



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE  
TRANSFERENCIACIÓN NEURAL DE CÉLULAS  
ESTROMALES MESENQUIMALES DE MÉDULA  
ÓSEA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**ALEJANDRO AGUILERA CASTREJÓN**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. GERARDO RAMOS MANDUJANO**

**MÉXICO, D.F.**

**2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**1. Datos del alumno**

Aguilera  
Castrejón  
Alejandro  
57 12 97 19  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
308316889

**2. Datos del tutor**

Doctor  
Gerardo  
Ramos  
Mandujano

**3. Datos del sinodal 1**

Doctora  
Marta Elena  
Castro  
Manreza

**4. Datos del sinodal 2**

Doctora  
Elizabeth  
Ortíz  
Sánchez

**5. Datos del sinodal 3**

Doctor  
Lenin David  
Ochoa  
De la Paz

**6. Datos del sinodal 4**

Maestro en Ciencias  
Daniel Edgar  
Cortés  
Pérez

**7. Datos del trabajo escrito**

Evaluación del potencial de transdiferenciación neural de células estromales mesenquimales de médula ósea  
98 p  
2015

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de Dr. Gerardo Ramos, en el laboratorio de la Dra. Herminia Pasantes de la división de neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, apoyado por el proyecto PAPIIT IN202313.

Quiero agradecer a mi tutor, el Dr. Gerardo Ramos. Por confiar en mi trabajo, por todo lo que me ha enseñado, su tiempo y dedicación. Por no buscar la manera más sencilla de enseñarme, sino la que más enriquezca mi formación, aprendizaje y me haga ser un mejor científico en el futuro. Por su paciencia y comprensión, por su apoyo y por ser mucho más que solo mi tutor de tesis, por alimentar mi pensamiento crítico y darme las bases más sólidas posibles que enriquezcan mi trabajo futuro.

A la Dra. Herminia Pasantes, por permitirme participar en este proyecto, formando parte de su grupo de trabajo como ayudante de investigador nacional emérito. Porque sin su apoyo, mi desarrollo en el campo de la investigación no habría sido posible.

A la UNAM y al instituto de Fisiología Celular, que se han convertido en mi casa. Al personal que labora en esta institución. Especialmente al personal de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM: Dra. Laura Ongay Larios, Biol. Guadalupe Códiz Huerta y M. en C. Minerva Mora Cabrera por el apoyo técnico en la realización de este trabajo. Al personal del bioterio: MVZ Claudia Rivera Cerecedo, M en IBB Gabriela Xóchitl Ayala Méndez y MVZ Hector Malagón por la provisión de los animales utilizados en este y previos estudios. Así como a los miembros de la unidad de cómputo del mismo instituto, sobre todo a Francisco Pérez Eugenio, por la asesoría prestada a lo largo del proyecto.

A la Dra. Marta Castro, el Dr. Lenin Ochoa, el M. en C. Daniel Cortés y la Dra. Elizabeth Ortíz, por darse el tiempo para la revisión de este trabajo y sus sugerencias para enriquecerlo. En especial a la Dra. Elizabeth, por todo lo que me ha apoyado y la confianza que ha tenido en mí.

A mis padres, por estar conmigo desde el día en que nací, y por todo el esfuerzo que hacen cada día para que yo esté aquí ahora. Sin ustedes jamás podría llegar a ningún lado. Aunque nunca podré pagarles todo lo que han hecho por mí, voy a hacerlos sentir orgullosos.

A mis amigos de la facultad, por hacer increíble mi camino en estos 4 años. Por apoyarme siempre, a pesar de mi constante ausencia. Estaré siempre ahí para ustedes, no importa cuanto tiempo pase ni en donde estemos. Porque los amigos son la familia que uno elige.

Nunca vayas por el camino trazado,  
Porque éste solo lleva a donde otros han ido ya.

Alexander Graham Bell

Que sea difícil no implica que sea imposible.  
Que sea imposible no implica que vaya a rendirme.

Domingo Edjang Moreno “El Chojin”

Dos opciones ahora se presentan:  
te dejas llevar o te frenas.  
Te puedes hundir en la pena  
o puedes luchar contra ella.  
Acepta la ayuda de fuera,  
pero no olvides que tu problema.  
Tú debes ser el que lo enfrenta,  
tú debes ser quien lo resuelva.  
Hay una salida que espera por cada  
laberinto en el que te metas,  
eres uno mientras la buscas  
y pasas a ser otro cuando la encuentras.  
Nunca es la misma persona aquella que  
sale que aquella que entra,  
cada experiencia te esculpe  
esculpir es quitar lo que sobra la fuerza.  
No busques finales de cuentos, los  
cambios ocurren y no hay moralejas.  
Si hay una cosa que sea cierta es que  
ninguna amargura es eterna.  
De las cenizas del fuego que consumió a  
aquel el hombre que yo era resurjo con  
fuerza.  
No es una pose, no lo hago para que me  
crean, es una certeza.  
No existe ese golpe que pueda dejarme  
tirado en la arena.  
No hasta que me muera, ya no,  
no hasta que sepa que cumplí mis metas.  
Soy yo, aquello que queda y no los  
recuerdos que la vida arranca y se lleva.  
Hoy sé que añoro montones de cosas  
y sé que nunca volveré a tenerlas.

El mundo sigue girando.  
Y soy un golpe más sabio,  
un golpe más realista,  
un golpe más preparado.  
El miedo es de sensatos,  
pero rendirse ante él es de mediocres,  
podré tener muchos fallos,  
pero no seré de los que se esconden.  
Vivir es la asignatura que estudias año

tras año, y no hay vacaciones,  
solo lecciones mi hermano,  
se aprende de los errores.  
Tampoco es que sea complicado,  
es cuestión de tiempo que te equivoques,  
Pero si he aprendido algo es que,  
todo depende de cómo lo enfoques.  
Confieso que he dudado,  
me hundí y desde ahí abajo,  
daba la sensación de que,  
no valía la pena intentarlo, pero...

¡Vuelvo!  
Renovado como el ave que nace del  
fuego, lleno de proyectos,  
quiero intentarlo de nuevo.  
Hoy prometo poner todo mi esfuerzo en  
hacerlo, siempre de acuerdo con lo que  
siento yo en cada momento.  
Contradictorio y complicado, así soy yo,  
con mis virtudes y pecados, pero yo.  
No hay una norma superior a la que dice  
que yo debo de mostrar valor y ánimo.  
Frente a los planes que no salen y la  
decepción,  
seré un ejemplo de completa  
determinación.  
Seré el corcho en la tormenta,  
aunque llueva,  
mi cabeza siempre atenta  
y siempre fuera.  
Nadie podrá ser capaz de hacer que no  
crea  
que tengo fuerza para hacer y pasar lo que  
sea.  
Aquí despido a los demonios del tipo que  
era  
y me quito la mochila que tenía llena de  
pedras.

Un nuevo yo despierta,  
un nuevo yo mejor de lo que era.  
He dejado que las cosas sucedieran  
pero vuelvo a ser yo el tipo que retoma el  
control de sus riendas.

Un nuevo enfoque, una nueva era,  
nueva promesa de enfrentar lo que quiera  
que venga.

Le digo adiós a la tristeza;  
gracias por la compañía pero debemos  
dejarlo princesa.

Hoy sé que la limitación estaba en mi  
cabeza, que la energía existía,  
existía aunque no la viera...  
Tenía derecho a descansar en mi ratito de  
pena, pero ya pasó.  
Cuando se muda lo de afuera, esto es lo  
que queda: ¡Energía!

Domingo Edjang Moreno “El Chojín”

## **DEDICATORIA**

Para mis padres, mi familia y mis amigos,  
Para la gente con la que compartí mi camino,  
Para los que me sonrían, para los que escribo,  
Esto es lo mejor que tengo, se los dedico.



## CONTENIDO

<b>PALABRAS CLAVE</b> .....	1
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>I. RESUMEN</b> .....	3
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
<b>III. ANTECEDENTES</b> .....	6
<b>Medicina regenerativa y células troncales para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas</b> .....	6
<i>Células troncales embrionarias humanas</i> .....	9
<i>Células troncales pluripotentes inducidas</i> .....	10
<i>Células troncales neurales adultas/fetales</i> .....	11
<i>Tejidos adultos no neurales</i> .....	13
<b>Células estromales mesenquimales de médula ósea</b> .....	14
<i>Biología de la médula ósea</i> .....	14
<i>Historia de las células estromales mesenquimales</i> .....	15
<i>Ontogenia de las BM-MSC</i> .....	17
<i>Caracterización</i> .....	19
<i>Potencial uso de las MSC en medicina regenerativa</i> .....	20
<i>Transdiferenciación y plasticidad</i> .....	22
<i>Transdiferenciación in vitro e in vivo de MSC hacia el linaje neuroectodérmico</i> .....	25
<b>Sistemas in vitro para el cultivo y expansión de células precursoras neurales</b> .....	32
<b>IV. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	35
<b>V. HIPÓTESIS</b> .....	37
<b>VI. OBJETIVOS</b> .....	38
<b>Objetivo general</b> .....	38
<b>Objetivos particulares</b> .....	38
<b>VII. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	39
<b>Cultivo y expansión de células estromales mesenquimales humanas</b> .....	39
<b>Inducción neural de hBM-MSC</b> .....	39
<b>Diferenciación neuronal</b> .....	40
<b>Determinación del número celular y viabilidad</b> .....	41
<b>Visualización de células viables y necróticas</b> .....	41
<b>Inmunocitoquímica</b> .....	42
<b>Incorporación de BrdU</b> .....	42

<b>Extracción de RNA</b> .....	43
<b>Síntesis de cDNA</b> .....	43
<b>Diseño de primers para qPCR</b> .....	43
<b>Curvas de eficiencia de los primers</b> .....	44
<b>Electroforesis en gel de agarosa</b> .....	44
<b>PCR cuantitativa en tiempo real</b> .....	44
<b>Análisis estadísticos</b> .....	45
<b>VIII. RESULTADOS</b> .....	46
<b>Morfología y generación de agregados similares a neuroesferas de hBM-MSC cultivadas en medios específicos</b> .....	46
<b>Incremento en el porcentaje de células positivas para el marcador nestina</b> .....	48
<b>Incremento dependiente del tiempo en el número de células positivas a nestina</b> .....	51
<b>Estandarización del análisis de cambios de expresión génica</b> .....	52
<i>Cambios en la expresión de genes asociados a células precursoras neurales y a células estromales mesenquimales</i> .....	56
<b>Análisis del ciclo celular y proliferación</b> .....	59
<b>Efecto de los tratamientos en la viabilidad de las hBM-MSC</b> .....	61
<b>Diferenciación neuronal de hBM-MSC</b> .....	63
<b>IX. DISCUSIÓN</b> .....	70
<b>Caracterización de las hBM-MSC</b> .....	70
<b>Transdiferenciación neural de hBM-MSC</b> .....	72
<i>Expresión de genes del linaje neural y mesenquimal</i> .....	72
<i>Proliferación y actividad del ciclo celular</i> .....	77
<i>Potencial de diferenciación en linajes del SNC</i> .....	80
<b>X. CONCLUSIONES</b> .....	83
<b>XI. REFERENCIAS</b> .....	84
<b>XII. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA</b> .....	95

## **PALABRAS CLAVE**

Células estromales mesenquimales de médula ósea; células precursoras neurales; diferenciación neural; transdiferenciación

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**AR:** Ácido retinoico

**BDNF:** Factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés *brain derived neurotrophic factor*

**βME:** β-mercaptoetanol

**BrdU:** Bromodeoxiuridina

**BSA:** Albúmina sérica bovina, del inglés *bovine serum albumine*

**cDNA:** DNA complementario, del inglés *complementary deoxyribonucleic acid*

**CFU-F:** Unidades formadores de colonias de fibroblastos, del inglés *colony forming units of fibroblasts*

**CMH:** Complejo mayor de histocompatibilidad

**CNTF:** Factor neurotrófico ciliar; del inglés *ciliar neurotrophic factor*

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**ES:** Error estándar

**ESC:** Células troncales embrionarias, del inglés *embryonic stem cells*

**DMEM:** Medio de Eagle modificado por Dubelcco, del inglés *Dubelcco's modified Eagle medium*

**hEGF:** Factor de crecimiento epidérmico humano, del inglés *human epidermal growth factor*

**hbFGF:** Factor de crecimiento fibroblástico básico humano, del inglés *human basic fibroblast growth factor*

**FN:** Fibronectina

**FSK:** Forskolina

**GDNF:** Factor neurotrófico derivado de la glia, del inglés *glial derived neurotrophic factor*

**GFAP:** Proteína glial ácida fibrilar, del inglés *glial fibrilar acidic protein*

**hBM-MSC:** Células estromales mesenquimales de médula ósea humanas, del inglés *human bone marrow mesenchymal stromal cells*

**HSC:** Células troncales hematopoyéticas, del inglés *hematopoietic stem cells*

**IGF:** Factor de crecimiento similar a la insulina del inglés *insulin-like growth factor*

**iPSC:** Células troncales pluripotentes inducidas, del inglés *induced pluripotent stem cells*

**MAP-2:** Proteína asociada a microtúbulos 2, del inglés *microtubule-associated protein 2*

**MCI:** Masa celular interna

**MD/B27:** Medio definido suplementado con B27

**MO:** Médula ósea

**MS1:** Proteína de unión a RNA Musashi-1

**NB/B27:** Medio Neurobasal suplementado con B27

**NeuN:** Antígeno específico del núcleo neuronal, del inglés *neuronal nuclei*

**NPC:** Células precursoras neurales, del inglés *neural precursor cells*.

**NSC:** Células troncales neurales, del inglés *neural stem cells*

**NSE:** Enolasa específica de neuronas

**PDL:** Poli-D-lisina

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*

**PMF:** Purmofamina

**rBM-MSC:** Células estromales mesenquimales de médula ósea de rata, del inglés *rat bone marrow mesenchymal stromal cells*

**SFB:** Suero fetal bovino

**SHH:** Sonic hedgehog

**SNC:** Sistema nervioso central

**SSC:** Células troncales somáticas, del inglés *somatic stem cells*

**TH:** Tirosin hidroxilasa

**Tub  $\beta$ -III:** Tubulina beta clase III

**ZSG:** Zona subgranular

**ZSV:** Zona subventricular

## I. RESUMEN

El trasplante de células troncales y/o progenitoras neurales se ha propuesto como una potencial terapia para el tratamiento de algunas enfermedades neurodegenerativas. Este tipo de células pueden ser aisladas directamente de tejido cerebral fetal, del cerebro adulto, o derivadas de ESC o iPSC. A pesar de ello, estas estrategias se ven limitadas por el bajo número de donadores, la toxicidad de los regímenes inmunosupresores, la baja accesibilidad al tejido, u otros problemas técnicos y limitaciones éticas. Las células estromales mesenquimales de médula ósea humana (hBM-MSC) se han propuesto como una posible fuente celular para el tratamiento de enfermedades neurológicas, debido su potencial de transdiferenciación hacia el linaje neuroectodérmico, además de la accesibilidad del tejido y su capacidad de expansión *in vitro*. Sin embargo, la diferenciación de las MSC hacia linajes no mesodérmicos aún es controversial. Por lo anterior, el presente estudio evaluó el potencial de las hBM-MSC para ser dirigidas a adoptar un destino neural inmaduro (células troncales y/o progenitoras neurales) al ser cultivadas en medios y factores que promueven la proliferación de precursores neurales. Bajo estas condiciones, las células presentaron cambios morfológicos y/o generaron agregados celulares en suspensión similares a neuroesferas. Tal proceso involucró el incremento de expresión en genes asociados a células troncales y progenitoras del linaje neural, como nestina y SOX2, acompañado por la disminución de algunos genes específicos de células mesenquimales. Las células mantuvieron la viabilidad, pero presentaron una limitada capacidad de proliferación. Además, en condiciones de diferenciación neuronal las células desarrollaron una morfología que asemeja a células neuronales inmaduras, positivas para el marcador característico de neuronas  $\beta$ -III tubulina. Mientras que protocolos de diferenciación neuronal directa de las MSC no fueron capaces de inducir cambios importantes en morfología o marcadores de linajes del SNC. Estos resultados demuestran que en las condiciones evaluadas, las células estromales mesenquimales de médula ósea tienen un potencial de transdiferenciación parcial, al no adquirir todas las propiedades fisiológicas que poseen las células precursoras neurales.

## II. INTRODUCCIÓN

El incremento en la esperanza de vida de la población está acompañada por una mayor prevalencia de enfermedades crónicas asociadas con la edad, las cuales representarán un reto mayor para los sistemas de salud en los próximos años, principalmente las enfermedades metabólicas, cardiovasculares y neurodegenerativas (Lang, 2010; Syngec, 2013). Éstas últimas son un grupo heterogéneo de padecimientos con una característica final común, la disfunción y pérdida aguda o crónica de células neuronales o gliales (Moraleda et al, 2011). En muchos tejidos adultos, la pérdida celular debida a procesos naturales o daño tisular es balanceada por la proliferación y diferenciación de células troncales, sin embargo, el sistema nervioso central (SNC) posee una limitada capacidad de regeneración ante lesiones agudas o crónicas. Aunado a esto, los actuales tratamientos para este tipo de enfermedades son limitados y tienen poco impacto en la salud de los pacientes a largo plazo (Lescaudron et al, 2012). Por estas razones, la terapia de remplazo celular con células troncales se ha sugerido como una alternativa atractiva para la restauración de la funciones neurológicas en pacientes con enfermedades neurodegenerativas (Nivet et al, 2011; Lemmens et al, 2013).

Se han propuesto una gran variedad de fuentes de células troncales y progenitoras para el tratamiento de este tipo de enfermedades, entre ellas las células troncales neurales (NSC) adultas o fetales, células troncales embrionarias (ESC) y células pluripotentes inducidas (iPSC) han mostrado gran potencial de restauración neuronal en varios modelos animales y en humanos (Olanow et al, 2003; Méndez et al, 2008; Chambers et al, 2009; Yu et al, 2013; Hemmer et al, 2014). Lo anterior, sumado a los avances obtenidos en los estudios *in vivo* e *in vitro* de la biología de células troncales, han llevado a plantear la posibilidad de restaurar las poblaciones de neuronas afectadas en enfermedades neurodegenerativas, mediante el trasplante de células progenitoras y/o diferenciadas generadas *in vitro* (Li et al, 2013). Sin embargo, las limitaciones éticas y/o técnicas asociadas a las iPSC, ESC y NSC adultas o fetales humanas, han potenciado la búsqueda de estrategias basadas en trasplantes de células troncales adultas, obtenidas de fuentes clínicamente accesibles, que además carezcan de limitaciones éticas y eliminen la necesidad de inmunosupresión (Roisen et al, 2001; Nivet, et al, 2011).

Entre las células troncales/progenitoras humanas propuestas para este fin se encuentran las células estromales mesenquimales (MSC). Un gran número de reportes indican que, bajo las condiciones experimentales adecuadas las MSC poseen la capacidad de transdiferenciación en linajes endodérmicos y derivados del neuroectodermo (Phinney et al, 2007; Kuroda et al, 2011). Recientemente, a partir de MSC se han generado células con marcadores de células progenitoras neurales, así como células con marcadores de neuronas, y características funcionales de neuronas específicas (Trzaska et al, 2007; Yang et al, 2008; Neirinckx et al, 2013). Al mismo tiempo, las células estromales mesenquimales de médula ósea humana (hBM-MSC por sus siglas en inglés) representan un tejido accesible y de alta capacidad de expansión para proveer de células multipotentes para un posible trasplante autólogo. Sin embargo, a pesar de los avances en este campo de investigación, aún existen muchas interrogantes sobre la capacidad de transdiferenciación neural de las MSC. Por éstas razones, la presente investigación buscó determinar el potencial de transdiferenciación de las hBM-MSC en células troncales/progenitoras neurales, comparando sus características fisiológicas con las reportadas en células precursoras neurales. Se evaluó la generación de agregados similares a neuroesferas, la capacidad de expansión de la población, actividad del ciclo celular, viabilidad, el perfil de expresión de algunos genes neurales y mesenquimales, así como su capacidad de diferenciación hacia el linaje neuronal y/o glial.

### **III. ANTECEDENTES**

#### **Medicina regenerativa y células troncales para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas**

El envejecimiento está asociado con un fallo progresivo en los procesos de reparación de los tejidos del organismo, lo cual lleva a un gran número de desórdenes asociados con la edad. La medicina regenerativa es un campo de investigación y aplicaciones clínicas que tiene como objetivo la reparación, sustitución o regeneración de las células, tejidos u órganos, para restaurar las funciones biológicas alteradas, ya sea debido a una malformación congénita, lesión, o como consecuencia del envejecimiento o enfermedad (Kassem, 2006; Mayani H, 2011). De manera general, existen dos estrategias para repoblar el área afectada con células específicas: i) El remplazo de las células perdidas o dañadas mediante el trasplante de células diferenciadas, o una población de células indiferenciadas con capacidad de generar uno o más tipos celulares específicos y ii) activando los mecanismos de reparación endógenos, a través de la inducción de la proliferación y diferenciación de células presentes en el tejido mediante tratamientos farmacológicos (Meyer et al, 2010).

La regeneración del sistema nervioso requiere de la reparación o remplazo de células nerviosas dañadas, por lo que el remplazo funcional de poblaciones de neuronas específicas, a través del trasplante del tejido neural representa la estrategia terapéutica más atractiva para el tratamiento de enfermedades neurológicas. Sin embargo, aún no se ha encontrado la fuente celular apropiada para este fin (Levy et al, 2004; Steward et al, 2013). Con el propósito de la regeneración tisular a partir estrategias de terapia celular, muchos esfuerzos se han enfocado en el uso de células troncales como una fuente de remplazo celular (Steward et al, 2013).

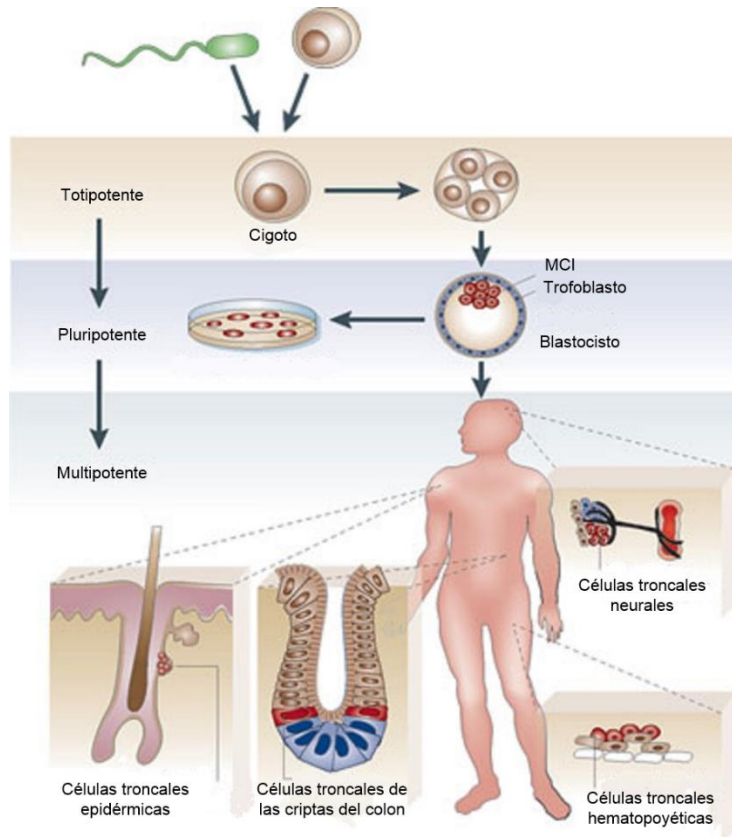
Las células troncales son células indiferenciadas que forman, mantienen y regeneran los tejidos y órganos en los que residen (Weissman, 2000). Las características que definen a una célula troncal son su habilidad para proliferar y auto-renovarse (generar células idénticas a sí misma), así como su capacidad de diferenciación en tipos celulares más especializados (Ahmed, 2009). Estas propiedades les confieren un gran potencial para su uso en terapias de remplazo celular. Existen muchos tipos de células troncales de distintas fuentes y con diferente potencial de diferenciación, desde las pluripotentes hasta las células troncales



adultas órgano específicas; cuyas diferencias entre poblaciones pueden tener un impacto en su potencial uso en la medicina regenerativa (Helmy et al, 2010).

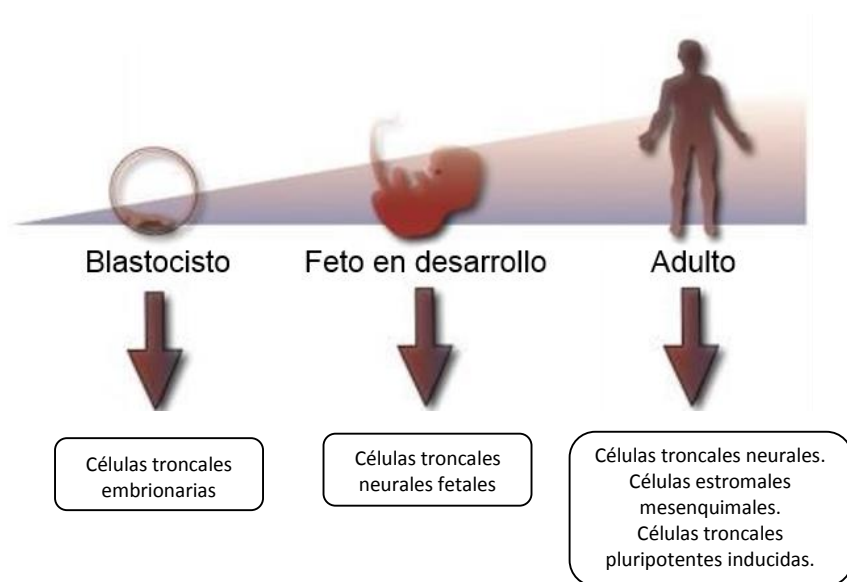
A lo largo del desarrollo de los mamíferos se generan diversos tipos de células troncales. De acuerdo a su potencial de diferenciación se clasifican en totipotentes, pluripotentes y multipotentes. Las células troncales totipotentes son producidas de la fusión de un ovocito y una célula espermática (es decir, el huevo fertilizado o cigoto) tienen la habilidad de dar lugar a todos los tipos celulares de un organismo, tanto embrionarios como extra-embrionarios (placenta, saco vitelino y cordón umbilical) (Figura 1). Las células troncales pluripotentes tienen la capacidad de generar células derivadas de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo). Por ejemplo, las ESC son células pluripotentes derivadas de la masa celular interna del blastocisto. Continuando en el desarrollo, a partir de las ESC se producen diferentes células troncales somáticas (SSC). Estas células son consideradas multipotentes, al poder diferenciarse en diversos linajes celulares dentro de un mismo tejido, o unipotentes, cuando son capaces de producir solo un tipo celular, conservando la capacidad de auto-renovación (Figura 1) (Avasthi et al, 2008; Mayani, 2011). Se han identificado SSC en casi todos los órganos del cuerpo humano, las cuales son mantenidas bajo un estricto control de crecimiento, y juegan un papel importante en el desarrollo, homeostasis y enfermedad (Ahmed, 2009).

La aplicación clínica del trasplante de células troncales y progenitoras comenzó después de la detección del daño letal de médula ósea causado a poblaciones civiles por la exposición a dosis de radiación (Revisado en Weissman, 2000). Se observó que ratones irradiados replicaban el síndrome, y trasplantes de médula ósea eran capaces de restablecer la hematopoyesis (Hollingsworth, 1958). En 1961, Till y McCulloch demostraron la existencia de precursores clonogénicos en la médula ósea con capacidad de generación de colonias hematopoyéticas multi-linaje en el bazo (unidades formadoras de colonias de bazo), las cuales tenían la propiedad de auto-renovación y diferenciación multi-linaje. (Till & McCulloch, 1961).



**Figura 1.** Jerarquía de las células troncales. El cigoto totipotente formado por la fusión de un ovocito y un espermatozoide atraviesa un proceso de división para formar la masa celular interna (MCI) y el trofoblasto del blastocisto. Células de la MCI pueden ser mantenidas *in vitro* como células pluripotentes (ESC). Durante el desarrollo del embrión, las células pluripotentes se restringen en su potencial de diferenciación y forman células troncales multipotentes tejido-específicas, entre las que se incluyen las células troncales epidérmicas, hematopoyéticas, neurales y gastrointestinales. Modificado de Eckfeldt et al, 2005.

En el caso de las patologías neuronales, estudios en modelos animales y ensayos clínicos preliminares han comenzado a elucidar la utilidad de las terapias basadas en células troncales para prevenir o reparar lesiones cerebrales. Predominantemente, células troncales neurales se han derivado de tejido neural adulto, embrionario o fetal, así como de células de origen no neural como las células troncales pluripotentes inducidas (iPSC), ESC o MSC (Figura 2).



**Figura 2.** Las fuentes celulares posibles para la investigación y desarrollo de terapias de reemplazo celular para tratar desórdenes del SNC pueden ser derivadas de tejido de origen embrionario (ESC), fetal (NSC) o adulto (NSC, MSC, iPSC). Modificado de Hall et al, 2007.

### *Células troncales embrionarias humanas*

Las ESC poseen muchas de las características de una fuente óptima para terapias de reemplazo celular. Tienen un potencial proliferativo casi ilimitado y pueden diferenciarse *in vitro e in vivo* en células precursoras neurales o neuronas diferenciadas, las cuales muestran propiedades morfológicas y electrofisiológicas, además de integración funcional en modelos animales (Björklund et al, 2002; Kim et al, 2002). Sin embargo, a pesar que estos resultados alientan el uso de ESC en terapia celular, existen problemas asociados al uso de estas células. Muchos estudios reportan formación de teratomas (tumores compuestos de múltiples tejidos que derivan de más de una capa embrionaria) como consecuencia de trasplantes (Brederlau et al, 2006; Dressel et al, 2008). Además, la investigación con células embrionarias humanas implica limitaciones éticas al involucrar la destrucción de un blastocisto. Otro problema potencial es el riesgo de rechazo inmunológico del trasplante, así como la baja estabilidad fenotípica y sobrevivencia de las células trasplantadas (Ben-Hur, 2006; Roy et al, 2006; Meyer et al, 2010).

### *Células troncales pluripotentes inducidas*

Las limitaciones éticas en el uso de las ESC impulsaron la búsqueda de otras fuentes de células pluripotentes con potencial uso en medicina regenerativa. Esto llevó al desarrollo de la reprogramación de células somáticas a un estado similar al embrionario. A pesar que, células somáticas pueden ser reprogramadas a un estado embrionario mediante fusión con ESC, o a través de la técnica de transferencia nuclear de célula somática (Gurdon, 1962), estas metodologías presentan también problemas éticos. Recientemente, Takahashi y Yamanaka (2006) demostraron que la expresión ectópica de factores de transcripción puede reprogramar una célula somática a un estado pluripotente, generando células casi indistinguibles a las ESC, denominadas células troncales pluripotentes inducidas (iPSC). Esto ha permitido la posibilidad de generar células pluripotentes paciente específicas que pueden utilizarse para terapias de remplazo celular o como modelo de algunas enfermedades, eliminando el rechazo inmunológico y los problemas bioéticos del uso de embriones humanos (Swistowski et al, 2010; Denham y Dottori, 2011). Se ha demostrado que las iPSC pueden expandirse indefinidamente *in vitro*, y son capaces de diferenciarse en neuronas similares a las generadas con ESC, en cuanto a curso temporal, eficiencia de generación y patrones de expresión génica en respuesta al mismo conjunto de morfógenos (Hu et al, 2010; Swistowski et al, 2010; Peng y Zeng, 2011). Además, las neuronas derivadas de iPSC muestran integración funcional y mejoran los déficits de comportamiento en modelos de ratones parkinsonianos, entre otras enfermedades (Roy et al, 2006; Meyer et al, 2010; Peng y Zeng, 2011).

