, células endoteliales de la vena del cordón umbilical. Se demostró que la presencia de medio de HUVECs en el medio de diferenciación Neu1 favoreció la proliferación celular pero inhibió el proceso de diferenciación neuronal. Este fenómeno pudo apreciarse tanto morfológicamente, observando el cultivo con microscopio óptico, como atendiendo a la expresión de marcadores neuronales. Sin embargo, una vez retirado el medio endotelial, las células recuperaron su tendencia a diferenciarse a linaje neuronal.

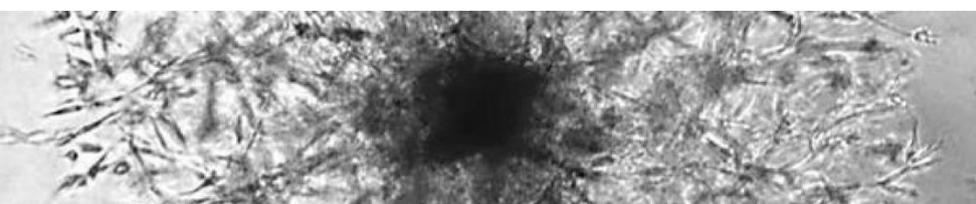
Estos datos sugieren que las citoquinas solubles secretadas por las células endoteliales pueden estimular la proliferación de las hASCs, pero inhiben su diferenciación neuronal, lo que apoyaría la hipótesis de Wild (Wild, Klems et al. 2017) que sostiene que la vasculogénesis interrumpe la neurogénesis en el tejido dañado. Ii (Ii, Nishimura et al. 2009) constató que la presencia del factor VEGF podría inducir fenotipos vasculares, lo que reprimiría en última instancia la diferenciación neuronal. Este hallazgo sugiere que el microentorno donde se trasplantan las hASCs diferenciadas podría favorecer o revertir la diferenciación neuronal de éstas, así como estimular o no su proliferación en células del mismo tipo. Este hecho también muestra que los núcleos de neurogénesis y vasculogénesis dentro de un tejido pueden derivarse de células madre progenitoras comunes y es el microambiente el que finalmente determina el destino celular. Según algunos autores (Shen, Wang et al. 2008, Tavazoie, Van der Veken et al. 2008), la vasculatura es un componente clave en los nichos de neurogénesis, donde las células progenitoras neuronales están preparadas para recibir señales reguladoras de la vasculatura. También se demostró que la expresión de marcadores neuronales en células diferenciadas ocurre cronológicamente, apareciendo algunos al comienzo de la inducción neuronal y otros después de un tiempo (Salehi, Amirpour et al. 2016).

La expresión de Vimentina está relacionada con la morfología mesenquimal y el comportamiento móvil de las MSCs. Por el contrario, una baja expresión de este marcador hace que las células mesenquimales adopten un fenotipo epitelial (Mendez, Kojima et al. 2010). Esta evidencia también fue corroborada por Patri y cols. (Pati, Khakoo et al. 2011), quienes confirmaron que, en ausencia de Vimentina, la diferenciación espontánea de los

progenitores celulares tiende hacia linaje endotelial. En este caso la expresión de Vimentina fue alta, por lo que se garantizó la progresión de la diferenciación neuronal sobre la endotelial. La N-cadherina, marcador relacionado con la adhesión celular, aumentó su concentración notablemente cuando se puso en contacto las hASCs con medio de HUVECs. Esta sobreexpresión, ya detectada por otros autores (Nassiri and Rahbarghazi 2014) y relacionada con la permeabilidad de las células endoteliales, se da únicamente cuando las MSCs interactúan con células endoteliales en el mismo cultivo, nunca en un cultivo independiente, lo que puso de manifiesto la interacción que estaba teniendo lugar en este experimento.

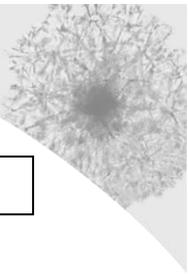
Como conclusión, podemos afirmar que el microambiente donde se trasplanten las hASCs en el paciente va a influir en su capacidad de diferenciación y parece necesario controlarlo, por ejemplo, variando su composición en ciertas sustancias como citoquinas, para evitar transdiferenciaciones a otros tipos celulares o una reversión de la diferenciación neuronal. Probablemente la creación de un nicho vascular sobre el que inducir la neurogénesis de hASCs sería una continuación adecuada para este estudio.

*En este trabajo, se ha demostrado que las hASCs pueden convertirse en células de tipo neuronal cuando se cultivan en un medio que promueve la activación de vías de señalización celular específicas. Para ello, se ha buscado el protocolo más confiable y eficiente, combinando los ingredientes más utilizados en bibliografía. Además, se ha realizado un estudio epigenético del genoma completo de las hASCs diferenciadas y de muestras control no tratadas para estudiar qué genes tienen mayor relevancia en el proceso de diferenciación. Para estudiar la importancia de esos genes, se ha creado una línea de hASCs modificadas genéticamente utilizando para ello una transfección con lentivirus y un sistema CRISPR/dCas9 que mejoran y aceleran el proceso de diferenciación neuronal. De esta forma se ha podido demostrar que manipular las hASCs hasta un estado epigenético deseado puede ser un método eficaz para conseguir que la diferenciación neuronal de estas células sea más rápida y efectiva, y este proceso puede combinarse con medios de diferenciación que ya han demostrado su utilidad en este sentido. Ambos procedimientos podrían ser utilizados de forma conjunta para obtener mejores resultados en la creación de estrategias terapéuticas dirigidas a la implantación celular en el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central.*



## 6. CONCLUSIONES

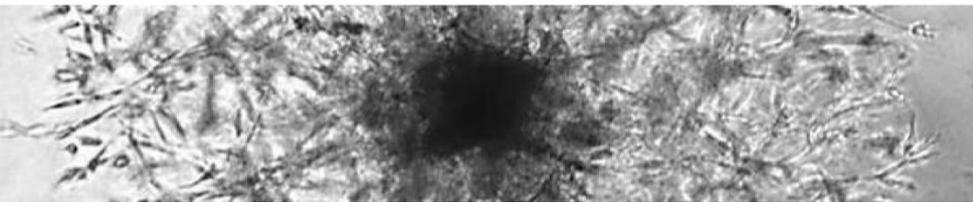




## VI. CONCLUSIONES

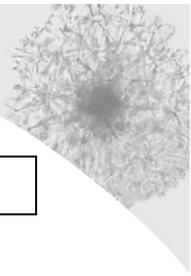
1. Las células madre mesenquimales humanas obtenidas de tejido adiposo cumplen los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular, presentando marcaje positivo para los marcadores mesenquimales CD73, CD90 y CD105 y negativo para los hematopoyéticos CD34, CD45 y CD133.
2. La inducción neuronal de las células madre mesenquimales humanas con los tres medios de diferenciación propuestos, ricos en factores de crecimiento, permite su diferenciación a linaje neuronal, adquiriendo una morfología típica del tejido nervioso.
3. El uso de los medios de diferenciación propuestos aumenta la expresión de marcadores proteicos neuronales estructurales y funcionales propios del sistema nervioso, destacando la encontrada en MAP2, SNAP25, CHAT, FOXO4 y especialmente en SCN9A.
4. La diferenciación neuronal de las hASCs formando neuroesferas en un medio pobre en glucosa favorece su capacidad migratoria hacia el tejido nervioso dañado.
5. La dediferenciación de las células por sustitución del medio de diferenciación por un medio estándar, revierte los cambios morfológicos adquiridos y disminuye la expresión de marcadores proteicos neuronales a niveles propios de células madre mesenquimales.
6. La inducción al linaje neuronal de las células madre mesenquimales humanas provoca la hipometilación del promotor del gen Hoxa-5, aumentando su expresión.
7. La sobreexpresión génica de Hoxa-5 mediante transfección con lentivirus o empleando un sistema CRISPR/dCas9 en células madre mesenquimales humanas, induce la expresión de marcadores proteicos neuronales como MAP2, SCN9A y CHAT, lo que demuestra la importancia de este gen en el proceso de diferenciación neuronal de las células madre mesenquimales.





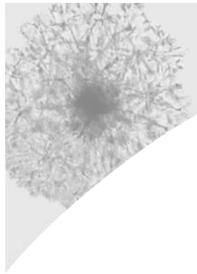
## 7. CONCLUSIONS (ENGLISH)

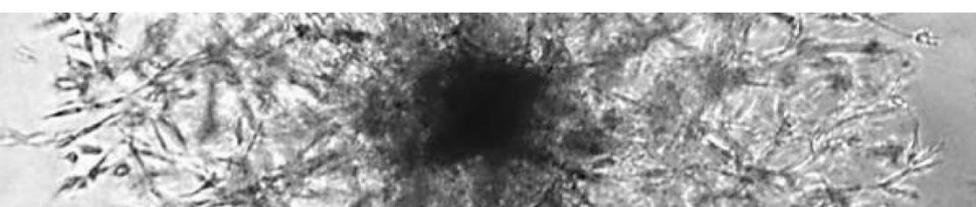




## VII. CONCLUSIONS (ENGLISH)

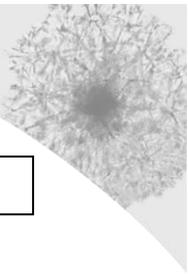
1. The human mesenchymal stem cells obtained from adipose tissue meet the criteria of the International Society of Cell Therapy, presenting positive labeling for the mesenchymal markers CD73, CD90 and CD105, and negative for the hematopoietic markers CD34, CD45 and CD133.
2. The neuronal induction of human mesenchymal stem cells with the three proposed differentiation media, which are rich in growth factors, allows their differentiation into neuronal lineage, acquiring a typical morphology of nervous tissue.
3. The use of the proposed differentiation media increases the expression of structural and functional neuronal protein markers characteristic of the nervous system, both in cells differentiated in monolayer and forming neurospheres.
4. Both the neuronal differentiation of hASCs in a medium poor in glucose and neurosphere formation favor their migratory capacity towards the damaged nervous tissue.
5. De-differentiation of the cells by substitution of the differentiation medium for a standard one, reverses the morphological changes acquired and decreases the expression of neuronal protein markers until they reach basal levels of undifferentiated mesenchymal stem cells.
6. The induction of the neuronal lineage of the human mesenchymal stem cells causes the hypomethylation of the Hoxa-5 gene promoter, increasing its expression, and the hypermethylation of the Pax-9 gene promoter, silencing it.
7. Gene overexpression of Hoxa-5 by transfection with lentivirus or using a CRISPR/dCas9 system in human mesenchymal stem cells induces the expression of neuronal protein markers such as MAP2, SCN9A and CHAT, thus demonstrating the importance of this gene in the process of neuronal differentiation of mesenchymal stem cells.





## 8. CONCLUSIONS (FRANÇAIS)

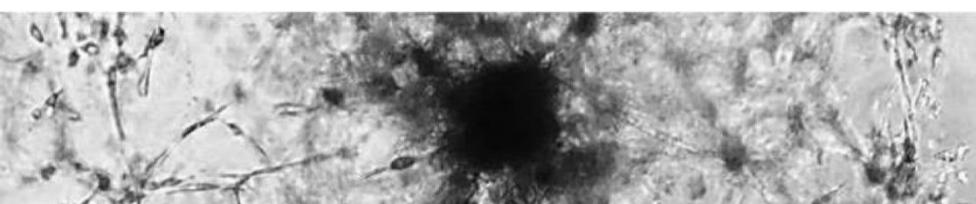




## VIII. CONCLUSIONS (FRANÇAIS)

1. Les cellules souches mésenchymateuses humaines obtenues à partir de tissu adipeux, répondent aux critères de la Société internationale de thérapie cellulaire, présentant un marquage positif pour les marqueurs mésenchymateux CD73, CD90 et CD105 et négatif pour les marqueurs hématopoïétiques CD34, CD45 et CD133.
2. L'induction neuronale de cellules souches mésenchymateuses humaines avec les trois milieux de différenciation proposés, riches en facteurs de croissance, permet leur différenciation en lignées neuronales, acquérant une morphologie typique du tissu nerveux.
3. L'utilisation des moyens de différenciation proposés augmente l'expression de marqueurs protéiques neuronaux structuraux et fonctionnels propre du système nerveux, à la fois dans les cellules différenciées en monocouches et sous forme de neurosphères.
4. La différenciation neuronale des hASC dans un milieu pauvre en glucose et formant des neurosphères, favorise leur capacité de migration vers le tissu nerveux endommagé.
5. La différenciation des cellules par substitution du milieu de différenciation par un milieu standard investit les modifications morphologiques acquises et diminue l'expression des marqueurs protéiques neuronaux aux niveaux des cellules souches mésenchymateuses non différenciées.
6. L'induction de la lignée neuronale des cellules souches mésenchymateuses humaines provoque l'hypométhylation du promoteur du gène Hoxa-5, augmentant ainsi son expression, et l'hyperméthylation du promoteur du gène Pax-9, le rendant ainsi silencieux.
7. La surexpression génique du gène Hoxa-5 par transfection avec lentivirus ou en utilisant un système CRISPR/dCas9 dans des cellules souches mésenchymateuses humaines induit l'expression de marqueurs protéiques neuronaux tels que MAP2, SCN9A et CHAT, démontrant ainsi l'importance de ce gène dans le processus de différenciation neuronale des cellules souches mésenchymateuses.





## 9. ÍNDICE DE FIGURAS



**IX. ÍNDICE DE FIGURAS**

*Figura 1. Tipos de células madre según su potencialidad. .... - 5 -*

*Figura 2. Tipos de células madre aisladas según el desarrollo ontogénico..... - 7 -*

*Figura 3. Fuentes de células madre adultas. .... - 8 -*

*Figura 4. Tipos celulares en los que pueden diferenciarse las hASCs. .... - 18 -*

*Figura 5. Mecanismos terapéuticos de las SC en el tejido nervioso dañado. .... - 24 -*

*Figura 6. Mecanismos para reprogramar las hASCs hacia distintos linajes celulares. .... - 27 -*

*Figura 7. Representación de un sistema CRISPR/Cas. .... - 43 -*

*Figura 8. Esquema del mecanismo de actuación del sistema CRISPR/Cas..... - 44 -*

*Figura 9. Esquema del funcionamiento de la nucleasa Cas9. .... - 45 -*

*Figura 10. Células madre y cáncer en el sistema nervioso. .... - 47 -*

*Figura 11. Perspectivas futuras de la investigación con MSCs..... - 49 -*

*Figura 12. Ensayos clínicos con MSCs para el tratamiento de enfermedades neuronales. .... - 60 -*

*Figura 13. Representación de la técnica de lipoaspirado..... - 67 -*

*Figura 14. Esquema del procesamiento del lipoaspirado..... - 68 -*

*Figura 15. Etapas del protocolo de extracción de MSCs a partir de un lipoaspirado..... - 69 -*

*Figura 16. Esquema de la formación y diferenciación de neuroesferas..... - 75 -*

*Figura 17. Esquema de los pasos seguidos en el experimento realizado con HUVECs. .... - 93 -*

*Figura 18. Tratamiento de ADN con bisulfito sódico..... - 96 -*

*Figura 19. Transformación de ADN con bisulfito según su estado de metilación. .... - 96 -*

*Figura 20. Esquema del vector pGEM-T-Easy (Promega)..... - 99 -*

*Figura 21. Ejemplo de análisis bioinformático de una secuenciación. .... - 106 -*

*Figura 22. Construcción del plásmido con el gen Hoxa-5 sin intrones. .... - 113 -*

*Figura 23. Secuencia de la proteína Hoxa-5 y de la proteína truncaada 60 aa más corta. .... - 114 -*

*Figura 24. Pasos seguidos en la construcción de la proteína truncaada. .... - 117 -*

*Figura 25. Esquema del envelope plasmid (pMD2.G) de Addgene. .... - 119 -*

*Figura 26. Esquema del packaging plasmid (psPAX2) de Addgene..... - 120 -*

*Figura 27. Representación del plásmido pdCas9-NED con la secuencia NEF (Addgene). .... - 125 -*

*Figura 28. Representación del plásmido MLM3636 que integra losARNg (Addgene). .... - 125 -*

*Figura 29. Representación del plásmido pMLM3705 con dCas9-VP64 (Addgene). .... - 126 -*

*Figura 30. Microscopia óptica de las hASCs durante las primeras tres semanas. .... - 131 -*

*Figura 31. Caracterización inmunofenotípica de las hASCs por FACScan. .... - 132 -*

*Figura 32. Cambios morfológicos apreciados en la diferenciación neuronal con Neu1..... - 134 -*

*Figura 33. Cambios morfológicos apreciados en la diferenciación neuronal con Neu2..... - 135 -*

*Figura 34. Cambios morfológicos apreciados en la diferenciación neuronal con Neu3..... - 136 -*

*Figura 35. Cambios morfológicos en la desdiferenciación de hASCs inducidas con Neu1. ... - 137 -*

*Figura 36. Cambios morfológicos en la desdiferenciación de hASCs inducidas con Neu2. ... - 138 -*

*Figura 37. Cambios morfológicos en la desdiferenciación de hASCs inducidas con Neu3. ... - 139 -*

*Figura 38. Resultados de los análisis de marcadores neuronales por western blot..... - 141 -*

*Figura 39. Cuantificación por densitometría de bandas de los resultados de western blot. - 142 -*

*Figura 40. Análisis de expresión de proteínas neuronales mediante inmunofluorescencia.. - 143 -*

*Figura 41. Análisis cuantitativo por RT-PCR de marcadores en hASC diferenciadas..... - 145 -*

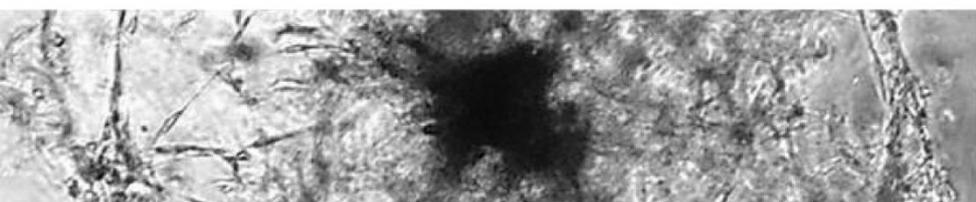
*Figura 42. Análisis cuantitativo por RT-PCR de marcadores en hASC desdiferenciadas. .... - 146 -*

*Figura 43. Formación de neuroesferas..... - 147 -*

*Figura 44. Inducción neuronal de neuroesferas. .... - 148 -*

- 207 -

Figura 45. Progresión de las prolongaciones celulares emitidas por neuroesferas. ....	148 -
Figura 46. Interconexión entre neuroesferas, ejemplos A y B. ....	149 -
Figura 47. Estudio de marcadores de diferenciación neuronal por inmunofluorescencia. ...	150 -
Figura 48. Cambios morfológicos durante la desdiferenciación de neuroesferas. ....	151 -
Figura 49. Capacidad de migración de hASCs y neuroesferas inducidas con Neu1. ....	152 -
Figura 50. Imágenes representativas de la migración en un medio rico en glucosa. ....	152 -
Figura 51. Imágenes representativas de la migración en un medio pobre en glucosa. ....	153 -
Figura 52. Cambios morfológicos observados en presencia de Neu1 y medio de HUVECs. ...	154 -
Figura 53. Cambios morfológicos en presencia de Neu1 sin el medio de HUVECs. ....	154 -
Figura 54. Estudio mediante inmunofluorescencia de los marcadores neuronales estudiados en hASCs en presencia o no de medio endotelial. ....	156 -
Figura 55. Estado de metilación de los genes candidatos seleccionados. ....	158 -
Figura 56. Secuenciación genómica con bisulfito de las islas CpG del gen Hoxa-5. ....	159 -
Figura 57. Secuenciación genómica con bisulfito de las islas CpG del gen Pax-. ....	160 -
Figura 58. Secuenciación genómica con bisulfito de las islas CpG del gen FGFR1. ....	160 -
Figura 59. Secuenciación genómica con bisulfito de las islas CpG del gen METRN. ....	161 -
Figura 60. Secuenciación genómica con bisulfito de las islas CpG del gen GRM4. ....	161 -
Figura 61. Secuenciación genómica con bisulfito, de las islas CpG del gen RETL1. ....	162 -
Figura 62. Estado de metilación del promotor del gen Hoxa-5 tras la desdiferenciación. ....	162 -
Figura 63. Estado de metilación del promotor del gen Pax-9 tras la desdiferenciación. ....	163 -
Figura 64. Estado de metilación del promotor del gen FGFR1 tras la desdiferenciación. ....	163 -
Figura 65. Estado de metilación del promotor del gen METRN tras la desdiferenciación. ...	164 -
Figura 66. Estado de metilación del promotor del gen GRM4 tras la desdiferenciación. ....	164 -
Figura 67. Estado de metilación del promotor del gen RETL1 tras la desdiferenciación. ....	165 -
Figura 68. Validación del array mediante Real Time PCR del gen Hoxa-5. ....	165 -
Figura 69. Imágenes de fluorescencia de la línea HEK-293T transfectada con lentivirus. ....	166 -
Figura 70. Resultados del sorter para el aislamiento de las células transfectadas. ....	167 -
Figura 71. Imágenes de fluorescencia de las hASCs infectadas con lentivirus. ....	168 -
Figura 72. Imagen de fluorescencia para la localización de la proteína Hoxa-5. ....	169 -
Figura 73. Estudio por western blot de la proteína Hoxa-5 en las hASCs transfectadas. ....	169 -
Figura 74. Expresión de ARNm de Hoxa-5 mediante RT-PCR en las líneas transfectadas. ...	170 -
Figura 75. Real Time PCR de marcadores neuronales en las muestras transfectadas. ....	171 -
Figura 76. Estudio de la expresión de Hoxa-5 por Real Time PCR en hASCs transfectadas. .	173 -
Figura 77. Estudio de la expresión de proteína Hoxa-5 por western blot. ....	173 -
Figura 78. Expresión de Hoxa-5 mediante Real Time PCR en hASCs transfectadas. ....	174 -
Figura 79. Modulación de la expresión de Hoxa-5 en hASC generadas por el sistema CRISPR/dCas9. ....	175 -



## 10. ÍNDICE DE TABLAS



**X. ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Incidencia de los desórdenes neurológicos más habituales. .... - 20 -

Tabla 2. Sustancias y marcadores neuronales más estudiados en diferenciación neuronal .. - 30 -

Tabla 3. Expresión de marcadores neuronales estudiados en hASCs. .... - 31 -

Tabla 4. Reguladores epigenéticos de la expresión génica más importantes. .... - 39 -

Tabla 5. Material necesario en el procesamiento de los lipoaspirados. .... - 68 -

Tabla 6. Anticuerpos empleados en la caracterización de las MSCs por citometría. .... - 73 -

Tabla 7. Composición de los medios de inducción neuronal: Neu1, Neu2 y Neu3. .... - 79 -

Tabla 8. Marcadores neuronales estudiados en la reprogramación celular de las hASCs. .... - 80 -

Tabla 9. Componentes de la solución de extracción de proteínas. .... - 81 -

Tabla 10. Composición de los geles y los buffers empleados en el western blot. .... - 82 -

Tabla 11. Componentes del tampón de carga 6X. .... - 83 -

Tabla 12. Anticuerpos primarios usados en western blot. .... - 84 -

Tabla 13. Anticuerpos secundarios usados en Western blot. .... - 85 -

Tabla 14. Componentes de la solución de bloqueo para inmunofluorescencia. .... - 86 -

Tabla 15. Anticuerpos primarios usados en inmunofluorescencias. .... - 87 -

Tabla 16. Anticuerpos secundarios usados en inmunofluorescencias. .... - 87 -

Tabla 17. Componentes de la Real Time PCR. .... - 89 -

Tabla 18. Condiciones de la Real Time PCR. .... - 89 -

Tabla 19. Primers usados y Tm empleadas en las Real Time PCR. .... - 90 -

Tabla 20. Primers empleados en las PCR tras la transformación con bisulfito. .... - 97 -

Tabla 21. Componentes de la PCR para los genes seleccionados. .... - 98 -

Tabla 22. Ciclos de la PCR de secuenciación. .... - 98 -

Tabla 23. Componentes de la Master mix de ligación. .... - 99 -

Tabla 24. Reactivos de la PCR de secuenciación. .... - 103 -

Tabla 25. Ciclos de la PCR de secuenciación. .... - 103 -

Tabla 26. Primers diseñados para las Real Time PCR de los genes candidatos. .... - 106 -

Tabla 27. Primers usados en la construcción del gen Hoxa-5 sin intrones. .... - 108 -

Tabla 28. Componentes de la PCR para la construcción de Hoxa-5 sin intrones. .... - 108 -

Tabla 29. Master mix y ciclos para amplificar los dos fragmentos de Hoxa-5. .... - 109 -

Tabla 30. Primers usados en el paso 3 de la construcción del gen Hoxa-5 sin intrones. .... - 110 -

Tabla 32. Temperaturas y ciclos empleados en la fusión de los fragmentos de Hoxa-5. .... - 110 -

Tabla 31. Master mix y ciclos para fusionar los dos fragmentos del gen Hoxa-5. .... - 110 -

Tabla 33. Digestiones de los fragmentos a y b, y el vector pLVX-irex-Zsgreen. .... - 111 -

Tabla 34. Composición del medio de congelación de bacterias. .... - 112 -

Tabla 35. Primers usados en la construcción de la proteína truncada. .... - 114 -

Tabla 37. Temperaturas y ciclos usados para amplificar los dos fragmentos de Hoxa-5. .... - 115 -

Tabla 36. Master mix y ciclos para amplificar los dos fragmentos del gen Hoxa-5. .... - 115 -

Tabla 38. Digestiones del fragmento y del vector pLVX-irex-tdTomato. .... - 116 -

Tabla 39. Plásmidos empleados en la transfección de células hospedadoras HEK-293T. .... - 120 -

Tabla 40. ARNg diseñados para la formación del sistema CRISPR/dCas9. .... - 123 -

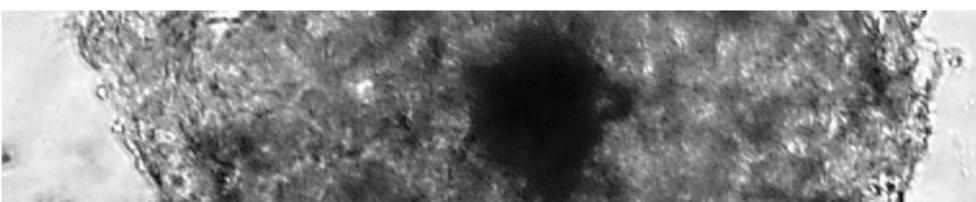
Tabla 41. Master mix y ciclos para la alineación de los oligonucleótidos. .... - 124 -

Tabla 42. Componentes de la Master mix para la alineación de los oligonucleótidos. .... - 124 -

Tabla 43. Genes candidatos tras analizar los resultados de los arrays de metilación. .... - 157 -

- 211 -





## BIBLIOGRAFÍA



## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abdal Dayem, A., S. B. Lee, K. Kim, K. M. Lim, T. I. Jeon, J. Seok and A. S. Cho (2019). "Production of Mesenchymal Stem Cells Through Stem Cell Reprogramming." Int J Mol Sci 20(8).
- Abel, J. L. and E. F. Rissman (2013). "Running-induced epigenetic and gene expression changes in the adolescent brain." Int J Dev Neurosci 31(6): 382-390.
- Achanta, P., N. I. Sedora Roman and A. Quinones-Hinojosa (2010). "Gliomagenesis and the use of neural stem cells in brain tumor treatment." Anticancer Agents Med Chem 10(2): 121-130.
- Acton, R. J., W. Yuan, F. Gao, Y. Xia, E. Bourne, E. Wozniak, J. Bell, K. Lillycrop, J. Wang, E. Dennison, N. C. Harvey, C. A. Mein, T. D. Spector, P. G. Hysi, C. Cooper and C. G. Bell (2021). "The genomic loci of specific human tRNA genes exhibit ageing-related DNA hypermethylation." Nat Commun 12(1): 2655.
- Ahangar, P., S. J. Mills, L. E. Smith, X. L. Strudwick, A. E. Ting, B. Vaes and A. J. Cowin (2020). "Human multipotent adult progenitor cell-conditioned medium improves wound healing through modulating inflammation and angiogenesis in mice." Stem Cell Res Ther 11(1): 299.
- Ahmadi, N., S. Razavi, M. Kazemi and S. Oryan (2012). "Stability of neural differentiation in human adipose derived stem cells by two induction protocols." Tissue Cell 44(2): 87-94.
- Ahn, S. Y., Y. S. Chang, D. K. Sung, S. I. Sung, J. Y. Ahn and W. S. Park (2017). "Pivotal Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor Secreted by Mesenchymal Stem Cells in Severe Intraventricular Hemorrhage in Newborn Rats." Cell Transplant 26(1): 145-156.
- Akin, E. J., L. Sole, S. D. Dib-Hajj, S. G. Waxman and M. M. Tamkun (2015). "Preferential targeting of Nav1.6 voltage-gated Na<sup>+</sup> Channels to the axon initial segment during development." PLoS One 10(4): e0124397.
- Alexanian, A. R. (2015). "Epigenetic modulators promote mesenchymal stem cell phenotype switches." Int J Biochem Cell Biol 64: 190-194.
- Alexanian, A. R., Q. S. Liu and Z. Zhang (2013). "Enhancing the efficiency of direct reprogramming of human mesenchymal stem cells into mature neuronal-like cells with the combination of small molecule modulators of chromatin modifying enzymes, SMAD signaling and cyclic adenosine monophosphate levels." Int J Biochem Cell Biol 45(8): 1633-1638.
- Alizadeh, A., S. M. Dyck and S. Karimi-Abdolrezaee (2019). "Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms." Front Neurol 10: 282.
- Alizadeh, R., G. Hassanzadeh, M. T. Joghataei, M. Soleimani, F. Moradi, S. Mohammadpour, J. Ghorbani, A. Safavi, M. Sarbishegi, V. Pirhajati Mahabadi, L. Alizadeh and M. Hadjighassem (2016). "In vitro differentiation of neural stem cells derived from human olfactory bulb into dopaminergic-like neurons." Eur J Neurosci.
- Altman, J. and G. D. Das (1965). "Post-natal origin of microneurons in the rat brain." Nature 207(5000): 953-956.
- Andreotti, J. P., W. N. Silva, A. C. Costa, C. C. Picoli, F. C. O. Bitencourt, L. M. C. Coimbra-Campos, R. R. Resende, L. A. V. Magno, M. A. Romano-Silva, A. Mintz and A. Birbrair (2019). "Neural stem cell niche heterogeneity." Semin Cell Dev Biol 95: 42-53.
- Angeloni, C., M. Gatti, C. Prata, S. Hrelia and T. Maraldi (2020). "Role of Mesenchymal Stem Cells in Counteracting Oxidative Stress-Related Neurodegeneration." Int J Mol Sci 21(9).
- Anghileri, E., S. Marconi, A. Pignatelli, P. Cifelli, M. Galie, A. Sbarbati, M. Krampera, O. Belluzzi and B. Bonetti (2008). "Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells." Stem Cells Dev 17(5): 909-916.

- Ara, J., S. Fekete, A. Zhu and M. Frank (2010). "Characterization of neural stem/progenitor cells expressing VEGF and its receptors in the subventricular zone of newborn piglet brain." Neurochem Res 35(9): 1455-1470.
- Arboleda, D., S. Forostyak, P. Jendelova, D. Marekova, T. Amemori, H. Pivonkova, K. Masinova and E. Sykova (2011). "Transplantation of predifferentiated adipose-derived stromal cells for the treatment of spinal cord injury." Cell Mol Neurobiol 31(7): 1113-1122.
- Arvanitakis, Z., A. W. Capuano, S. E. Leurgans, D. A. Bennett and J. A. Schneider (2016). "Relation of cerebral vessel disease to Alzheimer's disease dementia and cognitive function in elderly people: a cross-sectional study." Lancet Neurol 15(9): 934-943.
- Ashjian, P. H., A. S. Elbarbary, B. Edmonds, D. DeUgarte, M. Zhu, P. A. Zuk, H. P. Lorenz, P. Benhaim and M. H. Hedrick (2003). "In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors." Plast Reconstr Surg 111(6): 1922-1931.
- Asokan, A., A. R. Ball, C. D. Laird, L. Hermer and B. K. Ormerod (2014). "Desvenlafaxine may accelerate neuronal maturation in the dentate gyri of adult male rats." PLoS One 9(6): e98530.
- Aubin, J., M. Lemieux, M. Tremblay, J. Berard and L. Jeannotte (1997). "Early postnatal lethality in Hoxa-5 mutant mice is attributable to respiratory tract defects." Dev Biol 192(2): 432-445.
- Augusto-Oliveira, M., G. P. F. Arrifano, J. O. Malva and M. E. Crespo-Lopez (2019). "Adult Hippocampal Neurogenesis in Different Taxonomic Groups: Possible Functional Similarities and Striking Controversies." Cells 8(2).
- Ayala-Cuellar, A. P., J. H. Kang, E. B. Jeung and K. C. Choi (2019). "Roles of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration and Immunomodulation." Biomol Ther (Seoul) 27(1): 25-33.
- Ayala-Grosso, C., R. Pieruzzini, L. Vargas-Saturno and J. E. Cardier (2020). "Human olfactory mesenchymal stromal cells co-expressing horizontal basal and ensheathing cell proteins in culture." Biomedica 40(1): 72-88.
- Bacigalupo, A. (2017). "How I treat acquired aplastic anemia." Blood 129(11): 1428-1436.
- Bae, K. S., J. B. Park, H. S. Kim, D. S. Kim, D. J. Park and S. J. Kang (2011). "Neuron-like Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells." Yonsei Medical Journal 52(3): 401-412.
- Bae, K. S., J. B. Park, H. S. Kim, D. S. Kim, D. J. Park and S. J. Kang (2011). "Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells." Yonsei Med J 52(3): 401-412.
- Baig, S., A. H. S. Azizan, H. R. B. Raghavendran, E. Natarajan, S. Naveen, M. R. Murali, H. Y. Nam and T. Kamarul (2019). "Effect of Chitosan Nanoparticle-Loaded Thymus serpyllum on Hydrogen Peroxide-Induced Bone Marrow Stromal Cell Damage." Stem Cells Int 2019: 5142518.
- Baizabal, J. M. and L. Covarrubias (2009). "The embryonic midbrain directs neuronal specification of embryonic stem cells at early stages of differentiation." Dev Biol 325(1): 49-59.
- Bajek, A., J. Olkowska, N. Gurtowska, T. Kloskowski, M. Walentowicz-Sadlecka, P. Sadlecki, M. Grabiec and T. Drewa (2014). "Human amniotic-fluid-derived stem cells: a unique source for regenerative medicine." Expert Opin Biol Ther 14(6): 831-839.
- Bali, P., D. K. Lahiri, A. Banik, B. Nehru and A. Anand (2017). "Potential for Stem Cells Therapy in Alzheimer's Disease: Do Neurotrophic Factors Play Critical Role?" Curr Alzheimer Res 14(2): 208-220.
- Bannister, A. J. and T. Kouzarides (2011). "Regulation of chromatin by histone modifications." Cell Res 21(3): 381-395.
- Baptista, L. S., K. R. Silva and R. Borojevic (2015). "Obesity and weight loss could alter the properties of adipose stem cells?" World J Stem Cells 7(1): 165-173.
- Barati, M., M. Akhondi, N. S. Mousavi, N. Haghparast, A. Ghodsi, H. Baharvand, M. Ebrahimi and S. N. Hassani (2021). "Pluripotent Stem Cells: Cancer Study, Therapy, and Vaccination." Stem Cell Rev Rep.

- Barrangou, R., C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero and P. Horvath (2007). "CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes." Science 315(5819): 1709-1712.
- Bavelier, D., D. M. Levi, R. W. Li, Y. Dan and T. K. Hensch (2010). "Removing brakes on adult brain plasticity: from molecular to behavioral interventions." J Neurosci 30(45): 14964-14971.
- Beachy, P. A., S. G. Hymowitz, R. A. Lazarus, D. J. Leahy and C. Siebold (2010). "Interactions between Hedgehog proteins and their binding partners come into view." Genes Dev 24(18): 2001-2012.
- Bechara, A., C. Laumonnerie, N. Vilain, C. F. Kratochwil, V. Cankovic, N. A. Maiorano, M. A. Kirschmann, S. Ducret and F. M. Rijli (2015). "Hoxa2 Selects Barrelette Neuron Identity and Connectivity in the Mouse Somatosensory Brainstem." Cell Rep 13(4): 783-797.
- Beech, R. D., M. A. Cleary, H. B. Treloar, A. J. Eisch, A. V. Harrist, W. Zhong, C. A. Greer, R. S. Duman and M. R. Picciotto (2004). "Nestin promoter/enhancer directs transgene expression to precursors of adult generated periglomerular neurons." J Comp Neurol 475(1): 128-141.
- Ben Jehuda, R., Y. Shemer and O. Binah (2018). "Genome Editing in Induced Pluripotent Stem Cells using CRISPR/Cas9." Stem Cell Rev.
- Berdasco, M., C. Melguizo, J. Prados, A. Gomez, M. Alaminos, M. A. Pujana, M. Lopez, F. Setien, R. Ortiz, I. Zafra, A. Aranega and M. Esteller (2012). "DNA methylation plasticity of human adipose-derived stem cells in lineage commitment." Am J Pathol 181(6): 2079-2093.
- Berg, J., M. Roch, J. Altschuler, C. Winter, A. Schwerk, A. Kurtz and B. Steiner (2015). "Human adipose-derived mesenchymal stem cells improve motor functions and are neuroprotective in the 6-hydroxydopamine-rat model for Parkinson's disease when cultured in monolayer cultures but suppress hippocampal neurogenesis and hippocampal memory function when cultured in spheroids." Stem Cell Rev 11(1): 133-149.
- Bergfeld, S. A. and Y. A. DeClerck (2010). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment." Cancer Metastasis Rev 29(2): 249-261.
- Berman, D. M., S. S. Karhadkar, A. R. Hallahan, J. I. Pritchard, C. G. Eberhart, D. N. Watkins, J. K. Chen, M. K. Cooper, J. Taipale, J. M. Olson and P. A. Beachy (2002). "Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade." Science 297(5586): 1559-1561.
- Bernd, P. (2008). "The role of neurotrophins during early development." Gene Expr 14(4): 241-250.
- Bhang, S. H., Y. E. Lee, S. W. Cho, J. W. Shim, S. H. Lee, C. Y. Choi, J. W. Chang and B. S. Kim (2007). "Basic fibroblast growth factor promotes bone marrow stromal cell transplantation-mediated neural regeneration in traumatic brain injury." Biochem Biophys Res Commun 359(1): 40-45.
- Bhansali, S., P. Dutta, V. Kumar, M. K. Yadav, A. Jain, S. Mudaliar, R. R. Sharma, V. Jha, N. Marwaha, N. Khandelwal, A. Srinivasan, N. Sachdeva, M. Hawkins and A. Bhansali (2017). "Efficacy of Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell and Mononuclear Cell Transplantation in Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized, Placebo-Controlled Comparative Study." Stem Cells Dev 26(7): 471-481.
- Bi, Y., M. Gong, X. Zhang, W. Jiang, Y. Zhang, J. Chen, Y. Liu, T. C. He and T. Li (2010). "Pre-activation of retinoid signaling facilitates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells." Dev Growth Differ 52(5): 419-431.
- Blurton-Jones, M., B. Spencer, S. Michael, N. A. Castello, A. A. Agazaryan, J. L. Davis, F. J. Muller, J. F. Loring, E. Masliah and F. M. LaFerla (2014). "Neural stem cells genetically-modified to express neprilysin reduce pathology in Alzheimer transgenic models." Stem Cell Res Ther 5(2): 46.
- Boku, S., S. Nakagawa and T. Koyama (2010). "Glucocorticoids and lithium in adult hippocampal neurogenesis." Vitam Horm 82: 421-431.