La terapia basada en iPSC ofrece nuevas oportunidades terapéuticas, pero aún existen numerosos desafíos antes que las neuronas derivadas iPSC puedan ser utilizadas en aplicaciones clínicas. Por ejemplo, es posible que los vectores virales utilizados para la inserción de los factores de reprogramación se integren en el genoma de la célula, lo que puede llevar a la alteración de la función de genes celulares en el sitio de integración, provocando la activación de oncogenes, que pueden promover la tumorigénesis. Además, se ha encontrado que las iPSC pueden conservar características epigenéticas residuales de las células de origen (memoria epigenética), restringiendo su destino de diferenciación (Pan et al, 2012). De igual manera, las células diferenciadas a partir de iPSC derivadas de un paciente

poseen una capacidad intrínseca de desarrollar una patología similar a la que éste presenta (Barker, 2014). Finalmente, el proceso de reprogramación y cultivo puede inducir cambios en el número de copias, mutaciones puntuales y/o patrones anormales de metilación (Peng y Zeng, 2011; Pan et al, 2012).

### *Células troncales neurales adultas/fetales*

El descubrimiento de NSC en el cerebro adulto de los mamíferos rompió con la creencia que la neurogénesis está restringida al desarrollo embrionario y a etapas postnatales tempranas. La neurogénesis en el cerebro adulto ocurre principalmente en dos regiones, el giro dentado del hipocampo y la zona subventricular de los ventrículos laterales (Álvarez-Buylla et al, 2008). Las NSC se definen como células clonogénicas con capacidad de auto-renovación y diferenciación en los tres principales tipos celulares del SNC: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. El descubrimiento de NSC, migración e integración de nuevas neuronas en los circuitos neurales en el cerebro adulto, abrió la posibilidad de considerar a las NSC adultas como herramientas novedosas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Baizabal et al, 2003; Hall et al, 2007; Obernier, 2014).

Las NSC humanas trasplantadas en el cerebro embrionario, postnatal o adulto, han mostrado evidencia confiable de diferenciación sitio específica, adquiriendo morfologías y fenotipos neuroquímicos de acuerdo al sitio de integración (Baizabal et al, 2003). Por el contrario, muchos otros estudios han demostrado que los análisis de diferenciación *in vitro* no predicen su potencial de diferenciación *in vivo*. Las NSC de la zona subventricular trasplantadas en el estriado y corteza muestran limitada sobrevivencia, y principalmente se diferencian en astrocitos, mientras que la diferenciación neuronal solo se observa si las células se trasplantan en el bulbo olfatorio (Baizabal et al, 2003). Es decir, las NSC en el cerebro adulto son heterogéneas y región específicas. Células aisladas de diferentes regiones del cerebro adulto mantienen ciertos aspectos de su especificación molecular, expresan marcadores determinados, difieren en su capacidad de proliferación, migración y generan progenie característica de la región de origen. Así, las células precursoras neurales del cerebro anterior generan más neuronas gabaérgicas, mientras que las obtenidas del cerebro

medio se diferencian en neuronas dopaminérgicas maduras (Kallur et al, 2006; Meyer et al, 2010; Obernier, 2014). Un escenario más probable en el trasplante de NSC es que estas actúen como células de soporte, suministrando factores neurotróficos que interactúan con las células del hospedero, promoviendo la regeneración y supervivencia neuronal (Ahmed, 2009).

Antes que las NSC puedan ser utilizadas para reemplazar las células neurales perdidas en trauma o enfermedad, debemos entender cómo cambian éstas a través del tiempo, ya que difieren en morfología, perfiles de expresión genética y producen distinta progenie en distintos tiempos a lo largo del desarrollo. Las NSC crecidas en cultivo durante un tiempo determinado producen cierta progenie, y después de varios días más las células no son capaces de producir los tipos celulares generados más tempranamente (Merkle y Álvarez-Buylla, 2006). Las limitaciones técnicas son otro problema asociado al uso de las NSC adultas humanas en protocolos de terapia celular, ya que su localización dentro del SNC hace imposible su remoción sin causar un daño permanente para el donador (Roisen et al, 2001).

El cerebro fetal humano es otra fuente potencial de NSC. La mayoría de los estudios *in vitro* utilizan fetos de 12-20 semanas post-fertilización (Meyer et al, 2010). Kallur y cols. (2006) han reportado la diferenciación de NSC de corteza y estriado obtenidas de fetos humanos *in vitro*, así como la supervivencia, migración y diferenciación región específica de estas células en modelos *in vivo*. Igualmente, NSC fetales de humano y roedor se han trasplantado exitosamente en modelos animales con enfermedad de Parkinson, observándose supervivencia, migración y diferenciación, promoviendo recuperación histológica, bioquímica y funcional; sin observarse tumorigenicidad (Meyer et al, 2010). Análisis post-mortem de pacientes trasplantados con neuronas de cerebro medio fetal demostraron la supervivencia y re-inervación del estriado, aunque pocos pacientes mostraron mejoría clínica (Méndez et al, 2008; Meyer et al, 2010). Aunque las NSC tienen una capacidad de diferenciación más limitada en comparación con las ESC, se ha propuesto que el uso de células comprometidas puede ser más beneficioso en este tipo de terapias. Sin embargo, los problemas éticos asociados a la utilización de fetos humanos, así como la posibilidad de

rechazo inmunológico del tejido, limitan en gran medida la utilización de este tipo de células (Meyer et al, 2010).

### *Tejidos adultos no neurales*

La médula ósea ha recibido considerable atención en este sentido, debido a la presencia de poblaciones multipotentes residentes en el componente estromal de este tejido. Entre estas se incluyen las MSC (células estromales mesenquimales o células troncales mesenquimales), células adultas multilinaje aisladas de médula (marrow-isolated adult multilineage cells, MIAMI) y las células multipotentes progenitoras adultas (multipotent adult progenitor cells, MAPC). Un gran número de evidencias sugieren que este tipo de células troncales pueden atravesar la barrera del compromiso germinal, diferenciándose hacia tipos celulares del endodermo o ectodermo (Meyer et al, 2010). A diferencia de otros tipos de células troncales, las hBM-MSK son fáciles de aislar, no representan problemas éticos y pueden ser expandidas por un largo periodo de tiempo. Muchos autores han afirmado que bajo condiciones pro-neurogénicas, después de la exposición a factores exógenos, algunas de estas células asumen morfología de células gliales o neuronales, expresan marcadores del neuroectodermo como nestina, tubulina  $\beta$ -III, GFAP ó NF200, y presentan funciones de neuronas diferenciadas; aunque con poca evidencia de comunicación a través de sinapsis (Hall et al, 2007). Además, se ha demostrado que células con características de NPC pueden ser seleccionadas y expandidas *in vitro* a partir de MSC de médula ósea o cordón umbilical. Estas células expresan nestina (marcador asociado a células troncales y progenitoras neurales) y, en presencia de los factores de crecimiento adecuados o en condiciones de co-cultivo con células neurales, pueden ser diferenciadas hacia células similares a neuronas, astrocitos u oligodendrocitos. Además, animales con enfermedades cerebrales como isquemia o enfermedad de Parkinson demuestran mejoras conductuales o histológicas después de ser trasplantados con neuronas derivadas de MSC. No obstante, la veracidad de algunos de estos resultados ha sido cuestionada debido a cuestiones técnicas o de diseño experimental (Meyer et al, 2010).

Las propiedades terapéuticas de las MSC en las enfermedades neurodegenerativas no están basadas únicamente en el supuesto potencial de diferenciación neural, sino también en su capacidad de liberación de factores neurotróficos que pueden potenciar los mecanismos endógenos de regeneración. Además de sus efectos inmunomodulatorios y anti-inflamatorios, así como su capacidad de migración e integración en el tejido neural dañado (Meyer et al, 2010; Kuroda et al, 2011; Wakao et al, 2012; Liu et al, 2013).

## **Células estromales mesenquimales de médula ósea**

### *Biología de la médula ósea*

La médula ósea (MO) es la mayor fuente de células troncales adultas. Alberga principalmente dos tipos de células troncales. i) Las células troncales hematopoyéticas (HSC) son las células precursoras que dan lugar a todos los tipos celulares sanguíneos, que incluyen el linaje linfoide (linfocitos B, linfocitos T, células NK y algunas células dendríticas derivadas de este linaje) y mieloide (macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos, monocitos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas y células dendríticas) (Avasthi et al, 2008). ii) Las células estromales mesenquimales (BM-MSK) descritas como células multipotentes de la médula ósea, capaces de diferenciarse en células del linaje mesodérmico, como fibroblastos, adipocitos, condrocitos y osteoblastos (Flores-Figueroa et al, 2006).

La MO está conformada por tres componentes celulares principales: el hematopoyético, el mesenquimal y el endotelial. El componente hematopoyético se conforma por las HSC y su progenie. El componente mesenquimal se genera a partir de las MSC. El componente vascular se conforma de células endoteliales originadas a partir de un angioblasto, relacionado desde su origen con las HSC. Estos componentes se distribuyen en tres zonas espaciales: el parénquima formado por elementos hematopoyéticos y adipocitos, la zona endosteal y trabecular formada por osteoblastos y osteoclastos, y finalmente la zona vascular constituida por arteriolas, capilares y sinusoides (Saldívar-Santoyo et al, 2013).

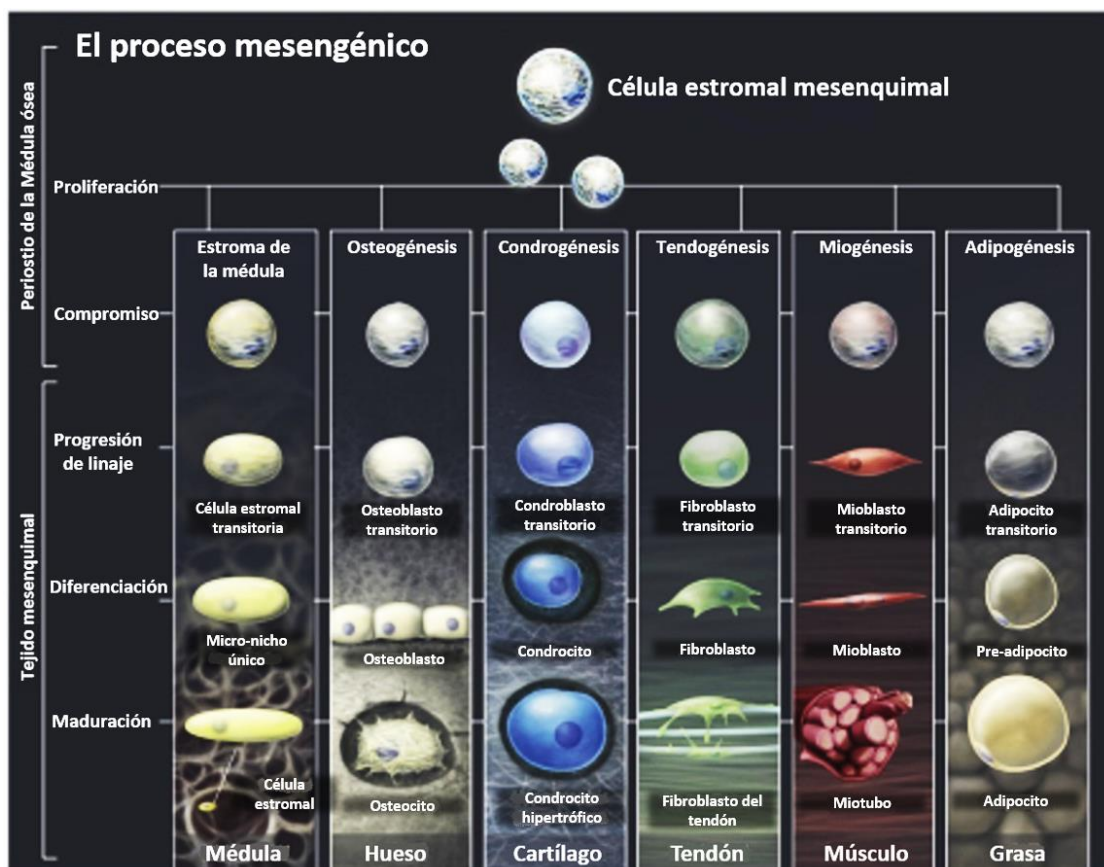


## *Historia de las células estromales mesenquimales*

El estudio de MSC puede ser rastreado hasta experimentos clásicos realizados por Goujon en 1869, demostrando que trasplantes de MO en sitios anatómicos heterotópicos resultan en la generación de hueso y médula ectópicos. Sin embargo, fueron Tabassoli y Crosbi en 1968 quienes establecieron claramente pruebas del inherente potencial osteogénico de la MO. No obstante, debido a que estos estudios se realizaron con fragmentos completos de la MO, la identidad precisa de la célula que originara a las células de hueso diferenciadas no había sido descrita (Bianco et al, 2008).

El descubrimiento de las MSC se atribuye a Alexander Friedenstein y colaboradores (Friedenstein et al, 1966, 1970), quienes en una serie de estudios entre las décadas de 1960 y 1970, utilizando ratones y cobayos, demostraron que fragmentos de la MO trasplantados bajo la cápsula renal tenían la capacidad de formar tejido óseo heterotópico con el potencial de auto-mantenerse, auto-renovarse y de soportar la hematopoyesis en el hospedero (Prockop et al, 2008). Posteriormente, mostraron que la actividad de formación ósea estaba contenida dentro de la fracción fibroblastoide, en una población de células que formaban parte del estroma medular, distinguidas de la fracción hematopoyética por su preferente adherencia a las placas de cultivo y su capacidad de establecer de manera clonal colonias de fibroblastos. Dichas células fueron denominadas como mecanocitos estromales o unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F) (Friedenstein et al, 1974; Friedenstein, 1976; Flores-Figueroa et al, 2006; Bianco et al, 2008; Boxall y Jones, 2012). Después de su implantación *in vivo* dentro de cámaras de difusión, las CFU-F generaban múltiples tejidos esqueléticos (hueso, cartílago, tejido adiposo, tejido fibroso) (Friedenstein et al, 1987). Por ello, Friedenstein denominó a estas células “progenitores osteogénicos determinados”, y más tarde junto con Maureen Owen acuñó el término células troncales osteogénicas o células troncales estromales de médula ósea (Owen y Friedenstein, 1988; Bianco et al, 2001; Bianco et al, 2008; Boxall y Jones, 2012;).

Los subsecuentes hallazgos sobre la multipotencialidad de éstas células hacia otros linajes mesenquimales llevaron a Arnold Caplan a proponer el término células troncales mesenquimales, y nombrar a este proceso mesengénesis (Figura 3) (Caplan, 1991). Recientemente, se ha sugerido emplear el término células estromales mesenquimales para la población heterogénea de células adherentes al plástico, mientras que el término células troncales mesenquimales debe ser reservado para una subpoblación de éstas células, que demuestren capacidad de autorenovación y diferenciación multi-linaje (Horwitz et al, 2005).



**Figura 3.** El proceso mesengénico. Las MSC tienen una localización perivascular en la médula ósea y diversos tejidos y su progenie puede ser inducida a diferenciarse en uno o más linajes mesenquimales. La figura muestra el modelo de la jerarquía de diferenciación de los más prominentes linajes derivados de las MSC. Modificado de Caplan y Correa, 2011.

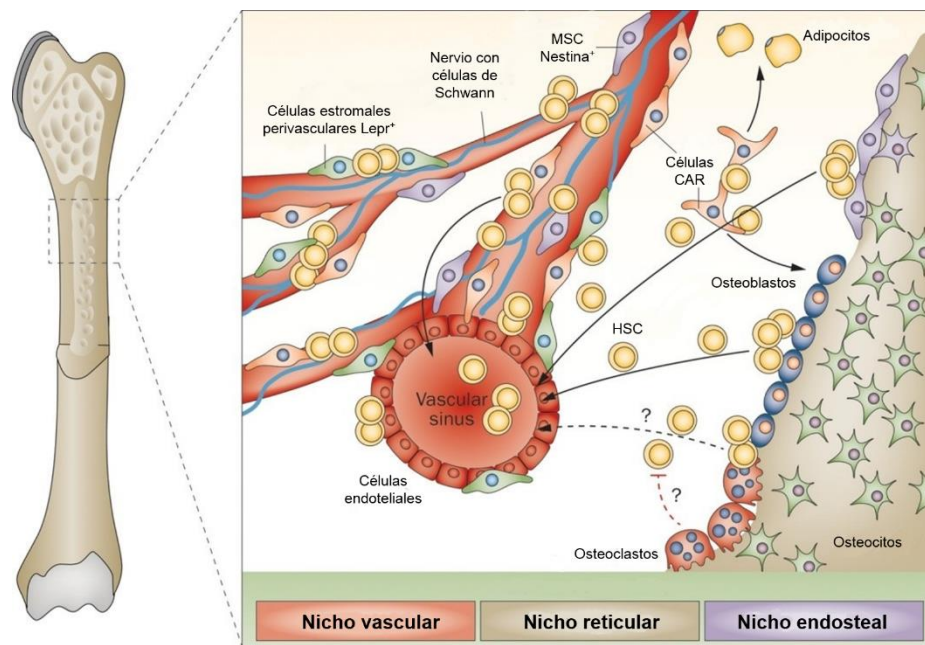
### *Ontogenia de las BM-MSc*

A pesar que se ha asumido el origen mesodérmico de las MSC, Takahashi (2007) mostró recientemente que las BM-MSc en el desarrollo se originan en distintas ondas, con la primera y segunda ondas derivadas del neuroepitelio y la cresta neural. Esto podría explicar su potencial de diferenciación neuroectodérmico (Uccelli et al, 2008). Sin embargo, aunque las células reclutadas de este origen siguen presentes en la MO postnatal, éstas decrecen en número y son remplazadas por MSC de origen desconocido, probablemente mesodérmicas (Takashima et al, 2007; Miller, 2007; Uccelli et al, 2008). También se ha sugerido un origen múltiple de las MSC debido a que diferentes estructuras óseas se derivan de distintas capas germinales. Por ejemplo, los huesos craneofaciales son generados del neuroectodermo, mientras que los huesos axiales y apendiculares se derivan del mesodermo paraxial y lateral.

En el desarrollo temprano de los vertebrados la cresta neural se especifica a partir del ectodermo embrionario. Una vez especificada, atraviesa un proceso de transición epitelio-mesénquima. Las células delaminan del pliegue neural y migran por diversas rutas para diferenciarse en una variedad de tipos celulares, incluyendo neuronas, células de la glía del sistema nervioso periférico, además de hueso y cartílago craneofaciales (Morikawa et al, 2009; Wislet-Gendebien et al, 2012).

En la MO adulta, una variedad de células mesenquimales regulan a las HSC. Isern y cols. (2014) examinando la MO de huesos largos en ratones postnatales, mostraron que una subpoblación de MSC nestina negativas derivadas del mesodermo están involucradas en la osificación endocondral, perdiendo su actividad de célula troncal en el proceso. En contraste, una distinta población de MSC caracterizadas por la expresión de nestina se desarrolla de la cresta neural (el mismo grupo de células que dan origen a las células de sistema nervioso), estas no contribuyen a la endocondrogénesis fetal, pero mantienen su troncalidad durante la vida adulta y son un componente esencial del nicho de las HSC. Las MSC nestina positivas son estrictamente perivasculares y se asocian con las HSC, constituyendo el denominado nicho reticular (Figura 4). Este tipo de MSC se encuentra típicamente en el parénquima de la médula, y con menor frecuencia en el endostio. Además están estrechamente asociadas con las fibras adrenérgicas del sistema nervioso simpático (Méndez-Ferrer et al, 2010; Ehninger

y Trumpp, 2011; Saldívar-Santoyo et al, 2013). Omatsu y cols (2010) describieron una población de MSC productoras de la quimiosina SDF-1 (factor derivado del estroma) o CXCL12, esencial para el “homing” y mantenimiento de las HSC, a la cual denominaron célula reticular con abundante CXCL12 (CAR por sus siglas en inglés). Las CAR son más abundantes que las MSC nestina<sup>+</sup>, y se localizan en áreas centrales de la médula o bien, asociadas al endotelio sinusoidal (Figura 4) (Ehninger y Trumpp, 2011; Saldívar-Santoyo et al, 2013).

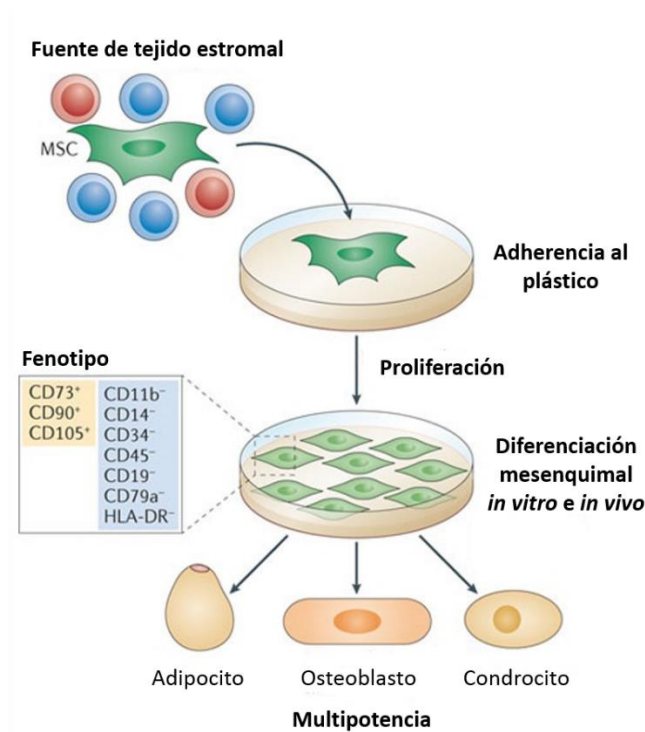


**Figura 4.** Localización de las MSC en la médula ósea. Tres tipos de nichos hematopoyéticos, el endosteal (conteniendo osteoblastos), vascular (con células estromales perivasculares Lepr<sup>+</sup>) y reticular (conteniendo células CAR y MSC nestina<sup>+</sup>) se han reportado en ratón y humano. Se aprecia la preferente localización perivascular de las distintas subpoblaciones de MSC. Modificado de Takayanagi, 2012.

### *Caracterización de las MSC*

La morfología de las MSC es muy heterogénea, mayoritariamente presentan una morfología fibroblastoide o fusiforme, y en una menor proporción son células con morfología romboide (Flores-Figueroa et al, 2006). A la fecha no existe una molécula única que permita la purificación de este tipo celular. Los primeros marcadores de las MSC fueron propuestos en un estudio realizado por Pittenger y cols. (1999), quienes también desarrollaron los primeros ensayos robustos y reproducibles *in vitro* para demostrar la multipotencialidad de estas células, diferenciándolas hacia hueso, cartílago y tejido adiposo. Estos marcadores incluían a SH2 y SH3, anticuerpos que hoy se sabe reconocen a los antígenos CD105 (Endogлина) y CD73 (Ecto-5 nucleotidasa), respectivamente (Flores-Figueroa et al, 2006; Boxall y Jones, 2012).

Debido a la heterogeneidad de los métodos de expansión y purificación de estas células, recientemente, la sociedad internacional para la terapia celular ha propuesto tres criterios para definir la identidad de las MSC. Primeramente, deben ser células adherentes al plástico mantenidas en métodos estándar de cultivo. Segundo, >95% de la población debe expresar CD105, CD73 y CD90, sumado a la ausencia (<2% de células positivas) del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II, marcadores de células del linaje hematopoyético como CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD43, CD56, CD133, CD68, CD79a o CD19 y células endoteliales (CD31) y expresar bajos niveles de CMH-I. Finalmente, las células deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos (Figura 5) (Dominici et al, 2006; Flores-Figueroa et al, 2006; Boxal y Jones, 2012).



**Figura 5.** Caracterización de las MSC. En cultivo las MSC pueden ser aisladas de otros tipos celulares por su adherencia a las cajas de cultivo plásticas, fenotipo y diferenciación *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos. Modificado de Le Blanc y Mougiakakos, 2012.

Las MSC, a pesar de haber sido descritas inicialmente en la MO, también se distribuyen en muchos otros órganos y tejidos fetales, perinatales y adultos. Entre ellos la placenta, el líquido amniótico, la sangre de cordón umbilical, los folículos pilosos, el endotelio, tejido adiposo, hígado, bazo, pulmón, músculo, gelatina de Wharton, pulpa dental e incluso cerebro (Si et al, 2011; Montesinos y Castro, 2011; Appaix et al, 2014).

#### *Potencial uso de las MSC en medicina regenerativa*

En comparación con las ESC y otras células troncales tejido específicas, las MSC poseen muchas ventajas para terapia celular debido a su fácil acceso, pocas limitaciones éticas, alta capacidad de expansión, amplio potencial de diferenciación y efectos inmunomodulatorios. Estudios recientes reportan que después del trasplante no inducen tumorigénesis ni otros efectos adversos en pacientes, y se ha demostrado su sobrevivencia por hasta 137 meses (Flores-Figueroa et al, 2006; Si et al, 2011; Shi et al, 2012).

En la actualidad, las MSC se están utilizando en numerosas pruebas clínicas en distintas patologías. En 2013 se reportaron al menos 344 estudios clínicos, involucrando 42 enfermedades (Wei et al, 2013). Entre las principales están la isquemia en corazón, extremidades y cerebro, regeneración pancreática, enfermedades neurodegenerativas, diabetes tipo I, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, cirrosis hepática, enfermedad injerto contra hospedero, artritis reumatoide, osteoartritis, osteogénesis imperfecta, síndrome de Hurler, leucodistrofia metacromática, anemia, asma, fallo renal agudo, lupus, autismo, quemaduras y regeneración de piel (Kassem et al, 2008; Salem et al, 2010; Si et al, 2011; Caplan y Correa, 2011; Shi et al, 2012). Es importante mencionar que hasta el momento se han obtenido resultados contradictorios, ya que en algunos estudios se ha observado mejoría clínica en los pacientes, pero en no otros (Montesinos y Castro 2011).

No obstante, las MSC despliegan diferentes propiedades biológicas que en conjunto favorecen la reparación de tejidos: i) potencial de diferenciación, ii) secreción de factores tróficos, iii) capacidad de inmunoregulación.

i) Numerosos estudios *in vivo* han mostrado la habilidad de las MSC para reconocer tejidos dañados, migrar e integrarse en el sitio, y finalmente diferenciarse, aunque en bajo porcentaje, en células específicas de ese tejido. De igual modo, ensayos *in vitro* demuestran que además de los linajes mesenquimales, las MSC estimuladas con citocinas o introducción de genes tienen la capacidad de diferenciarse no solo en tejidos del mesodermo, sino además en derivados del ectodermo y endodermo, propiedad que se ha descrito como plasticidad. Entre éstas se encuentran células endoteliales, células de músculo cardíaco y esquelético, hepatocitos, células neuronales, células de la glía, células pancreáticas y células epiteliales (Kuroda et al, 2011; Si et al, 2011, Montesinos y Castro, 2011).

ii) El efecto trófico de las MSC, mediado por su migración preferencial a sitios de lesión y la producción de factores y moléculas. Se ha observado que las MSC contribuyen a la reparación de los tejidos mediante interacciones célula-célula, o bien secretando un gran número de moléculas que incluyen glucoproteínas solubles de matriz extracelular, factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas. Estos efectos pueden reducir la inflamación,

apoptosis y fibrosis, además de estimular los mecanismos de regeneración endógena al promover la proliferación de células precursoras (da Silva-Meirelles et al, 2009; Si et al, 2011; Kuroda et al, 2011; van Velthoven et al, 2012). Los efectos tróficos de las MSC se han reportado en varios modelos de enfermedades, incluyendo infarto al miocardio, isquemia cerebral y enfermedad de Parkinson. Dentro del amplio rango de factores producidos por las MSC se encuentran factores neuroprotectores como BDNF, GDNF, SHH, NGF, neuroregulina 1 o FGF<sub>2</sub>, además de factores pro-angiogénicos indispensables para la reparación tisular como VEGF-1 (Flores-Figueroa et al, 2006; Kuroda et al, 2011; Si et al, 2011; van Velthoven et al, 2012). Por lo anterior, se ha propuesto que las MSC actúan como fábricas de moléculas bioactivas que promueven y soportan la regeneración natural en sitios de daño tisular (Caplan y Correa, 2011).

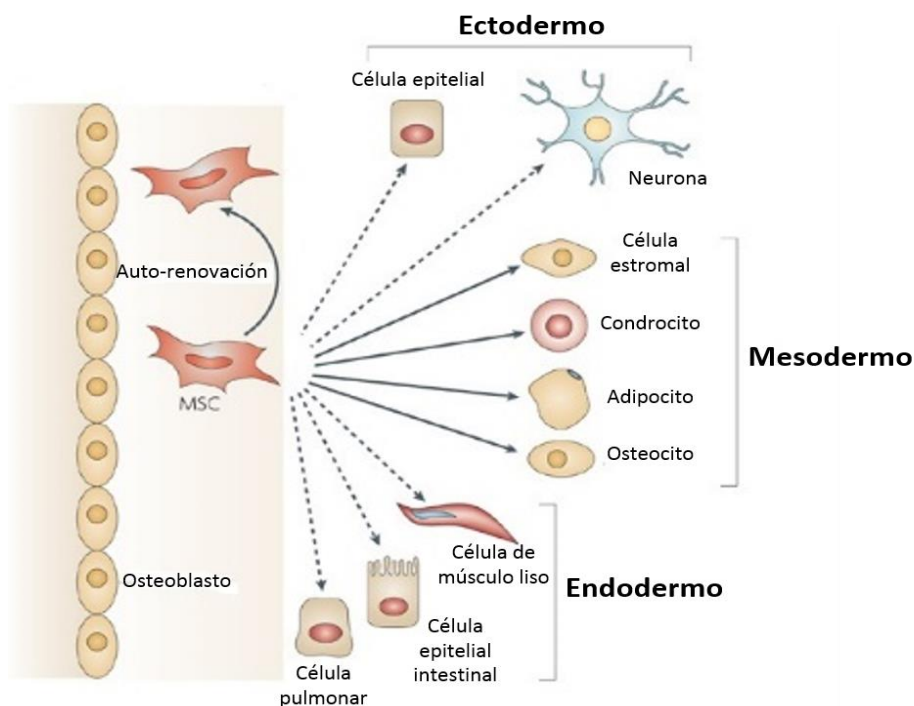
iii) Numerosos estudios han demostrado la capacidad inmunomodulatoria de las MSC *in vitro* e *in vivo*. Estas células son capaces de regular la respuesta inmune innata y adaptativa a través del contacto célula-célula o la secreción de diversos factores (Castro-Manreza y Montesinos, 2014). Las MSC pueden suprimir la activación y proliferación de linfocitos T, B, y células NK, regular la función de las células cebadas, e interferir con la maduración y función de células dendríticas, además de reclutar y regular la función de monocitos y macrófagos. En conjunto estos mecanismos favorecen la resolución de la inflamación y el daño en los tejidos (Si et al, 2011; Le Blanc y Mougikakos, 2012; Shi et al, 2012). Sumado a esto, las MSC presentan una baja expresión del complejo mayor de histocompatibilidad I, así como nula expresión de moléculas del CMH II (Salem et al, 2010; Montesinos y Castro, 2011).