- Boldrini, M., C. A. Fulmore, A. N. Tartt, L. R. Simeon, I. Pavlova, V. Poposka, G. B. Rosoklija, A. Stankov, V. Arango, A. J. Dwork, R. Hen and J. J. Mann (2018). "Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging." Cell Stem Cell 22(4): 589-599 e585.
- Bonifer, C. and P. N. Cockerill (2011). "Chromatin mechanisms regulating gene expression in health and disease." Adv Exp Med Biol 711: 12-25.
- Bonsack, B., S. Corey, A. Shear, M. Heyck, B. Cozene, N. Sadanandan, H. Zhang, B. Gonzales-Portillo, M. Sheyner and C. V. Borlongan (2020). "Mesenchymal stem cell therapy alleviates the neuroinflammation associated with acquired brain injury." CNS Neurosci Ther 26(6): 603-615.
- Borkowska, P., J. Kowalska, A. Fila-Danilow, A. M. Bielecka, M. Paul-Samojedny, M. Kowalczyk and J. Kowalski (2015). "Affect of antidepressants on the in vitro differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into neuronal cells." Eur J Pharm Sci 73: 81-87.
- Bossolasco, P., L. Cova, C. Calzarossa, S. G. Rimoldi, C. Borsotti, G. L. Delilieri, V. Silani, D. Soligo and E. Polli (2005). "Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro." Exp Neurol 193(2): 312-325.
- Boulland, J. L., M. Mastrangelopoulou, A. C. Boquest, R. Jakobsen, A. Noer, J. C. Glover and P. Collas (2013). "Epigenetic regulation of nestin expression during neurogenic differentiation of adipose tissue stem cells." Stem Cells Dev 22(7): 1042-1052.
- Bozdag, S. C., M. K. Yuksel and T. Demirer (2018). "Adult Stem Cells and Medicine." Adv Exp Med Biol 1079: 17-36.
- Brunt, K. R., R. D. Weisel and R. K. Li (2012). "Stem cells and regenerative medicine - future perspectives." Can J Physiol Pharmacol 90(3): 327-335.
- Bucci, C., P. Alifano and L. Cogli (2014). "The role of rab proteins in neuronal cells and in the trafficking of neurotrophin receptors." Membranes (Basel) 4(4): 642-677.
- Buee, L., T. Bussiere, V. Buee-Scherrer, A. Delacourte and P. R. Hof (2000). "Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders." Brain Res Brain Res Rev 33(1): 95-130.
- Bulati, M., V. Miceli, A. Gallo, G. Amico, C. Carcione, M. Pampalona and P. G. Conaldi (2020). "The Immunomodulatory Properties of the Human Amnion-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Induced by INF-gamma Produced by Activated Lymphomonocytes and Are Mediated by Cell-To-Cell Contact and Soluble Factors." Front Immunol 11: 54.
- Cai, A. Q., K. Radtke, A. Linville, A. D. Lander, Q. Nie and T. F. Schilling (2012). "Cellular retinoic acid-binding proteins are essential for hindbrain patterning and signal robustness in zebrafish." Development 139(12): 2150-2155.
- Cao, S., X. Wei, H. Li, J. Miao, G. Zhao, D. Wu, B. Liu, Y. Zhang, H. Gu, L. Wang, Y. Fan, D. An and Z. Yuan (2016). "Comparative Study on the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Between Fetal and Postnatal Rat Spinal Cord Niche." Cell Transplant 25(6): 1115-1130.
- Caplan, A. I. and J. E. Dennis (2006). "Mesenchymal stem cells as trophic mediators." J Cell Biochem 98(5): 1076-1084.
- Cardozo, A., M. Ielpi, D. Gomez and P. Argibay (2010). "Differential expression of Shh and BMP signaling in the potential conversion of human adipose tissue stem cells into neuron-like cells in vitro." Gene Expr 14(6): 307-319.
- Cardozo, A. J., D. E. Gomez and P. F. Argibay (2011). "Transcriptional characterization of Wnt and Notch signaling pathways in neuronal differentiation of human adipose tissue-derived stem cells." J Mol Neurosci 44(3): 186-194.
- Carelli, S., T. Giallongo, F. Rey, E. Latorre, M. Bordoni, S. Mazzucchelli, M. C. Gorio, O. Pansarasa, A. Provenzani, C. Cereda and A. M. Di Giulio (2019). "HuR interacts with lincBRN1a and lincBRN1b during neuronal stem cells differentiation." RNA Biol 16(10): 1471-1485.
- Caretti, A., V. Peli, M. Colombo and A. Zulueta (2019). "Lights and Shadows in the Use of Mesenchymal Stem Cells in Lung Inflammation, a Poorly Investigated Topic in Cystic Fibrosis." Cells 9(1).

- Cargnello, M. and P. P. Roux (2011). "Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases." Microbiol Mol Biol Rev 75(1): 50-83.
- Carty, F., J. M. Corbett, J. Cunha, J. L. Reading, T. I. M. Tree, A. E. Ting, S. R. Stubblefield and K. English (2018). "Multipotent Adult Progenitor Cells Suppress T Cell Activation in In Vivo Models of Homeostatic Proliferation in a Prostaglandin E2-Dependent Manner." Front Immunol 9: 645.
- Castro-Manreza, M. E. and J. J. Montesinos (2015). "Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications." J Immunol Res 2015: 394917.
- Catela, C., M. M. Shin, D. H. Lee, J. P. Liu and J. S. Dasen (2016). "Hox Proteins Coordinate Motor Neuron Differentiation and Connectivity Programs through Ret/Gfralpha Genes." Cell Rep 14(8): 1901-1915.
- Chambers, S. M., C. A. Fasano, E. P. Papapetrou, M. Tomishima, M. Sadelain and L. Studer (2009). "Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling." Nat Biotechnol 27(3): 275-280.
- Charpentier, E. and J. A. Doudna (2013). "Biotechnology: Rewriting a genome." Nature 495(7439): 50-51.
- Chen, H., Z. Song and J. A. Dennis (2020). "Hypertonic saline versus other intracranial pressure-lowering agents for people with acute traumatic brain injury." Cochrane Database Syst Rev 1: CD010904.
- Chen, L., Y. Wang, S. Li, B. Zuo, X. Zhang, F. Wang and D. Sun (2020). "Exosomes derived from GDNF-modified human adipose mesenchymal stem cells ameliorate peritubular capillary loss in tubulointerstitial fibrosis by activating the SIRT1/eNOS signaling pathway." Theranostics 10(20): 9425-9442.
- Cheng, N. C., T. Y. Hsieh, H. S. Lai and T. H. Young (2016). "High glucose-induced reactive oxygen species generation promotes stemness in human adipose-derived stem cells." Cytotherapy 18(3): 371-383.
- Choi, S. A., J. Y. Lee, K. C. Wang, J. H. Phi, S. H. Song, J. Song and S. K. Kim (2012). "Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: characteristics and therapeutic potential as cellular vehicles for prodrug gene therapy against brainstem gliomas." Eur J Cancer 48(1): 129-137.
- Chopp, M., X. H. Zhang, Y. Li, L. Wang, J. Chen, D. Lu, M. Lu and M. Rosenblum (2000). "Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation." Neuroreport 11(13): 3001-3005.
- Choudhery, M. S., M. Badowski, A. Muise and D. T. Harris (2013). "Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose and cord tissue." Cytotherapy 15(3): 330-343.
- Chun, S. Y., S. Soker, Y. J. Jang, T. G. Kwon and E. S. Yoo (2016). "Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells into Dopaminergic Neuron-like Cells in Vitro." J Korean Med Sci 31(2): 171-177.
- Chung, C. S., N. Fujita, N. Kawahara, S. Yui, E. Nam and R. Nishimura (2013). "A comparison of neurosphere differentiation potential of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose-derived mesenchymal stem cells." J Vet Med Sci 75(7): 879-886.
- Chung, D. J., A. Wong, K. Hayashi and C. E. Yellowley (2014). "Effect of hypoxia on generation of neurospheres from adipose tissue-derived canine mesenchymal stromal cells." Vet J 199(1): 123-130.
- Ciervo, Y., K. Ning, X. Jun, P. J. Shaw and R. J. Mead (2017). "Advances, challenges and future directions for stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis." Mol Neurodegener 12(1): 85.
- Clausen, J. (1969). "The effect of vitamin A deficiency on myelination in the central nervous system of the rat." Eur J Biochem 7(4): 575-582.
- Clement, F., E. Grockowiak, F. Zylbersztein, G. Fossard, S. Gobert and V. Maguer-Satta (2017). "Stem cell manipulation, gene therapy and the risk of cancer stem cell emergence." Stem Cell Investig 4: 67.

- Clevers, H. and F. M. Watt (2018). "Defining Adult Stem Cells by Function, not by Phenotype." Annu Rev Biochem 87: 1015-1027.
- Colafrancesco, V. and P. Villoslada (2011). "Targeting NGF pathway for developing neuroprotective therapies for multiple sclerosis and other neurological diseases." Arch Ital Biol 149(2): 183-192.
- Colazzo, F., A. H. Chester, P. M. Taylor and M. H. Yacoub (2010). "Induction of mesenchymal to endothelial transformation of adipose-derived stem cells." J Heart Valve Dis 19(6): 736-744.
- Colpo, G. D., B. M. Ascoli, B. Wollenhaupt-Aguiar, B. Pfaffenseller, E. G. Silva, E. O. Cirne-Lima, J. Quevedo, F. Kapczinski and A. R. Rosa (2015). "Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative and psychiatric disorders." An Acad Bras Cienc 87(2 Suppl): 1435-1449.
- Connick, P., M. Kolappan, R. Patani, M. A. Scott, C. Crawley, X. L. He, K. Richardson, K. Barber, D. J. Webber, C. A. Wheeler-Kingshott, D. J. Tozer, R. S. Samson, D. L. Thomas, M. Q. Du, S. L. Luan, A. W. Michell, D. R. Altmann, A. J. Thompson, D. H. Miller, A. Compston and S. Chandran (2011). "The mesenchymal stem cells in multiple sclerosis (MSCIMS) trial protocol and baseline cohort characteristics: an open-label pre-test: post-test study with blinded outcome assessments." Trials 12: 62.
- Cortes-Medina, L. V., H. Pasantes-Morales, A. Aguilera-Castrejon, A. Picones, C. O. Lara-Figueroa, E. Luis, J. J. Montesinos, V. A. Cortes-Morales, M. P. De la Rosa Ruiz, E. Hernandez-Estevez, L. C. Bonifaz, M. A. Alvarez-Perez and G. Ramos-Mandujano (2019). "Neuronal Transdifferentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells from Neonatal and Adult Sources by a Small Molecule Cocktail." Stem Cells Int 2019: 7627148.
- Costa, A., D. Ceresa, A. De Palma, R. Rossi, S. Turturo, S. Santamaria, C. Balbi, F. Villa, D. Reverberi, K. Cortese, P. De Biasio, D. Paladini, D. Coviello, S. Ravera, P. Malatesta, P. Mauri, R. Quarto and S. Bollini (2021). "Comprehensive Profiling of Secretome Formulations from Fetal- and Perinatal Human Amniotic Fluid Stem Cells." Int J Mol Sci 22(7).
- Cox, C. S., Jr., J. E. Baumgartner, M. T. Harting, L. L. Worth, P. A. Walker, S. K. Shah, L. Ewing-Cobbs, K. M. Hasan, M. C. Day, D. Lee, F. Jimenez and A. Gee (2011). "Autologous bone marrow mononuclear cell therapy for severe traumatic brain injury in children." Neurosurgery 68(3): 588-600.
- Cox, C. S., Jr., R. A. Hetz, G. P. Liao, B. M. Aertker, L. Ewing-Cobbs, J. Juranek, S. I. Savitz, M. L. Jackson, A. M. Romanowska-Pawliczek, F. Triolo, P. K. Dash, C. Pedroza, D. A. Lee, L. Worth, I. P. Aisiku, H. A. Choi, J. B. Holcomb and R. S. Kitagawa (2017). "Treatment of Severe Adult Traumatic Brain Injury Using Bone Marrow Mononuclear Cells." Stem Cells 35(4): 1065-1079.
- Crane, A. T., J. Rossignol and G. L. Dunbar (2014). "Use of Genetically Altered Stem Cells for the Treatment of Huntington's Disease." Brain Sci 4(1): 202-219.
- Cristante, A. F., T. E. Barros-Filho, N. Tatsui, A. Mendrone, J. G. Caldas, A. Camargo, A. Alexandre, W. G. Teixeira, R. P. Oliveira and R. M. Marcon (2009). "Stem cells in the treatment of chronic spinal cord injury: evaluation of somatosensitive evoked potentials in 39 patients." Spinal Cord 47(10): 733-738.
- Czubowicz, K., M. Cieslik, J. Pyszko, J. B. Strosznajder and R. P. Strosznajder (2015). "Sphingosine-1-phosphate and its effect on glucose deprivation/glucose reload stress: from gene expression to neuronal survival." Mol Neurobiol 51(3): 1300-1308.
- d'Anglemont de Tassigny, X., A. Pascual and J. Lopez-Barneo (2015). "GDNF-based therapies, GDNF-producing interneurons, and trophic support of the dopaminergic nigrostriatal pathway. Implications for Parkinson's disease." Front Neuroanat 9: 10.
- da Silva, P. G., J. L. Benton, B. S. Beltz and S. Allodi (2012). "Adult neurogenesis: ultrastructure of a neurogenic niche and neurovascular relationships." PLoS One 7(6): e39267.
- Dahbour, S., F. Jamali, D. Alhattab, A. Al-Radaideh, O. Ababneh, N. Al-Ryalat, M. Al-Bdour, B. Hourani, M. Msallam, M. Rasheed, A. Huneiti, Y. Bahou, E. Tarawneh and A. Awidi

- (2017). "Mesenchymal stem cells and conditioned media in the treatment of multiple sclerosis patients: Clinical, ophthalmological and radiological assessments of safety and efficacy." CNS Neurosci Ther 23(11): 866-874.
- Damasceno, P. K. F., T. A. de Santana, G. C. Santos, I. D. Orge, D. N. Silva, J. F. Albuquerque, G. Golinelli, G. Grisendi, M. Pinelli, R. Ribeiro Dos Santos, M. Dominici and M. B. P. Soares (2020). "Genetic Engineering as a Strategy to Improve the Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Medicine." Front Cell Dev Biol 8: 737.
  - Danesin, C. and C. Soula (2017). "Moving the Shh Source over Time: What Impact on Neural Cell Diversification in the Developing Spinal Cord?" J Dev Biol 5(2).
  - Darabi, S., T. Tiraihi, A. Ruintan, H. A. Abbaszadeh, A. Delshad and T. Taheri (2013). "Polarized neural stem cells derived from adult bone marrow stromal cells develop a rosette-like structure." In Vitro Cell Dev Biol Anim 49(8): 638-652.
  - Davis, H. E., J. R. Morgan and M. L. Yarmush (2002). "Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes." Biophys Chem 97(2-3): 159-172.
  - De Becker, A. and I. V. Riet (2016). "Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy?" World J Stem Cells 8(3): 73-87.
  - De Francesco, F., V. Tirino, V. Desiderio, G. Ferraro, F. D'Andrea, M. Giuliano, G. Libondi, G. Pirozzi, A. De Rosa and G. Papaccio (2009). "Human CD34/CD90 ASCs are capable of growing as sphere clusters, producing high levels of VEGF and forming capillaries." PLoS One 4(8): e6537.
  - Debnath, T. and L. K. Chelluri (2019). "Standardization and quality assessment for clinical grade mesenchymal stem cells from human adipose tissue." Hematol Transfus Cell Ther 41(1): 7-16.
  - Delcuve, G. P., D. H. Khan and J. R. Davie (2012). "Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors." Clin Epigenetics 4(1): 5.
  - Deng, J., B. E. Petersen, D. A. Steindler, M. L. Jorgensen and E. D. Laywell (2006). "Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation." Stem Cells 24(4): 1054-1064.
  - Di Bonito, M., Y. Narita, B. Avallone, L. Sequino, M. Mancuso, G. Andolfi, A. M. Franze, L. Puellas, F. M. Rijli and M. Studer (2013). "Assembly of the auditory circuitry by a Hox genetic network in the mouse brainstem." PLoS Genet 9(2): e1003249.
  - Diez-Villasenor, C., N. M. Guzman, C. Almendros, J. Garcia-Martinez and F. J. Mojica (2013). "CRISPR-spacer integration reporter plasmids reveal distinct genuine acquisition specificities among CRISPR-Cas I-E variants of Escherichia coli." RNA Biol 10(5): 792-802.
  - Ding, J., Y. Cheng, S. Gao and J. Chen (2011). "Effects of nerve growth factor and Noggin-modified bone marrow stromal cells on stroke in rats." J Neurosci Res 89(2): 222-230.
  - Divya, M. S., G. E. Roshin, T. S. Divya, V. A. Rasheed, T. R. Santhoshkumar, K. E. Elizabeth, J. James and R. M. Pillai (2012). "Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells consist of a unique population of progenitors co-expressing mesenchymal stem cell and neuronal markers capable of instantaneous neuronal differentiation." Stem Cell Res Ther 3(6): 57.
  - Dizaji Asl, K., H. Shafaei, J. Soleimani Rad and H. O. Nozad (2017). "Comparison of Characteristics of Human Amniotic Membrane and Human Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells." World J Plast Surg 6(1): 33-39.
  - Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop and E. Horwitz (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy 8(4): 315-317.
  - Dong, X., R. Pan, H. Zhang, C. Yang, J. Shao and L. Xiang (2013). "Modification of histone acetylation facilitates hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells." PLoS One 8(5): e63405.

- Dorsa, K. K., M. V. Santos and M. R. Silva (2010). "Enhancing T3 and cAMP responsive gene participation in the thermogenic regulation of fuel oxidation pathways." Arq Bras Endocrinol Metabol 54(4): 381-389.
- Duan, P., Y. Zhang, X. Han, J. Liu, W. Yan and Y. Xing (2012). "Effect of neuronal induction on NSE, Tau, and Oct4 promoter methylation in bone marrow mesenchymal stem cells." In Vitro Cell Dev Biol Anim 48(4): 251-258.
- Dulamea, A. (2015). "Mesenchymal stem cells in multiple sclerosis - translation to clinical trials." J Med Life 8(1): 24-27.
- Dunn, J., R. Simmons, S. Thabet and H. Jo (2015). "The role of epigenetics in the endothelial cell shear stress response and atherosclerosis." Int J Biochem Cell Biol 67: 167-176.
- Duscher, D., A. Luan, R. C. Rennert, D. Atashroo, Z. N. Maan, E. A. Brett, A. J. Whittam, N. Ho, M. Lin, M. S. Hu, G. G. Walmsley, R. Wenny, M. Schmidt, A. F. Schilling, H. G. Machens, G. M. Huemer, D. C. Wan, M. T. Longaker and G. C. Gurtner (2016). "Suction assisted liposuction does not impair the regenerative potential of adipose derived stem cells." J Transl Med 14(1): 126.
- Enzmann, G. U., R. L. Benton, J. F. Talbott, Q. Cao and S. R. Whittemore (2006). "Functional considerations of stem cell transplantation therapy for spinal cord repair." J Neurotrauma 23(3-4): 479-495.
- Erba, P., G. Terenghi and P. J. Kingham (2010). "Neural differentiation and therapeutic potential of adipose tissue derived stem cells." Curr Stem Cell Res Ther 5(2): 153-160.
- Erickson, G. R., J. M. Gimble, D. M. Franklin, H. E. Rice, H. Awad and F. Guilak (2002). "Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo." Biochem Biophys Res Commun 290(2): 763-769.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, A. M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson and F. H. Gage (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." Nat Med 4(11): 1313-1317.
- Eterno, V., A. Zambelli, L. Pavesi, L. Villani, V. Zanini, G. Petrolo, S. Manera, A. Tuscano and A. Amato (2014). "Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells (ASCs) may favour breast cancer recurrence via HGF/c-Met signaling." Oncotarget 5(3): 613-633.
- Eto, H., H. Suga, D. Matsumoto, K. Inoue, N. Aoi, H. Kato, J. Araki and K. Yoshimura (2009). "Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue." Plast Reconstr Surg 124(4): 1087-1097.
- Fan, J. R., H. T. Lee, W. Lee, C. H. Lin, C. Y. Hsu, C. H. Hsieh and W. C. Shyu (2018). "Potential role of CBX7 in regulating pluripotency of adult human pluripotent-like olfactory stem cells in stroke model." Cell Death Dis 9(5): 502.
- Fan, X. L., Y. Zhang, X. Li and Q. L. Fu (2020). "Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy." Cell Mol Life Sci 77(14): 2771-2794.
- Fang, H., C. Liu, M. Yang, H. Li, F. Zhang, W. Zhang and J. Zhang (2017). "Neurotrophic factor and Trk signaling mechanisms underlying the promotion of motor recovery after acute spinal cord injury in rats." Exp Ther Med 14(1): 652-656.
- Faulk, C. and D. C. Dolinoy (2011). "Timing is everything: the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals." Epigenetics 6(7): 791-797.
- Fedele, M., L. Cerchia, S. Pegoraro, R. Sgarra and G. Manfioletti (2019). "Proneural-Mesenchymal Transition: Phenotypic Plasticity to Acquire Multitherapy Resistance in Glioblastoma." Int J Mol Sci 20(11).
- Fehlings, M. G. and R. Vawda (2011). "Cellular treatments for spinal cord injury: the time is right for clinical trials." Neurotherapeutics 8(4): 704-720.
- Fernandes, M., S. G. Valente, R. G. Sabongi, J. B. Gomes Dos Santos, V. M. Leite, H. Ulrich, A. A. Nery and M. J. da Silva Fernandes (2018). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration." Neural Regen Res 13(1): 100-104.