### *Transdiferenciación y plasticidad*

Las células troncales adultas generalmente tienen un potencial de diferenciación limitado, al generar únicamente células diferenciadas del tejido en el que residen. Sin embargo, las hBM- MSC podrían representar un tipo excepcional de células troncales adultas. Se ha propuesto que las MSC son células multipotentes que, además de diferenciarse en células del linaje mesodérmico como hueso, cartílago, tejido adiposo y músculo, son capaces de dar lugar a



linajes celulares del endodermo y ectodermo (Figura 6) (Petersen et al, 1999; Mezey et al, 2000; Harris et al, 2004; Tian et al, 2010; Gabr et al, 2015). Además, al inyectarse en un blastocisto temprano, contribuyen a la mayoría de los tejidos somáticos (Jiang et al, 2002). Se ha reportado la capacidad de transdiferenciación (conversión de una célula de un linaje en una célula de un linaje distinto) de las MSC en células epiteliales, hepatocitos, endotelio, músculo cardíaco, células pancreáticas, neuronas y células de la glía (revisado en Kuroda et al, 2011). Ésta aún debatida capacidad de transdiferenciación, podría tener un potencial clínico inmenso en terapia de remplazo celular y medicina regenerativa. La diferenciación neural controlada de MSC podría convertirse en una importante fuente de células para terapia en enfermedades neurodegenerativas, ya que éstas células son de más fácil acceso y expansión que las NSC (Krabbe et al, 2005).



**Figura 6.** Plasticidad de las MSC. Las células estromales mesenquimales (MSC) pueden diferenciarse en células del linaje mesodérmico (tal como hueso, grasa, cartílago), pero se ha propuesto que también tienen el potencial de diferenciarse en células de distinta línea germinal (endodermo y ectodermo). Modificado de Uccelli et al, 2008.

En general, la conversión de un tipo celular en otro se denomina metaplasia, y puede incluir conversión entre células troncales o entre células diferenciadas. El término transdiferenciación originalmente era considerado un subtipo de metaplasia, describiendo el cambio irreversible de células totalmente diferenciadas en células de otro linaje celular sin pasar por un estado troncal o progenitor más primitivo. Actualmente, el término transdiferenciación se utiliza también comúnmente para describir la capacidad de una célula troncal de un linaje específico para diferenciarse en un linaje celular distinto. Ésta conlleva la pérdida de marcadores y funciones del tejido original y la adquisición de las características del tipo celular transdiferenciado. Este proceso puede ocurrir ya sea por mutaciones somáticas, cambios epigenéticos, factores extracelulares o microambientales que median cambios en la expresión genética (Tosh y Slack, 2002; Wagers y Weissman, 2004; Chia-Ning et al, 2004; Krabbe et al, 2005; Thowfeequ et al, 2007; Eberhard y Tosh, 2008; Montesinos y Castro, 2011; Sisakhtnezhad y Matin, 2012). La sugerida capacidad de transdiferenciación de las SSC dio origen al concepto de plasticidad. Este concepto sostiene que el potencial de diferenciación de las células troncales es flexible, permitiéndoles dar origen a linajes celulares de otros tejidos o capas germinales en respuesta a señales del microambiente (Wagers y Weissman, 2004).

La transdiferenciación puede ocurrir por dos mecanismos. Por un lado se producen cambios en la expresión genética de la célula, rediferenciándose sin mitosis. Por otro lado, la transdiferenciación involucra la desdiferenciación de la célula, proliferación y finalmente diferenciación (Sisakhtnezhad y Matin, 2012). Además, la transdiferenciación puede dividirse en natural e inducida. En la naturaleza esta ocurre durante el desarrollo y regeneración de algunos vertebrados e invertebrados. La transdiferenciación inducida es una tecnología basada en manipulación genética o tratamiento de las células *in vitro* con componentes que promueven la conversión de un tipo celular en otro (Sisakhtnezhad y Matin, 2012).

### *Transdiferenciación in vitro e in vivo de MSC hacia el linaje neuroectodérmico*

Muchos protocolos de inducción neural han sido sugeridos durante los últimos años. En los primeros estudios fueron utilizados diferentes medios de cultivo, suplementados con agentes químicos o farmacológicos (Woodbury et al, 2000; Sánchez-Ramos et al, 2000). En posteriores reportes, las MSC son expuestas a factores neurotróficos o factores que favorecen el crecimiento y diferenciación neuronal (Tropel et al, 2006; Trzaska et al, 2007), o inducidas a un fenotipo neural mediante transfección de genes (Koyhama et al, 2001; Dezawa et al, 2004). La inducción neural mediante co-cultivo con NSC o células gliales ha sido otra aproximación (Rivera et al, 2006; Wang et al, 2011). Mientras que, en otros estudios las MSC son convertidas en estados multipotentes o pluripotentes, y luego inducidas a diferenciación en linajes neurales mediante factores neurotróficos (Hermann et al, 2004; Wislet-Gendebien et al, 2005; Fu et al, 2008; Alexanian et al, 2008; Harris et al, 2012).

Sin embargo, el estudio de la diferenciación neural de MSC se inició con estudios *in vivo*. El trasplante de MSC en animales de experimentación con el propósito de analizar su integración y diferenciación al linaje neural comenzó en 1998. Azizi y cols. (1998) inyectaron MSC humanas en el estriato de ratones, reportando su integración, migración y pérdida de marcadores de células mesenquimales. Evidencia adicional fue presentada por Koppen (1999), quien inyectando MSC en el ventrículo lateral de ratones reporta la migración de las células al cerebro frontal y cerebelo, y algunas de éstas fueron GFAP o NF positivas, sugiriendo su diferenciación en astrocitos y neuronas. La evidencia más sólida acerca de la capacidad de las MSC para diferenciarse en células neurales *in vivo* fue presentada por Brazelton y cols. (2000) así como por Mezey y cols. (2000). Ambos grupos, realizaron trasplantes sistémicos en ratones de células derivadas de la MO marcadas genéticamente. Sus resultados mostraron que las células trasplantadas migran al cerebro y asumen características de neuronas del SNC, expresando antígenos específicos de este linaje como NF-200, NeuN o  $\beta$  tubulina clase III. Posteriormente, Mezey (2003) examinando muestras de cerebro post-mortem de pacientes femeninos que recibieron trasplantes de MO de donadores de sexo masculino, encontró en diversas regiones del cerebro la presencia de neuronas que presentan el cromosoma Y, especialmente en el hipocampo y la corteza cerebral. No obstante, estas evidencias han sido cuestionadas por algunos investigadores, quienes sugieren que las células

supuestamente transdiferenciadas resultan de fusión entre las células del donador y las neuronas del hospedero (Alvarez-Dolado et al, 2003). Más allá de los análisis de injerto y migración, la administración de MSC ha resultado en diversos grados de recuperación funcional en modelos de enfermedad de Huntington, Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones cerebrales traumáticas y daño en la médula espinal y sistema nervioso periférico (Maltman et al, 2011).

Por otra parte, un gran número de estudios *in vitro* sugieren que es posible derivar células del SNC a partir de MSC, mediante la administración de citocinas, inductores químicos, co-cultivo con células neurales o modificación genética. Woodbury y cols. (2000) fueron los primeros en mostrar que BM-MSc humanas y murinas pueden adoptar un fenotipo neuronal, después de ser cultivadas en medio libre de suero con anisol hidroxil butilado (BHA), dimetilsulfóxido o  $\beta$ -mercaptoetanol. Después de unas cuantas horas las células mostraban morfología neuronal y expresaban marcadores como nestina, TrkA y enolasa específica de neuronas (NSE). En ese mismo año, Sánchez-Ramos reportó la obtención de células positivas para la proteína nuclear específica de neuronas (NeuN), GFAP y nestina, a partir de MSC cultivadas en presencia de AR y EGF ó BDNF, o bien, mediante co-cultivo con células mesencefálicas de ratón. Sin embargo, análisis mediante western blot mostraron que estas proteínas están constitutivamente presentes en las MSC y no eran inducidas por los tratamientos (Sánchez-Ramos et al, 2000). Después de estos estudios, un gran número de grupos de investigación independientes han reportado la diferenciación neuronal de las MSC *in vitro*. Deng et al. (2001) sugieren que la utilización de agentes que incrementan el AMPc intracelular, como isobutilmetilxantina (IBMX) o dibutilil AMPc (dbAMPc) provoca la diferenciación del 25% de MSC en células similares a neuronas. Sin embargo, recientes hallazgos han puesto en duda si la utilización de agentes químicos pueden llevar realmente a la diferenciación neuronal. Estudios posteriores han comprobado que la adquisición de una morfología similar a la neuronal se debe a la retracción del citoplasma celular, resultado de la disrupción del citoesqueleto de actina. Esta retracción del citoplasma deja detrás largos procesos que asemejan a las neuritas, acompañado del incremento aberrante en la expresión de proteínas neurales debido al estrés celular, o bien, a causa del incremento de antígeno por unidad de área (Lu et al, 2004). Además, el tratamiento con estos agentes y toda una pléthora

de estresantes celulares como EDTA, citocalasina D, detergentes o agentes despolimerizantes del citoesqueleto, generan cambios morfológicos y de expresión similares en MSC y otros tipos celulares, como fibroblastos o células de adenocarcinoma prostático (Neuhuber et al, 2004; Lu et al, 2004; Croft y Przyborski, 2005). Estos resultados cuestionan la confiabilidad de la morfología celular y un limitado número de genes para determinar el destino neural de las células, por lo que surge la necesidad de evaluar otros criterios funcionales.

Distintas aproximaciones fueron desarrolladas por Koyhama et al. (2001), quienes utilizando el agente desmetilante 5-azacitidina en medio suplementado con el factor de crecimiento nervioso (NGF), BDNF y neurotrofina-3 (NT-3) reportaron la diferenciación de células similares a neuronas. No obstante, estas células expresaban tanto marcadores neurales (NeuN,  $\beta$ -III tubulina), como gliales (GFAP, Gal-C). Al mismo tiempo, este autor desarrolló otro método de transdiferenciación neural basado en la transfección del gen nogina (antagonista de las BMPs). Como resultado, las células formaron estructuras similares a neuroesferas, y en condiciones de adherencia a un sustrato se diferencian en células con morfología neuronal, responsivas a estímulos despolarizantes.

Un reporte más reciente sobre la diferenciación neural de MSC utilizando un transgen, involucra el uso del dominio intracelular de Notch (NICD). Dezawa y cols. (2004) demostraron la generación de neuronas a partir de MSC transfectadas con NICD, y cultivadas con una combinación de factores neurotróficos FGF, FSK, factor neurotrófico ciliar (CNTF), seguido de GDNF. Estas células demuestran potencial de membrana, expresan los marcadores MAP-2 e hidroxilasa de tirosina (TH), son aparentemente postmitóticas y secretan dopamina.

Los actuales protocolos de inducción han cambiado del uso inicial de estresantes químicos, a la utilización de moléculas de señalización más fisiológicas, como factores neurotróficos u otras citocinas, que provocan la conversión de MSC a neuronas (transdiferenciación directa). Trzaska y cols. (2007) basándose en el papel que juegan SHH, FGF8 y bFGF durante el desarrollo embrionario de las neuronas dopaminérgicas, reportaron que el cultivo de BM-MSC humanas en medio Neurobasal con el suplemento B27 y

utilizando un coctel de SHH, FGF8 y bFGF promueve la especificación de un fenotipo neuronal dopaminérgico post mitótico, con una eficiencia de casi 70%. Las células desarrollaron morfología neuronal, expresando marcadores como TH, Tubulina  $\beta$ -III y NeuN, además de la secreción de dopamina de manera independiente de despolarización. No obstante, una evaluación más profunda muestra que la distribución intracelular de los antígenos es distinta de la encontrada en neuronas adultas (Raedt et al, 2007). Mientras que, Tropel (2006) sugiere que únicamente el tratamiento con bFGF, provoca la adquisición de un fenotipo neuronal funcional, con características de un estado temprano de diferenciación. Estas células presentan marcadores de neuronas inmaduras (NF,  $\beta$ -III tubulina) y tienen la capacidad de incrementar el calcio citosólico en presencia de neurotransmisores, como glutamato o dopamina. Sumado a lo anterior, se han desarrollado diversos protocolos que utilizan diferentes combinaciones de factores de crecimiento, reportando distintos resultados, en ocasiones contradictorios.

Otra estrategia, desarrollada por Herman y cols. (2004), involucra la conversión de MSC en células con características de troncales y/o progenitoras neurales, utilizando condiciones similares a las empleadas para la propagación de NSC. Éstas células son cultivadas como estructuras similares a neuroesferas, expresan genes asociados al neuroectodermo temprano tales como nestina, MS1 o SOX2, son capaces de auto-renovarse y pueden ser subsecuentemente diferenciadas en neuronas, astroglia u oligodendroglia (transdiferenciación indirecta). En estas condiciones las MSC pierden su capacidad de diferenciación en linajes mesodermales, así como la expresión de marcadores característicos de células mesenquimales; y en presencia de medio con suero, ácido retinoico y BDNF tienen el potencial de diferenciarse en células que expresan marcadores de neuronas maduras como MAP2 o TH, o en astroglia (células GFAP<sup>+</sup>) en presencia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Estrategias similares empleando distintos medios y factores de crecimiento han sido utilizadas con éxito por diversos grupos de investigación (Wislet-Gendebien et al, 2005; Song et al, 2007; Alexanian et al, 2008; Fu et al, 2008; Yang et al, 2008; Harris et al, 2012; Heo et al, 2013; Huat et al, 2014). En muchos de estos estudios, se ha sugerido que las MSC pueden ser dirigidas a un fenotipo neuronal completamente diferenciado en co-cultivo con neuronas o astrocitos, o bien utilizando medio condicionado

de astrocitos o células neuronales (Wislet-Gendebien et al, 2005; Song et al, 2007; Fu et al, 2008). Entre éstos destaca el realizado por Fu y cols. (2008), quienes generando neuroesferas a partir de MSC y co-cultivándolas junto con astrocitos primarios, reportaron la diferenciación de estas células en GFAP<sup>+</sup> (astrocitos), GalC<sup>+</sup> (oligodendrocitos) y  $\beta$ -III tubulina<sup>+</sup> (neuronas); éstas últimas poseen procesos axonales y dendríticos, forman aparentes sinapsis y son capaces de disparar potenciales de acción.

De manera adicional, algunos de estos estudios han mostrado la habilidad de las neuronas derivadas de MSC para generar mejoras en aspectos histológicos y de comportamiento en modelos animales de lesiones de médula espinal, golpe isquémico o enfermedad de Parkinson (Alexanian et al, 2008; Yazdani et al, 2012; Wang et al, 2013).

A pesar de lo prometedor de estos resultados, los reportes algunas veces contradictorios, han llevado a muchos a considerar este un fenómeno con una limitada significancia biológica. Además, a la fecha no hay un estudio capaz de demostrar que las neuronas derivadas de MSC cumplen con todos los criterios para ser consideradas células neuronales. Estas deben ser post-mitóticas, polarizadas con un solo axón y múltiples dendritas, capaces de disparar potenciales de acción, y comunicarse con otras neuronas mediante sinapsis, esto último requiriendo liberación de neurotransmisores y presencia de receptores de éstos (Reh, 2002).

### **Factores involucrados en la inducción neural durante el desarrollo embrionario y la neurogénesis en el adulto**

La neurogénesis es un proceso dinámicamente regulado por factores intrínsecos y extrínsecos. Durante el desarrollo embrionario las células del neuroepitelio dentro del tubo neural dan lugar a los tipos neurales diferenciados, produciendo primeramente neuronas, y glía en estados tardíos (Kintner, 2002). Por otro lado, la neurogénesis en el adulto persiste en dos áreas específicas del cerebro: la zona subventricular (ZSV) y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo. En estas dos regiones, poblaciones de células troncales con características gliales generan progenitores amplificantes transitorios altamente

proliferativos, que luego dan lugar a precursores neuronales o gliales destino-comprometidos, los cuales migran a sus destinos finales y se diferencian en neuronas, astroglia u oligodendroglia.

Los tipos celulares dentro del neuroepitelio neurogénico de SNC adulto presentan ciertas similitudes con el neuroepitelio embrionario del que derivan. El destino de los progenitores neuronales en el embrión y en el adulto, se encuentra dirigido por una familia de factores de transcripción pro-neurales llamados hélice-vuelta-hélice básicos (bHLH) como *Ascl1*, *Neurogenina 2*, *Neuro-D1*, *Neuro-D2*, *Trb1* y *Trb2*. Estos actúan de una manera sucesiva, desde la proteína más ampliamente pro-neural (*Ascl1*) hasta las más neuronales y subtipo-específicas (*Neuro-D1*) (Pathania et al, 2010).

Los factores extracelulares también están implicados en la regulación de la neurogénesis en el SNC. Se ha demostrado que  $FGF_2$  es importante para el mantenimiento del pool de NSC. Este factor regula positivamente la proliferación de precursores e incrementa el número de neuronas que migran de la ZSV al bulbo olfatorio. La vía de señalización de Wnt también está implicada en el desarrollo de SNC, incluyendo la formación del tubo neural, y el desarrollo del cerebro medio. En la neurogénesis adulta la vía de Wnt se encuentra activa en la ZSG, y regula la proliferación de neuroblastos y diferenciación neuronal (Faigle y Song, 2013). El factor neurotrófico ciliar (CNTF) promueve la proliferación de progenitores neurales incrementando la expresión de NOTCH. Mientras que,  $TGF\alpha$  (un ligando endógeno de EGFR) incrementa la proliferación de progenitores, evitando la diferenciación (Pathania et al, 2010; Zhao et al, 2008; Hagg, 2005). Al mismo tiempo, el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) está implicado en potenciar la proliferación y migración en la ZSV. Además, la señalización de SHH se requiere para el establecimiento de la población de NSC. SHH es una proteína soluble extracelular crucial en la regulación de varios procesos durante el desarrollo del SNC, como la diferenciación de las neuronas en el cerebro anterior, de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro medio y la proliferación de precursores de neuronas cerebelares (Faigle y Song, 2013). La activación de la vía de NOTCH por sus ligandos es requerida en células troncales para mantener la auto-renovación y prevenir la diferenciación, además regula la salida del



ciclo celular y destino de las NSC. Además, noggina, un antagonista de las BMPs, bloquea la diferenciación glial de NSC, favoreciendo la neuronal (Pathania et al, 2010). Las hormonas que circulan por las regiones neurogénicas son también importantes para este proceso. Por ejemplo, la hormona tiroidea incrementa la proliferación de NSC, el efecto mitótico de IGF aparentemente es mediado o facilitado por el estrógeno, mientras que la prolactina promueve la proliferación y diferenciación neuronal en ZSV (Hagg, 2005).

Las etapas tardías de la neurogénesis comprenden la sobrevivencia, integración sináptica y formación dendrítica. La fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB por sus siglas en inglés) dependiente de AMPc y PKA, es importante en la sobrevivencia y arborización dendrítica de neuroblastos (Pathania et al, 2010). Estas etapas además son dependientes de neurotrofinas, que juegan importantes roles en el SNC en desarrollo y adulto. En mamíferos se han identificado cuatro: factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 y neurotrofina-4/5. Éstas se unen a receptores tirosin cinasa conocidos como receptores Trk (Faigle y Song, 2013). La señalización de BDNF es la más extensamente estudiada, es importante en la neurogénesis en el hipocampo y la ZSV, la formación dendrítica e integración sináptica (Zhao et al, 2008; Pathania et al, 2010). Este factor actúa reduciendo la proliferación e incrementando la diferenciación y sobrevivencia de neuroblastos (Kintner, 2002). También, neurotransmisores como GABA y glutamato juegan un importante papel en la neurogénesis, controlando procesos como proliferación e integración sináptica, a través del control de la síntesis y liberación de factores de crecimiento o el control de la expresión de factores de transcripción; formando el enlace entre la actividad neuronal y la neurogénesis (Pathania et al, 2010).

## **Sistemas *in vitro* para el cultivo y expansión de células precursoras neurales**

El sistema de cultivo de neuroesferas desarrollado por Reynolds y Weiss (1992) fue el primero en demostrar la presencia de células en el cerebro adulto con características de células troncales. Además, se mantiene como un sistema útil para analizar la auto-renovación, proliferación, y multipotencia de las células troncales y progenitoras neurales, en conjunto denominadas células precursoras neurales (NPC) (en el presente estudio este término es utilizado para describir colectivamente a una población mixta que comprende a las células troncales neurales y su progeñe indiferenciada (Louis y Reynolds, 2013)).

El ensayo de neuroesferas toma ventaja de la capacidad de las NPC de evadir anoikis (muerte celular inducida por la pérdida de uniones célula-matriz extracelular) y crecer independientemente de anclaje. Utiliza un medio libre de suero, en ausencia de sustratos de adhesión, suplementado con factor de crecimiento epidérmico (EGF) y/o factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF<sub>2</sub>). En estas condiciones las células diferenciadas no son capaces de sobrevivir, pero se permite la proliferación de una pequeña población de células responsivas a los factores de crecimiento, que flotando en suspensión, generan agregados celulares esferoides rodeados por matriz extracelular (Ahmed, 2009; Gorba et al, 2011; Casarosa et al, 2013). Una neuroesfera puede ser disociada para formar esferas secundarias más numerosas (procedimiento que puede ser repetido para expandir una población de NPC), o ser inducida a diferenciación generando los tres linajes celulares de SNC (Rietze y Reynolds, 2006; Conti y Cattaneo, 2010).

Las neuroesferas y las células formadoras de neuroesferas son funcional y morfológicamente heterogéneas. Existen diferencias en tamaño, viabilidad y contenido citoplásmico de las células. Aunado a ello, la localización de las células dentro de la neuroesfera afecta su proliferación, sobrevivencia, apoptosis y fagocitosis. Las células dentro de una neuroesfera no están sincronizadas, coexistiendo en diferentes fases del ciclo celular (Bez et al, 2003). Durante el crecimiento de la neuroesfera ocurren divisiones simétricas y asimétricas para auto-renovar a las NSC y producir una población de progenitores neurales, denominados progenitores transitorios amplificantes, que son mitóticamente muy activos y representan la mayor parte de las células en una neuroesfera. Además se generan de células

diferenciadas, que se encuentran generalmente en el centro de la neuroesfera (Baizabal et al, 2003; Conti y Cattaneo, 2010).

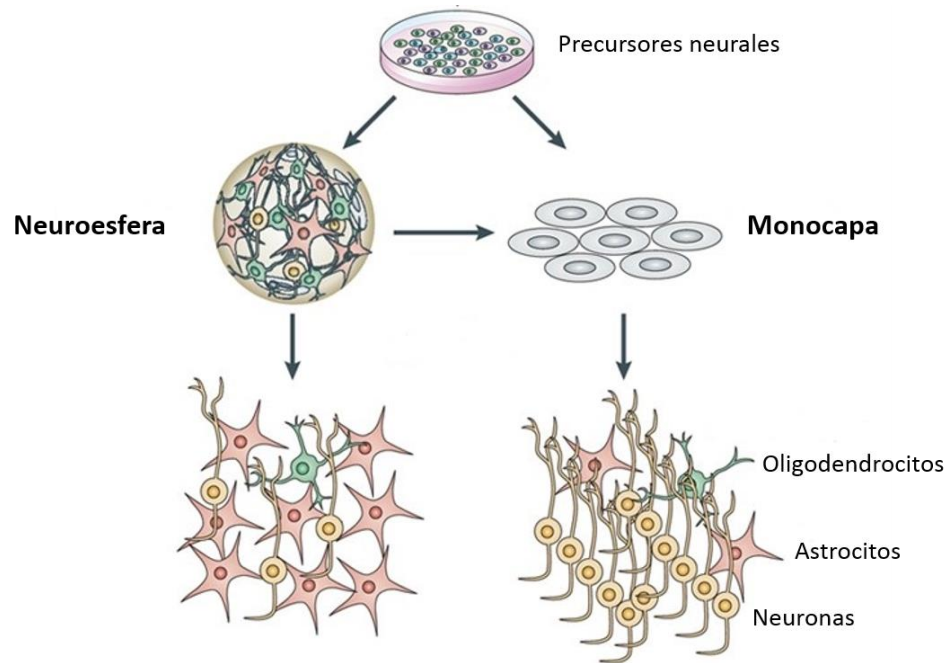
Se ha propuesto que la estructura tridimensional de las neuroesferas permite el establecimiento de un nicho equivalente al compartimiento neurogénico *in vivo*, en comparación con los cultivos en 2D. Esto permite modelar un ambiente dinámico, tal como concentraciones de pH, oxígeno, factores de crecimiento o nutrientes (Ahmed, 2009). Sin embargo, es ampliamente aceptado que la complejidad del sistema de neuroesferas representa un obstáculo para estudios bioquímicos y moleculares más precisos (Casarosa et al, 2013).

La formación de neuroesferas no es una propiedad única de las NSC multipotentes. Es posible obtener agregados similares a esferas a partir de progenitores astrocíticos, oligodendrocíticos o neuronales, aunque poseen una capacidad proliferativa limitada y no generan esferas secundarias (Baizabal et al, 2003).

De manera similar, se ha reportado la capacidad de proliferación, auto-renovación sostenida y diferenciación tripotencial en cultivos adherentes de NSC derivadas de tejido primario del SNC (por ejemplo telencéfalo y espina dorsal) y ESC, en presencia de EGF y FGF<sub>2</sub> (Jensen et al, 2006; Glaser et al, 2007). Bajo éstas condiciones, las células se dividen simétricamente, manteniendo su capacidad de diferenciación tripotencial, indicando que los cultivos en monocapa pueden reducir la heterogeneidad de las células neurales cultivadas, y mantener poblaciones de NPC con un bajo componente de células diferenciadas (Glaser et al, 2007; Conti y Cattaneo, 2010). Las células cultivadas bajo este procedimiento se han denominado células NS (neural stem). Es posible que estas células representen a la población de NSC dentro de las neuroesferas (Casarosa et al, 2013).

En ambos sistemas de cultivo las NSC se comportan como células troncales multipotentes, aunque poseen distinto potencial de diferenciación. Por un lado, las células expandidas en monocapa retienen la capacidad de diferenciarse *in vitro* en fenotipos de neuronas específicas en una gran proporción, aún después de expansión extensiva, pudiendo también responder ante señales gliogénicas. Mientras que la diferenciación de las

neuroesferas muestra un potencial prevalentemente dirigido hacia astrocitos, con menos eficiencia para producir fenotipos neuronales específicos después de pocos pasajes. (Baizabal et al, 2003; Conti y Cattaneo, 2010; Casarosa et al, 2013).



**Figura 7.** Sistemas de cultivo, expansión y potencial de diferenciación de células troncales/progenitoras neurales. Modificado de Conti y Cattaneo, 2010.

#### IV. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La biología de las células troncales ha atraído considerable interés en los últimos años, en parte debido a sus propiedades que potencialmente las vuelven una fuente ideal para la implementación de estrategias de replazo celular. A pesar que las células troncales son una gran promesa para el tratamiento de enfermedades del SNC, aún deben ser desarrollados métodos para el enriquecimiento y producción de células neurales funcionales.

Dentro de las células troncales, las NSC mantienen un tremendo potencial para su uso en el tratamiento de desórdenes neurológicos. Se ha demostrado que NSC trasplantadas en el cerebro adulto del ratón son capaces de diferenciarse en neuronas y glía. Sin embargo, debido a las dificultades asociadas con el aislamiento de NSC de pacientes, el uso terapéutico de estas células es limitado. Aunque estas células pueden ser obtenidas a partir de fetos humanos, ESC o iPSC, presentan diversas limitaciones de índole ético y/o técnico. Por estas razones, es de suma importancia la identificación de nuevas fuentes de células neurales con potencial uso en terapia celular (Yang et al, 2008).

Las MSC aisladas de médula ósea han adquirido un gran interés debido a su potencial aplicación en protocolos de terapia de replazo celular en enfermedades neurológicas. Estudios recientes han demostrado que esta población contiene progenitores mesenquimales que, además de ser capaces de diferenciarse en linajes mesodérmicos *in vitro* e *in vivo*, poseen el potencial de diferenciarse en linajes ecto y endodérmicos, incluyendo células con características morfológicas y fisiológicas de precursores neurales, así como los diferentes linajes diferenciados del SNC (Hermann et al, 2004; Yang et al, 2008). Lo anterior, sumado a la facilidad de su obtención a partir de aspirados de médula ósea, su gran capacidad de expansión en cultivo, además de sus efectos tróficos, inmunomodulatorios anti-apoptóticos, angiogénicos, neurogénicos y neuroprotectores han impulsado la utilización de MSC en enfermedades neurológicas (Harris et al, 2012).

Sin embargo, la evidencia actual acerca de la transdiferenciación de células no neurales hacia este linaje no es un hecho totalmente comprobado (Hall et al, 2007). Otros estudios han puesto en duda la aparente capacidad de transdiferenciación de las hBM-MS

hacia el linaje neuroectodérmico. Actualmente, existe debate sobre si este fenómeno resulta de una verdadera diferenciación neural, o es un artefacto generado por la fusión celular, encogimiento y retracción en el citoesqueleto provocado por estrés, cambios morfológicos transitorios o expresión aberrante de genes neurales (Hermann et al, 2006; Chen et al, 2006; Raedt et al, 2007). Estas controversias muestran la necesidad de mejorar y evaluar de una manera más rigurosa estos protocolos, antes que éste sea considerado un fenómeno real.

Por lo anterior, esta investigación buscó determinar el potencial de transdiferenciación neural de las células estromales mesenquimales humanas de médula ósea, y definir posibles protocolos para generar NPC y/o neuronas a partir de estas células. Para ello se evaluó si las hBM-MSC cultivadas con medios y factores específicos adquieren las principales características de las células precursoras neurales, así como su potencial de diferenciación hacia el linaje neuronal y/o glial.

## **V. HIPÓTESIS**

Las hBM-MSCs son células multipotentes con un potencial de transdiferenciación hacia tipos celulares de otras capas germinales, y se ha reportado que bajo condiciones específicas adquieren propiedades que asemejan a las células troncales/progenitoras neurales, perdiendo en el proceso las características de su linaje de origen. Sin embargo, los resultados de los protocolos son inconsistentes y usualmente no se evalúan todas las propiedades de las NPC. Por lo anterior, es posible que las células generadas mediante estos protocolos de transdiferenciación no adquieran todas las características para ser consideradas precursores neurales.