- Fernandez-Francos, S., N. Eiro, L. A. Costa, S. Escudero-Cernuda, M. L. Fernandez-Sanchez and F. J. Vizoso (2021). "Mesenchymal Stem Cells as a Cornerstone in a Galaxy of Intercellular Signals: Basis for a New Era of Medicine." Int J Mol Sci 22(7).
- Ferro, F., R. Spelat, G. Falini, A. Gallelli, F. D'Aurizio, E. Puppato, M. Pandolfi, A. P. Beltrami, D. Cesselli, C. A. Beltrami, F. S. Ambesi-Impiombato and F. Curcio (2011). "Adipose tissue-derived stem cell in vitro differentiation in a three-dimensional dental bud structure." Am J Pathol 178(5): 2299-2310.
- Fesharaki, M., S. Razavi, L. Ghasemi-Mobarakeh, M. Behjati, R. Yarahmadian, M. Kazemi and H. Hejazi (2018). "Differentiation of Human Scalp Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells into Mature Neural Cells on Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Nerve Tissue Engineering Applications." Cell J 20(2): 168-176.
- Fila-Danilow, A., P. Borkowska, M. Paul-Samojedny, M. Kowalczyk and J. Kowalski (2017). "The influence of TSA and VPA on the in vitro differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into neuronal lineage cells: Gene expression studies." Postepy Hig Med Dosw (Online) 71(0): 236-242.
- Fillion, M. L., J. El Andalousi, F. Tokhmafshan, V. Murugapoopathy, C. L. Watt, I. J. Murawski, J. P. Capolicchio, M. El-Sherbiny, R. Jednak and I. R. Gupta (2017). "Heterozygous loss-of-function mutation in Odd-skipped related 1 (Osr1) is associated with vesicoureteric reflux, duplex systems, and hydronephrosis." Am J Physiol Renal Physiol 313(5): F1106-F1115.
- Fitzsimmons, R. E. B., M. S. Mazurek, A. Soos and C. A. Simmons (2018). "Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Regenerative Medicine and Tissue Engineering." Stem Cells Int 2018: 8031718.
- Fleming, J. C., M. D. Norenberg, D. A. Ramsay, G. A. Dekaban, A. E. Marcillo, A. D. Saenz, M. Pasquale-Styles, W. D. Dietrich and L. C. Weaver (2006). "The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury." Brain 129(Pt 12): 3249-3269.
- Florek, M., M. Haase, A. M. Marzesco, D. Freund, G. Ehninger, W. B. Huttner and D. Corbeil (2005). "Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer." Cell Tissue Res 319(1): 15-26.
- Franco Lambert, A. P., A. Fraga Zandonai, D. Bonatto, D. Cantarelli Machado and J. A. Pegas Henriques (2009). "Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: does it work?" Differentiation 77(3): 221-228.
- Fraser, J. K., I. Wulur, Z. Alfonso and M. H. Hedrick (2006). "Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology." Trends Biotechnol 24(4): 150-154.
- Freitag, J., D. Li, J. Wickham, K. Shah and A. Tenen (2017). "Effect of autologous adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of a post-traumatic chondral defect of the knee." BMJ Case Rep 2017.
- Frese, L., P. E. Dijkman and S. P. Hoerstrup (2016). "Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine." Transfus Med Hemother 43(4): 268-274.
- Friedenstein, A. J., K. V. Petrakova, A. I. Kurolesova and G. P. Frolova (1968). "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues." Transplantation 6(2): 230-247.
- Fu, W., C. Lv, W. Zhuang, D. Chen, E. Lv, F. Li and X. Wang (2013). "An effective inducer of dopaminergic neuron-like differentiation." Neural Regen Res 8(5): 427-434.
- Fuchs, E. and H. M. Blau (2020). "Tissue Stem Cells: Architects of Their Niches." Cell Stem Cell 27(4): 532-556.
- Gaggi, G., A. Di Credico, P. Izzicupo, F. Alviano, M. Di Mauro, A. Di Baldassarre and B. Ghinassi (2020). "Human Mesenchymal Stromal Cells Unveil an Unexpected Differentiation Potential toward the Dopaminergic Neuronal Lineage." Int J Mol Sci 21(18).
- Galindo, L. T., T. R. Filippo, P. Semedo, C. B. Ariza, C. M. Moreira, N. O. Camara and M. A. Porcionatto (2011). "Mesenchymal stem cell therapy modulates the inflammatory response in experimental traumatic brain injury." Neurol Res Int 2011: 564089.

- Gao, Q., Y. Li and M. Chopp (2005). "Bone marrow stromal cells increase astrocyte survival via upregulation of phosphoinositide 3-kinase/threonine protein kinase and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathways and stimulate astrocyte trophic factor gene expression after anaerobic insult." Neuroscience 136(1): 123-134.
- Gao, S., P. Zhao, C. Lin, Y. Sun, Y. Wang, Z. Zhou, D. Yang, X. Wang, H. Xu, F. Zhou, L. Cao, W. Zhou, K. Ning, X. Chen and J. Xu (2014). "Differentiation of human adipose-derived stem cells into neuron-like cells which are compatible with photocurable three-dimensional scaffolds." Tissue Eng Part A 20(7-8): 1271-1284.
- Gao, Y., C. Bai, K. Wang, B. Sun, W. Guan and D. Zheng (2014). "All-trans retinoic acid promotes nerve cell differentiation of yolk sac-derived mesenchymal stem cells." Appl Biochem Biotechnol 174(2): 682-692.
- Garcez, R. C., B. L. Teixeira, S. Schmitt Sdos, M. Alvarez-Silva and A. G. Trentin (2009). "Epidermal growth factor (EGF) promotes the in vitro differentiation of neural crest cells to neurons and melanocytes." Cell Mol Neurobiol 29(8): 1087-1091.
- Garg, N., T. Vijayakumar, D. Bakhshinyan, C. Venugopal and S. K. Singh (2015). "MicroRNA Regulation of Brain Tumour Initiating Cells in Central Nervous System Tumours." Stem Cells Int 2015: 141793.
- Gasiunas, G., R. Barrangou, P. Horvath and V. Siksnys (2012). "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A 109(39): E2579-2586.
- Gasiuniene, M., A. Zentelyte, G. Treigyte, S. Baronaite, J. Savickiene, A. Utkus and R. Navakauskiene (2019). "Epigenetic alterations in amniotic fluid mesenchymal stem cells derived from normal and fetus-affected gestations: A focus on myogenic and neural differentiations." Cell Biol Int 43(3): 299-312.
- Gennai, S., A. Monsel, Q. Hao, J. Liu, V. Gudapati, E. L. Barbier and J. W. Lee (2015). "Cell-based therapy for traumatic brain injury." Br J Anaesth 115(2): 203-212.
- Ghavifekr Fakhr, M., M. Farshdousti Hagh, D. Shanebandi and B. Baradaran (2013). "DNA methylation pattern as important epigenetic criterion in cancer." Genet Res Int 2013: 317569.
- Giger, R. J., E. R. Hollis, 2nd and M. H. Tuszynski (2010). "Guidance molecules in axon regeneration." Cold Spring Harb Perspect Biol 2(7): a001867.
- Gjaltama, R. A. F. and E. G. Schulz (2018). "CRISPR/dCas9 Switch Systems for Temporal Transcriptional Control." Methods Mol Biol 1767: 167-185.
- Goncalves, M. B., Y. Wu, E. Clarke, J. Grist, C. Hobbs, D. Trigo, J. Jack and J. P. T. Corcoran (2019). "Regulation of Myelination by Exosome Associated Retinoic Acid Release from NG2-Positive Cells." J Neurosci 39(16): 3013-3027.
- Gong, L., L. Cao, Z. Shen, L. Shao, S. Gao, C. Zhang, J. Lu and W. Li (2018). "Materials for Neural Differentiation, Trans-Differentiation, and Modeling of Neurological Disease." Adv Mater 30(17): e1705684.
- Gould, E. (2007). "How widespread is adult neurogenesis in mammals?" Nat Rev Neurosci 8(6): 481-488.
- Grafe, I., S. Alexander, J. R. Peterson, T. N. Snider, B. Levi, B. Lee and Y. Mishina (2018). "TGF-beta Family Signaling in Mesenchymal Differentiation." Cold Spring Harb Perspect Biol 10(5).
- Gu, W., F. Zhang, Q. Xue, Z. Ma, P. Lu and B. Yu (2010). "Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells reduces lesion volume and induces axonal regrowth of injured spinal cord." Neuropathology 30(3): 205-217.
- Gudas, L. J. and J. A. Wagner (2011). "Retinoids regulate stem cell differentiation." J Cell Physiol 226(2): 322-330.
- Gurgul, A., J. Opiela, K. Pawlina, T. Szmatoła, M. Bochenek and M. Bugno-Poniewierska (2017). "The effect of histone deacetylase inhibitor trichostatin A on porcine mesenchymal stem cell transcriptome." Biochimie 139: 56-73.

- Hajivalili, M., F. Pourgholi, H. S. Kafil, F. Jadidi-Niaragh and M. Yousefi (2016). "Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis." Curr Stem Cell Res Ther 11(1): 41-50.
- Hakki, S. S., G. Turac, S. B. Bozkurt, S. A. Kayis, E. E. Hakki, E. Sahin, C. Subasi and E. Karaoz (2017). "Comparison of Different Sources of Mesenchymal Stem Cells: Palatal versus Lipoaspirated Adipose Tissue." Cells Tissues Organs 204(5-6): 228-240.
- Halder, D., G. H. Kim and I. Shin (2015). "Synthetic small molecules that induce neuronal differentiation in neuroblastoma and fibroblast cells." Mol Biosyst 11(10): 2727-2737.
- Han, Y., X. Li, Y. Zhang, F. Chang and J. Ding (2019). "Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine." Cells 8(8).
- Hans, F. and S. Dimitrov (2001). "Histone H3 phosphorylation and cell division." Oncogene 20(24): 3021-3027.
- Hashmi, F., M. Liu, S. Shen and L. Y. Qiao (2016). "EXPRESS: Phospholipase C gamma mediates endogenous brain-derived neurotrophic factor - regulated calcitonin gene-related peptide expression in colitis - induced visceral pain." Mol Pain 12.
- Haurwitz, R. E., S. H. Sternberg and J. A. Doudna (2012). "Csy4 relies on an unusual catalytic dyad to position and cleave CRISPR RNA." EMBO J 31(12): 2824-2832.
- Heng, B. C., P. Saxena and M. Fussenegger (2014). "Heterogeneity of baseline neural marker expression by undifferentiated mesenchymal stem cells may be correlated to donor age." J Biotechnol 174: 29-33.
- Herdy, J., S. Schafer, Y. Kim, Z. Ansari, D. Zangwill, M. Ku, A. Paquola, H. Lee, J. Mertens and F. H. Gage (2019). "Chemical modulation of transcriptionally enriched signaling pathways to optimize the conversion of fibroblasts into neurons." Elife 8.
- Herlofsen, S. R., J. C. Bryne, T. Hoiby, L. Wang, R. Issner, X. Zhang, M. J. Coyne, P. Boyle, H. Gu, L. A. Meza-Zepeda, P. Collas, T. S. Mikkelsen and J. E. Brinchmann (2013). "Genome-wide map of quantified epigenetic changes during in vitro chondrogenic differentiation of primary human mesenchymal stem cells." BMC Genomics 14: 105.
- Hess, D. C., L. R. Wechsler, W. M. Clark, S. I. Savitz, G. A. Ford, D. Chiu, D. R. Yavagal, K. Uchino, D. S. Liebeskind, A. P. Auchus, S. Sen, C. A. Sila, J. D. Vest and R. W. Mays (2017). "Safety and efficacy of multipotent adult progenitor cells in acute ischaemic stroke (MASTERS): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial." Lancet Neurol 16(5): 360-368.
- Ho, Y. K., J. Y. Woo, G. X. E. Tu, L. W. Deng and H. P. Too (2020). "A highly efficient non-viral process for programming mesenchymal stem cells for gene directed enzyme prodrug cancer therapy." Sci Rep 10(1): 14257.
- Hokkanen, S. R. K., S. Hunter, T. M. Polvikoski, H. A. D. Keage, T. Minett, F. E. Matthews, C. Brayne, C. Mrc and C. C. S. Group (2018). "Hippocampal sclerosis, hippocampal neuron loss patterns and TDP-43 in the aged population." Brain Pathol 28(4): 548-559.
- Honda, S., M. Kagoshima, A. Wanaka, M. Tohyama, K. Matsumoto and T. Nakamura (1995). "Localization and functional coupling of HGF and c-Met/HGF receptor in rat brain: implication as neurotrophic factor." Brain Res Mol Brain Res 32(2): 197-210.
- Hong, S. Q., H. T. Zhang, J. You, M. Y. Zhang, Y. Q. Cai, X. D. Jiang and R. X. Xu (2011). "Comparison of transdifferentiated and undifferentiated human umbilical mesenchymal stem cells in rats after traumatic brain injury." Neurochem Res 36(12): 2391-2400.
- Hopf, A., D. J. Schaefer, D. F. Kalbermatten, R. Guzman and S. Madduri (2020). "Schwann Cell-Like Cells: Origin and Usability for Repair and Regeneration of the Peripheral and Central Nervous System." Cells 9(9).
- Hu, F., X. Wang, G. Liang, L. Lv, Y. Zhu, B. Sun and Z. Xiao (2013). "Effects of epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and osteogenic and neural differentiation of adipose-derived stem cells." Cell Reprogram 15(3): 224-232.
- Hu, W., F. X. Guan, Y. Li, Y. J. Tang, F. Yang and B. Yang (2013). "New methods for inducing the differentiation of amniotic-derived mesenchymal stem cells into motor neuron precursor cells." Tissue Cell 45(5): 295-305.

- Hu, Y., Y. Zhang, K. Tian, C. Xun, S. Wang and D. Lv (2016). "Effects of nerve growth factor and basic fibroblast growth factor dual gene modification on rat bone marrow mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like cells in vitro." Mol Med Rep 13(1): 49-58.
- Huaman, O., J. Bahamonde, B. Cahuascanco, M. Jervis, J. Palomino, C. G. Torres and O. A. Peralta (2019). "Immunomodulatory and immunogenic properties of mesenchymal stem cells derived from bovine fetal bone marrow and adipose tissue." Res Vet Sci 124: 212-222.
- Huang, H., W. Young, S. Skaper, L. Chen, G. Moviglia, H. Saberi, Z. Al-Zoubi, H. S. Sharma, D. Muresanu, A. Sharma, W. El Masry, S. Feng, N. International Association of and N. The Chinese Association of (2020). "Clinical Neurorestorative Therapeutic Guidelines for Spinal Cord Injury (IANR/CANR version 2019)." J Orthop Translat 20: 14-24.
- Huang, W. C., W. C. Kuo, S. H. Hsu, C. H. Cheng, J. C. Liu and H. Cheng (2010). "Gait analysis of spinal cord injured rats after delivery of chondroitinase ABC and adult olfactory mucosa progenitor cell transplantation." Neurosci Lett 472(2): 79-84.
- Hutchings, G., K. Janowicz, L. Moncrieff, C. Dompe, E. Strauss, I. Kocherova, M. J. Nawrocki, L. Kruszyna, G. Wasiatycz, P. Antosik, J. A. Shibli, P. Mozdziak, B. Perek, Z. Krasinski, B. Kempisty and M. Nowicki (2020). "The Proliferation and Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells in Neovascularization and Angiogenesis." Int J Mol Sci 21(11).
- Li, M., H. Nishimura, H. Sekiguchi, N. Kamei, A. Yokoyama, M. Horii and T. Asahara (2009). "Concurrent vasculogenesis and neurogenesis from adult neural stem cells." Circ Res 105(9): 860-868.
- Iohara, K., L. Zheng, H. Wake, M. Ito, J. Nabekura, H. Wakita, H. Nakamura, T. Into, K. Matsushita and M. Nakashima (2008). "A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp." Stem Cells 26(9): 2408-2418.
- Ishino, Y., H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura and A. Nakata (1987). "Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product." J Bacteriol 169(12): 5429-5433.
- Ivanova-Todorova, E., I. Bochev, M. Mourdjeva, R. Dimitrov, D. Bukarev, S. Kyurkchiev, P. Tivchev, I. Altunkova and D. S. Kyurkchiev (2009). "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells." Immunol Lett 126(1-2): 37-42.
- Jack, G. S., R. Zhang, M. Lee, Y. Xu, B. M. Wu and L. V. Rodriguez (2009). "Urinary bladder smooth muscle engineered from adipose stem cells and a three dimensional synthetic composite." Biomaterials 30(19): 3259-3270.
- Jaenisch, R. and A. Bird (2003). "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals." Nat Genet 33 Suppl: 245-254.
- Jahan, S., D. Kumar, A. Kumar, C. S. Rajpurohit, S. Singh, A. Srivastava, A. Pandey and A. B. Pant (2017). "Neurotrophic factor mediated neuronal differentiation of human cord blood mesenchymal stem cells and their applicability to assess the developmental neurotoxicity." Biochem Biophys Res Commun 482(4): 961-967.
- Jang, S., H. H. Cho, Y. B. Cho, J. S. Park and H. S. Jeong (2010). "Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin." BMC Cell Biol 11: 25.
- Jansen, R., J. D. Embden, W. Gastra and L. M. Schouls (2002). "Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes." Mol Microbiol 43(6): 1565-1575.
- Jeon, B. G., B. M. Kumar, E. J. Kang, S. A. Ock, S. L. Lee, D. O. Kwack, J. H. Byun, B. W. Park and G. J. Rho (2011). "Characterization and comparison of telomere length, telomerase and reverse transcriptase activity and gene expression in human mesenchymal stem cells and cancer cells of various origins." Cell Tissue Res 345(1): 149-161.
- Ji, Y., H. Hao, K. Reynolds, M. McMahan and C. J. Zhou (2019). "Wnt Signaling in Neural Crest Ontogenesis and Oncogenesis." Cells 8(10).