## **VI. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar si las hBM-MSC cultivadas en condiciones de inducción neural determinadas, adquieren propiedades de células precursoras neurales.

### **Objetivos particulares**

- Determinar si las hBM-MSC, cultivadas en medios de NPC, modifican su morfología y/o son capaces de generar agregados en suspensión similares a neuroesferas, e identificar cambios de expresión en genes asociados al linaje neural y el linaje mesenquimal.
- Evaluar la capacidad de expansión de la población, actividad del ciclo celular y viabilidad de las MSC en las condiciones de inducción neural.
- Evaluar el potencial de las hBM-MSC para generar células con morfología y marcadores neuronales y/o gliales, a partir de métodos de transdiferenciación directa e indirecta.



## VII. DISEÑO EXPERIMENTAL

### Cultivo y expansión de células estromales mesenquimales humanas

Las MSC obtenidas de médula ósea de tres pacientes sanos fueron proporcionadas y previamente caracterizadas por Montesinos et al. (2009). Las células se cultivaron en medio DMEM bajo en glucosa (DMEM) (Gibco® BRL, Rockville, MD, USA) suplementado con 10 % de SFB, glutamina [2 mM] y 100 µg/mL de gentamicina, a una densidad de  $3-5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>, reemplazando el medio cada 2 días. Cuando las células alcanzaron el 80-90 % de confluencia se realizó una resiembra. Para ello, las células se lavaron con PBS y se despegaron de la placa adicionando tripsina 0.05%-EDTA 0.48 mM (Gibco®) incubando por 5 minutos a 37° C. Posteriormente la tripsina se inactivó con medio completo. Las células fueron centrifugadas a 220 g durante 5 minutos y se sembraron en cajas de cultivo de 100 mm bajo las mismas condiciones, hasta un máximo de 8 resiembras (pasaje 8). En todas las condiciones con o sin suero se añadieron 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina.

### Inducción neural de hBM-MSK

Las células se sembraron a una densidad de  $1-1.5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de cultivo estándar, o en placas de ultra baja adherencia (Corning, Costar, NY, USA), y se cultivaron durante 9 días en los siguientes medios específicos libres de suero:

- 1) **Medio definido/B27 sin vitamina A (MD/B27):** Medio DMEM/F-12, Glutamax [1X], 25 µg/mL de insulina, 100 µg/mL de transferrina, progesterona [20 nM], putresina [60 µM], selenita de sodio 30 [nM], suplemento B27 libre de vitamina A [1X] (Gibco®) y 20 ng/mL de los factores de crecimiento humanos EGF y bFGF (Gibco®).
- 2) **Medio NeuroCult™ NS-A Proliferation (humano):** NeuroCult NS-A Basal, 10% NeuroCult NS-A Proliferation supplement (STEMCELL

TECHNOLOGIES, Vancouver, Canadá), suplementado con 20 ng/mL de EGF y bFGF (Gibco®).

Los factores de crecimiento EGF y bFGF fueron añadidos cada 3 días y la mitad del medio fue remplazado al día 6 de cultivo.

### **Diferenciación neuronal**

Los ensayos de diferenciación se llevaron a cabo en protocolos de diferenciación directa de hBM-MS (células cultivadas en medio con suero) o indirecta (células derivadas de cultivos en medio de proliferación de precursores neurales). Las células fueron cultivadas con medio con suero, MD/B27 o NeuroCult, y posteriormente sembradas en cubreobjetos pre-tratados con poli-D-lisina (50 µg/mL) y fibronectina (1 µg/mL) a una densidad de  $0.5-2 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>. Se utilizaron 2 medios de diferenciación libres de suero:

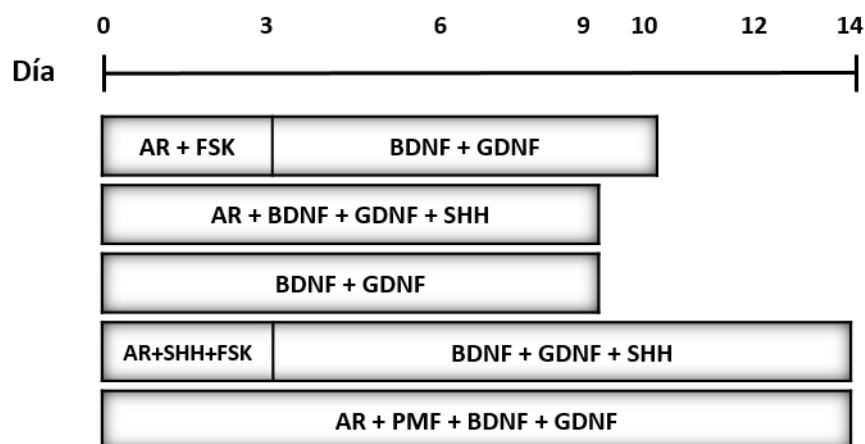
- 1) **Medio Neurobasal/B27 (NB/B27):** Neurobasal (Gibco®), suplemento B27 [1X] (Gibco®).
- 2) **Medio NeuroCult™ NS-A Differentiation (humano) (NeuroCult-D):** NeuroCult NS-A Basal, 10% NeuroCult NS-A Differentiation supplement (STEMCELL TECHNOLOGIES).

Ambos medios fueron suplementados durante distintos tiempos con uno o más de los siguientes factores de crecimiento:

- 1) BDNF - Factor neurotrófico derivado del cerebro (Gibco): 10 ng/mL
- 2) GDNF - Factor neurotrófico derivado de la glía (Gibco): 20 ng/mL
- 3) SHH - Sonic hedgehog (Gibco): 50 ng/mL
- 4) AR - Ácido retinoico (Sigma Aldrich): 10 µM
- 5) PMF – Purmofamina (Sigma Aldrich) : 2.5 µM
- 6) FSK – Forskolina (Sigma Aldrich): 20 µM

Las células fueron re-estimuladas con los factores de crecimiento correspondientes cada 3 días. Al mismo tiempo, como modelo de diferenciación neuronal de células humanas se utilizó la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y.

El tiempo y los factores específicos utilizados en cada protocolo de diferenciación de MSC, ya sea con medio NB/B27 o NeuroCult-D, se especifican a continuación:



### **Determinación del número celular y viabilidad**

El número celular y la viabilidad se determinaron usando una cámara de Neubauer y el colorante azul tripano. Se contaron las células vivas y muertas, determinándose la viabilidad así como el incremento en la población, el cual fue calculado como la proporción entre el número final/número inicial de células.

### **Visualización de células viables y necróticas**

Para marcar las células viables y necróticas se utilizó Calceina AM (1  $\mu$ M) (Life technologies) y yoduro de propidio (2  $\mu$ g/mL) respectivamente. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (4  $\mu$ g/mL). Los fluoróforos se adicionaron directamente al medio de las células y se incubaron por 30 minutos a 37° C. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio de epi-fluorescencia Olympus IX71 utilizando el software QCapture Pro 6.0

## **Inmunocitoquímica**

Las células se colectaron, se resuspendieron en medio de cultivo y se colocaron en cubreobjetos o placas de 96 pozos, ambos pre-tratados con poli-D-lisina (50 µg/mL) y fibronectina (1 µg/mL). Dos horas después del plaqueo las células fueron fijadas con PBS/paraformaldehído 4 % por 15 minutos, lavadas (3 veces, 5 min c/u) con PBS/0.1% BSA, permeabilizadas/bloqueadas con una solución de PBS+0.1% BSA+10% suero de cabra+0.3% de tritón X-100 (1 hr a temperatura ambiente) e incubadas toda la noche a 4° C con uno de los siguientes anticuerpos primarios: ratón anti-nestina [1:500], conejo anti-Ki67 [1:50] (ambos de GeneTex), conejo anti MAP-2 [1:500], ratón anti-β III tubulina [1:1000], conejo anti-GFAP [1:100] (todos de SantaCruz Biotechnology), y ratón anti-NeuN [1:50] (Millipore). Posteriormente se lavaron (3 veces, 5 min c/u) con PBS/0.1% BSA y se incubaron durante 1 hr con el anticuerpo secundario correspondiente: cabra anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 488 o cabra anti-IgG de conejo conjugado a Alexa 568 (Molecular Probes, Life Technologies). Los núcleos se tiñeron utilizando 2 µg/mL de Hoechst 33258 (Sigma-aldrich) diluido en PBS. Las microfotografías se obtuvieron mediante un microscopio de epifluorescencia directa Olympus IX71 con un objetivo 10X, usando el software QCapture Pro 6.0 y se analizaron utilizando el software ImageJ. El porcentaje de células positivas para cada marcador se determinó en relación al número total de núcleos teñidos con Hoechst. En un experimento típico se contaron entre 500-1000 células.

## **Incorporación de BrdU**

La incorporación de BrdU se determinó añadiendo un pulso de BrdU 10 µM durante las 72 horas previas al término del cultivo en tres distintos tiempos: día 3, 6 y 9. Las células se colectaron, se plaquearon en cubreobjetos o placas de 96 pozos (ambos pre-tratados con poli-D-lisina y fibronectina), se fijaron y lavaron con PBS/0.1% BSA (3 veces, 5 min c/u), para luego incubarse con una solución de PBS + HCl 2N por 10 minutos a 37°C y se procesaron mediante el protocolo de inmunocitoquímica previamente mencionado. Se utilizó el anticuerpo primario rata anti-BrdU [1:100] (Accurate chemical OBT0030), y el anticuerpo secundario cabra anti-IgG de rata Alexa Fluor 488 [1:200] (Molecular Probes, Life Technologies) para visualizar la señal.

## **Extracción de RNA**

El RNA total de los cultivos se extrajo utilizando el RNeasy Mini Kit (Qiagen). Brevemente, las células fueron lisadas con buffer RLT, el lisado homogeneizado con ayuda de columnas de homogeneización QIAshredder (Qiagen), centrifugando 2 min a 10000g. Un volumen de etanol (70%) fue añadido a la muestra, y ésta se transfirió a una columna RNeasy para ser centrifugada (15 seg, 10000g). Los lavados se realizaron añadiendo el buffer RW1 (2 veces) y RPE, cada paso seguido de centrifugación para eliminar el buffer de lavado (15 seg, 10000g). La muestra fue centrifugada (1 min, 12000g) y colectada en H<sub>2</sub>O libre de RNasas. La concentración de RNA en cada muestra se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) a 260 nm. La pureza del RNA extraído fue determinada con la proporción 260 nm/280 nm.

## **Síntesis de cDNA**

El DNA complementario (cDNA) de cadena sencilla fue sintetizado a partir de 1 µg de RNA utilizando el iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad Laboratories), en un termociclador Veriti (Applied Biosystems). El tiempo de incubación fue el siguiente: 25° C por 5 min, 42° C por 30 min y 85° C por 5 min.

## **Diseño de primers para qPCR**

Las secuencias de los primers específicos humanos para qPCR fueron diseñadas utilizando el software PrimerBlast, a partir de la secuencia de referencia (RefSeq) de cada gen. Se consideraron los siguientes criterios: Amplificación de al menos una unión exón-exón, tamaño del producto entre 50 a 200 pb, tamaño de los primers entre 18-30 bases, temperatura de fusión de 55 a 60° C con una diferencia no mayor a 3° C entre el par de primers, contenido de GC 40-60 %, ausencia de secuencias repetidas de 4 o más nucleótidos, ausencia de un residuo T en el extremo 3', auto complementariedad menor a 6 en el extremo 5' y menor a 3 en el extremo 3'. Los primers se sintetizaron comercialmente (SigmaAldrich).

## **Curvas de eficiencia de los primers**

La eficiencia de cada primer se determinó realizando 4 diluciones seriadas de una muestra de cDNA (1:1, 1:4, 1:16, 1:64) extraído de células humanas positivas para un determinado gen y realizando una qPCR en tiempo real. Se utilizó cDNA de BM-MSC, y de las líneas celulares SY-SY5Y y H9. La eficiencia de cada para de primers se determinó a través de la gráfica de la regresión semi-logarítmica del valor de  $C_T$  (ciclo umbral) promedio de cada dilución, contra el logaritmo de la dilución empleada en ese punto. La pendiente resultante fue tomada para calcular la eficiencia de amplificación.

## **Electroforesis en gel de agarosa**

Los productos de amplificación de los primers se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2% en TBE teñido con bromuro de etidio [0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] para determinar la presencia y tamaño de los productos. Además, la integridad del RNA extraído se analizó por electroforesis no desnaturizante en gel de agarosa 1%. El peso de los productos se identificó con ayuda del marcador de peso molecular 1 KB Plus DNA Ladder (Invitrogen). Las imágenes se obtuvieron utilizando el sistema AlphaDigidoc (Sigma Aldrich).

## **PCR cuantitativa en tiempo real**

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en el sistema StepOnePlus (Applied Biosystems) utilizando el SYBR Green PCR Kit (Qiagen). El siguiente programa de amplificación fue utilizado: Después de 5 min a 95° C, se realizaron 40 ciclos de qPCR con amplificación de 2 pasos (desnaturalización a 95° C por 10 seg, alineación/extensión 60° C por 30 seg), seguido del análisis de curva de disociación de los productos (95° C-15 seg, 60° C-1 min, 95° C-15 seg). La eficiencia de los primers para cada gen fue óptima (90-100%). La expresión de los genes fue normalizada en relación a la proteína de unión a caja TATA (TBP). La cuantificación relativa de los niveles de expresión se realizó mediante el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001). Para todas las condiciones se realizaron al menos 3 experimentos independientes.

## **Análisis estadísticos**

Todos los resultados son reportados como la media  $\pm$  ES de al menos 3 experimentos independientes. La significancia estadística se evaluó utilizando la prueba de ANDEVA de una vía seguida de la prueba de Tukey para comparaciones entre múltiples medias. Para determinar el efecto e interacción entre dos variables se utilizó un ANDEVA de 2 vías, seguido de la prueba de Tukey. El software GraphPad Prism versión 6 (La Jolla, CA, USA) fue utilizado para todos los procedimientos estadísticos. Las diferencias fueron consideradas significativas a  $p < 0.05$ .

## VIII. RESULTADOS

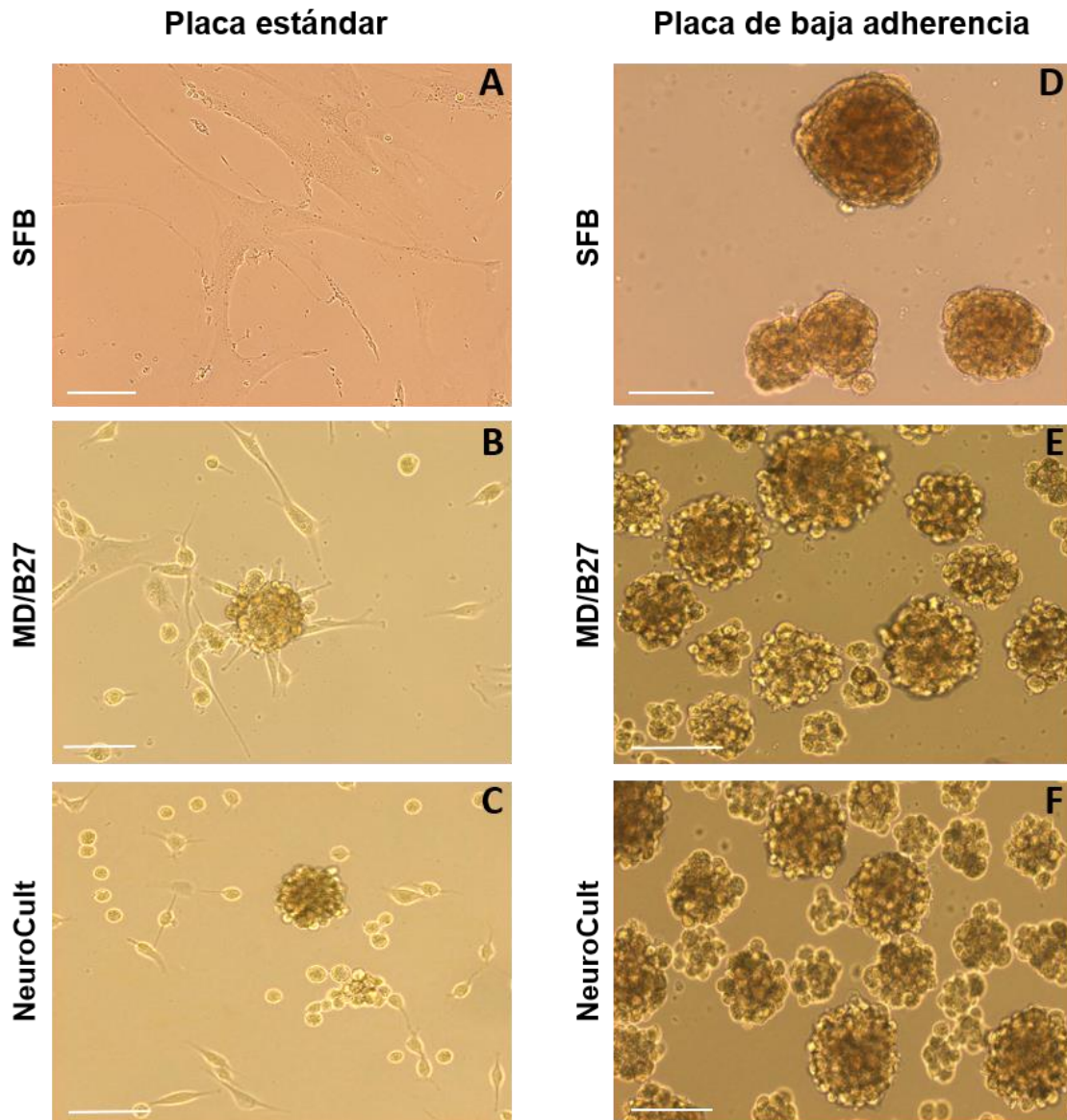
### **Morfología y generación de agregados similares a neuroesferas de hBM-MSC cultivadas en medios específicos**

Para determinar la capacidad de las hBM-MSC de generar células con propiedades de NPC, se probaron dos medios específicos libres de suero (MD/B27 o NeuroCult) suplementados con los factores de crecimiento EGF y bFGF. Las células fueron sembradas con estos medios en placas estándar, y además se utilizaron placas de ultra baja adherencia con el objetivo de favorecer la formación de agregados en suspensión. En cada tipo de placa se adicionó una condición con medio completo (DMEM/SFB 10%) como condición control.

Después de 9 días de cultivo se observaron los cambios morfológicos inducidos por las condiciones experimentales. Cuando las hBM-MSC se cultivaron en placas estándar con SFB, los cultivos presentan células adherentes con morfología fibroblastoide y un abundante citoplasma, características del linaje mesenquimal (Figura 8A). Mientras que, en las células incubadas con los medios específicos se observan cambios morfológicos evidentes, las células son más pequeñas y se distinguen principalmente células redondas que pueden presentar pequeñas prolongaciones, o bien células con citoplasma fusiforme y prolongaciones alargadas. Además, se observó la presencia de algunos agregados celulares (Figura 8B y C).

Cuando las células fueron cultivadas en las placas de baja adherencia, tanto en los medios específicos como en el medio con SFB, se induce la generación de agregados de células en suspensión. En ambos medios libres de suero los agregados son regulares, formados de células bien delimitadas, la mayoría de color translúcido (Figura 8E y F). Sin embargo, en la condición con suero los agregados fueron compactos, de color oscuro y sin una delimitación clara entre las células (Figura 8D).



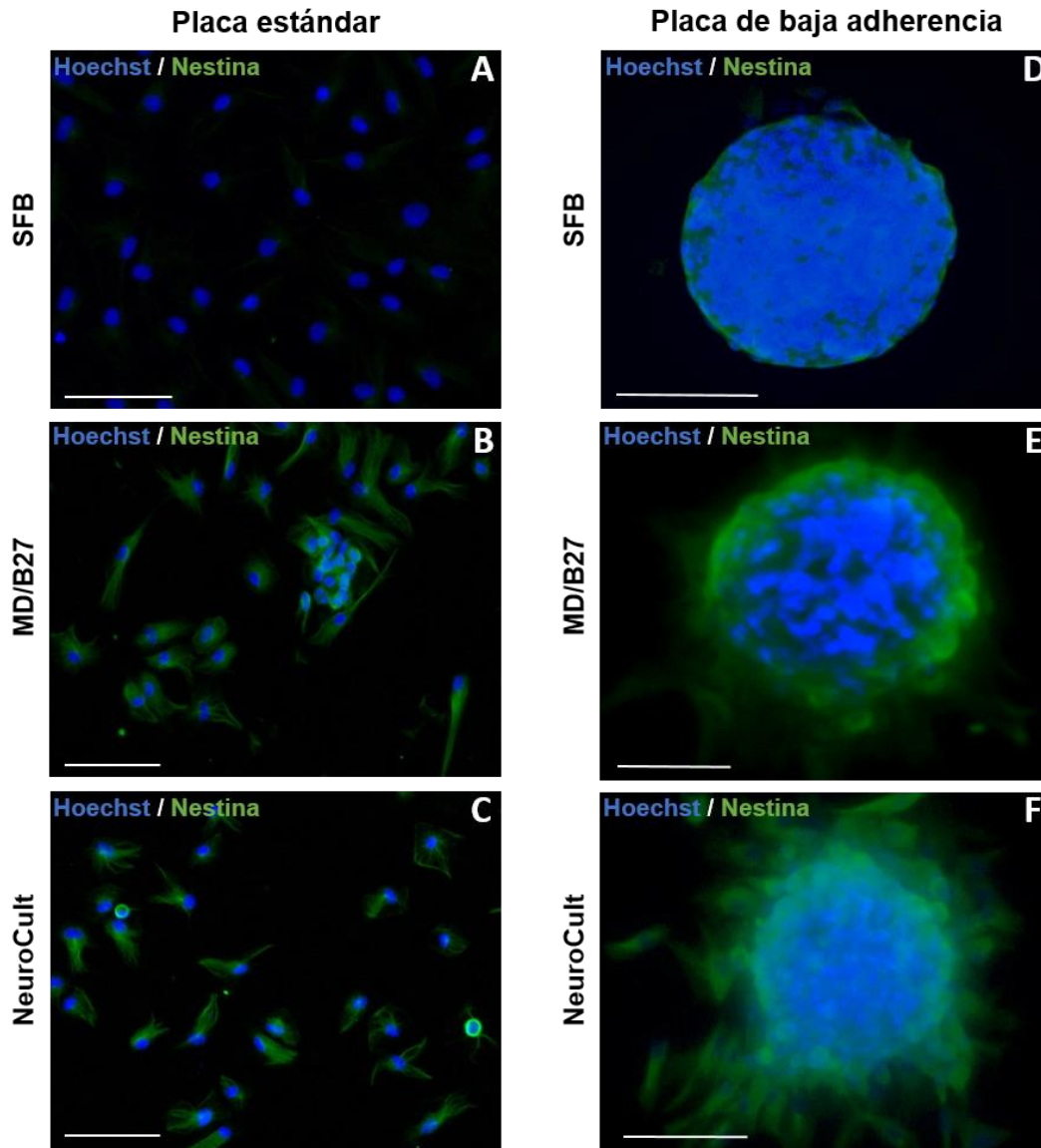


**Figura 8. Cambios morfológicos y generación de agregados celulares en hBM-MSK cultivadas con medios específicos.** Las células se sembraron en placas estándar o de ultra baja adherencia, y se cultivaron en medio con suero o en los medios específicos MD/B27 o NeuroCult. Las imágenes fueron obtenidas después de 9 días de cultivo utilizando un microscopio Olympus IX71 con un objetivo 10 X. Barra de escala 100  $\mu$ m.

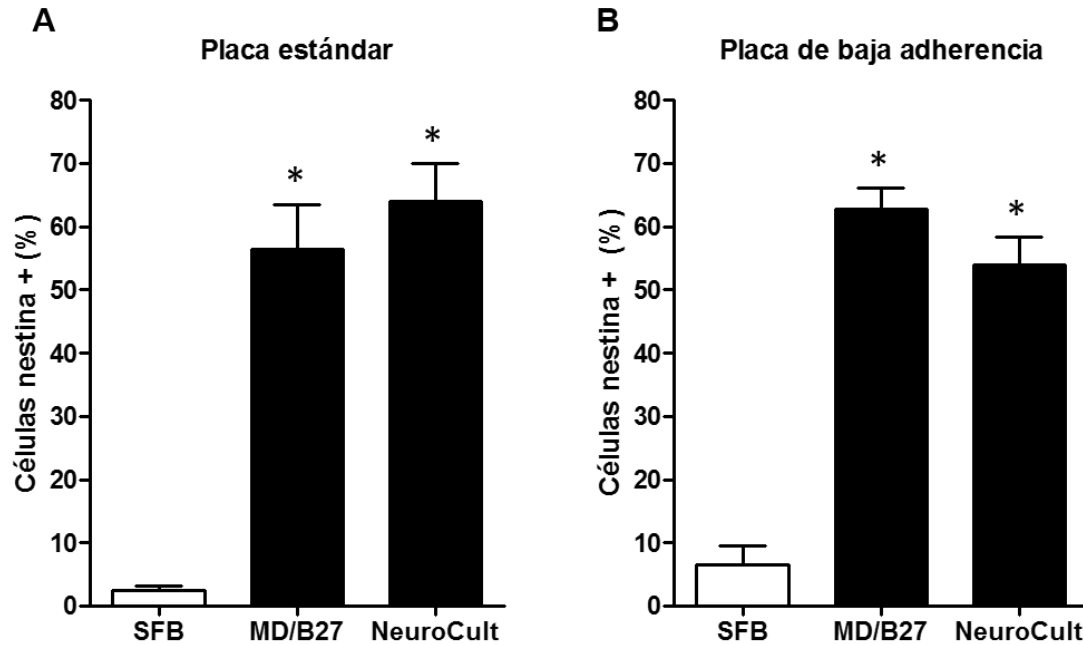
## **Incremento en el porcentaje de células positivas para el marcador nestina**

Para evaluar si las células y los agregados generados presentan marcadores de precursores neurales, se determinó mediante inmunocitoquímica la reactividad y el porcentaje de células positivas para nestina. Esta proteína es un componente de los filamentos intermedios, y uno de los principales marcadores de células troncales y progenitoras neurales.

Tanto las células cultivadas en las placas de superficie estándar, como los agregados generados en las placas de baja adherencia, presentaron reactividad para nestina en todos los tratamientos. Sin embargo, esta reactividad fue baja en las condiciones con suero, e incrementa en las células incubadas con los medios libres de suero (Figura 9). El porcentaje de células nestina positivas en las placas estándar fue de 2.4 % en la condición con SFB. Este porcentaje incrementó a 56.4 % y a 63.9 % en MD/B27 y NeuroCult, respectivamente (Figura 10A). Las células cultivadas en placa de baja adherencia en medio con suero presentaron solo un 6.6% de células nestina<sup>+</sup>, a pesar de su capacidad de formar agregados celulares en suspensión. En estas placas los medios específicos también incrementaron el porcentaje de células nestina<sup>+</sup>. Las células cultivadas en MD/B27 presentaron un porcentaje de 62.81 %, mientras en NeuroCult un 53.93 % (Figura 10B). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de células nestina<sup>+</sup> entre ambos medios libres de suero en ambas superficies de cultivo.



**Figura 9. Imágenes representativas de la presencia de células nestina<sup>+</sup> en hBM-MSC cultivadas en medios específicos.** Después de 9 días las células fueron plaqueadas sobre cubreobjetos y la reactividad a nestina se detectó por inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo primario anti-nestina, seguido por el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (verde). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258. Las microfotografías fueron tomadas mediante microscopía de epifluorescencia con un objetivo 10X en un microscopio Olympus IX71. Barra de escala 100  $\mu$ m.

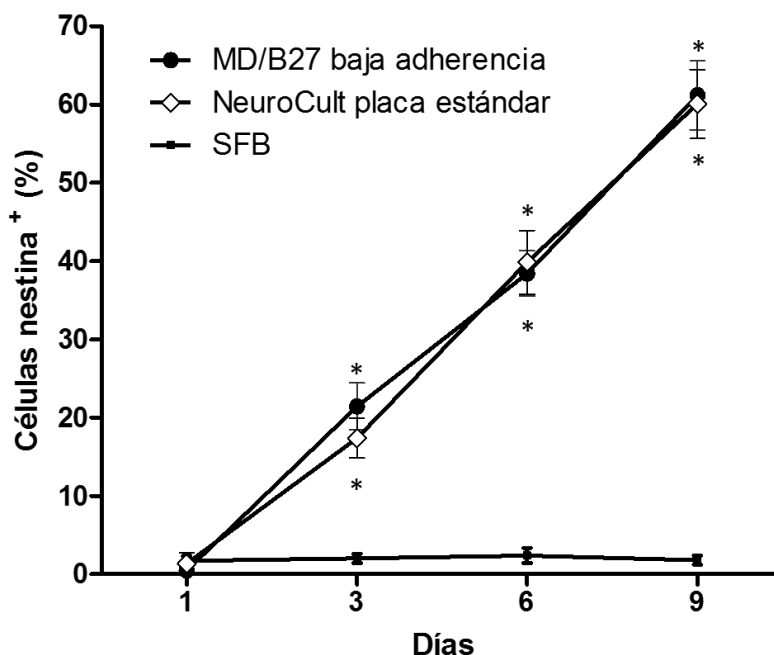


**Figura 10. Porcentaje de células nestina<sup>+</sup> en hBM-MSC cultivadas en medios específicos libres de suero.**

**A)** Porcentaje de células nestina<sup>+</sup> cultivadas en placa con superficie estándar. **B)** Porcentaje de células nestina<sup>+</sup> cultivadas en placas de baja adherencia. Las células y agregados fueron tripsinizados para ser procesados por inmunocitoquímica y el número de células positivas para nestina se determinó con relación al número total de núcleos teñidos con Hoechst. Las barras representan la media  $\pm$  ES de al menos 5 experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron mediante ANDEVA de 1 vía seguido de la prueba de Tukey. (\*  $p < 0.01$ ) comparado con hBM-MSC en medio con suero.

## Incremento dependiente del tiempo en el número de células positivas a nestina

Para determinar el incremento en las células positivas a nestina con respecto al tiempo de cultivo, las hBM-MSCs fueron incubadas en MD/B27 sobre placas de baja adherencia ó NeuroCult en placas estándar durante 1, 3, 6 y 9 días. Después de 24 horas no existe incremento en este marcador en ninguno de los tratamientos. Al día 3, el cultivo control se mantiene con bajos porcentajes de células nestina<sup>+</sup>. Sin embargo, a este tiempo se observa un incremento evidente en el porcentaje de células nestina<sup>+</sup> en ambos medios, MD/B27 y NeuroCult (21.4% y 17.4% respectivamente). En los subsecuentes días, el porcentaje de células nestina<sup>+</sup> continúa incrementando en los medios específicos (Figura 11). Esta respuesta gradual mostró que existe una interacción entre el tiempo y el incremento en las células positivas a nestina por los medios específicos. No se presentaron diferencias significativas entre MD/B27 y NeuroCult a ningún tiempo.



**Figura 11. Evaluación del curso temporal de células nestina<sup>+</sup> en hBM-MSCs.** Las células fueron cultivadas en placa estándar con SFB o con los medios libres de suero. El porcentaje de células nestina<sup>+</sup> fue evaluado mediante inmunocitoquímica a los días 1, 3, 6 y 9. Los puntos representan la media  $\pm$  ES de al menos 4 experimentos independientes. Las diferencias significativas con respecto al cultivo control (\* $p < 0.01$ ), así como la interacción entre el tiempo y los tratamientos se determinaron mediante ANDEVA de 2 vías seguido de la prueba de Tukey.

## **Estandarización del análisis de cambios de expresión génica**

Además de evaluar la presencia del marcador neural nestina, se determinaron por PCR cuantitativa (qRT-PCR) los cambios en la expresión de genes relacionados al linaje neural y al linaje mesenquimal. Para este fin, se diseñaron primers específicos, se realizó la curva de eficiencia correspondiente, y se seleccionó el gen endógeno más adecuado.

Mediante el software Primer-BLAST se diseñaron oligonucleótidos específicos para detectar genes expresados en células precursoras neurales y en células mesenquimales humanas, además de genes cuya expresión se considera constitutiva (Tabla 1). Para cada par de primers se realizó una curva de eficiencia, y se seleccionaron aquellos que presentaron especificidad en la amplificación, una eficiencia óptima ( $100\% \pm 10$ ) y un coeficiente de correlación  $\geq 0.99$  (Tabla 2; figura suplementaria 2 y 3). Fueron 15 los pares de primers seleccionados: seis para genes constitutivos (*TBP*, *GAPDH*, *B2M*, *HPRT1*, *ACTB* y *UBC*), 4 para genes marcadores de células mesenquimales (*FNI*, *CD105*, *CD90*, *CD73*), 4 para marcadores de células troncales/progenitoras neurales (*NES*, *SOX2*, *MS1*, *NOTCH1*), además de *POU5F1*, marcador de pluripotencia también conocido como *OCT4*.

De los 6 genes constitutivos probados se seleccionó a TBP (TATA binding protein), ya que mostró la menor variación de expresión entre la condición control y los tratamientos (Figura 12).

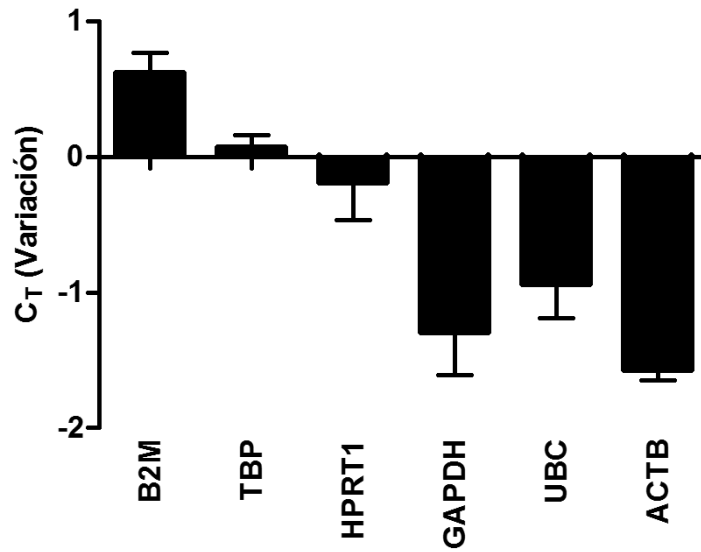
**Tabla 1. Primers diseñados para PCR cuantitativa en tiempo real.**

GEN	REFSEQ	SECUENCIA (SENTIDO; ANTISENTIDO)	TAMAÑO DEL PRODUCTO (PB)
<i>ACTB</i> (Beta Actina)	NM_001101.3	5'-CCGCGAGCACAGAGCC-3' 5'-ATCATCCATGGTGAGCTGGC-3'	72
<i>GAPDH</i> (Gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa, variante de transcrito 2)	NM_001256799.1	5'-ACCATCTTCCAGGAGCGAGA-3' 5'-GACTCCACGACGTACTCAGC-3'	71
<i>B2M</i> (Beta-2 microglobulina)	NM_004048.2	5'-GAGTATGCCTGCCGTGTGAA-3' 5'-GCGGCATCTTCAAACCTCC-3'	101
<i>HPRT1</i> (Hipoxantina fosforibosil transferasa 1)	NM_000194.2	5'-CCCTGGCGTCGTGATTAGTG-3' 5'-TCGAGCAAGACGTTTCAAGTCC-3'	139
<i>GUSB</i> (Glucoronidasa beta, variante de transcrito 1)	NM_000181.3	5'-TTCCTATGCCATCGTGTGGG-3' 5'-ATAGTGATTCGGAGCCGGGA-3'	129
<i>TBP</i> (Proteína de unión a caja TATA)	NM_003194.4	5'-GCAAGGGTTTCTGGTTTGCC-3' 5'-CAAGCCCTGAGCGTAAGGTG-3'	80
<i>UBC</i> (Ubiquitina C)	NM_021009	5'-TGGGTCGCAGTCTTGTGTTG-3' 5'-CACGAAGATCTGCATTGTCAAG-3'	61
<i>NES</i> (Nestina)	NM_006617.1	5'-CTCAGCTTTCAGGACCCCAAG-3' 5'-GCACAGGTGTCTCAAGGTA-3'	133
<i>SOX2</i> (SRY (Región determinante del sexo Y) Box 2)	NM_003106.3	5'-CAGGAGTTGTCAAGGCAGAGA-3' 5'-GTCCTAGTCTTAAAGAGGCAGCA-3'	75
<i>MS1</i> (Proteína de unión a RNA musashi 1)	NM_002442.3	5'-AAGAGATCCAGGGGTTTCGG-3' 5'-AGTCACCATCTTGGGCTGTG-3'	147
<i>CD133</i> (Prominina 1, variante de transcrito 1)	NM_006017.2	5'-TGGTACAGCCGCGTGATTC-3' 5'-ACCTAAGATTACAGTTTCTGGCTTG-3'	104
<i>ASCL1</i> (Factor de transcripción HLH 1 de la familia achaete scute)	NM_004316.3	5'-GGACTTTGGAAGCAGGGTGA-3' 5'-CGCCACTGACAAGAAAGCAC-3'	60
<i>NOTCH1</i> (Notch1)	NM_017617.3	5'-CACGCTGACGGAGTACAAGT-3' 5'-GGCACGATTCCTTGACCA-3'	56
<i>FN1</i> (Fibronectina 1)	NM_212482.1	5'-GGGACTCAATCAAATGCCTC-3' 5'-TCTTCATCAGTGCCAACAGGA-3'	123
<i>CD105</i> (Endogлина, variante de transcrito 2) (ENG)	NM_00018.3	5'-CCTGACCTGTCTGGTTGCAC-3' 5'-ACGCGTGTGCGAGTAGATG-3'	126
<i>CD90</i> (Antígeno de superficie celular Thy -1) (THY1)	NM_006288.3	5'-CAGCATCGCTCTCCTGCTAA-3' 5'-ACTGGATGGGTGAACTGCTG-3'	134
<i>CD73</i> (Ecto 5-nucleotidasa, variante de transcrito 1) (NT5E)	NM_002526.3	5'-GATGAACGCAACAATGGCACA-3' 5'-CAAATGTGCCTCAAAGGGC-3'	70
<i>POU5F1</i> (Homeobox 1 POU clase 5) (OCT4)	NM_002701.5	5'-GCAGCAGATCAGCCACATCG-3' 5'-CACACTCGGACCACATCCTTC-3'	60

**Tabla 2. Eficiencia de amplificación, coeficiente de correlación ( $R^2$ ) y especificidad de amplificación de los primers diseñados.** La especificidad de cada par de primers fue determinada mediante electroforesis y la curva de disociación respectiva. La detección de un solo producto del tamaño esperado, así como la presencia de un producto en la curva de disociación se representan como (+/+), mientras que la ausencia de producto se representa como (-).

GEN	PENDIENTE DE LA RECTA	EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN	$R^2$	ESPECIFICIDAD DE AMPLIFICACIÓN
ACTB (Actina Beta)	-3.23	1.04	0.99	+/+
<i>GAPDH</i> (Gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa, variante de transcrito 2)	-3.45	0.95	0.99	+/+
B2M (Beta-2 microglobulina)	-3.33	0.97	0.99	+/+
<i>HPRT1</i> (Hipoxantina fosforibosil tranferasa 1)	-3.31	1.01	0.99	+/+
<i>GUSB</i> (Glucoronidasa beta, variante de transcrito 1)	-1.33	4.67	0.95	+/+
<i>TBP</i> (Proteína de unión a caja TATA)	-3.21	1.05	0.99	+/+
<i>UBC</i> (Ubiquitina C)	-3.32	1.00	0.99	+/+
<i>NES</i> (Nestina)	-3.48	1.01	0.99	+/+
<i>SOX2</i> (SRY (Región determinante del sexo Y) Box 2)	-3.47	0.94	0.99	+/+
<i>MS1</i> (Proteína de unión a RNA musashi 1)	-3.47	0.94	0.99	+/+
<i>CD133</i> (Prominina 1, variante de transcrito 1)	1.45	-0.80	0.31	+/+
<i>ASCL1</i> (Factor de transcripción HLH 1 de la familia achaete scute)	-2.66	1.38	0.69	-
<i>NOTCH1</i>	-3.20	1.05	0.99	+/+
<i>FN1</i> (Fibronectina 1)	-3.18	1.06	1	+/+
<i>CD105</i> (Endoglina, variante de transcrito 2) (ENG)	-3.24	1.04	0.99	+/+
<i>CD90</i> (Antígeno de superficie celular Thy -1) (THY1)	-3.35	0.99	0.99	+/+
<i>CD73</i> (Ecto 5-nucleotidasa, variante de transcrito 1) (NT5E)	-3.13	1.09	0.99	+/+
<i>POU5F1</i> (Homeobox 1 POU clase 5) (OCT4)	-3.39	0.97	0.99	+/+

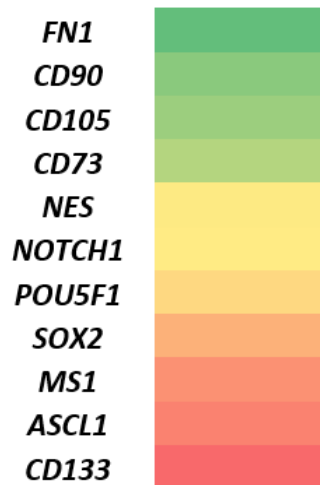




**Figura 12. Variación en la expresión de los genes constitutivos debido a los tratamientos.** Las células se cultivaron en medios inductores (MD/B27 placa de baja adherencia y NeuroCult placa estándar), y se evaluó el cambio en la expresión de ambas condiciones con respecto a la condición control mediante qPCR. Las barras representan la media de ambas condiciones  $\pm$  ES de al menos 4 experimentos independientes.

### *Cambios en la expresión de genes asociados a células precursoras neurales y a células estromales mesenquimales*

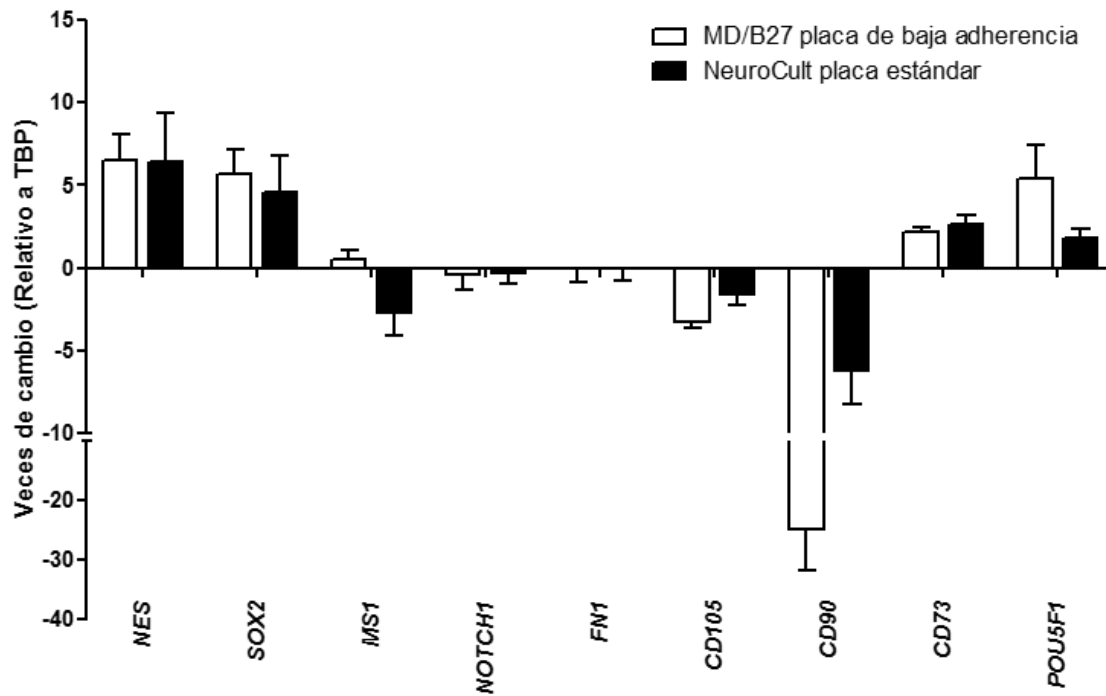
Con los parámetros previamente establecidos, en primer lugar, se cuantificó la expresión basal de los genes neurales y mesenquimales a evaluar. Las 3 muestras independientes de hBM-MSC mostraron niveles de expresión similares. Los genes asociados al linaje mesenquimal tienen una alta expresión, en el siguiente orden: *FN1* > *CD90* > *CD105* > *CD73*. Mientras que los niveles de los genes asociados a NPC son relativamente bajos (*NES* > *NOTCH1* > *SOX2* > *MS1* > *ASCL1* > *CD133*). Además, las células expresan el marcador de pluripotencia *POU5F1*, aunque a bajos niveles (Figura 13).



**Figura 13. Expresión basal relativa de genes del linaje neural y mesenquimal en las muestras de hBM-MSC.** Muestras de RNA de células control fueron extraídas y analizadas por qRT-PCR. La expresión relativa de cada gen fue calculada con respecto a los niveles de expresión de TBP. El patrón de colores fue asociado a la expresión relativa mediante Microsoft Excel 2013. Rojo: Nivel de expresión baja. Verde: Nivel de expresión alta.

Para evaluar los cambios inducidos por los tratamientos en la expresión de los genes mencionados, se seleccionaron las condiciones que presentaron el mayor porcentaje de células nestina<sup>+</sup> en ambos tipos de placa: NeuroCult en placas estándar y MD/B27 en placas de ultra baja adherencia.

Después de 9 días de cultivo ambos medios libres de suero incrementaron la transcripción de algunos genes característicos de NPC en las hBM-MSCs, específicamente *NES* y *SOX2*. No se encontró ningún cambio importante en la expresión de *NOTCH*, y se observó una disminución de *MSI* en el medio NeuroCult. Al mismo tiempo, las células incubadas en ambas condiciones presentaron una disminución en *CD90* y *CD105*, genes asociados al linaje mesenquimal, con mayor magnitud en la condición MD/B27 baja adherencia. No obstante, otros marcadores del linaje mesenquimal como *FNI* y *CD73*, mantienen o incrementan su expresión. La expresión de *POU5F1* se ve incrementada por ambos tratamientos, especialmente MD/B27 en superficie no adherente (Figura 14).

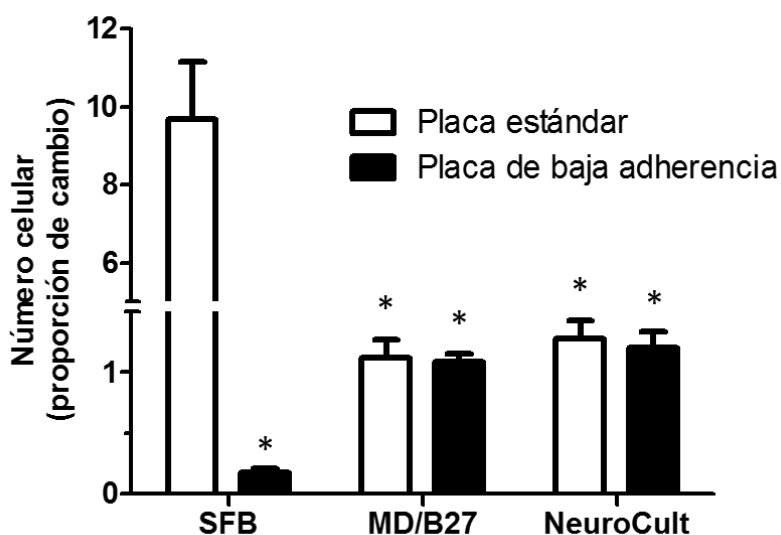


**Figura 14. Expresión relativa de genes del linaje neural y mesenquimal en hBM-MSC cultivadas en medios de inducción neural.** Las muestras de RNA obtenidas de hBM-MSC cultivadas en medio control placa estándar, MD/B27 placa de baja adherencia o NeuroCult placa estándar fueron procesadas por qRT-PCR. La expresión de *NES* (Nestina), *SOX2* (SRY Box 2), *MSI* (Proteína de unión a RNA musashi 1), *NOTCH1*, *FN1* (Fibronectina 1), *CD105* (Endogлина), *CD90* (Antígeno de superficie celular Thy-1), *CD73* (Ecto 5-nucleotidasa) y *POU5F1* (Homeobox 1 POU clase 5) fue evaluada. Las veces de cambio en la expresión para cada gen fueron calculadas por el método de Pfaffl después de la normalización con respecto a la expresión de TBP. Los resultados representan la media  $\pm$  ES de al menos 4 experimentos independientes.

## Análisis del ciclo celular y proliferación

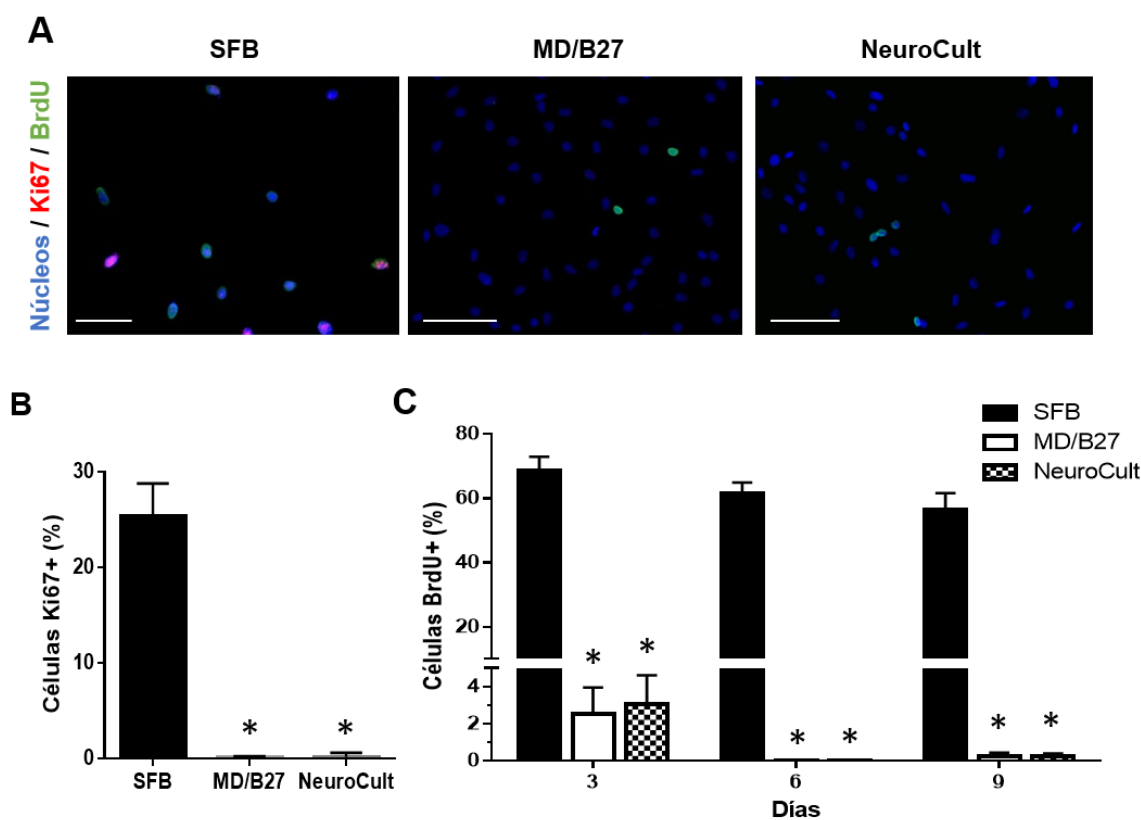
Con el objetivo de determinar si las células cultivadas en las condiciones libres de suero son capaces de proliferar, manteniendo un ciclo celular activo, se evaluaron los siguientes parámetros: i) la proporción de cambio en la población al finalizar el cultivo con respecto al número inicial, ii) presencia de Ki67 e iii) incorporación de BrdU.

El cambio en el número celular fue evaluado como la relación entre las células iniciales y las células obtenidas al finalizar los 9 días de cultivo. La hBM-MSc en la condición control incrementaron el número celular en promedio 9.68 veces. Mientras que, en las células cultivadas con los medios específicos, en ambos tipos de placa, la población no incrementó, pero se mantuvo cercana al número inicial. Por el contrario, en medio con SFB en las placas de baja adherencia el número celular se ve notablemente disminuido, obteniéndose solo el 18% del número inicial (Figura 15).



**Figura 15. Proporción final de incremento/disminución del número de células.** Las células se contaron y el cambio en la población al día 9 fue determinado como la proporción final/inicial en el número celular. Las diferencias significativas (\*  $p < 0.01$ ) se determinaron mediante ANDEVA 1 vía y por la prueba de Tukey con respecto a las MSC cultivadas con suero en placas estándar.

La actividad del ciclo celular se determinó mediante la proteína nuclear Ki67, presente en todas las fases del ciclo celular excepto en la fase G0, y las células que pasaron por la fase S se evaluaron por la incorporación de BrdU. Cultivos subconfluentes de hBM-MSK presentaron células Ki67<sup>+</sup> y BrdU<sup>+</sup>, mientras que en los tratamientos solo se observó un bajo porcentaje de células positivas (Figura 16A). El cultivo control al día 3 mostró un 27.4% de células Ki67<sup>+</sup> y más del 60% de BrdU<sup>+</sup>. Mientras que, en los tratamientos se encontraron menos del 0.5% de células Ki67 positivas, y el porcentaje de células BrdU<sup>+</sup> fue menor al 4%, aún evaluando a los 3, 6 o 9 días (Figura 16B y C).



**Figura 16. Incorporación de BrdU y presencia de Ki67.** Las hBM-MSK fueron incubadas en condiciones control, con MD/B27 en placa de baja adherencia o con NeuroCult en placa estándar. **A)** Microfotografías representativas de la reactividad a BrdU (Alexa Fluor 488: verde) y Ki67 (Alexa Fluor 568: rojo). Los núcleos fueron marcados con Hoechst (Azul). **B)** Porcentaje de células positivas para Ki67 al día 3. **C)** Porcentaje de células BrdU<sup>+</sup> a los 3, 6 o 9 días. Las diferencias significativas (\* p<0.01) se determinaron mediante ANDEVA 1 vía y prueba de Tukey. Barra de escala 100µm.

## Efecto de los tratamientos en la viabilidad de las hBM-MSK

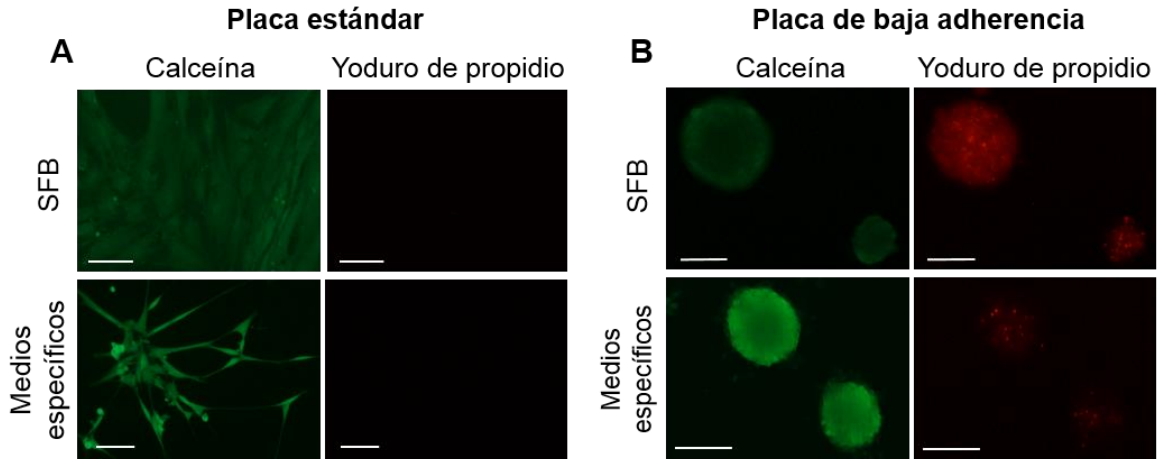
La viabilidad en los tratamientos se evaluó después de disgregar las células mediante el ensayo de exclusión al azul tripano. Además, la viabilidad se determinó *in situ* usando los reactivos fluorescentes calceína AM y yoduro de propidio para detectar las células viables y las células necróticas, respectivamente.

Los resultados obtenidos del ensayo con azul tripano indicaron que la viabilidad no se ve alterada de manera significativa por ninguna condición, conservando valores de alrededor del 90 % (Tabla 3). En las placas estándar la evaluación *in situ* mostró que la mayoría de las células fueron positivas para Calceína-AM y muy pocas presentaron reactividad para yoduro de propidio (Figura 17A). Al evaluarse el porcentaje de células necróticas no se encontraron diferencias significativas entre el control y los medios libres de suero (Tabla 4).

Los agregados formados en las placas de baja adherencia mostraron reactividad para calceína-AM, pero también se observaron células necróticas tanto en el cultivo con suero como en ambos medios específicos (Figura 17B). Sin embargo, el número de células necróticas por agregado fue significativamente mayor en las células cultivadas con SFB (Tabla 4).

**Tabla 3. Porcentaje de viabilidad al día 9 evaluado por azul tripano en MSC cultivadas en medio con suero o medios de inducción neural, en placa estándar o de baja adherencia.**

	VIABILIDAD (%)	
	(CÉLULAS EXCLUYENTES AL AZUL TRIPANO)	
	Placa estándar	Placa de baja adherencia
SFB	93.5 ± 1.8	87.2 ± 2.9
MD/B27	93.7 ± 1.7	96.1 ± 0.5
NeuroCult	96.7 ± 1.4	92.8 ± 2.8



**Figura 17. Viabilidad y necrosis en hBM-MSC cultivadas en medios específicos.** Imágenes representativas de células viables y necróticas evaluadas mediante calceína AM y yoduro de propidio respectivamente. Las células se cultivaron en medio con suero o medios libres de suero (MD/B27 o NeuroCult) en **A)** placas de superficie estándar o **B)** placas de ultra baja adherencia. La reactividad se visualizó en un microscopio de epifluorescencia Olympus IX71 con un objetivo 10X. Barra de escala 100  $\mu$ m.

**Tabla 4. Porcentaje de necrosis y número de células necróticas por agregado *in situ*, evaluado mediante yoduro de propidio.** Diferencias significativas (\*  $p < 0.01$ ) con respecto al medio con suero se determinaron mediante ANDEVA 1 vía seguido de la prueba de Tukey.

NECROSIS <i>IN SITU</i>		
	Placa estándar (Porcentaje de necrosis)	Placa de baja adherencia (Células necróticas / agregado)
<b>SFB</b>	0.1 $\pm$ 0.1	62.42 $\pm$ 1.9
<b>MD/B27</b>	6.2 $\pm$ 3.1	11.57 $\pm$ 0.9*
<b>NeuroCult</b>	7.2 $\pm$ 3.1	14.94 $\pm$ 3.77*

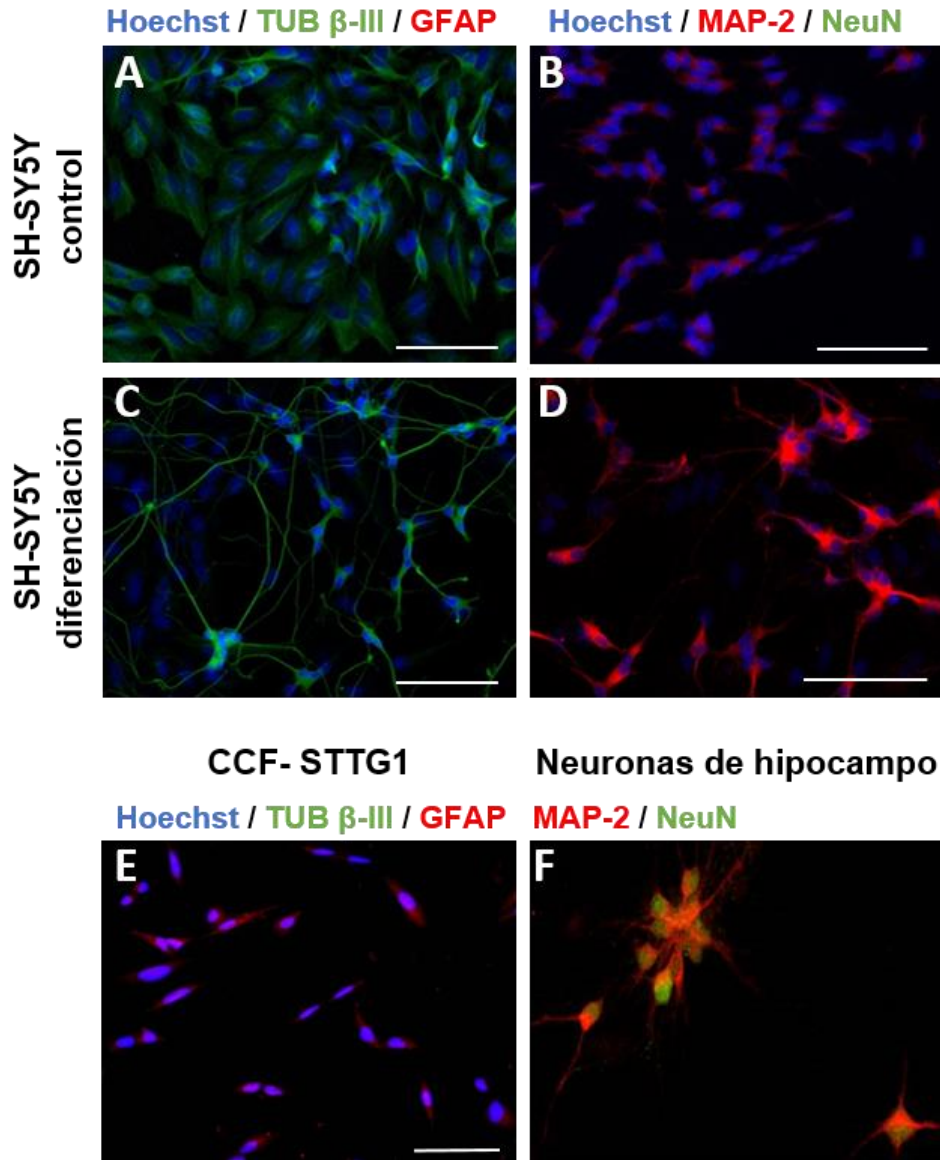


## Diferenciación neuronal de hBM-MSC

Para evaluar la capacidad de transdiferenciación neuronal de las hBM-MSC se utilizó el medio neurobasal suplementado con B27 (NB/B27), y un medio específico para la diferenciación de NPC humanas, denominado NeuroCult™ NS-A Differentiation (NeuroCult-D). Además de los siguientes compuestos y factores neurotróficos, previamente reportados en la inducción de la transdiferenciación neural de MSC: ácido retinoico (AR), purmofamina (PMF) un análogo de Shh, forskolina (FSK) un activador de la adenilato ciclasa, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF).