- Jiang, Y., D. C. Berry, A. Jo, W. Tang, R. W. Arpke, M. Kyba and J. M. Graff (2017). "A PPARGamma transcriptional cascade directs adipose progenitor cell-niche interaction and niche expansion." Nat Commun 8: 15926.
- Jiao, J. and D. F. Chen (2008). "Induction of neurogenesis in nonconventional neurogenic regions of the adult central nervous system by niche astrocyte-produced signals." Stem Cells 26(5): 1221-1230.
- Jin, K., Y. Zhu, Y. Sun, X. O. Mao, L. Xie and D. A. Greenberg (2002). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 99(18): 11946-11950.
- Josipovic, G., V. Tadic, M. Klasic, V. Zanki, I. Beceheli, F. Chung, A. Ghantous, T. Keser, J. Madunic, M. Boskovic, G. Lauc, Z. Herceg, A. Vojta and V. Zoldos (2019). "Antagonistic and synergistic epigenetic modulation using orthologous CRISPR/dCas9-based modular system." Nucleic Acids Res 47(18): 9637-9657.
- Jurecic, R. (2019). "Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity." Adv Exp Med Biol 1169: 195-211.
- Jurkowski, M. P., L. Bettio, K. W. E. A. Patten, S. Y. Yau and J. Gil-Mohapel (2020). "Beyond the Hippocampus and the SVZ: Adult Neurogenesis Throughout the Brain." Front Cell Neurosci 14: 576444.
- Kajiyama, H., T. S. Hamazaki, M. Tokuhara, S. Masui, K. Okabayashi, K. Ohnuma, S. Yabe, K. Yasuda, S. Ishiura, H. Okochi and M. Asashima (2010). "Pdx1-transfected adipose tissue-derived stem cells differentiate into insulin-producing cells in vivo and reduce hyperglycemia in diabetic mice." Int J Dev Biol 54(4): 699-705.
- Kalladka, D. and K. W. Muir (2014). "Brain repair: cell therapy in stroke." Stem Cells Cloning 7: 31-44.
- Kaltz, N., A. Funari, S. Hippauf, B. Delorme, D. Noel, M. Riminucci, V. R. Jacobs, T. Haupl, C. Jorgensen, P. Charbord, C. Peschel, P. Bianco and R. A. Oostendorp (2008). "In vivo osteoprogenitor potency of human stromal cells from different tissues does not correlate with expression of POU5F1 or its pseudogenes." Stem Cells 26(9): 2419-2424.
- Kang, Y., C. Park, D. Kim, C. M. Seong, K. Kwon and C. Choi (2010). "Unsorted human adipose tissue-derived stem cells promote angiogenesis and myogenesis in murine ischemic hindlimb model." Microvasc Res 80(3): 310-316.
- Kangari, P., T. Talaie-Khozani, I. Razeghian-Jahromi and M. Razmkhah (2020). "Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects." Stem Cell Res Ther 11(1): 492.
- Kansy, B. A., P. A. Dissmann, H. Hemeda, K. Bruderek, A. M. Westerkamp, V. Jagalski, P. Schuler, K. Kansy, S. Lang, C. A. Dumitru and S. Brandau (2014). "The bidirectional tumor--mesenchymal stromal cell interaction promotes the progression of head and neck cancer." Stem Cell Res Ther 5(4): 95.
- Kao, H. T., H. J. Song, B. Porton, G. L. Ming, J. Hoh, M. Abraham, A. J. Czernik, V. A. Pieribone, M. M. Poo and P. Greengard (2002). "A protein kinase A-dependent molecular switch in synapsins regulates neurite outgrowth." Nat Neurosci 5(5): 431-437.
- Karakas, N., S. Bay, N. Turkel, N. Oztunc, M. Oncul, H. Bilgen, K. Shah, F. Sahin and G. Ozturk (2020). "Neurons from human mesenchymal stem cells display both spontaneous and stimuli responsive activity." PLoS One 15(5): e0228510.
- Karamouzian, S., S. N. Nematollahi-Mahani, N. Nakhaee and H. Eskandary (2012). "Clinical safety and primary efficacy of bone marrow mesenchymal cell transplantation in subacute spinal cord injured patients." Clin Neurol Neurosurg 114(7): 935-939.
- Karginov, F. V. and G. J. Hannon (2010). "The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea." Mol Cell 37(1): 7-19.
- Karimi-Abdolrezaee, S., E. Eftekharpour, J. Wang, D. Schut and M. G. Fehlings (2010). "Synergistic effects of transplanted adult neural stem/progenitor cells, chondroitinase, and growth factors promote functional repair and plasticity of the chronically injured spinal cord." J Neurosci 30(5): 1657-1676.

- Karussis, D., C. Karageorgiou, A. Vaknin-Dembinsky, B. Gowda-Kurkalli, J. M. Gomori, I. Kassis, J. W. Bulte, P. Petrou, T. Ben-Hur, O. Abramsky and S. Slavin (2010). "Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis." Arch Neurol 67(10): 1187-1194.
- Kashyap, M. P., C. Roberts, M. Waseem and P. Tyagi (2018). "Drug Targets in Neurotrophin Signaling in the Central and Peripheral Nervous System." Mol Neurobiol 55(8): 6939-6955.
- Kato, T., H. Funakoshi, K. Kadoyama, S. Noma, M. Kanai, W. Ohya-Shimada, S. Mizuno, N. Doe, T. Taniguchi and T. Nakamura (2012). "Hepatocyte growth factor overexpression in the nervous system enhances learning and memory performance in mice." J Neurosci Res 90(9): 1743-1755.
- Kaundal, U., U. Bagai and A. Rakha (2018). "Immunomodulatory plasticity of mesenchymal stem cells: a potential key to successful solid organ transplantation." J Transl Med 16(1): 31.
- Kawaguchi, A., H. Asano, K. Matsushima, T. Wada, S. Yoshida and S. Ichida (2007). "Enhancement of sodium current in NG108-15 cells during neural differentiation is mainly due to an increase in NaV1.7 expression." Neurochem Res 32(9): 1469-1475.
- Kawamoto, K., M. Konno, H. Nagano, S. Nishikawa, Y. Tomimaru, H. Akita, N. Hama, H. Wada, S. Kobayashi, H. Eguchi, M. Tanemura, T. Ito, Y. Doki, M. Mori and H. Ishii (2013). "CD90- (Thy-1-) high selection enhances reprogramming capacity of murine adipose-derived mesenchymal stem cells." Dis Markers 35(5): 573-579.
- Kern, S., H. Eichler, J. Stoeve, H. Kluter and K. Bieback (2006). "Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue." Stem Cells 24(5): 1294-1301.
- Kim, C., C. Y. Cheng, S. A. Saldanha and S. S. Taylor (2007). "PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation." Cell 130(6): 1032-1043.
- Kim, H. J., S. W. Seo, J. W. Chang, J. I. Lee, C. H. Kim, J. Chin, S. J. Choi, H. Kwon, H. J. Yun, J. M. Lee, S. T. Kim, Y. S. Choe, K. H. Lee and D. L. Na (2015). "Stereotactic brain injection of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in patients with Alzheimer's disease dementia: A phase 1 clinical trial." Alzheimers Dement (N Y) 1(2): 95-102.
- Kim, H. T., S. G. Jeong and G. W. Cho (2016). "G9a inhibition promotes neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells through the transcriptional induction of RE-1 containing neuronal specific genes." Neurochem Int 96: 77-83.
- Kim, M., Y. K. Bae, S. Um, J. H. Kwon, G. H. Kim, S. J. Choi, W. Oh and H. J. Jin (2020). "A Small-Sized Population of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Shows High Stemness Properties and Therapeutic Benefit." Stem Cells Int 2020: 5924983.
- Kim, W. S., B. S. Park, H. K. Kim, J. S. Park, K. J. Kim, J. S. Choi, S. J. Chung, D. D. Kim and J. H. Sung (2008). "Evidence supporting antioxidant action of adipose-derived stem cells: protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress." J Dermatol Sci 49(2): 133-142.
- Kim, W. S., B. S. Park and J. H. Sung (2009). "The wound-healing and antioxidant effects of adipose-derived stem cells." Expert Opin Biol Ther 9(7): 879-887.
- Kim, Y., Y. Zhang, K. Pang, H. Kang, H. Park, Y. Lee, B. Lee, H. J. Lee, W. K. Kim, D. Geum and K. Han (2016). "Bipolar Disorder Associated microRNA, miR-1908-5p, Regulates the Expression of Genes Functioning in Neuronal Glutamatergic Synapses." Exp Neurobiol 25(6): 296-306.
- Kiraly, M., B. Porcsalmy, A. Pataki, K. Kadar, M. Jelitai, B. Molnar, P. Hermann, I. Gera, W. D. Grimm, B. Ganss, A. Zsembery and G. Varga (2009). "Simultaneous PKC and cAMP activation induces differentiation of human dental pulp stem cells into functionally active neurons." Neurochem Int 55(5): 323-332.
- Knoth, R., I. Singec, M. Ditter, G. Pantazis, P. Capetian, R. P. Meyer, V. Horvat, B. Volk and G. Kempermann (2010). "Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years." PLoS One 5(1): e8809.

- Kocan, B., A. Maziarz, J. Tabarkiewicz, T. Ochiya and A. Banas-Zabczyk (2017). "Trophic Activity and Phenotype of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Background of Their Regenerative Potential." Stem Cells Int 2017: 1653254.
- Kokai, L. E., J. P. Rubin and K. G. Marra (2005). "The potential of adipose-derived adult stem cells as a source of neuronal progenitor cells." Plast Reconstr Surg 116(5): 1453-1460.
- Kornack, D. R. and P. Rakic (2001). "The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain." Proc Natl Acad Sci U S A 98(8): 4752-4757.
- Kornblum, H. I., H. K. Raymon, R. S. Morrison, K. P. Cavanaugh, R. A. Bradshaw and F. M. Leslie (1990). "Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor: effects on an overlapping population of neocortical neurons in vitro." Brain Res 535(2): 255-263.
- Kozłowska, U., A. Krawczenko, K. Futoma, T. Jurek, M. Rorat, D. Patrzalek and A. Klimczak (2019). "Similarities and differences between mesenchymal stem/progenitor cells derived from various human tissues." World J Stem Cells 11(6): 347-374.
- Krampera, M., S. Marconi, A. Pasini, M. Galie, G. Rigotti, F. Mosna, M. Tinelli, L. Lovato, E. Anghileri, A. Andreini, G. Pizzolo, A. Sbarbati and B. Bonetti (2007). "Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus." Bone 40(2): 382-390.
- Kubinova, S., D. Horak, A. Hejcl, Z. Plichta, J. Kotek, V. Proks, S. Forostyak and E. Sykova (2015). "SIKVAV-modified highly superporous PHEMA scaffolds with oriented pores for spinal cord injury repair." J Tissue Eng Regen Med 9(11): 1298-1309.
- Kubinova, S. and E. Sykova (2012). "Biomaterials combined with cell therapy for treatment of spinal cord injury." Regen Med 7(2): 207-224.
- Kwon, B. K., L. J. Soril, M. Bacon, M. S. Beattie, A. Blesch, J. C. Bresnahan, M. B. Bunge, S. A. Dunlop, M. G. Fehlings, A. R. Ferguson, C. E. Hill, S. Karimi-Abdolrezaee, P. Lu, J. W. McDonald, H. W. Muller, M. Oudega, E. S. Rosenzweig, P. J. Reier, J. Silver, E. Sykova, X. M. Xu, J. D. Guest and W. Tetzlaff (2013). "Demonstrating efficacy in preclinical studies of cellular therapies for spinal cord injury - how much is enough?" Exp Neurol 248: 30-44.
- Kwon, S., K. H. Yoo, S. J. Sym and D. Khang (2019). "Mesenchymal stem cell therapy assisted by nanotechnology: a possible combinational treatment for brain tumor and central nerve regeneration." Int J Nanomedicine 14: 5925-5942.
- Kwon, S. J., J. H. Park, E. J. Park, S. A. Lee, H. S. Lee, S. W. Kang and J. Kwon (2015). "ATM-mediated phosphorylation of the chromatin remodeling enzyme BRG1 modulates DNA double-strand break repair." Oncogene 34(3): 303-313.
- Ladiwala, U., H. Basu and D. Mathur (2012). "Assembling neurospheres: dynamics of neural progenitor/stem cell aggregation probed using an optical trap." PLoS One 7(6): e38613.
- Lalu, M. M., L. McIntyre, C. Pugliese, D. Fergusson, B. W. Winston, J. C. Marshall, J. Granton and D. J. Stewart (2012). "Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials." PLoS One 7(10): e47559.
- Lambert, W. S., A. F. Clark and R. J. Wordinger (2004). "Neurotrophin and Trk expression by cells of the human lamina cribrosa following oxygen-glucose deprivation." BMC Neurosci 5: 51.
- Lanzetta, M., A. Gal, B. Wright and E. Owen (2003). "Effect of FK506 and basic fibroblast growth factor on nerve regeneration using a polytetrafluoroethylene chamber for nerve repair." Int Surg 88(1): 47-51.
- Laroni, A., N. K. de Rosbo and A. Uccelli (2015). "Mesenchymal stem cells for the treatment of neurological diseases: Immunoregulation beyond neuroprotection." Immunol Lett 168(2): 183-190.
- Laudani, S., V. La Cognata, R. Iemmolo, G. Bonaventura, G. Villaggio, S. Saccone, M. L. Barcellona, S. Cavallaro and F. Sinatra (2020). "Effect of a Bone Marrow-Derived Extracellular Matrix on Cell Adhesion and Neural Induction of Dental Pulp Stem Cells." Front Cell Dev Biol 8: 100.

- Le Blanc, K., I. Rasmusson, B. Sundberg, C. Gotherstrom, M. Hassan, M. Uzunel and O. Ringden (2004). "Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells." Lancet 363(9419): 1439-1441.
- Lee, J. H., H. K. Jung, Y. S. Han, Y. M. Yoon, C. W. Yun, H. Y. Sun, H. W. Cho and S. H. Lee (2016). "Antioxidant effects of Cirsium setidens extract on oxidative stress in human mesenchymal stem cells." Mol Med Rep 14(4): 3777-3784.
- Lee, P. H., J. W. Kim, O. Y. Bang, Y. H. Ahn, I. S. Joo and K. Huh (2008). "Autologous mesenchymal stem cell therapy delays the progression of neurological deficits in patients with multiple system atrophy." Clin Pharmacol Ther 83(5): 723-730.
- Lee, S. Y., J. H. George, D. A. Nagel, H. Ye, G. Kueberuwa and L. W. Seymour (2019). "Optogenetic control of iPS cell-derived neurons in 2D and 3D culture systems using channelrhodopsin-2 expression driven by the synapsin-1 and calcium-calmodulin kinase II promoters." J Tissue Eng Regen Med 13(3): 369-384.
- Leto Barone, A. A., S. Khalifian, W. P. Lee and G. Brandacher (2013). "Immunomodulatory effects of adipose-derived stem cells: fact or fiction?" Biomed Res Int 2013: 383685.
- Leto, K. and F. Rossi (2012). "Specification and differentiation of cerebellar GABAergic neurons." Cerebellum 11(2): 434-435.
- Leung, C. T., P. A. Coulombe and R. R. Reed (2007). "Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration." Nat Neurosci 10(6): 720-726.
- Li, G., T. Jin, H. Liang, Z. Zhang, S. He, Y. Tu, H. Yang, T. Geng, G. Cui, C. Chen and G. Gao (2013). "RTEL1 tagging SNPs and haplotypes were associated with glioma development." Diagn Pathol 8: 83.
- Li, H., H. Liu, C. E. Corrales, J. R. Risner, J. Forrester, J. R. Holt, S. Heller and A. S. Edge (2009). "Differentiation of neurons from neural precursors generated in floating spheres from embryonic stem cells." BMC Neurosci 10: 122.
- Li, J. F., H. L. Yin, A. Shuboy, H. F. Duan, J. Y. Lou, J. Li, H. W. Wang and Y. L. Wang (2013). "Differentiation of hUC-MSC into dopaminergic-like cells after transduction with hepatocyte growth factor." Mol Cell Biochem 381(1-2): 183-190.
- Li, N., Z. Liu, G. Wang and S. Wang (2015). "Downregulation of the sodium channel Nav1.6 by potential transcriptomic deregulation may explain sensory deficits in critical illness neuropathy." Life Sci 143: 231-236.
- Li, W., W. Wei, S. Zhu, J. Zhu, Y. Shi, T. Lin, E. Hao, A. Hayek, H. Deng and S. Ding (2009). "Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors." Cell Stem Cell 4(1): 16-19.
- Li, X., L. He, Q. Yue, J. Lu, N. Kang, X. Xu, H. Wang and H. Zhang (2017). "MiR-9-5p promotes MSC migration by activating beta-catenin signaling pathway." Am J Physiol Cell Physiol 313(1): C80-C93.
- Li, X., J. Yao, L. Wu, W. Jing, W. Tang, Y. Lin, W. Tian and L. Liu (2010). "Osteogenic induction of adipose-derived stromal cells: not a requirement for bone formation in vivo." Artif Organs 34(1): 46-54.
- Li, Y., Y. Kamei, M. Kambe, K. Ebisawa, M. Oishi and K. Takanari (2021). "Peripheral Nerve Regeneration Using Different Germ Layer-Derived Adult Stem Cells in the Past Decade." Behav Neurol 2021: 5586523.
- Li, Y., B. Xia, R. Li, D. Yin, Y. Wang and W. Liang (2017). "Expression of brain-derived neurotrophic factors, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 in the nucleus accumbens during heroin dependency and withdrawal." Neuroreport 28(11): 654-660.
- Li, Y. P., Q. Shi, X. Xing, D. K. Wang, Y. Zhuang and D. Li (2011). "[Influence of penicillin and streptomycin on gene expression of extracellular secretion from human umbilical cord tissue derived mesenchymal stem cells in vitro]." Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 19(1): 163-168.
- Liao, G. P., M. T. Harting, R. A. Hetz, P. A. Walker, S. K. Shah, C. J. Corkins, T. G. Hughes, F. Jimenez, S. C. Kosmach, M. C. Day, K. Tsao, D. A. Lee, L. L. Worth, J. E. Baumgartner and C. S. Cox, Jr. (2015). "Autologous bone marrow mononuclear cells reduce therapeutic

- intensity for severe traumatic brain injury in children." *Pediatr Crit Care Med* 16(3): 245-255.
- Liao, W. L. and F. C. Liu (2005). "RARbeta isoform-specific regulation of DARPP-32 gene expression: an ectopic expression study in the developing rat telencephalon." *Eur J Neurosci* 21(12): 3262-3268.
  - Liao, Y., M. B. Geyer, A. J. Yang and M. S. Cairo (2011). "Cord blood transplantation and stem cell regenerative potential." *Exp Hematol* 39(4): 393-412.
  - Liesveld, J. L., N. Sharma and O. S. Aljotawi (2020). "Stem cell homing: From physiology to therapeutics." *Stem Cells* 38(10): 1241-1253.
  - Lillestol, R. K., P. Redder, R. A. Garrett and K. Brugger (2006). "A putative viral defence mechanism in archaeal cells." *Archaea* 2(1): 59-72.
  - Lim, J. Y., C. H. Jeong, J. A. Jun, S. M. Kim, C. H. Ryu, Y. Hou, W. Oh, J. W. Chang and S. S. Jeun (2011). "Therapeutic effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells after intrathecal administration by lumbar puncture in a rat model of cerebral ischemia." *Stem Cell Res Ther* 2(5): 38.
  - Lindroos, B., R. Suuronen and S. Miettinen (2011). "The potential of adipose stem cells in regenerative medicine." *Stem Cell Rev* 7(2): 269-291.
  - Lippens, E., I. Swennen, J. Girones, H. Declercq, G. Vertenten, L. Vlamincx, F. Gasthuys, E. Schacht and R. Cornelissen (2013). "Cell survival and proliferation after encapsulation in a chemically modified Pluronic(R) F127 hydrogel." *J Biomater Appl* 27(7): 828-839.
  - Liqing, Y., G. Jia, C. Jiqing, G. Ran, C. Fei, K. Jie, W. Yanyun and Z. Cheng (2011). "Directed differentiation of motor neuron cell-like cells from human adipose-derived stem cells in vitro." *Neuroreport* 22(8): 370-373.
  - Liu, G., B. T. David, M. Trawczynski and R. G. Fessler (2020). "Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications." *Stem Cell Rev Rep* 16(1): 3-32.
  - Liu, Q., M. X. Chen, L. Sun, C. U. Wallis, J. S. Zhou, L. J. Ao, Q. Li and P. C. Sham (2019). "Rational use of mesenchymal stem cells in the treatment of autism spectrum disorders." *World J Stem Cells* 11(2): 55-72.
  - Liu, Q., G. Cheng, Z. Wang, S. Zhan, B. Xiong and X. Zhao (2015). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate into nerve-like cells in vitro after transfection with brain-derived neurotrophic factor gene." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 51(3): 319-327.
  - Liu, W. G., Z. Y. Wang and Z. S. Huang (2011). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells expressing the bFGF transgene promote axon regeneration and functional recovery after spinal cord injury in rats." *Neurol Res* 33(7): 686-693.
  - Liu, Y., X. C. Yi, G. Guo, Q. F. Long, X. A. Wang, J. Zhong, W. P. Liu, Z. Fei, D. M. Wang and J. Liu (2014). "Basic fibroblast growth factor increases the transplantation-mediated therapeutic effect of bone mesenchymal stem cells following traumatic brain injury." *Mol Med Rep* 9(1): 333-339.
  - Lizen, B., B. Hutlet, D. Bissen, D. Sauvegarde, M. Hermant, M. T. Ahn and F. Gofflot (2017). "HOXA5 localization in postnatal and adult mouse brain is suggestive of regulatory roles in postmitotic neurons." *J Comp Neurol* 525(5): 1155-1175.
  - Lo Furno, D., G. Mannino, R. Giuffrida, E. Gili, C. Vancheri, M. S. Tarico, R. E. Perrotta and R. Pellitteri (2018). "Neural differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells induced by glial cell conditioned media." *J Cell Physiol*.
  - Logan, S., T. Arzua, S. G. Canfield, E. R. Seminary, S. L. Sison, A. D. Ebert and X. Bai (2019). "Studying Human Neurological Disorders Using Induced Pluripotent Stem Cells: From 2D Monolayer to 3D Organoid and Blood Brain Barrier Models." *Compr Physiol* 9(2): 565-611.
  - Lu, D., Y. Li, L. Wang, J. Chen, A. Mahmood and M. Chopp (2001). "Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury." *J Neurotrauma* 18(8): 813-819.
  - Lu, J., L. Tan, P. Li, H. Gao, B. Fang, S. Ye, Z. Geng, P. Zheng and H. Song (2009). "All-trans retinoic acid promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells via multiple pathways." *BMC Cell Biol* 10: 57.