Los tipos celulares generados se identificaron con anticuerpos que reconocen marcadores de neuronas inmaduras ( $\beta$ -III tubulina), neuronas maduras (MAP-2, NeuN) y astrocitos (GFAP). La eficacia de los métodos de inducción y la especificidad de los anticuerpos, fueron probadas induciendo la diferenciación de la línea celular SH-SY5Y y con neuronas maduras de hipocampo de ratón.

Las células SH-SY5Y, una línea celular de neuroblastoma, presentaron reactividad para  $\beta$ -III tubulina y MAP-2 (Figura 18A y B). La incubación por 14 días con NB/B27 y BDNF, promovió la extensión de neuritas y un incremento en la reactividad a MAP-2 (Figuras 18C y D). A pesar del prolongado tiempo de cultivo, no se observaron células positivas para el marcador de neuronas post-mitóticas NeuN (Figura 18D). Por lo que la especificidad de este anticuerpo fue probada en cultivos de neuronas de hipocampo, en las cuales sí se encontró reactividad para este antígeno específico del núcleo neuronal (Figura 18F). Finalmente, la especificidad del anticuerpo anti-GFAP fue determinada con la línea celular de astrocitoma CCF-STTG1 (Figura 18E).

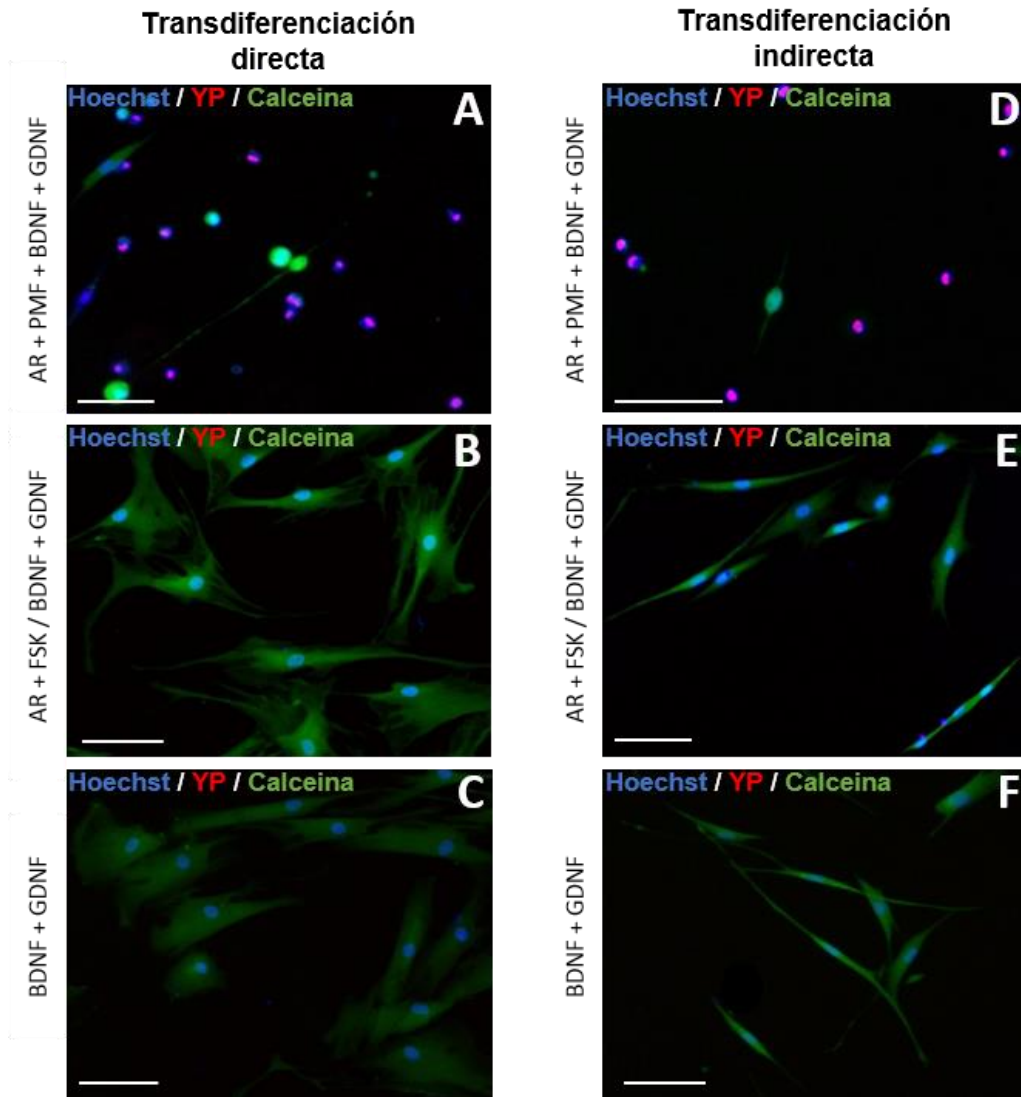


**Figura 18. Presencia específica de marcadores de neuronas maduras, inmaduras y células gliales.** Microfotografías representativas de la presencia de Tubulina  $\beta$ -III y GFAP (A, C y E), MAP-2 y NeuN (B, D y F), en las células SH-SY5Y control o diferenciadas, neuronas de hipocampo y células CCF-STTG1. La reactividad a los marcadores se detectó por inmunocitoquímica utilizando los anticuerpos primarios anti-Tubulina  $\beta$ -III, anti-GFAP, anti-MAP-2 o anti-NeuN, seguido por los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 (verde) para NeuN y Tubulina  $\beta$ -III o Alexa 568 (rojo) para MAP-2 y GFAP. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst. La reactividad se visualizó mediante microscopía de epifluorescencia con un objetivo 10X en un microscopio Olympus IX71, con excepción de las neuronas de hipocampo que fueron visualizadas en un microscopio confocal FV1000 con un objetivo 40X. Barra de escala 100  $\mu$ m.

La generación de linajes neurales se llevó a cabo en las hBM-MSCs cultivadas en medio con suero (transdiferenciación directa), y en las células pre-inducidas generadas con el MD/B27 y el medio NeuroCult (transdiferenciación indirecta), probándose distintas combinaciones de factores.

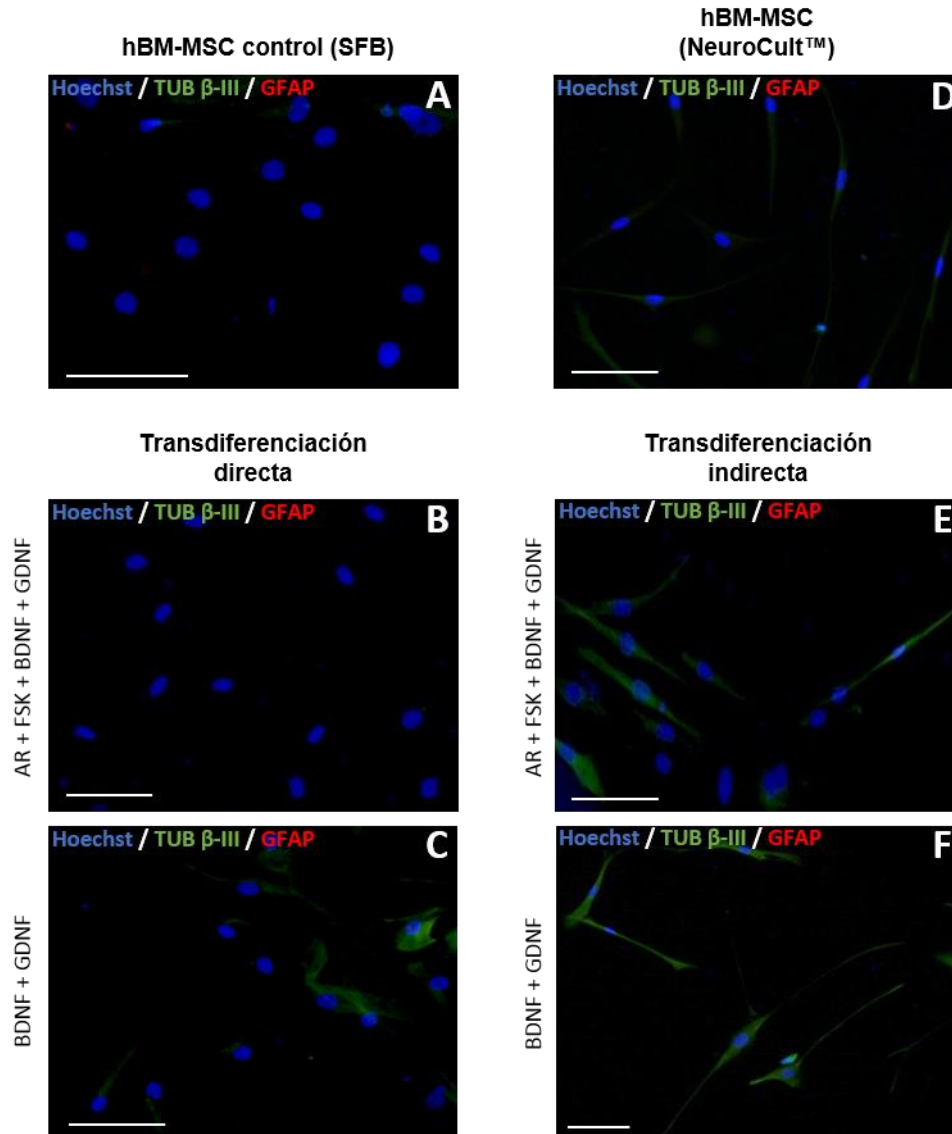
Para determinar si los tratamientos inductores provocan citotoxicidad se evaluó la viabilidad de las células. Con la combinación de AR, PMF, BDNF y GDNF se observó un alto número de células necróticas, tanto en los protocolos de transdiferenciación directa como indirecta (Figura 19A y D). En los demás tratamientos la mayoría de las células se mantuvieron viables durante el tiempo de cultivo (Figura 19B, C, E y F).

Para analizar los cambios morfológicos en las células se tomó ventaja de la fluorescencia emitida por la calceína. En los protocolos de transdiferenciación directa no se observaron cambios evidentes en la morfología (Figura 19 A-C). En la diferenciación indirecta se observaron células con prolongaciones alargadas, estos cambios fueron más acentuados en presencia del medio NB/B27 (Figura 19 E y F). Los cambios en la morfología fueron similares en las células que provienen de los cultivos con MD/B27 y de NeuroCult (dato no mostrado).

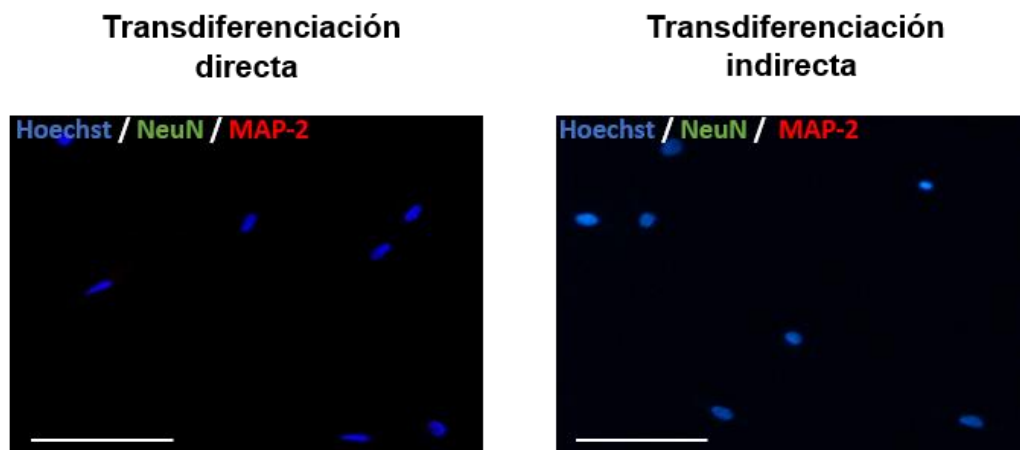


**Figura 19. Morfología, viabilidad y necrosis de hBM-MSC en condiciones de diferenciación neuronal.** Morfología celular de hBM-MSC inducidas a diferenciación neuronal mediante diferenciación directa o previo cultivo en MD/B27 baja adherencia y NeuroCult placa estándar. Las células fueron tratadas con el protocolo de diferenciación indicado en adherencia (PDL y fibronectina). Las imágenes fueron tomadas mediante un microscopio de epifluorescencia Olympus IX71. Barra de escala 100  $\mu$ m.

Posteriormente, se evaluó la presencia de marcadores neuronales y de células gliales. En las hBM-MSC control no se observaron células positivas para  $\beta$ -III tubulina o para GFAP (Figura 20A), mientras que al inducirse su transdiferenciación se encontraron algunas células con reactividad para  $\beta$ -III tubulina, solo en los cultivos con medio NB/B27 adicionado con BDNF y GDNF (Figura 19C). Las hBM-MSC incubadas previamente con NeuroCult (Figura 19D) o MD/B27 presentaron una ligera reactividad para  $\beta$ -III tubulina, y la inducción de diferenciación (diferenciación indirecta) incrementó la reactividad para este marcador, efecto que fue mayor en medio NB/B27 con BDNF y GDNF (Figura 19 F). A pesar de que las células cultivadas con medio NeuroCult-D incrementaron también la presencia de este antígeno, el efecto fue menor que con NB/B27 (dato no mostrado). No se detectaron células positivas para los marcadores de neuronas maduras MAP-2 y NeuN en ninguno de los tratamientos, incluso en la condición NB/B27 con BDNF y GDNF, la cual mostró la mayor reactividad para  $\beta$ -III tubulina (Figura 21). Asimismo, no se observó reactividad para el marcador de astrocitos GFAP (Figura 20).



**Figura 20. Transdiferenciación neuronal de las células hBM-MSC inducida con NB/B27.** La diferenciación hacia linajes neuronales fue inducida con medio NB/B27 en las hBM-MSC control cultivadas con SFB (transdiferenciación directa) (**A-C**), o en las hBM-MSC cultivadas por 9 días con los medios específicos MD/B27 o NeuroCult (transdiferenciación indirecta) (**D-F**). La reactividad a tubulina  $\beta$ -III y GFAP se detectó por inmunocitoquímica en un microscopio Olympus IX71 utilizando el anticuerpo Alexa Fluor 488 (verde). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst. Barra de escala 100  $\mu$ m.



**Figura 21. Ausencia de marcadores de neuronas maduras en hBM-MSC en condiciones de transdiferenciación neuronal.** Imágenes representativas de la reactividad a las proteínas MAP-2 y NeuN en hBM-MSC inducidas a diferenciación neuronal con medio NB/B27 + BDNF + GDNF. La reactividad se detectó por inmunocitoquímica empleando los anticuerpos Alexa Fluor 488 (verde) para NeuN y Alexa Fluor 568 (rojo) para MAP-2. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst. Barra de escala 100  $\mu$ m.

## **IX. DISCUSIÓN**

Existe un número creciente de reportes que afirman la generación de células neurales *in vivo* e *in vitro* a partir de MSC humanas o murinas, ya sea a través de citocinas, inductores químicos, co-cultivo con células neurales o modificaciones genéticas más citocinas (Woodbury et al 2000; Sánchez-Ramos et al, 2000; Hermann et al, 2004; Dezawa et al, 2004; Tropel et al, 2006; Fu et al, 2008). Recientemente, estos resultados se han puesto en duda, debido a que la mayoría de los estudios que demuestran la diferenciación neural de MSC basan sus conclusiones en la adopción de morfología neuronal y expresión de algunos genes neurales. Además, estudios recientes han mostrado que células no neurales pueden extender estructuras similares a dendritas a causa de alteraciones del citoesqueleto y expresar de manera aberrante genes del linaje neural (Raedt et al, 2007; Rooney et al, 2009).

Con el objeto de investigar más a fondo la capacidad de generación de células troncales/progenitoras neurales y/o neuronas diferenciadas a partir de células estromales mesenquimales de médula ósea humana (hBM-MS) el presente estudio evaluó si éstas adquieren marcadores y morfología de células del linaje neural, al ser cultivadas en condiciones de inducción, evaluando las principales características funcionales de las NPC. Para esto se determinaron los cambios en morfología y/o generación de agregados celulares en suspensión, los cambios de expresión en marcadores del linaje neural y mesenquimal, la capacidad de expansión de la población, actividad del ciclo celular, viabilidad, y el potencial de diferenciación en neuronas y células gliales.

### **Caracterización de las hBM-MS**

Las muestras utilizadas en este estudio fueron previamente caracterizadas por Montesinos et al. (2009), y se demostró que presentan la morfología e inmunofenotipo característicos de las células estromales mesenquimales de médula ósea humana. Son células adherentes al plástico, con morfología fibroblastoide o fusiforme, citoplasma abundante, expresan altos niveles de CD90, CD105 y CD73 y poseen la capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica.



Además, las hBM-MSC expresaron en baja proporción algunos marcadores de células inmaduras del linaje neural, tales como nestina o SOX2. También se ha reportado la expresión de tubulina  $\beta$ -III, Neurogenina 2 o NeuroD1, mientras que marcadores de neuronas maduras y células gliales como GFAP o MAP-2 se han encontrado expresados al incrementar el número de pasajes. Aunque, este fenómeno podría indicar que las MSC mantienen la habilidad de diferenciarse en células del linaje neuroectodérmico, como se ha sugerido, también es posible que algunos de estos genes tengan alguna función en la fisiología de las BM-MSC en la MO (Krabbe et al, 2005; Hermann et al, 2006; Rooney et al, 2009; Méndez-Ferrer et al, 2010). Se sabe que la MO está inervada por tejido nervioso organizado en un circuito llamado complejo neurorreticular, que permite a las células estromales recibir señales de sistema nervioso y regular la hematopoyesis (Barzilay et al, 2009).

Por otra parte, se encontró también la expresión del marcador POU5F1 (OCT4), cuya expresión conjunta con SOX2 (otro regulador de la pluripotencia) ya sido reportada en hBM-MSC, y se ha propuesto como evidencia de su capacidad de diferenciación en células derivadas de ectodermo y endodermo, ya que la expresión de estos factores de transcripción es necesaria para la pluripotencia de las ESC (Hermann et al, 2006; Hermann et al 2010). Sin embargo, la expresión de SOX2 y OCT4 no es suficiente para considerar a las hBM-MSC como pluripotentes, ya que estos factores de transcripción generalmente no controlan sus genes blanco de manera independiente, sino que actúan de manera coordinada junto con otros factores como Nanog para mantener el programa transcripcional requerido para la pluripotencia (Jaenisch y Young, 2008). Aunque, sí se han identificado subpoblaciones de células en la fracción mesenquimal de la médula ósea que presentan muchos otros marcadores de ESC (Kucia et al, 2006; Kuroda et al, 2010). Por lo anterior, sería necesario evaluar una mayor gama de genes relacionados con el circuito de pluripotencia.

## **Transdiferenciación neural de hBM-MSC**

### *Marcadores del linaje neural y mesenquimal*

En el presente estudio, las hBM-MSC cultivadas en medios libres de suero (MD/B27 y NeuroCult) que favorecen la proliferación de NPC, y en condiciones que evitan la adherencia, son capaces de formar agregados celulares en suspensión similares a las neuroesferas generadas por las NSC, como se ha reportado en estudios previos (Herman et al, 2004; Hermann et al, 2006; Fu et al, 2008; Harris et al, 2012; Huat et al, 2014). En este sentido, las hBM-MSC son similares a otras células troncales/progenitoras que tienden a agregarse y generar esferas cuando se cultivan en superficies no adherentes. De manera importante, se demostró que las hBM-MSC también forman agregados celulares en suspensión cultivadas con medio DMEM/SFB en superficie de baja adherencia. Sin embargo, los agregados en medio con suero estuvieron conformados por células más compactadas entre sí y con un alto porcentaje de necrosis, provocando que el número celular disminuya drásticamente en comparación con células cultivadas en los medios específicos. Esto sugiere que las hBM-MSC en ausencia de adherencia, son capaces de mantener la viabilidad como una respuesta específica a los factores de crecimiento y condiciones de inducción neural, aspecto que no había sido evaluado previamente. Además, cultivadas en placas estándar, las células exhiben notables cambios morfológicos, adquiriendo forma alargada o redonda con protrusiones citoplasmáticas elongadas, además de generar agregados celulares semi-adherentes o en suspensión. Este último es un comportamiento similar al observado en las NPC (Casarosa et al, 2013).

Además de lo anterior, el presente estudio demostró que el incremento en nestina no es dependiente de la formación de agregados en suspensión similares a neuroesferas. Nuestros resultados muestran que, las hBM-MSC cultivadas en placas que evitan la adherencia y en presencia de los medios y factores específicos, un gran porcentaje de las células que forman los agregados expresaron nestina. Mientras que, cultivadas en placas con superficie estándar se presentó un porcentaje similar de células nestina positivas. Es decir, el incremento en la expresión de nestina no se ve afectado por el tipo de placa, por lo que no se

requiere la generación de estructuras esféricas en suspensión como se ha sugerido previamente (Hermann et al, 2004; Fu et al, 2008; Heo et al, 2013).

En este sentido, los agregados formados en medio con SFB no presentaron un aumento significativo en la expresión de nestina. Lo anterior podría indicar que el incremento en este marcador es provocado por el efecto de los factores de crecimiento junto con los medios específicos. Este resultado contrasta con lo reportado por Wislet-Gendebien y cols. (2003, 2005), quienes proponen que la expresión de nestina es una pre-condición para la formación de agregados similares a neuroesferas. Una posible explicación se ha propuesto en estudios previos, en los cuales se sugiere que la presencia de suero reprime la expresión de nestina (Wislet-Gendebien et al 2003; Croft y Przyborsky, 2006). No obstante, el incremento de nestina en medio con suero se ha observado en otros estudios (Tondreau et al, 2004; Tropel et al, 2006). Entonces, este incremento puede estar más relacionado al efecto de los factores de crecimiento. Recientes estudios han demostrado que la exposición a EGF y FGF<sub>2</sub> puede alterar el fenotipo transcripcional y celular, induciendo la transcripción de una amplia gama de genes en células progenitoras neurales y MSC, lo que sugiere que éstos factores de crecimiento pueden tener un papel crucial en la generación de NPC *in vitro* (Conti y Cattaneo, 2011; Huat et al, 2014).

Se demostró también el incremento en la expresión de nestina, a nivel de mRNA y proteína en las hBM-MSc tratadas con los medios y factores de crecimiento específicos, consistentemente con un gran número de reportes previos. La expresión de nestina por las MSC se ha considerado como marcador de la respuesta de progresión hacia el linaje neural (Wislet-Gendebien et al, 2010). Durante el desarrollo del SNC las células en proliferación del neuroepitelio expresan nestina (acrónimo para proteína de células troncales neuroepiteliales) (Lehndal et al, 1990). Este filamento intermedio es también expresado en células troncales y progenitoras neurales en mamíferos adultos, y se ha utilizado para identificarlas en cultivo (Lehndal et al, 1990; Bazán et al, 2004). La expresión de esta proteína es especialmente importante, dado que la diferenciación celular *in vivo* e *in vitro* está estrechamente conectada con cambios morfológicos basados en la remodelación de los filamentos intermedios (Wiese et al, 2004). Sumado al incremento de Nestina, las hBM-MSc

en estas condiciones incrementan la expresión de SOX2, como se ha reportado también en anteriores trabajos (Wislet-Gendebien, 2005; Heo et al, 2013). SOX2 es un factor de transcripción altamente expresado en el neuroepitelio durante el desarrollo embrionario, y está involucrado en el mantenimiento de la identidad en ESC y NSC, así como en la neurogénesis (Episkopou, 2005). Se ha identificado que las NSC en la zona subventricular y el giro dentado del hipocampo marcadas como GFAP/Nestina positivas expresan también SOX2 (Pevny y Nicolis, 2010).

Al mismo tiempo, las MSC en estas condiciones de inducción disminuyen la expresión de dos importantes marcadores de las MSC: CD90 y CD105. Este fenómeno es similar a los resultados obtenidos en MSC cultivadas en distintos medios de cultivo libres de suero con los mismos factores de crecimiento (Harris et al, 2012; Heo et al, 2013). Por ello, esta disminución de expresión puede estar más relacionada con la respuesta a los factores EGF y FGF<sub>2</sub>. CD105, también conocido como endoglina, es el receptor de TGF- $\beta$  III, el cual está potencialmente implicado durante la señalización de TGF- $\beta$  en la diferenciación condrogénica (Boxall y Jones, 2012). Mientras que, CD90 (Thy-1) es una glicoproteína de adhesión célula-célula o célula-matriz extracelular. Juega un papel importante en sitios de inflamación al promover la activación de linfocitos T, regula la migración, fenotipo y proliferación de fibroblastos durante la curación de heridas y fibrosis, está implicada en el crecimiento y diferenciación de células troncales y se sabe que su expresión inhibe el crecimiento de neuritas en células neurales (Rege y Hagood, 2006; Kisselbach et al, 2009; Boxall y Jones, 2012). Por lo anterior, la disminución en ambos marcadores sugiere la pérdida de algunas características del linaje mesenquimal y podría favorecer la diferenciación neural.

Sin embargo, no se encontró un incremento en la expresión de los genes MS1 (Musashi 1) y NOTCH1, genes fuertemente expresados, aunque no exclusivos de NPC. MS1 es una proteína de unión a RNA que se ha asociado con divisiones asimétricas de precursores ectodermales. No es un gen específico del SNC, ya que se ha encontrado en células basales de las criptas del colon y células troncales mamarias, por lo que puede estar implicado en funciones generales de las células troncales. MS1 está además expresado en células pluripotentes embrionarias y neuroblastos en proliferación. Se ha reportado que Musashi y

nestina no están siempre coexpresados en NSC, sino que pueden representar distintas poblaciones de progenitores neurales. (Bazán et al, 2004; Okano et al, 2005). Por otro lado, NOTCH regula numerosos procesos del desarrollo en diferentes tejidos. En el SNC está implicado en las divisiones asimétricas en NSC, el mantenimiento del estado indiferenciado de los progenitores neurales, así como el balance entre gliogénesis y neurogénesis. Otra evidencia sugiere que la activación de NOTCH1 promueve la diferenciación glial (Hatakeyama y Kageyama, 2006; Zhou et al, 2010; Andersson et al, 2011; Hatakeyama et al, 2014). Por consiguiente, aunque no se haya encontrado un incremento en ambos genes, esto no descarta la transdiferenciación de las MSC.

De manera similar sucedió con los genes marcadores de células mesenquimales CD73 y FN1 (Fibronectina), en los cuales no se observó un cambio de expresión importante. CD73 es una 5'-ecto nucleotidasa involucrada en la diferenciación osteogénica, la interacción de las células estromales en la médula ósea, la migración y la modulación de la respuesta inmune adaptativa. La reducción en su expresión está implicada en la condrogénesis, mientras que su presencia se relaciona con una mayor osteogénesis (Boxall y Jones, 2012; Ode et al, 2013). Además, recientemente se ha descrito que, durante los estados tempranos de la reprogramación de células diferenciadas a iPSC, CD73 es un marcador de las células que se encuentran en estados intermedios de la reprogramación, por lo que podría estar también implicado en la plasticidad de las MSC (Luján et al, 2015). Mientras que, FN1 es un componente de la matriz extracelular, ampliamente utilizado como marcador del linaje mesodermal, promueve la adhesión celular, migración y organización del citoesqueleto, y está involucrada en el desarrollo de diversos tejidos, incluyendo el SNC, donde las NPC también la producen (Lysy et al, 2007; Ahmed, 2009). Mutaciones en un alelo de este gen durante el desarrollo conducen a defectos en tejidos derivados del mesodermo y en el tubo neural (George et al, 1993). Por consiguiente, esta evidencia sugiere que aunque las MSC muestran un fenotipo que se asemeja a las NPC, aún conservan algunos signos de su origen mesenquimal.

La relevancia del aumento en la expresión de antígenos neurales como indicador de diferenciación neural ha sido cuestionada por diversas razones. Se ha reportado que genes

considerados marcadores de células troncales/progenitoras neurales se encuentran expresados en MSC y otros tipos celulares (Woodbury et al, 2002; Tondreau et al, 2004; Raedt et al, 2007). Además, algunos investigadores proponen que el incremento en la expresión de marcadores neurales en MSC es resultado de estrés, causado por la ausencia de suero o la adición de agentes químicos (Raedt et al, 2007). Por último, recientes estudios han demostrado que, gran parte de los protocolos de diferenciación en los que las células muestran morfología neuronal y expresan marcadores de células neurales, son resultado de cambios transitorios reversibles, que no representan una verdadera transdiferenciación. Frecuentemente estos cambios ocurren después de unas cuantas horas, por lo cual no son consistentes con el desarrollo neural. Es poco probable que los cambios en la organización celular y expresión génica que constituyen el compromiso de diferenciación se logren después de unas pocas horas de exposición a las condiciones de inducción (Neuhuber et al, 2004; Croft y Przyborsky, 2006; Raedt et al, 2007; Rooney et al, 2009).

En relación a lo anterior, en esta investigación se demostró que el estrés causado por la ausencia de suero, junto con la falta de anclaje, no promueve un aumento importante en la expresión de nestina. Sino que se requiere la exposición de las células a los factores de crecimiento EGF y FGF<sub>2</sub>. Del mismo modo, un estudio realizado por Huat y cols. (2014) demostró que en rBM-MSc cultivadas con medio libre de suero sin factores de crecimiento, un bajo porcentaje de células expresan nestina, en comparación con las células cultivadas en el medio más los factores de crecimiento EGF, FGF<sub>2</sub> e IGF. Aunado a esto, en este estudio no se utilizaron altas concentraciones de agentes químicos (DMSO,  $\beta$ -ME) que puedan provocar estrés a las células, descartando la expresión aberrante causada por este tipo de agentes. Asimismo, nuestros resultados muestran que el aumento en la presencia de nestina no ocurre de inmediato, sino que esta proteína se incrementó respecto al tiempo. Por otro lado, a pesar que la nestina se encuentra en otros tipos celulares, incluidas las hBM-MSc, esta se expresa en bajos niveles. Aunque a la fecha no existen marcadores definitivos para NSC, el incremento de nestina junto con el de SOX2, dos de las principales moléculas utilizadas como marcadores de células precursoras del SNC, sumado a la disminución de marcadores específicos de MSc, refuerza el concepto que el destino neural de las hBM-MSc

es una consecuencia de un proceso de transdiferenciación (Bazán et al, 2004; Wislet-Gendebien et al 2005; Croft y Przyborsky, 2006; Ahmed, 2009).