- Lu, M., S. Wang, X. Han and D. Lv (2013). "Butein inhibits NF-kappaB activation and reduces infiltration of inflammatory cells and apoptosis after spinal cord injury in rats." Neurosci Lett 542: 87-91.
- Lunyak, V. V. and M. G. Rosenfeld (2008). "Epigenetic regulation of stem cell fate." Hum Mol Genet 17(R1): R28-36.
- Luo, L., D. H. Hu, J. Q. Yin and R. X. Xu (2018). "Molecular Mechanisms of Transdifferentiation of Adipose-Derived Stem Cells into Neural Cells: Current Status and Perspectives." Stem Cells Int 2018: 5630802.
- Luz-Crawford, P., M. J. Torres, D. Noel, A. Fernandez, K. Toupet, F. Alcayaga-Miranda, G. Tejedor, C. Jorgensen, S. E. Illanes, F. E. Figueroa, F. Djouad and M. Khoury (2016). "The immunosuppressive signature of menstrual blood mesenchymal stem cells entails opposite effects on experimental arthritis and graft versus host diseases." Stem Cells 34(2): 456-469.
- Ma, Z. J., J. J. Yang, Y. B. Lu, Z. Y. Liu and X. X. Wang (2020). "Mesenchymal stem cell-derived exosomes: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine." World J Stem Cells 12(8): 814-840.
- Mahmood, A., D. Lu, L. Wang and M. Chopp (2002). "Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury." J Neurotrauma 19(12): 1609-1617.
- Mancarella, D. and C. Plass (2021). "Epigenetic signatures in cancer: proper controls, current challenges and the potential for clinical translation." Genome Med 13(1): 23.
- Manochantr, S., K. Marupanthorn, C. Tantrawatpan and P. Kheolamai (2015). "The expression of neurogenic markers after neuronal induction of chorion-derived mesenchymal stromal cells." Neurol Res 37(6): 545-552.
- Mansoor, H., H. S. Ong, A. K. Riau, T. P. Stanzel, J. S. Mehta and G. H. Yam (2019). "Current Trends and Future Perspective of Mesenchymal Stem Cells and Exosomes in Corneal Diseases." Int J Mol Sci 20(12).
- Marchetti, B., C. Tirolo, F. L'Episcopo, S. Caniglia, N. Testa, J. A. Smith, S. Pluchino and M. F. Serapide (2020). "Parkinson's disease, aging and adult neurogenesis: Wnt/beta-catenin signalling as the key to unlock the mystery of endogenous brain repair." Aging Cell 19(3): e13101.
- Marei, H. E. S., A. El-Gamal, A. Althani, N. Afifi, A. Abd-Elmaksoud, A. Farag, C. Cenciarelli, C. Thomas and H. Anwarul (2018). "Cholinergic and dopaminergic neuronal differentiation of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells." J Cell Physiol 233(2): 936-945.
- Martellucci, S., C. Santacroce, F. Santilli, L. Piccoli, S. Delle Monache, A. Angelucci, R. Misasi, M. Sorice and V. Mattei (2019). "Cellular and Molecular Mechanisms Mediated by recPrP(C) Involved in the Neuronal Differentiation Process of Mesenchymal Stem Cells." Int J Mol Sci 20(2).
- Martens, D. J., R. M. Seaberg and D. van der Kooy (2002). "In vivo infusions of exogenous growth factors into the fourth ventricle of the adult mouse brain increase the proliferation of neural progenitors around the fourth ventricle and the central canal of the spinal cord." Eur J Neurosci 16(6): 1045-1057.
- Mauney, J. R., T. Nguyen, K. Gillen, C. Kirker-Head, J. M. Gimble and D. L. Kaplan (2007). "Engineering adipose-like tissue in vitro and in vivo utilizing human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin 3D scaffolds." Biomaterials 28(35): 5280-5290.
- Mayfield, A. E., E. L. Tilokee, N. Latham, B. McNeill, B. K. Lam, M. Ruel, E. J. Suuronen, D. W. Courtman, D. J. Stewart and D. R. Davis (2014). "The effect of encapsulation of cardiac stem cells within matrix-enriched hydrogel capsules on cell survival, post-ischemic cell retention and cardiac function." Biomaterials 35(1): 133-142.
- Mazini, L., L. Rochette, B. Admou, S. Amal and G. Malka (2020). "Hopes and Limits of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Wound Healing." Int J Mol Sci 21(4).

- Mazini, L., L. Rochette, M. Amine and G. Malka (2019). "Regenerative Capacity of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs), Comparison with Mesenchymal Stem Cells (MSCs)." Int J Mol Sci 20(10).
- McMahon, A. P. (2000). "More surprises in the Hedgehog signaling pathway." Cell 100(2): 185-188.
- McMurtrey, R. J. (2016). "Analytic Models of Oxygen and Nutrient Diffusion, Metabolism Dynamics, and Architecture Optimization in Three-Dimensional Tissue Constructs with Applications and Insights in Cerebral Organoids." Tissue Eng Part C Methods 22(3): 221-249.
- Mead, B. and S. Tomarev (2017). "Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes Promote Survival of Retinal Ganglion Cells Through miRNA-Dependent Mechanisms." Stem Cells Transl Med 6(4): 1273-1285.
- Mendes Filho, D., P. D. C. Ribeiro, L. F. Oliveira, D. R. M. de Paula, V. Capuano, T. S. F. de Assuncao and V. J. D. da Silva (2018). "Therapy With Mesenchymal Stem Cells in Parkinson Disease: History and Perspectives." Neurologist 23(4): 141-147.
- Mendez, M. G., S. Kojima and R. D. Goldman (2010). "Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition." FASEB J 24(6): 1838-1851.
- Menezes, K., B. G. Rosa, C. Freitas, A. S. da Cruz, R. de Siqueira Santos, M. A. Nascimento, D. V. L. Alves, M. Bonamino, M. I. Rossi, R. Borojevic and T. Coelho-Sampaio (2020). "Human mesenchymal stromal/stem cells recruit resident pericytes and induce blood vessels maturation to repair experimental spinal cord injury in rats." Sci Rep 10(1): 19604.
- Mesquita, T. J. B., C. R. Sargo, J. R. N. Fuzer, S. A. H. Paredes, R. C. Giordano, A. C. L. Horta and T. C. Zangirolami (2019). "Metabolic fluxes-oriented control of bioreactors: a novel approach to tune micro-aeration and substrate feeding in fermentations." Microb Cell Fact 18(1): 150.
- Migaud, M., M. Batailler, S. Segura, A. Duittoz, I. Franceschini and D. Pilon (2010). "Emerging new sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: a comparative study between the hypothalamus and the classical neurogenic zones." Eur J Neurosci 32(12): 2042-2052.
- Minana, M. D., F. Carbonell-Uberos, V. Mirabet, S. Marin and A. Encabo (2008). "IFATS collection: Identification of hemangioblasts in the adult human adipose tissue." Stem Cells 26(10): 2696-2704.
- Ming, G. L. and H. Song (2011). "Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions." Neuron 70(4): 687-702.
- Miranville, A., C. Heeschen, C. Sengenès, C. A. Curat, R. Busse and A. Bouloumie (2004). "Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells." Circulation 110(3): 349-355.
- Mishra, V. K., H. H. Shih, F. Parveen, D. Lenzen, E. Ito, T. F. Chan and L. Y. Ke (2020). "Identifying the Therapeutic Significance of Mesenchymal Stem Cells." Cells 9(5).
- Mohamed Ariff, I., A. Mitra and A. Basu (2012). "Epigenetic regulation of self-renewal and fate determination in neural stem cells." J Neurosci Res 90(3): 529-539.
- Mohammad, K., P. Dakik, Y. Medkour, D. Mitrofanova and V. I. Titorenko (2019). "Quiescence Entry, Maintenance, and Exit in Adult Stem Cells." Int J Mol Sci 20(9).
- Mohammad, M. H., A. M. Al-Shammari, A. A. Al-Juboory and N. Y. Yaseen (2016). "Characterization of neural stemness status through the neurogenesis process for bone marrow mesenchymal stem cells." Stem Cells Cloning 9: 1-15.
- Mojica, F. J., C. Diez-Villasenor, J. Garcia-Martinez and C. Almendros (2009). "Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system." Microbiology 155(Pt 3): 733-740.
- Mojica, F. J., C. Diez-Villasenor, J. Garcia-Martinez and E. Soria (2005). "Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements." J Mol Evol 60(2): 174-182.

- Mojica, F. J., C. Diez-Villasenor, E. Soria and G. Juez (2000). "Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria." Mol Microbiol 36(1): 244-246.
- Mojica, F. J., G. Juez and F. Rodriguez-Valera (1993). "Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites." Mol Microbiol 9(3): 613-621.
- Molcanyi, M., P. Riess, K. Bentz, M. Maegele, J. Hescheler, B. Schafke, T. Trapp, E. Neugebauer, N. Klug and U. Schafer (2007). "Trauma-associated inflammatory response impairs embryonic stem cell survival and integration after implantation into injured rat brain." J Neurotrauma 24(4): 625-637.
- Monaghan, T. K., C. Pou, C. J. MacKenzie, R. Plevin and E. M. Lutz (2008). "Neurotrophic actions of PACAP-38 and LIF on human neuroblastoma SH-SY5Y cells." J Mol Neurosci 36(1-3): 45-56.
- Monsoro-Burq, A. H. (2015). "PAX transcription factors in neural crest development." Semin Cell Dev Biol 44: 87-96.
- Moon, M. Y., H. J. Kim, B. Y. Choi, M. Sohn, T. N. Chung and S. W. Suh (2018). "Zinc Promotes Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation towards a Neuronal Fate." Stem Cells Int 2018: 5736535.
- Mu, M. W., Z. Y. Zhao and C. G. Li (2015). "Comparative study of neural differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by different induction methods." Genet Mol Res 14(4): 14169-14176.
- Mukai, T., T. Nagamura-Inoue, T. Shimazu, Y. Mori, A. Takahashi, H. Tsunoda, S. Yamaguchi and A. Tojo (2016). "Neurosphere formation enhances the neurogenic differentiation potential and migratory ability of umbilical cord-mesenchymal stromal cells." Cytotherapy 18(2): 229-241.
- Murphy, M., R. Dutton, S. Koblar, S. Cheema and P. Bartlett (1997). "Cytokines which signal through the LIF receptor and their actions in the nervous system." Prog Neurobiol 52(5): 355-378.
- Najafabadi, H. S., S. Mnaimneh, F. W. Schmitges, M. Garton, K. N. Lam, A. Yang, M. Albu, M. T. Weirauch, E. Radovani, P. M. Kim, J. Greenblatt, B. J. Frey and T. R. Hughes (2015). "C2H2 zinc finger proteins greatly expand the human regulatory lexicon." Nat Biotechnol 33(5): 555-562.
- Nakagawa, S. (2010). "[Involvement of neurogenesis in the action of psychotropic drugs]." Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi 30(3): 109-113.
- Naseri, M. H., H. Madani, S. H. Ahmadi Tafti, M. Moshkani Farahani, D. Kazemi Saleh, H. Hosseinnejad, S. Hosseini, S. Hekmat, Z. Hossein Ahmadi, M. Dehghani, A. Saadat, S. Mardpour, S. E. Hosseini, M. Esmaeilzadeh, H. Sadeghian, G. Bahoush, A. Bassi, A. Amin, R. Fazeli, Y. Sharafi, L. Arab, M. Movahhed, S. Davaran, N. Ramezanzadeh, A. Kouhkan, A. Hezavehei, M. Namiri, F. Kashfi, A. Akhlaghi, F. Sotoodehnejadnematalahi, A. Vosough Dizaji, H. Gourabi, N. Syedi, A. H. Shahverdi, H. Baharvand and N. Aghdami (2018). "COMPARE CPM-RMI Trial: Intramyocardial Transplantation of Autologous Bone Marrow-Derived CD133+ Cells and MNCs during CABG in Patients with Recent MI: A Phase II/III, Multicenter, Placebo-Controlled, Randomized, Double-Blind Clinical Trial." Cell J 20(3): 449.
- Nasrallah, H. A., T. Hopkins and S. K. Pixley (2010). "Differential effects of antipsychotic and antidepressant drugs on neurogenic regions in rats." Brain Res 1354: 23-29.
- Nassiri, S. M. and R. Rahbarghazi (2014). "Interactions of mesenchymal stem cells with endothelial cells." Stem Cells Dev 23(4): 319-332.
- Neri, S., P. Bourin, J. A. Peyrafitte, L. Cattini, A. Facchini and E. Mariani (2013). "Human adipose stromal cells (ASC) for the regeneration of injured cartilage display genetic stability after in vitro culture expansion." PLoS One 8(10): e77895.
- Newman, M. P., F. Feron and A. Mackay-Sim (2000). "Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium." Neuroscience 99(2): 343-350.

- Nguemeni, C., M. W. McDonald, M. S. Jeffers, J. Livingston-Thomas, D. Lagace and D. Corbett (2018). "Short- and Long-term Exposure to Low and High Dose Running Produce Differential Effects on Hippocampal Neurogenesis." Neuroscience 369: 202-211.
- Ning, H., G. Lin, T. F. Lue and C. S. Lin (2006). "Neuron-like differentiation of adipose tissue-derived stromal cells and vascular smooth muscle cells." Differentiation 74(9-10): 510-518.
- Nishimura, K., S. Semba, K. Aoyagi, H. Sasaki and H. Yokozaki (2012). "Mesenchymal stem cells provide an advantageous tumor microenvironment for the restoration of cancer stem cells." Pathobiology 79(6): 290-306.
- Nishino, J., K. Yamashita, H. Hashiguchi, H. Fujii, T. Shimazaki and H. Hamada (2004). "Meteorin: a secreted protein that regulates glial cell differentiation and promotes axonal extension." EMBO J 23(9): 1998-2008.
- Noisa, P., T. Raivio and W. Cui (2015). "Neural Progenitor Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells as an Origin of Dopaminergic Neurons." Stem Cells Int 2015: 647437.
- Norozi, F., A. Ahmadzadeh, S. Shahrabi, T. Vosoughi and N. Saki (2016). "Mesenchymal stem cells as a double-edged sword in suppression or progression of solid tumor cells." Tumour Biol 37(9): 11679-11689.
- Norwood, L. E., S. K. Grade, D. E. Cryderman, K. A. Hines, N. Furiasse, R. Toro, Y. Li, A. Dhasarathy, M. P. Kladde, M. J. Hendrix, D. A. Kirschmann and L. L. Wallrath (2004). "Conserved properties of HP1(Hsalph)." Gene 336(1): 37-46.
- Ocansey, D. K. W., B. Pei, Y. Yan, H. Qian, X. Zhang, W. Xu and F. Mao (2020). "Improved therapeutics of modified mesenchymal stem cells: an update." J Transl Med 18(1): 42.
- Okubo, T., D. Hayashi, T. Yaguchi, Y. Fujita, M. Sakaue, T. Suzuki, A. Tsukamoto, O. Murayama, J. Lynch, Y. Miyazaki, K. Tanaka and T. Takizawa (2016). "Differentiation of rat adipose tissue-derived stem cells into neuron-like cells by valproic acid, a histone deacetylase inhibitor." Exp Anim 65(1): 45-51.
- Ottoboni, L., B. von Wunster and G. Martino (2020). "Therapeutic Plasticity of Neural Stem Cells." Front Neurol 11: 148.
- Palmer, T. D., A. R. Willhoite and F. H. Gage (2000). "Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis." J Comp Neurol 425(4): 479-494.
- Pan, W. K., H. Yu, A. L. Wu, Y. Gao, B. J. Zheng, P. Li, W. L. Yang, Q. Huang, H. J. Wang and X. Ge (2016). "Combination of basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor enhances proliferation and neuronal/glial differential of postnatal human enteric neurosphere cells in vitro." Neuroreport 27(11): 858-863.
- Pandit, L. and J. M. Murthy (2011). "Treatment of multiple sclerosis." Ann Indian Acad Neurol 14(Suppl 1): S65-69.
- Park, D., Y. Wu, S. E. Lee, G. Kim, S. Jeong, D. Milovanovic, P. De Camilli and S. Chang (2021). "Cooperative function of synaptophysin and synapsin in the generation of synaptic vesicle-like clusters in non-neuronal cells." Nat Commun 12(1): 263.
- Park, H. C., Y. S. Shim, Y. Ha, S. H. Yoon, S. R. Park, B. H. Choi and H. S. Park (2005). "Treatment of complete spinal cord injury patients by autologous bone marrow cell transplantation and administration of granulocyte-macrophage colony stimulating factor." Tissue Eng 11(5-6): 913-922.
- Park, J. H., D. Y. Kim, I. Y. Sung, G. H. Choi, M. H. Jeon, K. K. Kim and S. R. Jeon (2012). "Long-term results of spinal cord injury therapy using mesenchymal stem cells derived from bone marrow in humans." Neurosurgery 70(5): 1238-1247; discussion 1247.
- Park, S., H. H. Jung, Y. H. Park, J. S. Ahn and Y. H. Im (2011). "ERK/MAPK pathways play critical roles in EGFR ligands-induced MMP1 expression." Biochem Biophys Res Commun 407(4): 680-686.
- Park, S. J., H. J. Kim, W. Kim, O. S. Kim, S. Lee, S. Y. Han, E. J. Jeong, H. S. Park, H. W. Kim and K. S. Moon (2016). "Tumorigenicity Evaluation of Umbilical Cord Blood-derived Mesenchymal Stem Cells." Toxicol Res 32(3): 251-258.

- Pasque, V., J. Jullien, K. Miyamoto, R. P. Halley-Stott and J. B. Gurdon (2011). "Epigenetic factors influencing resistance to nuclear reprogramming." Trends Genet 27(12): 516-525.
- Passweg, J. R., H. Baldomero, P. Bader, C. Bonini, R. F. Duarte, C. Dufour, A. Gennery, N. Kroger, J. Kuball, F. Lanza, S. Montoto, A. Nagler, J. A. Snowden, J. Styczynski and M. Mohty (2017). "Use of haploidentical stem cell transplantation continues to increase: the 2015 European Society for Blood and Marrow Transplant activity survey report." Bone Marrow Transplant 52(6): 811-817.
- Pati, S., A. Y. Khakoo, J. Zhao, F. Jimenez, M. H. Gerber, M. Harting, J. B. Redell, R. Grill, Y. Matsuo, S. Guha, C. S. Cox, M. S. Reitz, J. B. Holcomb and P. K. Dash (2011). "Human mesenchymal stem cells inhibit vascular permeability by modulating vascular endothelial cadherin/beta-catenin signaling." Stem Cells Dev 20(1): 89-101.
- Patterson, P. H. (1994). "Leukemia inhibitory factor, a cytokine at the interface between neurobiology and immunology." Proc Natl Acad Sci U S A 91(17): 7833-7835.
- Pego, A. P., S. Kubinova, D. Cizkova, I. Vanicky, F. M. Mar, M. M. Sousa and E. Sykova (2012). "Regenerative medicine for the treatment of spinal cord injury: more than just promises?" J Cell Mol Med 16(11): 2564-2582.
- Peinado, J. R., M. Pardo, O. de la Rosa and M. M. Malagon (2012). "Proteomic characterization of adipose tissue constituents, a necessary step for understanding adipose tissue complexity." Proteomics 12(4-5): 607-620.
- Peschanski, M., G. Defer, J. P. N'Guyen, F. Ricolfi, J. C. Monfort, P. Remy, C. Geny, Y. Samson, P. Hantraye, R. Jeny and et al. (1994). "Bilateral motor improvement and alteration of L-dopa effect in two patients with Parkinson's disease following intrastriatal transplantation of foetal ventral mesencephalon." Brain 117 ( Pt 3): 487-499.
- Philippidou, P., C. M. Walsh, J. Aubin, L. Jeannotte and J. S. Dasen (2012). "Sustained Hox5 gene activity is required for respiratory motor neuron development." Nat Neurosci 15(12): 1636-1644.
- Pikula, M., N. Marek-Trzonkowska, A. Wardowska, A. Renkielska and P. Trzonkowski (2013). "Adipose tissue-derived stem cells in clinical applications." Expert Opin Biol Ther 13(10): 1357-1370.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science 284(5411): 143-147.
- Polymeri, A., W. V. Giannobile and D. Kaigler (2016). "Bone Marrow Stromal Stem Cells in Tissue Engineering and Regenerative Medicine." Horm Metab Res 48(11): 700-713.
- Ponti, G., K. Obernier and A. Alvarez-Buylla (2013). "Lineage progression from stem cells to new neurons in the adult brain ventricular-subventricular zone." Cell Cycle 12(11): 1649-1650.
- Priestler, C., A. MacDonald, M. Dhar and A. Bow (2020). "Examining the Characteristics and Applications of Mesenchymal, Induced Pluripotent, and Embryonic Stem Cells for Tissue Engineering Approaches across the Germ Layers." Pharmaceuticals (Basel) 13(11).
- Qian, D. X., H. T. Zhang, X. Ma, X. D. Jiang and R. X. Xu (2010). "Comparison of the efficiencies of three neural induction protocols in human adipose stromal cells." Neurochem Res 35(4): 572-579.
- Qureshi, I. A. and M. F. Mehler (2018). "Epigenetic mechanisms underlying nervous system diseases." Handb Clin Neurol 147: 43-58.
- Ra, J. C., I. S. Shin, S. H. Kim, S. K. Kang, B. C. Kang, H. Y. Lee, Y. J. Kim, J. Y. Jo, E. J. Yoon, H. J. Choi and E. Kwon (2011). "Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans." Stem Cells Dev 20(8): 1297-1308.
- Rafieemehr, H., M. Kheirandish and M. Soleimani (2015). "Improving the neuronal differentiation efficiency of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells cultivated under appropriate conditions." Iran J Basic Med Sci 18(11): 1100-1106.

- Rafieemehr, H., M. Kheyrandish and M. Soleimani (2015). "Neuroprotective Effects of Transplanted Mesenchymal Stromal Cells-derived Human Umbilical Cord Blood Neural Progenitor Cells in EAE." Iran J Allergy Asthma Immunol 14(6): 596-604.
- Razavi, S., M. Mardani, M. Kazemi, E. Esfandiari, M. Narimani, A. Esmaeili and N. Ahmadi (2013). "Effect of leukemia inhibitory factor on the myelinogenic ability of Schwann-like cells induced from human adipose-derived stem cells." Cell Mol Neurobiol 33(2): 283-289.
- Rezsóhazy, R., A. J. Saurin, C. Maurel-Zaffran and Y. Graba (2015). "Cellular and molecular insights into Hox protein action." Development 142(7): 1212-1227.
- Rhee, Y. H., M. Choi, H. S. Lee, C. H. Park, S. M. Kim, S. H. Yi, S. M. Oh, H. J. Cha, M. Y. Chang and S. H. Lee (2013). "Insulin concentration is critical in culturing human neural stem cells and neurons." Cell Death Dis 4: e766.
- Rindler, M. J., M. M. Bashor, N. Spitzer and M. H. Saier, Jr. (1978). "Regulation of adenosine 3':5'-monophosphate efflux from animal cells." J Biol Chem 253(15): 5431-5436.
- Robb, K. P., J. C. Fitzgerald, F. Barry and S. Viswanathan (2019). "Mesenchymal stromal cell therapy: progress in manufacturing and assessments of potency." Cytotherapy 21(3): 289-306.
- Romorini, L., D. A. Riva, C. Bluguermann, G. A. Videla Richardson, M. E. Scassa, G. E. Sevlever and S. G. Miriuka (2013). "Effect of antibiotics against Mycoplasma sp. on human embryonic stem cells undifferentiated status, pluripotency, cell viability and growth." PLoS One 8(7): e70267.
- Ronn, R. E., C. Guibentif, R. Moraghebi, P. Chaves, S. Saxena, B. Garcia and N. B. Woods (2015). "Retinoic acid regulates hematopoietic development from human pluripotent stem cells." Stem Cell Reports 4(2): 269-281.
- Rosso, S. B. and N. C. Inestrosa (2013). "WNT signaling in neuronal maturation and synaptogenesis." Front Cell Neurosci 7: 103.
- Roura, S., J. M. Pujal, C. Galvez-Monton and A. Bayes-Genis (2015). "The role and potential of umbilical cord blood in an era of new therapies: a review." Stem Cell Res Ther 6: 123.
- Sachs, P. C., M. P. Francis, M. Zhao, J. Brumelle, R. R. Rao, L. W. Elmore and S. E. Holt (2012). "Defining essential stem cell characteristics in adipose-derived stromal cells extracted from distinct anatomical sites." Cell Tissue Res 349(2): 505-515.
- Saetrom, P., O. Snove, Jr. and J. J. Rossi (2007). "Epigenetics and microRNAs." Pediatr Res 61(5 Pt 2): 17R-23R.
- Safford, K. M., K. C. Hicok, S. D. Safford, Y. D. Halvorsen, W. O. Wilkison, J. M. Gimble and H. E. Rice (2002). "Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells." Biochem Biophys Res Commun 294(2): 371-379.
- Saheb, A., S. Patterson and M. Josowicz (2014). "Probing for DNA methylation with a voltammetric DNA detector." Analyst 139(4): 786-792.
- Sahni, V. and J. A. Kessler (2010). "Stem cell therapies for spinal cord injury." Nat Rev Neurol 6(7): 363-372.
- Sahuquillo, J. and J. A. Dennis (2019). "Decompressive craniectomy for the treatment of high intracranial pressure in closed traumatic brain injury." Cochrane Database Syst Rev 12: CD003983.
- Salari, V., F. Mengoni, F. Del Gallo, G. Bertini and P. F. Fabene (2020). "The Anti-Inflammatory Properties of Mesenchymal Stem Cells in Epilepsy: Possible Treatments and Future Perspectives." Int J Mol Sci 21(24).
- Salehi, H., N. Amirpour, A. Niapour and S. Razavi (2016). "An Overview of Neural Differentiation Potential of Human Adipose Derived Stem Cells." Stem Cell Rev 12(1): 26-41.
- Salehinejad, P., N. B. Alitheen, A. M. Ali, A. R. Omar, M. Moshrefi, B. Motamedi and S. N. Nematollahi-Mahani (2015). "Neural differentiation of human umbilical cord matrix-derived mesenchymal cells under special culture conditions." Cytotechnology 67(3): 449-460.

- Samsonraj, R. M., M. Raghunath, V. Nurcombe, J. H. Hui, A. J. van Wijnen and S. M. Cool (2017). "Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine." Stem Cells Transl Med 6(12): 2173-2185.
- Sanchez, S., C. Jimenez, A. C. Carrera, J. Diaz-Nido, J. Avila and F. Wandosell (2004). "A cAMP-activated pathway, including PKA and PI3K, regulates neuronal differentiation." Neurochem Int 44(4): 231-242.
- Sander, J. D. and J. K. Joung (2014). "CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes." Nat Biotechnol 32(4): 347-355.
- Santiago, L. A., B. C. Oh, P. K. Dash, J. B. Holcomb and C. E. Wade (2012). "A clinical comparison of penetrating and blunt traumatic brain injuries." Brain Inj 26(2): 107-125.
- Sasaki, N., N. Sachs, K. Wiebrands, S. I. Ellenbroek, A. Fumagalli, A. Lyubimova, H. Begthel, M. van den Born, J. H. van Es, W. R. Karthaus, V. S. Li, C. Lopez-Iglesias, P. J. Peters, J. van Rheenen, A. van Oudenaarden and H. Clevers (2016). "Reg4+ deep crypt secretory cells function as epithelial niche for Lgr5+ stem cells in colon." Proc Natl Acad Sci U S A 113(37): E5399-5407.
- Sawicka, A. and C. Seiser (2014). "Sensing core histone phosphorylation - a matter of perfect timing." Biochim Biophys Acta 1839(8): 711-718.
- Scheibe, F., O. Klein, J. Klose and J. Priller (2012). "Mesenchymal stromal cells rescue cortical neurons from apoptotic cell death in an in vitro model of cerebral ischemia." Cell Mol Neurobiol 32(4): 567-576.
- Schmidt, R. and K. Plath (2012). "The roles of the reprogramming factors Oct4, Sox2 and Klf4 in resetting the somatic cell epigenome during induced pluripotent stem cell generation." Genome Biol 13(10): 251.
- Schulz, T. J., T. L. Huang, T. T. Tran, H. Zhang, K. L. Townsend, J. L. Shadrach, M. Cerletti, L. E. McDougall, N. Giordanze, T. Tchkonina, D. Schrier, D. Falb, J. L. Kirkland, A. J. Wagers and Y. H. Tseng (2011). "Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat." Proc Natl Acad Sci U S A 108(1): 143-148.
- Sensebe, L., K. Tarte, J. Galipeau, M. Krampera, I. Martin, D. G. Phinney and Y. Shi (2012). "Limited acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells." Cell Stem Cell 10(1): 9-10; author reply 10-11.
- Seo, M. J., S. Y. Suh, Y. C. Bae and J. S. Jung (2005). "Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo." Biochem Biophys Res Commun 328(1): 258-264.
- Seo, Y., T. H. Shin and H. S. Kim (2019). "Current Strategies to Enhance Adipose Stem Cell Function: An Update." Int J Mol Sci 20(15).
- Sgodda, M., H. Aurich, S. Kleist, I. Aurich, S. Konig, M. M. Dollinger, W. E. Fleig and B. Christ (2007). "Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo." Exp Cell Res 313(13): 2875-2886.
- Shahbazi, A., M. Safa, F. Alikarami, S. Kargozar, M. H. Asadi, M. T. Joghataei and M. Soleimani (2016). "Rapid Induction of Neural Differentiation in Human Umbilical Cord Matrix Mesenchymal Stem Cells by cAMP-elevating Agents." Int J Mol Cell Med 5(3): 167-177.
- Shao, X., C. Zhang, M. A. Sun, X. Lu and H. Xie (2014). "Deciphering the heterogeneity in DNA methylation patterns during stem cell differentiation and reprogramming." BMC Genomics 15: 978.
- Shao, Z., F. Raible, R. Mollaaghababa, J. R. Guyon, C. T. Wu, W. Bender and R. E. Kingston (1999). "Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex." Cell 98(1): 37-46.
- Shen, Q., S. K. Goderie, L. Jin, N. Karanth, Y. Sun, N. Abramova, P. Vincent, K. Pumiglia and S. Temple (2004). "Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells." Science 304(5675): 1338-1340.
- Shen, Q., Y. Wang, E. Kokovay, G. Lin, S. M. Chuang, S. K. Goderie, B. Roysam and S. Temple (2008). "Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions." Cell Stem Cell 3(3): 289-300.

- Shi, Y., Y. Hu, C. Lv and G. Tu (2016). "Effects of Reactive Oxygen Species on Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells." Ann Transplant 21: 695-700.
- Shigyo, M., T. Kuboyama, Y. Sawai, M. Tada-Umezaki and C. Tohda (2015). "Extracellular vimentin interacts with insulin-like growth factor 1 receptor to promote axonal growth." Sci Rep 5: 12055.
- Shimojo, D., K. Onodera, Y. Doi-Torii, Y. Ishihara, C. Hattori, Y. Miwa, S. Tanaka, R. Okada, M. Ohyama, M. Shoji, A. Nakanishi, M. Doyu, H. Okano and Y. Okada (2015). "Rapid, efficient, and simple motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells." Mol Brain 8(1): 79.
- Silberberg, D., N. P. Anand, K. Michels and R. N. Kalaria (2015). "Brain and other nervous system disorders across the lifespan - global challenges and opportunities." Nature 527(7578): S151-154.
- Sims, N. R. and H. Muyderman (2010). "Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke." Biochim Biophys Acta 1802(1): 80-91.
- Singh, M., P. K. Vaishnav, A. K. Dinda and S. Mohanty (2020). "Evaluation of Priming Efficiency of Forskolin in Tissue-Specific Human Mesenchymal Stem Cells into Dopaminergic Neurons: An In Vitro Comparative Study." Cells 9(9).
- Sinkunas, T., G. Gasiunas, S. P. Waghmare, M. J. Dickman, R. Barrangou, P. Horvath and V. Siksnys (2013). "In vitro reconstitution of Cascade-mediated CRISPR immunity in *Streptococcus thermophilus*." EMBO J 32(3): 385-394.
- Sobhani, A., N. Khanlarkhani, M. Baazm, F. Mohammadzadeh, A. Najafi, S. Mehdinejadi and F. Sargolzaei Aval (2017). "Multipotent Stem Cell and Current Application." Acta Med Iran 55(1): 6-23.
- Song, C. H., O. Honmou, N. Ohsawa, K. Nakamura, H. Hamada, H. Furuoka, R. Hasebe and M. Horiuchi (2009). "Effect of transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prions." J Virol 83(11): 5918-5927.
- Song, Y., J. Li, Y. Zhu, Y. Dai, T. Zeng, L. Liu, H. Wang, Y. Qin, M. Zeng, X. Y. Guan and Y. Li (2014). "MicroRNA-9 promotes tumor metastasis via repressing E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma." Oncotarget 5(22): 11669-11680.
- Sorrells, S. F., M. F. Paredes, A. Cebrian-Silla, K. Sandoval, D. Qi, K. W. Kelley, D. James, S. Mayer, J. Chang, K. I. Auguste, E. F. Chang, A. J. Gutierrez, A. R. Kriegstein, G. W. Mathern, M. C. Oldham, E. J. Huang, J. M. Garcia-Verdugo, Z. Yang and A. Alvarez-Buylla (2018). "Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults." Nature 555(7696): 377-381.
- Sousa, B. R., R. C. Parreira, E. A. Fonseca, M. J. Amaya, F. M. Tonelli, S. M. Lacerda, P. Lalwani, A. K. Santos, K. N. Gomes, H. Ulrich, A. H. Kihara and R. R. Resende (2014). "Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications." Cytometry A 85(1): 43-77.
- Spalding, K. L., O. Bergmann, K. Alkass, S. Bernard, M. Salehpour, H. B. Huttner, E. Bostrom, I. Westerlund, C. Vial, B. A. Buchholz, G. Possnert, D. C. Mash, H. Druid and J. Frisen (2013). "Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans." Cell 153(6): 1219-1227.
- Srivastava, A., S. Singh, A. Pandey, D. Kumar, C. S. Rajpurohit, V. K. Khanna and A. B. Pant (2018). "Secretome of Differentiated PC12 Cells Enhances Neuronal Differentiation in Human Mesenchymal Stem Cells Via NGF-Like Mechanism." Mol Neurobiol.
- Stern, J. H., Y. Tian, J. Funderburgh, G. Pellegrini, K. Zhang, J. L. Goldberg, R. R. Ali, M. Young, Y. Xie and S. Temple (2018). "Regenerating Eye Tissues to Preserve and Restore Vision." Cell Stem Cell 23(3): 453.
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature 403(6765): 41-45.
- Strebel, H., B. Haller, M. Sohn, W. Schepp and F. Gundling (2020). "Role of Brain Biomarkers S-100-Beta and Neuron-Specific Enolase for Detection and Follow-Up of Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis before, during and after Treatment with L-Ornithine-L-Aspartate." GE Port J Gastroenterol 27(6): 391-403.

- Stricker, P. E. F., D. de Souza Dobuchak, A. C. Irioda, B. F. Mogharbel, C. R. C. Franco, J. R. de Souza Almeida Leite, A. R. de Araujo, F. A. Borges, R. D. Herculanio, C. F. de Oliveira Graeff, J. C. Chachques and K. A. T. de Carvalho (2021). "Human Mesenchymal Stem Cells Seeded on the Natural Membrane to Neurospheres for Cholinergic-like Neurons." Membranes (Basel) 11(8).
- Strioga, M., S. Viswanathan, A. Darinskas, O. Slaby and J. Michalek (2012). "Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells." Stem Cells Dev 21(14): 2724-2752.
- Suhara, Y., Y. Hirota, N. Hanada, S. Nishina, S. Eguchi, R. Sakane, K. Nakagawa, A. Wada, K. Takahashi, H. Tokiwa and T. Okano (2015). "Synthetic Small Molecules Derived from Natural Vitamin K Homologues that Induce Selective Neuronal Differentiation of Neuronal Progenitor Cells." J Med Chem 58(17): 7088-7092.
- Sultan, N., L. E. Amin, A. R. Zaher, M. E. Grawish and B. A. Scheven (2020). "Neurotrophic effects of dental pulp stem cells on trigeminal neuronal cells." Sci Rep 10(1): 19694.
- Sumarwoto, T., H. Suroto, F. Mahyudin, D. N. Utomo, Romaniyanto, D. Tinduh, H. B. Notobroto, C. R. Sigit Prakoeswa, F. A. Rantam and S. Rhatomy (2021). "Role of adipose mesenchymal stem cells and secretome in peripheral nerve regeneration." Ann Med Surg (Lond) 67: 102482.
- Sun, C., J. Shao, L. Su, J. Zhao, J. Bi, S. Yang, S. Zhang, J. Gao and J. Miao (2013). "Cholinergic neuron-like cells derived from bone marrow stromal cells induced by tricyclodecane-9-yl-xanthogenate promote functional recovery and neural protection after spinal cord injury." Cell Transplant 22(6): 961-975.
- Sun, W., H. Funakoshi and T. Nakamura (2002). "Overexpression of HGF retards disease progression and prolongs life span in a transgenic mouse model of ALS." J Neurosci 22(15): 6537-6548.
- Sykova, E., D. Cizkova and S. Kubinova (2021). "Mesenchymal Stem Cells in Treatment of Spinal Cord Injury and Amyotrophic Lateral Sclerosis." Front Cell Dev Biol 9: 695900.
- Tamaki, R., S. I. Orié, B. Alessandri, O. Kempski and A. Heimann (2017). "Spreading depression and focal venous cerebral ischemia enhance cortical neurogenesis." Neural Regen Res 12(8): 1278-1286.
- Tantrawatpan, C., S. Manochantr, P. Kheolamai, U. P. Y, A. Supokawej and S. Issaragrisil (2013). "Pluripotent gene expression in mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly and their differentiation potential to neural-like cells." J Med Assoc Thai 96(9): 1208-1217.
- Tao, H., R. Rao and D. D. Ma (2005). "Cytokine-induced stable neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a serum/feeder cell-free condition." Dev Growth Differ 47(6): 423-433.
- Tavazoie, M., L. Van der Veken, V. Silva-Vargas, M. Louissaint, L. Colonna, B. Zaidi, J. M. Garcia-Verdugo and F. Doetsch (2008). "A specialized vascular niche for adult neural stem cells." Cell Stem Cell 3(3): 279-288.
- Taylor, K. M., M. H. Saint-Hilaire, L. Sudarsky, D. K. Simon, B. Hersh, D. Sparrow, H. Hu and M. G. Weisskopf (2016). "Head injury at early ages is associated with risk of Parkinson's disease." Parkinsonism Relat Disord 23: 57-61.
- Teven, C. M., X. Liu, N. Hu, N. Tang, S. H. Kim, E. Huang, K. Yang, M. Li, J. L. Gao, H. Liu, R. B. Natale, G. Luther, Q. Luo, L. Wang, R. Rames, Y. Bi, J. Luo, H. H. Luu, R. C. Haydon, R. R. Reid and T. C. He (2011). "Epigenetic regulation of mesenchymal stem cells: a focus on osteogenic and adipogenic differentiation." Stem Cells Int 2011: 201371.
- Tian, C., X. Wang, L. Wang, S. Wu and Z. Wan (2013). "Autologous bone marrow mesenchymal stem cell therapy in the subacute stage of traumatic brain injury by lumbar puncture." Exp Clin Transplant 11(2): 176-181.
- Tio, M., K. H. Tan, W. Lee, T. T. Wang and G. Udolph (2010). "Roles of db-cAMP, IBMX and RA in aspects of neural differentiation of cord blood derived mesenchymal-like stem cells." PLoS One 5(2): e9398.