Por otro lado, el marcador POU5F1 se vió incrementado por la condiciones de inducción neural, en especial durante la generación de agregados esféricos. Con respecto a esto, se ha propuesto que el cultivo en esferoides puede incrementar la multipotencialidad de las MSC (Jing y Jian-Xiong, 2011). Así, el incremento en la expresión de POU5F1 podría estar relacionado con este fenómeno observado previamente.

#### *Proliferación y actividad del ciclo celular*

La expresión de nestina, la habilidad de formar agregados en suspensión, y la generación de células con marcadores de linajes neurales diferenciados se ha catalogado como fenotipo de NPC, por lo que la mayor parte de los estudios no evalúan otras características de éstas células, especialmente la proliferación. En nuestras condiciones, las células tienen una baja capacidad de expansión de la población manteniéndose en la fase no proliferativa del ciclo celular, como se demostró por la ausencia de Ki67 y BrdU. Esto sugiere que las estructuras similares a neuroesferas generadas son resultado principalmente de agregación celular, y no del proceso de proliferación como ocurre con las NPC (Hernández-Benítez et al, 2012; Ramos-Mandujano et al, 2014). La generación de esferas por agregación ya ha sido demostrada en condiciones de cultivo distintas mediante microscopía de lapso de tiempo por Bartosh y cols., quienes además muestran que el tamaño de las esferas es dependiente del número de células iniciales (2010). Entonces, las hBM-MSC no poseen la capacidad de proliferación de los precursores neurales. Este efecto de los medios libres de suero sobre la proliferación contrasta con lo reportado por algunos estudios previos (Hermann et al, 2004; Fu et al, 2008; Harris et al, 2012) y al mismo tiempo es consistente con otros (Heo et al, 2013).

Dentro de las pocas investigaciones previas que evalúan la proliferación se encuentran las realizadas por Herman et al (2004, 2006), Song et al (2007), Fu et al (2008) y más recientemente Heo et al (2013). Los estudios de Hermann y Fu muestran que, en medios

de células progenitoras neurales con los factores EGF y FGF<sub>2</sub>, las hBM-MSC son clonogénicas, capaces de auto-renovarse y proliferar a tasas comparables con las NSC. En ambos estudios se determinó la capacidad de autorenovación de las células formadoras de neuroesferas utilizando ensayos de baja densidad, reportándose la generación un agregado a partir de diluciones de 1 sola célula. Asimismo, Herman et al. (2004) reporta un tiempo de doblaje de 2.6 días, generando  $1.6 \times 10^8$  NSC a partir de  $1 \times 10^6$  MSC. Sin embargo, estos estudios evalúan únicamente el número celular, y no la presencia de marcadores de ciclo celular como Ki67 o BrdU. Se sabe que factores adicionales como la densidad celular, distribución espacial de las células, componentes sólidos en el cultivo (como componentes del sustrato) influyen en la fisiología de las MSC (Gregory et al, 2005). Los estudios de Hermann y Fu utilizan una muy alta densidad celular durante la generación de NPC ( $1-2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>), esto podría explicar en parte algunas de las diferencias observadas con la actual investigación. Cabe resaltar que en un posterior estudio, Hermann y cols. (2010) reportan los cambios de expresión en Ki67 por qRT-PCR durante la inducción de hBM-MSC hacia NSC, en donde se muestra una disminución de más de 10 veces en la transcripción de este gen con respecto a las mismas células en medio con suero, lo cual no corresponde con las células altamente proliferativas que aseguran obtener en estudios previos. Por otro lado, en el trabajo realizado por Heo et al (2013), en condiciones similares a los estudios previos, las hBM-MSC no incrementan su número celular y son negativas para la proteína Ki67. Muy similar a lo encontrado en esta investigación. En otros reportes como el de Song et al. (2007), las MSC son expandidas en medio con suero después de haber sido cultivadas en medios de precursores neurales, lo que indica que no son capaces de proliferar en estas condiciones. No obstante, el uso de sistemas de cultivo que no utilicen SFB es necesario para el uso de células expandidas *in vitro* en terapia celular (Raedt et al, 2009). En otros estudios el incremento en tamaño de las neuroesferas se ha considerado como un indicador de proliferación (Huat et al, 2014). No obstante, la generación de neuroesferas, junto con el incremento en el tamaño de éstas no puede considerarse una medida de la proliferación celular. Se sabe que las NSC cultivadas a altas densidades pueden agregarse entre ellas, lo que provoca la generación de neuroesferas grandes en pocos días de cultivo (Ahmed, 2009; Pastrana et al, 2011).



Asimismo, un gran número de estudios relacionados no solo con la transdiferenciación neural, sino con la generación de agregados en suspensión a partir de MSC (mesesferas) en distintas condiciones, ya sea en placas no adherentes o cultivos en gota colgante, demuestran la baja o nula proliferación de las MSC en estas condiciones (Bartosh et al, 2010; Kuroda et al, 2010; Baraniak y McDevitt, 2012; Bartosh et al, 2013). Bartosh et al. (2010 y 2013) mostraron mediante microarreglos que hBM-MSC cultivadas como esferas presentan una regulación negativa en genes de proliferación celular, mientras que Baraniak y McDevitt, estudiando rBM-MSC encontraron una población menor al 5% de células BrdU<sup>+</sup> incluso después de 7 días en cultivo en suspensión. Además, Kuroda y cols. (2010) aislando células positivas para marcadores de pluripotencia a partir de BM-MSC, reportan la ausencia de proliferación en cultivos en suspensión. Por lo anterior, son necesarios estudios más a fondo replicando los protocolos usados por Hermann (2004; 2006) y Fu (2008) para determinar si las hBM-MSC poseen o no la capacidad de proliferación al ser inducidas a NPC.

El modelo predominante de desarrollo y diferenciación involucra la división de células multipotentes, generando progresivamente precursores y progenitores comprometidos a linajes específicos. Es decir, las células alcanzan un estado terminalmente diferenciado después de una secuencia de estados separados por divisiones celulares (Beresford, 1990). Por lo anterior, se considera que la mitosis seguida de la salida del ciclo celular preceden obligatoriamente el compromiso y diferenciación (Muñoz-Elias et al, 2003). Sin embargo, nuestros resultados indican que ésta transdiferenciación parcial de las MSC puede ocurrir en la ausencia de mitosis. Existen algunos ejemplos que la división celular no es requerida para la transdiferenciación. Esto ocurre durante la conversión de células Y intestinales a motoneuronas PDA en *C. elegans*, células de soporte epitelial a células ciliadas sensoriales en aves y ratones, y en la transdiferenciación pancreática-hepática o la conversión de células retinales en epitelio del cristalino (Beresford, 1990; Opas y Dziak, 1998; Tosh y Slack, 2002; Sisakhtnezhad y Matin, 2012; Benton et al, 2014 Corbett y Tosh, 2014). Entonces, la ausencia de división celular no descarta completamente el proceso de transdiferenciación.

### *Potencial de diferenciación en linajes del SNC*

La validez de la transdiferenciación hacia neuronas *in vitro* de MSC se ha puesto en controversia recientemente, especialmente mediante métodos químicos. Se ha encontrado que los rápidos efectos que generan morfología neuronal a causa de la exposición a químicos como DMSO o  $\beta$ -ME resultan de artefactos debidos a toxicidad celular, disrupción del citoesqueleto y retracción del citoplasma (Lu et al, 2004; Neuhuber et al, 2005; Croft y Przyborski, 2006). Además, se ha sugerido también que la rápida pérdida y ganancia en la morfología de las células es resultado de un efecto transitorio, revirtiéndose a su morfología original después de 24 hrs, o al retirar las células del medio de inducción, indicando que no es un proceso de diferenciación fisiológico (Krabbe et al, 2005; Rooney et al, 2009). De igual manera se ha encontrado que la distribución intracelular de los antígenos neurales en ocasiones es distinta a la observada en neuronas maduras (Raedt et al, 2006; Krabbe et al, 2005). Sin embargo, los métodos de diferenciación neuronal basados en factores de crecimiento han mostrado resultados prometedores (Khoo et al, 2011). Se ha sugerido que la exitosa diferenciación de MSC hacia el linaje neuronal podría requerir la dediferenciación inicial a un estado más temprano, seguido de la exposición a condiciones de diferenciación (Hermann et al, 2004; Hermann et al, 2006; Rooney et al, 2009).

En este sentido, la actual investigación demuestra que únicamente el protocolo de transdiferenciación indirecta, en el cual se generan células con características de precursores neurales seguido de la diferenciación terminal, provoca el surgimiento de células con morfología neuronal, las cuales presentan prolongaciones similares a neuritas y un incremento en el marcador de neuronas inmaduras tubulina  $\beta$ -III. En concordancia con estos resultados, se ha sugerido que la diferenciación de MSC *in vitro*, especialmente hacia linajes no mesenquimales, es regulada por un mecanismo de dos etapas, involucrando factores preconditionantes en el microambiente de cultivo, los cuales son seguidos por la respuesta a los factores de diferenciación (Gregory et al, 2005; Herman et al, 2006). Además, el requerimiento de tiempos prolongados de exposición a las condiciones de diferenciación, muestra que este no es un proceso rápido como en estudios previos. Aunado a ello, se demostró que las células que sufren los cambios morfológicos se conservan viables. Sin embargo, la ausencia de marcadores de células gliales en los protocolos de diferenciación

refuerza la idea que el cultivo de MSC en condiciones de NPC induce una transdiferenciación incompleta hacia el linaje neural, ya que estas células son incapaces de generar los 3 linajes celulares del SNC, como lo hacen las NSC (Hernández-Benítez et al, 2012).

Sin embargo, empleando factores de crecimiento utilizados para inducir la diferenciación neuronal en NSC no se lograron generar células que expresen los marcadores de neuronas maduras MAP-2 y NeuN. Por lo que posiblemente, bajo estas condiciones, las células similares a neuronas derivadas de MSC no pueden alcanzar un estado neural terminalmente diferenciado. El anterior resultado puede explicarse debido a que la formación de células especializadas requiere de ambientes (nichos) específicos. Estos nichos consisten de factores solubles e interacciones célula-célula que pueden activar vías de señalización específicas, además de componentes de la matriz extracelular y la distribución espacial de las células (Gregory et al, 2005; Graf, 2011). Por ejemplo, los astrocitos producen una variedad de factores solubles y asociados a membrana que influyen en el desarrollo del SNC (Fu et al, 2008). Entonces, posiblemente sea necesaria la utilización de métodos de co-cultivo con células gliales para generar células con un fenotipo totalmente diferenciado, como se ha reportado por Fu et al. (2008) y Wislet-Gendebien et al. (2005). Utilizando estrategias de co-cultivo con células gliales o neuronales, se ha logrado diferenciar células con características de neuronas a partir de precursores neurales derivados de MSC. Estas generan potenciales de acción, forman sinapsis y secretan neurotransmisores (Fu et al, 2008; Wislet-Gendebien et al, 2005). Además, la manipulación de moléculas de superficie o sustratos de cultivo ha sido otra aproximación para la diferenciación neuronal de MSC. Lee et al (2014) mostraron que MSC cultivadas sobre geles suaves (0.5 KPa) expresan elevados marcadores neurogénicos, mientras que los platos de cultivo pueden tener una rigidez de  $>10^4$  KPa (Wang, 2014). En línea con este resultado, se ha demostrado que la rigidez de la matriz celular puede regular el balance entre la osteogénesis y adipogénesis en MSC. Mientras que la derivación de neuronas motoras a partir de iPSC incrementa su eficiencia en sustratos suaves (1-5 KPa) (Sun et al, 2014); lo cual concuerda con lo reportado por Lee y cols (2014). Estos fenómenos de mecanotransducción en MSC e iPSC son regulados por la señalización de HIPPO/YAP-TAZ (Sun et al, 2014).

En el presente estudio no se caracterizó electrofisiológicamente las células generadas. Sin embargo, a la fecha ningún estudio ha mostrado la presencia de receptores funcionales para neurotransmisores en células similares a neuronas derivadas de médula ósea, y se ha comprobado que, aunque estas poseen propiedades electrofisiológicas, sus propiedades son atípicas comparadas con neuronas primarias (Croft y Przyborski, 2006). Además, las células no expresan la totalidad de los marcadores neuronales encontrados en neuronas derivadas de NSC (Raedt et al, 2006). Por lo anterior, en el presente y anteriores estudios, las aparentes neuronas derivadas de MSC adquieren algunas, pero no todas las características de las células neuronales, por lo que no cumplen todos los criterios para ser definidas como tal.

## **X. CONCLUSIONES**

- Las hBM-MSC en condiciones de inducción neural presentan cambios morfológicos y generan agregados en suspensión similares a neuroesferas. Este proceso es acompañado de un incremento en los marcadores de precursores neurales nestina y SOX2, así como una disminución en los marcadores del linaje mesenquimal CD90 y CD105.
- En presencia de los medios y factores específicos, las células mantienen la viabilidad, pero presentan una limitada capacidad de proliferación.
- Únicamente con los protocolos de diferenciación indirecta, las células mesenquimales tienen el potencial de diferenciarse en células con morfología similar a las neuronas inmaduras, positivas para el marcador de neuroblastos  $\beta$ -III tubulina.

Por lo tanto, esta investigación muestra que en condiciones de cultivo de NPC, las hBM-MSC son capaces de adquirir algunas de las características fisiológicas de las células precursoras neurales, pero no poseen todas las propiedades de éstas células, por lo que su potencial de transdiferenciación hacia un fenotipo troncal/progenitor neural es parcial.

## XI. REFERENCIAS

- Ahmed S. (2009). The culture of neural stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 106:1–6
- Alexanian A.R., Maiman D.J., Kurpad S.N. & Gennarelli T.A. (2008). In vitro and in vivo Characterization of Neurally Modified Mesenchymal Stem Cells Induced by epigenetic modifiers and neural stem cell environment. *Stem Cells and Development*, 17:1123-1130
- Álvarez-Buylla A., Kohwi M., Nguyen T.M. & Merkle F.T. (2008). The Heterogeneity of Adult Neural Stem Cells and the Emerging of Their Niche. *Cold Spring Harbor Symposya on Quantitative Biology*, 73:357-365
- Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J.M., Fike J.R., Lee H.O., Pfeffer K., Lois C., Morrison S.J. & Álvarez-Buylla A. (2003). Fusion of bone marrow-derived cells with purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 425:968–973
- Andersson E.R., Sandberg R. & Lendahl U. (2011). Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development*, 138, 3593-3612
- Appaix F., Nissou M.F., van der Sanden B., Dreyfus M., Berger F., Issartel J.P. & Wion D. (2014). Brain mesenchymal stem cells: The other stem cells of the brain? *World Journal of Stem Cells*, 26; 6(2):134-143
- Avasthi S., Srivastava R.N., Singh A. & Srivastava M. (2007). Stem cell: past, present and future- a review article. *Internet Journal of Medical Update*, 3:22-30
- Azizi S.A., Stokes D., Augelli B.J., DiGiloramo C. & Prockop D.J. (1998). Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats— similarities to astrocyte grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:3908–3913
- Baizabal J.M., Furlan-Magaril M., Santa-Olalla J. & Covarrubias L. (2003). Neural stem cells in development and regenerative medicine. *Archives of Medical Research* 34:572–588
- Baraniak P.R. & McDevitt T.C. (2012). Scaffold-free culture of mesenchymal stem cell spheroids in suspension preserves multilineage potential. *Cell and Tissue Research*, 347:701-711
- Barker, R. A. (2014). Developing stem cell therapies for Parkinson’s disease: waiting until the time is right. *Cell stem cell*, 15:539-542
- Bartosh J.T., Ylöstalo J.H., Mohammadipoor A., Bazhanov N., Coble K., Claypool K., Lee R.H., Choi H. & Prockop D.J. (2010). Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107:13724-13729
- Bartosh J.T., Ylöstalo J.H., Bazhanov N., Kuhlman J. & Prockop D.J. (2013). Dynamic Compaction of Human Mesenchymal Stem/Precursor Cells into Spheres Self-Activates Caspase-Dependent IL1 Signaling to Enhance Secretion of Modulators of Inflammation and Immunity (PGE2, TSG6, and STC1). *Stem Cells*, 31:2443-2456
- Barzilay R., Melamed D. & Offen D. (2009). Introducing transcription factors to multipotent mesenchymal stem cells: making transdifferentiation possible. *Stem Cells*, 27:2509–2515
- Ben-Hur T. (2006). Human embryonic stem cells for neuronal repair. *The Israel Medical Association Journal*, 8:122-126
- Beresford W.A. (1990). Direct transdifferentiation: can cells change their phenotype without dividing? *Cell Differentiation and Development*, 29:81-93
- Bez A., Corsisni E., Curti D., Biggiogera M., Colombo A., Nicosia R.F., Pagano S.F., & Parati E.A. (2003). Neurosphere and neurosphere formig cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Research*, 993:18-29
- Bianco P., Riminucci M., Gronthos S. & Robey P. (2001). Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 19:180-192
- Bianco P., Robey P., Simmons P.J. (2008). Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, 2:313-319
- Björklund L.M., Sánchez-Pernaute R., Chung S., Andersson T., Chen I.Y.C., McNaught K.St.P, Brownell A.L., Jenkins B.G., Wahlestedt C., Kim K.S. & Isacson O. (2002). Embryonic stem

- cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99:2344-2349
- Boxall S.A & Jones E. (2012). Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells International*, 2012, Article ID 975871
- Brazelton T.R., Rossi F.M., Keshet G.I. & Blau, H.M. (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*, 290:1775–1779
- Brederlau A., Correia A.S., Anisimov S.V., Elmi M., Paul G., Roybon L., Morizane A., Bergquist F., Riebe I., Nannmark U., Carta M., Hanse E., Takahashi J., Sasai Y., Funa K., Brundin P., Eriksson P.S. & Li J. (2006). Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of in vitro differentiation on graft survival and teratoma formation. *Stem Cells*, 24:1433-1440
- Caplan A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 9:641-650
- Caplan A. & Correa D. (2011). The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*, 9:11-15
- Casarosa S., Zasso J. & Conti L. (2013). Systems for ex-vivo isolation and culturing of neural stem cells. En: Luca Bonfanti (Ed.), *Neural stem cells: New perspectives*. ISBN: 978-953-51-1069-9, InTech, DOI: 10.5772/55137, 3-27
- Castro-Manreza & Montesinos J.J. (2014). Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *Journal of Immunology Research*, Article ID: 394917
- Chambers S.M., Fasano C.A., Papapetrou E.P., Tomishima M., Sadelain M. & Studer L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature Biotechnology*, 27: 275-280
- Chia-Ning S., Burke Z. & Tosh D. (2004). Transdifferentiation, metaplasia and tissue regeneration. *Organogenesis*, 1:36-44
- Conti L. & Cattaneo E. (2010). Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *Nature Reviews Neuroscience*, 11:176-187
- Corbett J.L. & Tosh D. (2014). Conversion of one cell type into another: implications for understanding organ development, pathogenesis of cancer and generating cells for therapy. *Biochemical Society Transactions*, 42:609–616
- Croft A.P. & Przyborski S.A. (2006). Formation of neurons by non-neural adult stem cells: potential mechanism implicates an artifact of growth in culture. *Stem Cells*, 24:1841–1851
- Da Silva Meirelles L., Fontes A.M., Covas T.D & Caplan A.I. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factors Reviews*, 20:419-427
- Deng W., Obrocka M., Fischer I. & Prockop D.J. (2001). In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282:148–52
- Denham M., Dottori M. (2011). Neural differentiation of induced pluripotent stem cells. En: Manfredi G. y Kawamata H (Eds.), *Neurodegeneration: Methods and protocols*, Methods in molecular biology, vol. 793, Springer Science+Business Media
- Dezawa, M., Kanno, H., Hoshino, M., Cho, H., Matsumoto, N., Itokazu, Y., Tajima, N., Yamada, H., Sawada, H., Ishikawa, H., Mimura, T., Kitada, M., Suzuki, Y. & Ide C. (2004). Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *Journal of Clinical Investigation*, 113:1701–1710
- Dominici M., Blanc K.L., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Krause D.S., Deans R.J., Keating A., Prockop D.J. & Horwitz E.M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8:315-317
- Dressel R., Schindehütte J., Kuhlmann T., Elsner L., Novota P., Baier P.C., Schillert A., Bickeböller H., Herrmann T., Trenkwalder C., Paulus W. & Mansouri A. (2008). The tumorigenicity of

- mouse embryonic stem cells and in vitro differentiated neuronal cells is controlled by the recipients' immune response. *PLoS One*, 3:e2622.
- Eberhard D. & Tosh D. (2008). Transdifferentiation and metaplasia as a paradigm for understanding development and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65:33-40
- Eckfeldt E.C., Mendelhall E.M & Verfaillie C.M. (2005). The molecular repertoire of the “almighty” stem cell. *Nature Reviews*, 6:726-737
- Ehninger A. & Trumpp A. (2011). The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *Journal of Experimental Medicine*, 208:421-428
- Episkopou V. (2005). SOX2 functions in adult neural stem cells. *Trends in Neuroscience*. 19:219-221
- Faigle R. & Song H. (2013). Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830:2435–2448
- Flores-Figueroa E., Montesinos J.J., Mayani H. (2006). Las células troncales mesenquimales: Historia, biología y aplicación clínica. *Revista de Investigación Clínica*, 58:498-511.
- Friedenstein A.J., Piatetzky-Shapiro I.I. & Petrakova K.V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 16:381–390
- Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K. & Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics*, 3:393–403.
- Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K., Latsinik N.V., Panasyuk A.F. & Keiliss-Borok, I.V. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, 17:331–340
- Friedenstein A.J. (1976). Precursor cells of mechanocytes. *International Review of Cytology*, 47:327–359
- Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K. & Gerasimov U.V. (1987). Bone marrow osteogenic stem cells: In vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell and Tissue Kinetics*, 20:263–272.
- Fu L., Zhu L., Huang Y., Lee T.D., Forman S.J. & Shih C.C. (2008). Derivation of neural stem cells from mesenchymal stem cells: Evidence for a bipotential stem cell population. *Stem Cells and Development*, 17:1109–1122
- Gabr M.M., Zakaria M.M., Refaie A.F., Kather S.M., Ashamallah S.A., Ismail A.M., El-Halawani S.M., & Ghoneim M.A. (2015). Differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into insulin-producing cells: Evidence for further maturation in vivo. *BioMed Research International*, article ID: 575837
- Glaser T., Pollard S.M., Smith A. & Brüstle O. (2007). Tripotential differentiation of adherently expandable neural stem cells. *Plos One*, 2:e298
- George E.L., Georges-Labouesse E.N., Patel-King R. S., Rayburn H. & Hynes R.O. (1993). Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development*, 119:1079-1091
- Gorba T., Harper S., Mee J.P. (2011). Prospects for neural stem cell therapy of Alzheimer disease. En: K. Appasani y R.K. Appasani (Eds.), *Stem cells & regenerative medicine, Stem cell biology and regenerative medicine*, Springer Science+Business Media, LLC
- Goujon E. (1869). Recherches experimentales sur les proprietes physiologiques de la moelle des os. *Journal de L'Anatomie et de La Physiologie*. 6:399–412
- Graf T. (2011). Historical origins of transdifferentiation and reprogramming. *Cell Stem Cell*, 9:504-516
- Gregory C.A., Ylostalo J. & Prockop D.J. (2005). Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironmental niches in culture: A two-stage hypothesis for regulation of MSC fate. *Science Signaling*, 2005 (294), pe37 [DOI: 10.1126/stke.2942005pe37]



- Gurdon J.B. (1962). Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Developmental biology*, 4:256-273
- Hagg T. (2005). Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *Trends in Neurosciences*, 28:589-595
- Hall V.J., Li J. & Brundin P. (2007). Restorative cell therapy for Parkinson's disease: A quest for the perfect cell. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18:859–869
- Harris R.G., Herzog E.L., Bruscia E.M., Grove J.E., Van Arnam J.S. & Krause D.S. (2004). Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science*, 305:90-93
- Harris V.K., Farouqi R., Vishkina T. & Sadiq S.A. (2012). Characterization of autologous mesenchymal stem cell-derived neural progenitors as a feasible source of stem cells for central nervous system applications in multiple sclerosis. *Stem Cells Translational Medicine*, 1:536-547
- Hatakeyama J & Kageyama R. (2006). Notch1 expression is spatiotemporally correlated with neurogenesis and negatively regulated by Notch1- independent Hes genes in the developing nervous system. *Cerebral Cortex*, 16:132-137
- Hatakeyama J., Wakamatsu Y., Nagafuchi A., Kageyama R., Shigemoto R. & Shimamura K. (2014). Cadherin-based adhesions in the apical endfoot are required for active Notch signaling to control neurogenesis in vertebrates. *Development*, 141:1671-1682
- Helmy K.Y., Patel S.A., Silverio K., Pliner L. & Rameshwar P. (2010). Stem cells and regenerative medicine: accomplishments to date and future promise. *Therapeutic Delivery*, 21:693-705.
- Hemmer K., Zhang M., van Wüllen T., Sakalem M., Tapia N., Baumuratov A., Kaltschmidt B., Schöler H.R., Zhang W. & Schwamborn J.C. (2014). Induced neural stem cells achieve long-term survival and functional integration in the adult mouse brain. *Stem Cell Reports*, 3:423-431
- Heo J.S., Choi S.M., Kim H.O., Kim E.H., You J., Park T., Kim E. & Kim H.S. (2013). Neural transdifferentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on hydrophobic polymer-modified surface and therapeutic effects in an animal model of ischemic stroke. *Neuroscience*, 238:305-318
- Hermann A., Gastl R., Liebau S., Popa M.O., Fiedler J., Boehm B.O., Maisel M., Lerche H., Schwarz J., Brenner R. & Storch A. (2004). Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *Journal of Cell Science*, 117: 4411-22.
- Hermann A., Liebau S., Gastl R., Fickert S., Habisch H.J., Fiedler J., Schwarz J., Brenner R. & Storch A. (2006). Comparative analysis of neuroectodermal differentiation capacity of human bone marrow stromal cells using various conversion protocols. *Journal of Neuroscience Research*, 83:1502–1514
- Hermann A., List C., Habisch H., Vukicevic V., Ehrhart-Bornstein M., Brenner R., Bernstein P., Fickert S. & Storch A. (2010). Age dependent neuroectodermal differentiation capacity of human mesenchymal stromal cells: limitations of autologous cell replacement strategies. *Cytotherapy*, 12:17-30
- Hernández-Benítez R., Ramos-Mandujano G. & Pasantes-Morales H. (2012). Taurine stimulates proliferation and promotes neurogenesis of mouse adult cultured neural stem/progenitor cells. *Stem Cell Research*, 9:24-34
- Hollingworth, J.W. (1958). Compatibility factors influencing the acceptance of rat bone marrow by the irradiated mouse. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 31:157-163
- Horwitz E.M., Blanc K.L., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Deans R.J., Krause D.S. & Keating A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 7:393-395
- Hua B.Y., Weicka J.P., Yub J., Maa L.X., Zhanga X.Q., Thomson J.A. & Zhang S.C. (2010). Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107:4335–4340

- Huat T.J., Khan A.A., Pati S., Mustafa Z., Abdullah J.M. & Jaafar H. (2014). IGF-1 enhances cell proliferation and survival during early differentiation of mesenchymal stem cells to neural progenitor-like cells. *BioMedCentral Neuroscience*, 15 (91)
- Isern J., García-García A., Martín A.M., Arranz L., Martín-Pérez D., Torroja C., Sánchez-Cabo F. & Méndez-Ferrer S. (2014). The neural crest is a source of mesenchymal stem cells with specialized hematopoietic stem cell niche function. *Elife* 2014, 10.7554/eLife.03696
- Jaenisch R & Young R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, 132:567-582
- Jensen J.B. & Parmar M. (2006). Strengths and limitations of the neurosphere culture system. *Molecular Neurobiology*, 34:153-161
- Jiang Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A. & Verfaillie C.M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418:41-49
- Jing Y. & Jian-xiong Y. (2011). 3-D spheroid culture of bone marrow mesenchymal stem cell of rhesus monkey with improved multi-differentiation potential to epithelial progenitors and neuron *in vitro*. *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 39: 808-819
- Kallur T., Darsalia V., Lindvall O. & Kokaia Z. (2006). Human fetal cortical and striatal neural stem cells generate region-specific neurons *in vitro* and differentiate extensively to neurons after intrastriatal transplantation in neonatal rats. *Journal of Neuroscience Research*, 84:1630-1644
- Kassem M. (2006). Stem cells potential therapy for age related diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067: 436-442
- Kassem M. & Abdallah M. (2008). Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases. *Cell Tissue Research*, 331:157-163
- Khoo M., Tao H., Meedeniya A., Mackay-Sim A. & Ma D. (2011). Transplantation of Neuronal-Primed Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Hemiparkinsonian Rodents. *PLoS ONE*, 6(5)
- Kim J.H., Auerbach J.M., Rodríguez-Gómez J.A., Velasco I., Gavin D., Lumelsky N., Lee S.H., Nguyen J., Sánchez-Pernaute R., Bankiewicz K. & McKay R. (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*, 418:50-56
- Kintner C. (2002). Neurogenesis in Embryos and in Adult Neural Stem Cells. *The Journal of Neuroscience*, 22:639-643
- Kisselbach L., Merges M., Bossie A. & Boyd A. (2009). CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. *Cytotechnology*, 59:31-44
- Kohyama J., Abe H., Shimazaki T., Koizumi A., Nakashima K., Gojo S., Taga T., Okano H., Hata J. & Umezawa A. (2001). Brain from bone: efficient 'meta-differentiation' of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation*, 68:235-244
- Kopen G.C., Prockop D.J. & Phinney D.G. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96: 10711-10716
- Kucia M., Reza R., Campbell F.R., Zuba-Surma E., Majka M., Ratajczak J. & Ratajczak M.Z. (2006). A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4<sup>+</sup> SSEA-1<sup>+</sup> Oct-4<sup>+</sup> stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia*, 20:857-869
- Kuroda Y., Kitada M., Wakao S., Nishikawa K., Tanimura Y., Makinoshima H., Godac M., Akashia H., Inutsuka A., Niwad A., Shigemoto T., Nabeshima Y., Nakahata T., Nabeshima Y., Fujiyoshi Y. & Dezawa M. (2010). Unique multipotent cells in adult human