- Tondreau, T., M. Dejeneffe, N. Meuleman, B. Stamatopoulos, A. Delforge, P. Martiat, D. Bron and L. Lagneaux (2008). "Gene expression pattern of functional neuronal cells derived from human bone marrow mesenchymal stromal cells." Bmc Genomics 9.
- Tondreau, T., M. Dejeneffe, N. Meuleman, B. Stamatopoulos, A. Delforge, P. Martiat, D. Bron and L. Lagneaux (2008). "Gene expression pattern of functional neuronal cells derived from human bone marrow mesenchymal stromal cells." BMC Genomics 9: 166.
- Totoiu, M. O. and H. S. Keirstead (2005). "Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination." J Comp Neurol 486(4): 373-383.
- Trentesaux, C., K. Striedinger, J. H. Pomerantz and O. D. Klein (2020). "From gut to glutes: The critical role of niche signals in the maintenance and renewal of adult stem cells." Curr Opin Cell Biol 63: 88-101.
- Trosko, J. E. (2008). "Human adult stem cells as the target cells for the initiation of carcinogenesis and for the generation of "cancer stem cells"." Int J Stem Cells 1(1): 8-26.
- Trosko, J. E. (2014). "Induction of iPS cells and of cancer stem cells: the stem cell or reprogramming hypothesis of cancer?" Anat Rec (Hoboken) 297(1): 161-173.
- Tsuji, W., J. P. Rubin and K. G. Marra (2014). "Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration." World J Stem Cells 6(3): 312-321.
- Turac, G., G. Duruksu and E. Karaoz (2018). "The Effect of Recombinant Tyrosine Hydroxylase Expression on the Neurogenic Differentiation Potency of Mesenchymal Stem Cells." Neurospine 15(1): 42-53.
- Um, S., J. Ha, S. J. Choi, W. Oh and H. J. Jin (2020). "Prospects for the therapeutic development of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells." World J Stem Cells 12(12): 1511-1528.
- Urban, N. and T. H. Cheung (2021). "Stem cell quiescence: the challenging path to activation." Development 148(3).
- Urrutia, D. N., P. Caviedes, R. Mardones, J. J. Minguell, A. M. Vega-Letter and C. M. Jofre (2019). "Comparative study of the neural differentiation capacity of mesenchymal stromal cells from different tissue sources: An approach for their use in neural regeneration therapies." PLoS One 14(3): e0213032.
- Vallee, M., J. F. Cote and J. Fradette (2009). "Adipose-tissue engineering: taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells." Pathol Biol (Paris) 57(4): 309-317.
- Venkat, P., Y. Shen, M. Chopp and J. Chen (2017). "Cell-based and pharmacological neurorestorative therapies for ischemic stroke." Neuropharmacology.
- Venkataramana, N. K., S. K. Kumar, S. Balaraju, R. C. Radhakrishnan, A. Bansal, A. Dixit, D. K. Rao, M. Das, M. Jan, P. K. Gupta and S. M. Totey (2010). "Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease." Transl Res 155(2): 62-70.
- Vilchez, D., L. Boyer, M. Lutz, C. Merkwirth, I. Morantte, C. Tse, B. Spencer, L. Page, E. Masliah, W. T. Berggren, F. H. Gage and A. Dillin (2013). "FOXO4 is necessary for neural differentiation of human embryonic stem cells." Aging Cell 12(3): 518-522.
- Vindigni, V., L. Michelotto, L. Lancerotto, A. D. Puppa, D. D'Avella, G. Abatangelo, R. Cortivo and B. Zavan (2009). "Isolation method for a stem cell population with neural potential from skin and adipose tissue." Neurol Res.
- Voigt, P., W. W. Tee and D. Reinberg (2013). "A double take on bivalent promoters." Genes Dev 27(12): 1318-1338.
- Vossmerbaeumer, U., S. Ohnesorge, S. Kuehl, M. Haapalahti, H. Kluter, J. B. Jonas, H. J. Thierse and K. Bieback (2009). "Retinal pigment epithelial phenotype induced in human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells." Cytotherapy 11(2): 177-188.
- Vulic, K. and M. S. Shoichet (2012). "Tunable growth factor delivery from injectable hydrogels for tissue engineering." J Am Chem Soc 134(2): 882-885.
- Wagner, W., F. Wein, A. Seckinger, M. Frankhauser, U. Wirkner, U. Krause, J. Blake, C. Schwager, V. Eckstein, W. Ansorge and A. D. Ho (2005). "Comparative characteristics of

- mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood." Exp Hematol 33(11): 1402-1416.
- Wakao, S., Y. Kuroda, F. Ogura, T. Shigemoto and M. Dezawa (2012). "Regenerative Effects of Mesenchymal Stem Cells: Contribution of Muse Cells, a Novel Pluripotent Stem Cell Type that Resides in Mesenchymal Cells." Cells 1(4): 1045-1060.
  - Wang, F. W., Z. Wang, Y. M. Zhang, Z. X. Du, X. L. Zhang, Q. Liu, Y. J. Guo, X. G. Li and A. J. Hao (2013). "Protective effect of melatonin on bone marrow mesenchymal stem cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis in vitro." J Cell Biochem 114(10): 2346-2355.
  - Wang, N., Y. Xu, T. Qin, F. P. Wang, L. L. Ma, X. G. Luo and T. C. Zhang (2013). "Myocardin-related transcription factor-A is a key regulator in retinoic acid-induced neural-like differentiation of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells." Gene 523(2): 178-186.
  - Wang, T. T., M. Tio, W. Lee, W. Beerheide and G. Udolph (2007). "Neural differentiation of mesenchymal-like stem cells from cord blood is mediated by PKA." Biochem Biophys Res Commun 357(4): 1021-1027.
  - Waymire, J. C., K. Gilmer-Waymire and J. W. Haycock (1978). "Cyclic-AMP-induced differentiation in neuroblastoma is independent of cell division rate." Nature 276(5684): 194-195.
  - WHO (2006). World Health Organization. Global burden of neurological disorders: estimates and projections. Neurological Disorders: Public Health Challenges: 27-39.
  - Wild, R., A. Klems, M. Takamiya, Y. Hayashi, U. Strahle, K. Ando, N. Mochizuki, A. van Impel, S. Schulte-Merker, J. Krueger, L. Preau and F. le Noble (2017). "Neuronal sFlt1 and Vegfaa determine venous sprouting and spinal cord vascularization." Nat Commun 8: 13991.
  - Wilson, A., A. Webster and P. Genever (2019). "Nomenclature and heterogeneity: consequences for the use of mesenchymal stem cells in regenerative medicine." Regen Med 14(6): 595-611.
  - Wilson, J. R., L. A. Tetreault, B. K. Kwon, P. M. Arnold, T. E. Mroz, C. Shaffrey, J. S. Harrop, J. R. Chapman, S. Casha, A. C. Skelly, H. K. Holmer, E. D. Brodt and M. G. Fehlings (2017). "Timing of Decompression in Patients With Acute Spinal Cord Injury: A Systematic Review." Global Spine J 7(3 Suppl): 95S-115S.
  - Woodbury, D., E. J. Schwarz, D. J. Prockop and I. B. Black (2000). "Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons." J Neurosci Res 61(4): 364-370.
  - Woodbury, M. E. and T. Ikezu (2014). "Fibroblast growth factor-2 signaling in neurogenesis and neurodegeneration." J Neuroimmune Pharmacol 9(2): 92-101.
  - Woodcock, T. and M. C. Morganti-Kossmann (2013). "The role of markers of inflammation in traumatic brain injury." Front Neurol 4: 18.
  - Wrage, P. C., T. Tran, K. To, E. W. Keefer, K. A. Ruhn, J. Hong, S. Hattangadi, I. Trevino and M. G. Tansey (2008). "The neuro-glial properties of adipose-derived adult stromal (ADAS) cells are not regulated by Notch 1 and are not derived from neural crest lineage." PLoS One 3(1): e1453.
  - Wu, H., J. Zhao, B. Fu, S. Yin, C. Song, J. Zhang, S. Zhao and Y. Zhang (2017). "Retinoic acid-induced upregulation of miR-219 promotes the differentiation of embryonic stem cells into neural cells." Cell Death Dis 8(7): e2953.
  - Wyse, R. D., G. L. Dunbar and J. Rossignol (2014). "Use of genetically modified mesenchymal stem cells to treat neurodegenerative diseases." Int J Mol Sci 15(2): 1719-1745.
  - Xie, K., D. Wei, Q. Shi and S. Huang (2004). "Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor." Cytokine Growth Factor Rev 15(5): 297-324.
  - Xie, Y., P. Zong, W. Wang, D. Liu, B. Li, Y. Wang, J. Hu, Y. Ren, Y. Qi, X. Cui, Y. Chen, C. Liu and F. Li (2015). "Hypermethylation of potential tumor suppressor miR-34b/c is correlated

- with late clinical stage in patients with soft tissue sarcomas." *Exp Mol Pathol* 98(3): 446-454.
- Xin, H., Y. Li, Z. Liu, X. Wang, X. Shang, Y. Cui, Z. G. Zhang and M. Chopp (2013). "MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles." *Stem Cells* 31(12): 2737-2746.
  - Xu, J., T. Gong, B. C. Heng and C. F. Zhang (2017). "A systematic review: differentiation of stem cells into functional pericytes." *FASEB J* 31(5): 1775-1786.
  - Xu, J., H. Lu, Z. N. Miao, W. J. Wu, Z. J. Y, F. Ge, W. F. Fang, A. H. Zhu, G. Chen, J. H. Zhou, Y. Z. Lu, Z. F. Tang and Y. Wang (2016). "Immunoregulatory effect of neuronal-like cells in inducing differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 20(24): 5041-5048.
  - Xu, L., J. Long, C. Shi, N. Zhang, Y. Lv, J. Feng, A. Xuan, X. He, Q. Li, Y. Bai, S. Liu and D. Long (2018). "Effect of leukocyte inhibitory factor on neuron differentiation from human induced pluripotent stem cell-derived neural precursor cells." *Int J Mol Med* 41(4): 2037-2049.
  - Yagita, Y., T. Sakurai, H. Tanaka, K. Kitagawa, D. R. Colman and W. Shan (2009). "N-cadherin mediates interaction between precursor cells in the subventricular zone and regulates further differentiation." *J Neurosci Res* 87(15): 3331-3342.
  - Yam, G. H., E. P. Teo, M. Setiawan, M. J. Lovatt, N. Yusoff, M. Fuest, B. T. Goh and J. S. Mehta (2018). "Postnatal periodontal ligament as a novel adult stem cell source for regenerative corneal cell therapy." *J Cell Mol Med* 22(6): 3119-3132.
  - Yan, Z. J., P. Zhang, Y. Q. Hu, H. T. Zhang, S. Q. Hong, H. L. Zhou, M. Y. Zhang and R. X. Xu (2013). "Neural stem-like cells derived from human amnion tissue are effective in treating traumatic brain injury in rat." *Neurochem Res* 38(5): 1022-1033.
  - Yellamilli, A. and J. H. van Berlo (2016). "The Role of Cardiac Side Population Cells in Cardiac Regeneration." *Front Cell Dev Biol* 4: 102.
  - Ying, C., W. Hu, B. Cheng, X. Zheng and S. Li (2012). "Neural differentiation of rat adipose-derived stem cells in vitro." *Cell Mol Neurobiol* 32(8): 1255-1263.
  - Ying, Q. L., J. Nichols, I. Chambers and A. Smith (2003). "BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3." *Cell* 115(3): 281-292.
  - Yoo, S. and S. Blackshaw (2018). "Regulation and function of neurogenesis in the adult mammalian hypothalamus." *Prog Neurobiol* 170: 53-66.
  - Yoshimura, K., K. Sato, N. Aoi, M. Kurita, T. Hirohi and K. Harii (2008). "Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells." *Aesthetic Plast Surg* 32(1): 48-55; discussion 56-47.
  - Yousefi, B., D. Sanooghi, F. Faghihi, M. T. Joghataei and N. Latifi (2017). "Evaluation of motor neuron differentiation potential of human umbilical cord blood- derived mesenchymal stem cells, in vitro." *J Chem Neuroanat* 81: 18-26.
  - Yu, J. M., B. A. Bunnell and S. K. Kang (2011). "Neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells." *Methods Mol Biol* 702: 219-231.
  - Yu, L., W. Hong, H. Yang, Y. Y. Xia and Z. Feng (2020). "Gene Profiles in the Early Stage of Neuronal Differentiation of Mouse Bone Marrow Stromal Cells Induced by Basic Fibroblast Growth Factor." *Stem Cells Int* 2020: 8857057.
  - Yu, T., C. Zhao, S. Hou, W. Zhou, B. Wang and Y. Chen (2019). "Exosomes secreted from miRNA-29b-modified mesenchymal stem cells repaired spinal cord injury in rats." *Braz J Med Biol Res* 52(12): e8735.
  - Zanni, G., W. Michno, E. Di Martino, A. Tjarnlund-Wolf, J. Pettersson, C. E. Mason, G. Hellspång, K. Blomgren and J. Hanrieder (2017). "Lithium Accumulates in Neurogenic Brain Regions as Revealed by High Resolution Ion Imaging." *Sci Rep* 7: 40726.
  - Zarrinpour, V., Z. Hajebrahimi and M. Jafarinaia (2017). "Expression pattern of neurotrophins and their receptors during neuronal differentiation of adipose-derived stem cells in simulated microgravity condition." *Iran J Basic Med Sci* 20(2): 178-186.

- Zavan, B., L. Michelotto, L. Lancerotto, A. Della Puppa, D. D'Avella, G. Abatangelo, V. Vindigni and R. Cortivo (2010). "Neural potential of a stem cell population in the adipose and cutaneous tissues." Neurol Res 32(1): 47-54.
- Zavan, B., V. Vindigni, C. Gardin, D. D'Avella, A. Della Puppa, G. Abatangelo and R. Cortivo (2010). "Neural potential of adipose stem cells." Discov Med 10(50): 37-43.
- Zemel'ko, V. I., I. B. Kozhukharova, L. L. Alekseenko, A. P. Domnina, G. F. Reshetnikova, M. V. Puzanov, R. I. Dmitrieva, T. M. Grinchuk, N. N. Nikol'skii and S. V. Anisimov (2013). "[Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, adipose tissue and endometrium: a comparative study]." Tsitologiya 55(2): 101-110.
- Zemel'ko, V. I., I. V. Kozhukharova, Z. V. Kovaleva, A. P. Domnina, N. A. Pugovkina, Fridlianskaia, I., M. V. Puzanov, S. V. Anisimov, T. M. Grinchuk and N. N. Nikol'skii (2014). "[BDNF secretion in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, endometrium and adipose tissue]." Tsitologiya 56(3): 204-211.
- Zhang, B., N. Liu, H. Shi, H. Wu, Y. Gao, H. He, B. Gu and H. Liu (2016). "High glucose microenvironments inhibit the proliferation and migration of bone mesenchymal stem cells by activating GSK3beta." J Bone Miner Metab 34(2): 140-150.
- Zhang, H., L. Vutskits, M. S. Pepper and J. Z. Kiss (2003). "VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors." J Cell Biol 163(6): 1375-1384.
- Zhang, H., W. Zhang, G. Bai, L. Gao and K. Li (2021). "Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) Promotes Neuronal Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BMSCs) In Vitro." Biomed Res Int 2021: 7239783.
- Zhang, J., X. Lu, G. Feng, Z. Gu, Y. Sun, G. Bao, G. Xu, Y. Lu, J. Chen, L. Xu, X. Feng and Z. Cui (2016). "Chitosan scaffolds induce human dental pulp stem cells to neural differentiation: potential roles for spinal cord injury therapy." Cell Tissue Res 366(1): 129-142.
- Zhang, J. M., H. Wang, Y. Y. Fan and F. H. Yang (2021). "Effect of mesenchymal stem cells transplantation on the changes of oligodendrocyte lineage in rat brain with experimental autoimmune encephalomyelitis." Brain Behav 11(2): e01999.
- Zhang, L., L. C. Seitz, A. M. Abramczyk, L. Liu and C. Chan (2011). "cAMP initiates early phase neuron-like morphology changes and late phase neural differentiation in mesenchymal stem cells." Cell Mol Life Sci 68(5): 863-876.
- Zhang, M. (2002). "Toward re-expressing tumor suppressor gene maspin in breast cancer." Clin Breast Cancer 3(5): 353-354.
- Zhang, X., X. He, Q. Li, X. Kong, Z. Ou, L. Zhang, Z. Gong, D. Long, J. Li, M. Zhang, W. Ji, W. Zhang, L. Xu and A. Xuan (2017). "PI3K/AKT/mTOR Signaling Mediates Valproic Acid-Induced Neuronal Differentiation of Neural Stem Cells through Epigenetic Modifications." Stem Cell Reports 8(5): 1256-1269.
- Zhang, Y., M. Chopp, Z. G. Zhang, M. Katakowski, H. Xin, C. Qu, M. Ali, A. Mahmood and Y. Xiong (2017). "Systemic administration of cell-free exosomes generated by human bone marrow derived mesenchymal stem cells cultured under 2D and 3D conditions improves functional recovery in rats after traumatic brain injury." Neurochem Int 111: 69-81.
- Zhang, Y., Y. Yuan, P. Liang, X. Guo, Y. Ying, X. S. Shu, M. Gao, Jr. and Y. Cheng (2017). "OSR1 is a novel epigenetic silenced tumor suppressor regulating invasion and proliferation in renal cell carcinoma." Oncotarget 8(18): 30008-30018.
- Zhang, Y. J., W. Zhang, C. G. Lin, Y. Ding, S. F. Huang, J. L. Wu, Y. Li, H. Dong and Y. S. Zeng (2012). "Neurotrophin-3 gene modified mesenchymal stem cells promote remyelination and functional recovery in the demyelinated spinal cord of rats." J Neurol Sci 313(1-2): 64-74.
- Zhao, Y., H. Jiang, X. W. Liu, J. T. Chen, L. B. Xiang and D. P. Zhou (2015). "Neurogenic differentiation from adipose-derived stem cells and application for autologous transplantation in spinal cord injury." Cell Tissue Bank 16(3): 335-342.
- Zheng, B., B. Cao, G. Li and J. Huard (2006). "Mouse adipose-derived stem cells undergo multilineage differentiation in vitro but primarily osteogenic and chondrogenic differentiation in vivo." Tissue Eng 12(7): 1891-1901.

- Zheng, C., F. Q. Jin and M. Chalfie (2015). "Hox Proteins Act as Transcriptional Guarantors to Ensure Terminal Differentiation." Cell Rep 13(7): 1343-1352.
- Zhu, Y., T. Liu, K. Song, R. Ning, X. Ma and Z. Cui (2009). "ADSCs differentiated into cardiomyocytes in cardiac microenvironment." Mol Cell Biochem 324(1-2): 117-129.
- Zhuang, W. Z., Y. H. Lin, L. J. Su, M. S. Wu, H. Y. Jeng, H. C. Chang, Y. H. Huang and T. Y. Ling (2021). "Mesenchymal stem/stromal cell-based therapy: mechanism, systemic safety and biodistribution for precision clinical applications." J Biomed Sci 28(1): 28.
- Zimmerlin, L., A. D. Donnenberg, J. P. Rubin, P. Basse, R. J. Landreneau and V. S. Donnenberg (2011). "Regenerative therapy and cancer: in vitro and in vivo studies of the interaction between adipose-derived stem cells and breast cancer cells from clinical isolates." Tissue Eng Part A 17(1-2): 93-106.







UNIVERSIDAD  
DE GRANADA