- mesenchymal cell populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107:8639-8643
- Kuroda Y., Kitada M., Wakao S. & Dezawa M. (2011). Bone marrow mesenchymal cells: How do they contribute to tissue repair and are they really stem cells? *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, 59:369-378
- Lang A.E. (2001). Clinical trials of disease modifying therapies for neurodegenerative diseases: the challenges and the future. *Nature Medicine*, 16:1223-1226
- Lee J., Abdeen A. A., & Kilian K. A. (2014). Rewiring mesenchymal stem cell lineage specification by switching the biophysical microenvironment. *Scientific Reports*, 4:5188
- Lemmens R. & Steinberg G.K. (2013). Stem cell therapy for acute cerebral injury: what do we know and what will the future bring. *Current Opinion in Neurology*, 26:617-625
- Lendahl U., Zimmerman L. B. & McKay R. D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60:585-595.
- Lescaudron L., Boyer C., Bonnamain V., Fink K.D., Lévêque X., Rossignol J., Nerrière-Daguin V., Malouet A.C., Lelan F., Dey N.D., Michel-Monigadon D., Lu M., Neveu I., von Hörsten S., Naveilhan P. & Dunbar G.L. (2012). Assessing the potential clinical utility of transplantations of neural and mesenchymal stem cells for treating neurodegenerative diseases. En: Shree Ram Singh (Ed.), *Somatic Stem Cells: Methods and Protocols*. Springer Protocols. Methods in Molecular Biology. Humana press.
- Levy Y.S., Stroomza M., Melamed E., Offen D. (2004). Embryonic and adult stem cells as a source for cell therapy in Parkinson's disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 24:353-386
- Le Blanc K. & Mougiakakos D. (2012). Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nature Reviews Immunology*, 12:383-396
- Li W., Li K., Wei W. & Ding S. (2013). Chemical approaches to stem cell biology and therapeutics. *Cell Stem Cell*. 13:270-83.
- Liu L., Eckert M. A., Riazifar H., Kang D., Agalliu D. & Zhao W. (2013). From blood to the brain: Can systemically transplanted mesenchymal stem cells cross the blood-brain barrier? *Stem Cells International*, 2013:1-7
- López-González R., Velasco I. (2011). Therapeutic potential of motor neurons derived from embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Archives of Medical Research*, 43:1-10
- Louis A.S. & Reynolds B.A. (2013). Mini-review. Neural stem cells. STEM CELL technologies Inc.
- Lu P., Blesch A. & Tuszynski M.H. (2004). Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *Journal of Neuroscience Research*, 77:174-91.
- Luján E., Zunder E.R., Ng, Y.H., Goronzy I.N., Nolan G.P. & Werning M. (2015). Early reprogramming regulators identified by prospective isolation and mass cytometry. *Nature*, 000:1-5
- Lysy P.A., Smets F., Sibille C., Najimi M. & Sokal E.M. (2007) Human skin fibroblast: From mesodermal to hepatocyte-like differentiation. *Hepatology*, 46:1574-1585
- Mackay-Sim A. (2012). Concise review: Patient-derived olfactory stem cells: new models for brain diseases. *Stem Cells*, 30:2361-5.
- Maltman D.J., Hardy S.A. & Przyborski S.A. (2011). Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. *Neurochemistry International*, 59:347-356
- Mayani H. (2011). Células troncales y medicina regenerativa: conceptos básicos, estado actual y perspectivas futuras. En: Pelayo R, Santa-Olalla J y Velasco I. Células troncales y medicina regenerativa. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- Mayani H., Flores-Figueroa E., Pelayo R., Montesinos J.J., Flores-Guzmán P. & Chávez González A. (2007). Hematopoiesis. *Cancerología*, 2: 95-107
- Méndez-Ferrer, S., Michurina T.V., Ferraro F., Mazloom A.M., MacArthur B.D., Lira S.A., Scadden D.T., Ma'ayan A., Enikopolov G.N. & Frenette P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 466:829-834

- Mendez I., Viñuela A., Astradsson A., Mukhida K., Hallet P., Robertson H., Tierney T., Holness R., Dagher A., Trojanowski J.Q. & Isacson O. (2008). Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nature Medicine*, 14:507-509
- Merkle F. T. & Álvarez-Buylla A. (2006). Neural stem cells in mammalian development *Current Opinion in Cell Biology*, 18:704–709
- Meyer A.K., Maisel M., Hermann A., Stirl K., Storch A. (2010). Restorative approaches in Parkinson's disease: which cell type wins the race? *Journal of the Neurological Sciences*, 289:93–103
- Mezey E., Chandross K.J., Harta G., Maki R.A. & McKecher S.R. (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*, 290:1779–1782
- Mezey E., Key S., Vogelsang G., Szalayova I., Lange G.D. & Crain B. (2003). Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100:1364–1369
- Miller F.D. (2007). Riding the Waves: Neural and Nonneural Origins for Mesenchymal Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 1:129-130
- Montesinos J.J., Flores-Figueroa E., Castillo-Medina S., Flores-Guzmán P., Hernández-Estévez E., Fajardo-Orduña G., Orozco S. & Mayani H. (2009). Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. *Cytotherapy*, 11:163-76
- Montesinos J.J y Castro M.E. (2011). Células troncales mesenquimales. En: Pelayo R, Santa-Olalla J y Velasco I. Células troncales y medicina regenerativa. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- Moraleda J.M., Blanquer M., Gómez-Spuch J., Iniesta F., Hurtado V., Pérez-Espejo M.A., Rodríguez-Lozano F.J. & Martínez S. (2011). Terapia con células madre en enfermedades neurodegenerativas. *Revista de Hematología Mexicana*, 12:144-148
- Morikawa S., Mabuchi Y., Niibe K., Susuki S., Nagoshi N., Sunabori T., Shimmura S., Nagai Y., Nakagawa T. & Okano H. (2009). Development of mesenchymal stem cells partially originate from the neural crest. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379:1114–1119
- Muñoz-Elias G., Woodbury D & Black I.B. (2003). Marrow Stromal Cells, Mitosis, and Neuronal Differentiation: Stem Cell and Precursor Functions. *Stem Cells*, 21:437-448
- Neirinckx V., Coste C., Rogister B. & Wislet-Gendebien S. (2013). Concise review: Adult mesenchymal stem cells, adult neural crest stem cells, and therapy of neurological pathologies: A state of play. *Stem Cells Translational Medicine*, 2:284-296
- Neuhuber B., Gallo G., Howard L., Kostura L., Mackay A. & Fischer I. (2004). Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: Disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *Journal of Neuroscience Research*, 77:192–204
- Nivet E., Vignes M., Girard S.D., Pierrisnard C., Baril N., Deveze A., Magnan J., Lanté F., Khrestchatsky M., Féron F. & Roman F.S. (2011). Engraftment of human nasal olfactory stem cells restores neuroplasticity in mice with hippocampal lesions. *The Journal of Clinical Investigation*, 121:2808-2820
- Ode A., Schoon J., Kurtz A., Gaetjen M., Ode J.E., Geissler S & Duda G.N. (2013). CD73/5'-ectonucleotidase acts as a regulatory factor in osteo/chondrogenic differentiation of mechanically stimulated mesenchymal stromal cells. *European Cells and Materials*, 25:37-47
- Okano H., Kawahara H., Toriyama M., Nakao K., Shibata S. & Imai T. (2005). Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cell. *Experimental Cell Research*, 306:349-356

- Olanov C.W., Goetz C.G., Kordower J.H., Stoessl J., Sossi V., Brin M., Shannon K.M., Nauert M., Perl D.P., Godbold J. & Freeman T.B. (2003). A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Annals of neurology*, 54:403-414
- Omatsu, Y., Sugiyama T., Kohara H., Kondoh G., Fujii N., Kohno K. & Nagasawa T. (2010). The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*, 33:387-399
- Opas M. & Deziak. (1998). Direct transdifferentiation in the vertebrate retina. *International Journal of Developmental Biology*, 42:199-208
- Owen M. & Friedenstein, A.J. (1988). Stromal stem cells: Marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Foundation Symposia*, 136:42-60.
- Pan G., Wang T., Yao H. & Pei D. (2012). Somatic cell reprogramming for regenerative medicine: SCNT vs. iPS cells. *Bioessays*, 34: 472-476
- Pastrana E., Silva-Vargas V. & Doetsch F. (2011). Eyes wide open: a critical review of sphere formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell*, 8:486-498
- Pathania M., Yan L.D. & Bordey A. (2010). A symphony of signals conducts early and late stages of adult neurogenesis. *Neuropharmacology*, 58:865-876
- Peng J., Zeng X. (2011). The role of induced pluripotent stem cells in regenerative medicine: neurodegenerative diseases. *Stem Cell Research & Therapy*, 2:32
- Petersen B.E., Bowen W.C., Patrene K.D., Mars W.M., Sullivan A.K., Murase N., Boggs S.S., Greenberg J.S. & Goff J.P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 284: 1168-1170
- Pevny H.L., Nicolis S.K. (2010). Sox2 roles in neural stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42:421-424
- Pfaffl W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29:2002-2007
- Phinney D.G. & Prockop, D.J. (2007). Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: The state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells*, 25:2896-2902
- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.K., Simonetti D.W., Craig S. & Marshak D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284:143-147
- Prockop D.J., Phinney D.G. & Bunell B.A. (2008). Mesenchymal stem cells: Methods and protocols. Humana Press.
- Raedt R., Pinxteren J., Van Dycke A., Waeytens A., Craeye D., Timmermans F., Vonck K., Vandekerckhove B., Plum J. & Boon P. (2007). Differentiation assays of bone marrow-derived multipotent adult progenitor cell (MAPC)-like cells towards neural cells cannot depend on morphology and a limited set of neural markers. *Experimental Neurology*, 203: 542-554
- Ramos-Mandujano G., Hernández-Benítez R. & Pasantés-Morales H. (2014). Multiple mechanisms mediate the taurine induced proliferation of neural stem/progenitor cells from the subventricular zone of the adult mouse. *Stem Cell Research*, 12:690-702
- Rege A.T. & Hagood J.S. (2006). Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *The FASEB Journal*, 20:1045-1054
- Reh T.A. (2002). Neural stem cells: form and function, *Nature Neuroscience*, 5:392-394
- Reynolds B. A. & Weiss S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult central nervous system. *Science*, 255:1707-1710
- Rietze R.L. & Reynolds B.A. (2006). Neural stem cell isolation and characterization. *Methods in enzymology*, 419:3-23

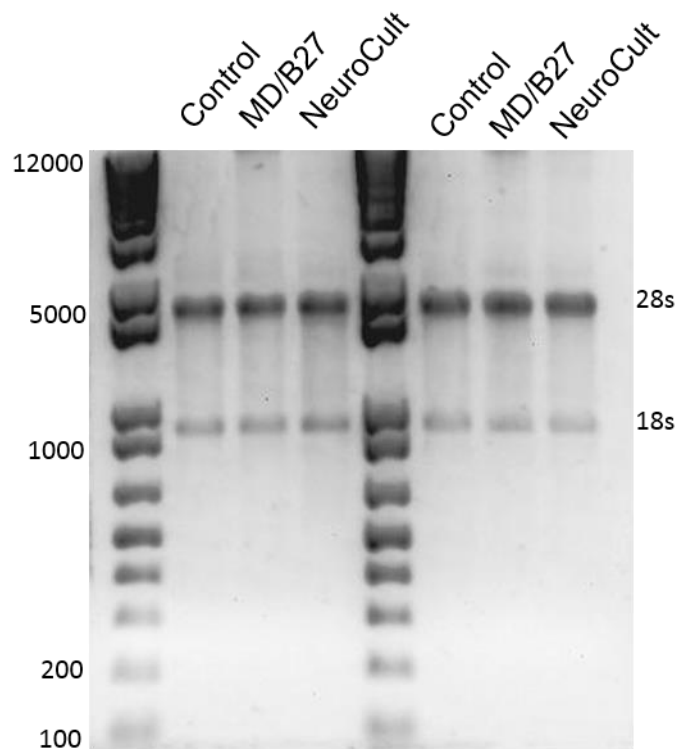
- Rivera F.J., Sierralta W.D., Minguell J.J. & Aigner L. (2006). Adult hippocampus derived soluble factors induce a neuronal-like phenotype in mesenchymal stem cells. *Neuroscience letter*, 406:49-54
- Roisen F.J., Klueber K.M., Lu C.L., Hatcher L.M., Doizer A., Shields C.B. & Maguire S. (2001). Adult human olfactory stem cells. *Brain research* 890:11-22.
- Rooney G.E., Howard L., O'Brien T., Windebank A.J. & Barry F.P. (2009). Elevation of cAMP in mesenchymal stem cells transiently upregulates neural markers rather than inducing neural differentiation. *Stem cells and development*, 18:387-398
- Roy N.S., Cleren C., Singh S.K., Yang L., Beal M.F. & Goldman S.A. (2006). Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nature Medicine*, 12:1259-1268
- Saldívar-Santoyo H.J., Flores-Guzmán P., Mayani H & Flores-Figueroa E. (2013). El nicho de las células troncales: los secretos de su “código postal”. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 56:47-59
- Salem H.K. & Thiemerman C. (2010). Mesenchymal stromal cells: Current understanding and clinical status. *Stem Cells*, 28:585–596
- Sánchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F., Hazzi C., Stedeford T. & Willing A. (2000). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Experimental Neurology*, 164:247–56
- Shi Y., Su J., Roberts A.I., Shou P., Rabson A.B. & Ren G. (2012). How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends in Immunology*, 33:136-143
- Si Y.L., Zhao Y.L., Hao H.J., Fu X.B & Han W.D. (2011). MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. *Ageing Research Reviews*, 10:93–103
- Sisakhtezhad S. & Matin M. M. (2012). Transdifferentiation: a cell and molecular reprogramming process. *Cell Tissue Research*, 348:379–396
- Song S., Song S., Zhang H., Cuevas J. & Sánchez-Ramos J. (2007). Comparison of neuron-like cells derived from bone marrow stem cells to those differentiated from adult brain neural stem cells. *Stem Cells and Development*, 16:747–756
- Steward M.M., Sridhar A. & Meyer J.S. (2013). Neural regeneration. En: Heber-Katz E y Stocum DL (Eds.). *New perspectives in regeneration, Current Topics in Microbiology and Immunology*, 367:163–191
- Sun Y., Yong K., Villa-Díaz L.G., Zhang X., Chen W., Philson R., Weng S., Xu H., Krebsbach P.H. & Fu J. (2014). Hippo/YAP mediated rigidity-dependent motor neuron differentiation of human pluripotent stem cells. *Nature Materials*, 13:599-604
- Swistowski A., Peng J., Liu Q., Mali P., Rao M.S., Cheng L., Zeng X. (2010). Efficient Generation of Functional Dopaminergic Neurons from Human Induced Pluripotent Stem Cells Under Defined Conditions. *Stem Cells*, 28:1893–1904
- Syngec I. (2013). Cell therapy for neurodegenerative disorders. En: Baharvand H y Aghdami N (Eds.). *Regenerative medicine and cell therapy, stem cell biology and regenerative medicine*. Springer Science Business Media, New York.
- Takashima Y., Era T., Nakao K., Kondo S., Kasuga M., Smith A.G. & Nishikawa S. (2007). Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell*, 129:1377–1388
- Takayanagi H. (2012). New developments in osteoimmunology. *Nature Reviews Rheumatology*, 8:684-689
- Tavassoli M. & Crosby W.H. (1968). Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science*, 161:54–56
- Thowfequ S., Myatt E.J. & Tosh D. (2007). Transdifferentiation in Developmental Biology, Disease, and in Therapy. *Developmental dynamics*, 236:3208 –3217

- Tian H., Bharadwaj S., Liu Y., Ma P.X., Atala A. & Zhang W. (2010). Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into bladder cells: Potential for urological tissue engineering. *Tissue engineering*, 16:1769-1779
- Till J.E. & McCulloch E.A. (1961). Direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow. *Radiation Research*, 14:213-222
- Tondreau, T., Lagneaux, L., Dejeneffe, M., Massy, M., Mortier, C., Delforge, A. & Bron, D. (2004). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 72:319–326.
- Tosh D & Slack J. (2002). How cells change their phenotype. *Nature Reviews*, 3:187-194
- Tropel P., Platet N., Platel J.C; Noël D., Albrieux M., Benabid A.L. & Berger F. (2006). Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24:2868-2876
- Trzaska K.A., Kuzhikandathil E.V. & Rameshwar P. (2007). Specification of a dopaminergic phenotype from adult human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 25:2797-808.
- Uccelli A., Moretta L. & Pistoia V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature*, 8:726-736
- Van Velthoven C.T.J., Kavelaars A & Heijnen C.J. (2012). Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemic brain damage. *Pediatric Research*, 7:474-481
- Wagers A.J & Weissman I.L. (2004). Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell*, 116:639–648
- Wakao S., Kuroda Y., Ogura F., Shigemoto T. & Dezawa M. (2012). Regenerative effects of mesenchymal stem cells: Contribution of muse cells, a novel pluripotent stem cell type that resides in mesenchymal cells. *Cells*, 1:1045-1060
- Wang D.Y., Wu S.C., Lin S.P., Hsiao S.H., Chung T.W. & Huang Y.Y. (2011). Evaluation of transdifferentiation from mesenchymal stem cells to neuron-like cells using microfluidic patterned co-culture system. *Biomed Microdevices*, 13:517-526
- Wang N. (2014). Stem cells go soft: Pliant substrate surfaces enhance motor neuron differentiation. *Cell Stem Cell*, 14:701-703
- Wang Y., Yang J., Li H., Wang X., Zhu L., Fan M., & Wang X. (2013). Hypoxia promotes dopaminergic differentiation of mesenchymal stem cells and shows benefits for transplantation in a rat model of Parkinson's disease. *PLoS ONE*, 8:e54296
- Wang N. (2014). Stem cells go soft: Pliant substrate surfaces enhance motor neuron differentiation. *Cell Stem Cell*, 14:701-703
- Wei X., Yang X., Han Z., Q F., Shao L., Shi Y. (2013). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34:747-754
- Weissman I.L. (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*, 287:1442-1446
- Wetzig A., Mackay-Sim A. & Murrell W. (2011). Characterization of olfactory stem cells. *Cell Transplantation*, 20:1673–1691
- Wiese C., Rolletschek A., Kania G., Blyszczuk P., Tarasov K.V., Tarasova Y., Wersto, R.P., Boheler K.R. & Wobus A.M. (2004). Nestin expression – a property of multi-lineage progenitor cells? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61:2510–2522
- Wislet-Gendebien S., Leprince P., Moonen G. & Rogister B. (2003). Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *Journal of Cell Science*, 116:3295-3302
- Wislet-Gendebien S., Wautier F., Leprince P. & Rogister B. (2005). Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin. *Brain Research Bulletin*, 68:95–102
- Wislet-Gendebien S., Hans H., Leprince P., Rigo J.M., Moonen G. & Rogister B. (2005). Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells*, 23:392–402
- Wislet-Gendebien S., Laudet E., Neirinckx V., Alix P., Leprince P., Glejzer A., Poulet C., Hennuy B., Sommer L., Shakhova O. & Rogister B. (2012). Mesenchymal stem cells and neural crest

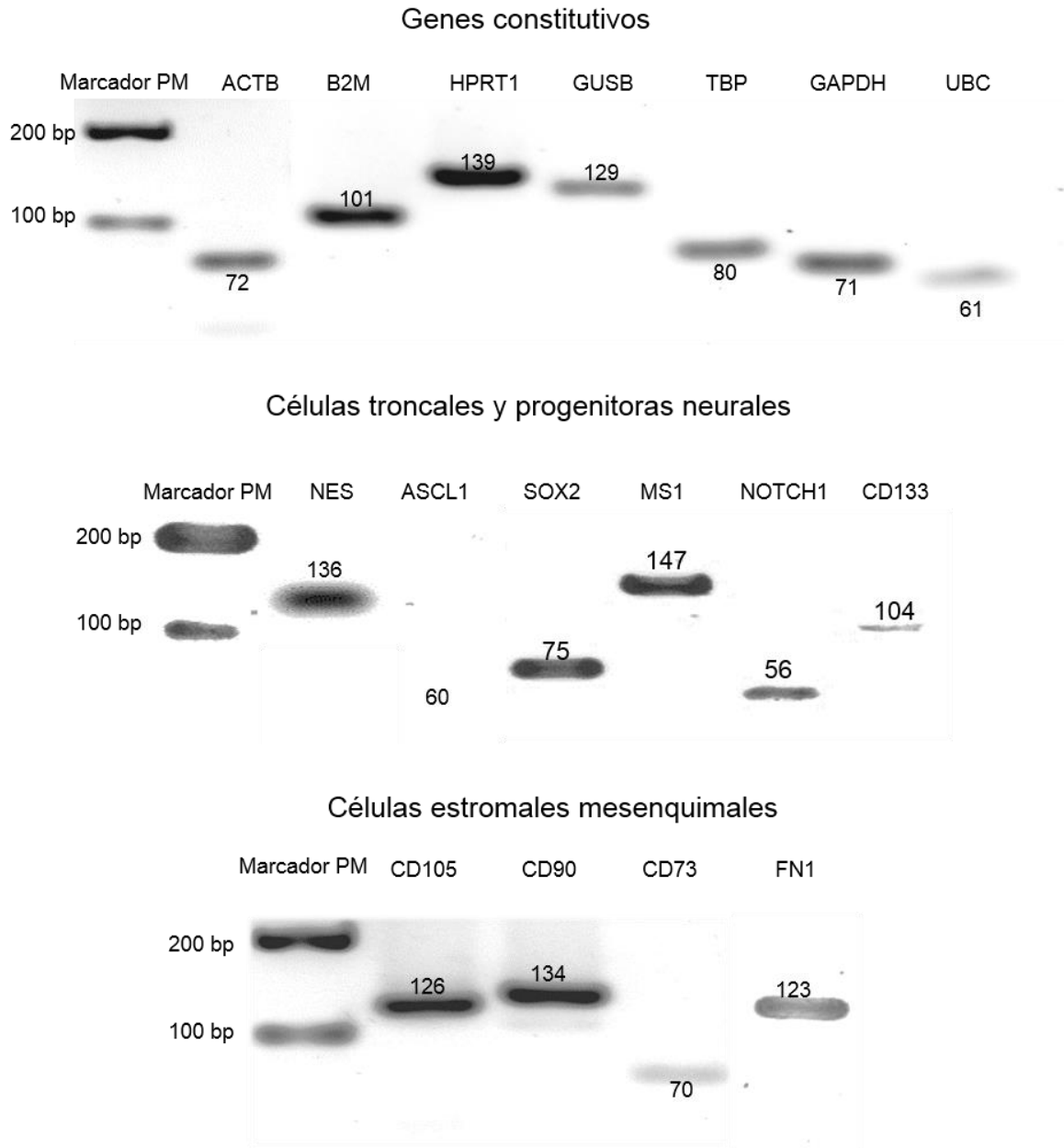
- stem cells from adult bone marrow: characterization of their surprising similarities and differences. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69:2593–2608
- Woodbury D., Schwarz E.J., Prockop D.J. & Black I.B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neurosciences Research*, 61:364–70
- Woodbury, D., Reynolds, K. & Black, I.B. (2002). Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *Journal of Neurosciences Research*, 69:908–917.
- Yang Q., Mu J., Li Q., Li A., Zeng Z., Yang J., Zhang X., Tang J. & Xie P. (2008). A simple and efficient method for deriving neurospheres from bone marrow stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372:520–524
- Yazdani S.O., Pedram M., Hafizi M., Kabiri M., Soleimani M., Dehghan M-M., Jahanzad I., Gheisari Y., & Hashemi S.M. (2012). A comparison between neurally induced bone marrow derived mesenchymal stem cells and olfactory ensheathing glial cells to repair spinal cord injuries in rat. *Tissue and Cell*, 44:205– 213
- Yu D.X., Marchetto M.C. & Gage F.H. (2013). Therapeutic translation of iPSC for treating neurological diseases. *Cell Stem Cell*, 12:678-688
- Zhao C., Deng W. & Gage F.H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 132:645-660
- Zhou Z., Kumari U., Xiao Z. & Tan E. (2010). Notch as a molecular switch in neural stem cells. *Life*, 62:618–623



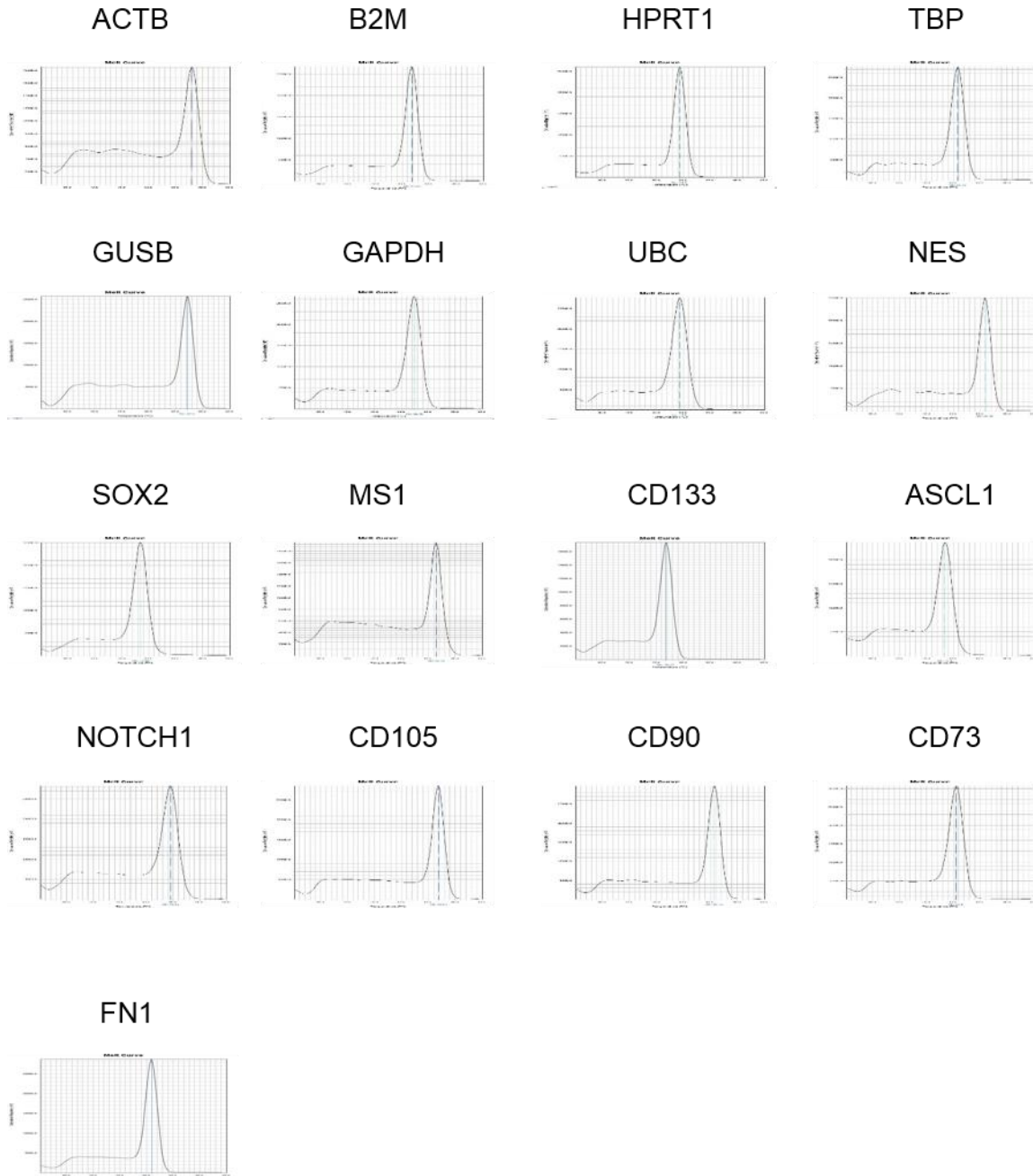
## XII. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA



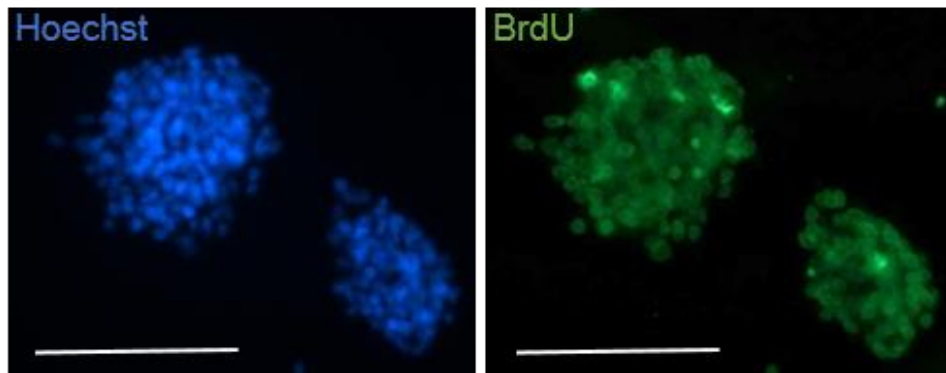
**Figura suplementaria 1. Integridad del RNA extraído.** Imagen representativa de electroforesis en gel de agarosa 1% no desnaturalizante de RNA aislado de MSC cultivadas en medio DMEM SFB 10% y medios de precursores neurales (MD/B27 en placa de baja adherencia y NeuroCult en placa normal). La proporción de la intensidad de las bandas de rRNA (RNA ribosomal) 28s (5034 bases) y 18s (1870 bases) es alrededor de 2.7, indicador su integridad. Aunado a esto la ausencia de productos de pequeño tamaño demuestra la pureza e integridad del RNA. Éste fue teñido mediante bromuro de etidio y las imágenes se obtuvieron en un espectrofotómetro con luz UV. El tamaño de los productos se identificó mediante el marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder.



**Figura suplementaria 2. Productos de amplificación de qPCR de los primers específicos para genes constitutivos, marcadores de células precursoras neurales y células mesenquimales.** Los productos fueron detectados después de la amplificación por PCR mediante electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio. Las imágenes fueron observadas en un espectrofotómetro con luz UV. El tamaño de los productos fue identificado mediante el marcador de peso molecular 1 KB DNA Ladder (Marcador PM).



**Figura suplementaria 3. Curvas de disociación de los productos de PCR.** Los productos de los primers para genes específicos humanos especificados en la tabla 3 se amplificaron mediante PCR y se realizó la curva de disociación en el sistema StepOnePlus (95° C-15 seg, 60° C-1 min, 95° C-15 seg).



**Figura suplementaria 4. Incorporación de BrdU en neuroesferas de NSC de ratón.** Neuroesferas generadas a partir de NSC obtenidas de la ZSV del cerebro de ratones neonatales CD1 fueron aisladas de acuerdo a Ramos-Mandujano et al (2014) y cultivadas en MD/B27 con BrdU (10  $\mu$ M) durante 24 horas. Las células se procesaron por inmunocitoquímica y la señal fue visualizada con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 mediante un microscopio de epifluorescencia Olympus IX71. Los núcleos fueron marcados con Hoechst 33258. Barra de escala 100 $\mu$ m. Se observa el 100% de las células positivas.