



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS**

**TRANSDIFERENCIACION NEURONAL DE CÉLULAS
ESTROMALES MESENQUIMALES DE FUENTES ADULTAS Y
NEONATALES POR MOLÉCULAS PEQUEÑAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
BIÓLOGA**

P R E S E N T A

LORENA VIRIDIANA CORTÉS MEDINA

DIRECTOR: DR. GERARDO RAMOS MANDUJANO

**ASESOR INTERNO: DR. EDGAR LEDESMA
MARTÍNEZ**

MARZO, 2017



CIUDAD DE MÉXICO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del 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 IN205916.

Agradezco primeramente a la UNAM y el Instituto de Fisiología Celular que se han vuelto no parte, sino mi vida.

A la Dra. Herminia Pasantes por permitirme ser parte de su equipo como ayudante de investigador emérito CONACyT y darme la confianza de contribuir en este proyecto. Por ser una pieza clave como ejemplo e inspiración en el mundo de la ciencia y como ser humano.

A mi director de tesis el Dr. Gerardo Ramos, por los cientos de horas que invirtió en mí e inculcarme la ciencia del modo más honesto mostrándome lo emocionante que esta puede ser. Por transmitirme sin titubeos sus conocimientos con la precisa firmeza y exigencia que lo caracterizan.

Al Dr. Juan José Montesinos y su equipo de trabajo, por el aporte de las células de las diferentes fuentes, además de sus observaciones y contribuciones al proyecto.

A mi comité tutor: Dr. Edgar Ledesma, Dr. Jorge Hernández, M. en C. Rosalva Rangel y Dr. Benny Weiss; por tomar parte de su tiempo para la revisión de este trabajo y sus valiosas aportaciones para enriquecerlo.

DEDICATORIAS

Dedico especialmente este trabajo a mis hermanas, Paty-Bere, Pao y Karen por ser el mejor equipo que la vida me pudiera dar. Porque han sido mis amigas y compañeras de locuras, que junto con Kiara hacen de muchos momentos, los más especiales. Les dedico lo mejor que tengo por ser las más molestonas y horribles en el universo. Simplemente las amo chicas, son las mejores y gracias por todo.

A mis padres Sergio Cortés y Tere Medina porque de alguna forma me han hecho a su manera una mujer fuerte e independiente, con la capacidad de salir adelante. Gracias por sembrar en mí la idea de superarme un poco más cada día.

A mí querido John, por ser pieza clave en todo esto y dar todo conmigo. Amor, gracias por estar conmigo desde el inicio.

Al Dr. Edgar Ledesma por ser un valioso amigo y compañero, por soportar mis locuras siempre y por tener las palabras adecuadas para el momento preciso.

Fundamentalmente a mi confidente y director de tesis Gerardo Ramos, por brindarme la gran oportunidad de trabajar con él, por su confianza en mi trabajo y por cada una de las cosas que me ha enseñado con toda la paciencia y sabiduría. Quiero agradecerle todos esos intentos desesperados por hacerme comprender cada paso desde “Palitos I” y no llevarme por el camino más sencillo, sino por el más adecuado para hacer de mí una profesionalista con bases y preparación. Pero más que nada, por el enorme apoyo que me ha brindado y por dejarme conocer a esa persona tan fuerte y completa que se ha vuelto mi mejor amigo. Gera, con todo mi respeto y admiración... infinitas gracias.

Finalmente, a todos aquellos que creyeron en mí y a los que no. Todos impulsaron mi trabajo de alguna manera.

Nunca dejes pasar una oportunidad que te haga feliz, aunque a los demás no les guste.

-Oscar Wilde.

La grandeza puede ser alcanzada solamente si se quiere alcanzar.

-Elvia Santos

La ciencia es fascinante, es entretenida, es divertida, es importante y la estamos viviendo en estos momentos, todos los días.

-Herminia Pasantes.

El futuro depende de lo que hagas hoy.

-Gandhi.

***TRANSDIFERENCIACIÓN
NEURONAL DE CÉLULAS
ESTROMALES
MESENQUIMALES DE FUENTES
ADULTAS Y NEONATALES POR
MOLÉCULAS PEQUEÑAS***

ÍNDICE

PALABRAS CLAVE	1
LISTA DE ABREVIATURAS	1
I. RESUMEN	3
II. INTRODUCCIÓN	5
• Trastornos neurodegenerativos y medicina regenerativa	5
• Generación de poblaciones neuronales por Células Troncales.....	6
○ Células Progenitoras/Troncales Neurales (NPC's)	6
○ Células Troncales Embrionarias (ESC's).....	7
○ Células troncales pluripotentes inducidas (iPSC's).....	7
○ Limitaciones de las células troncales en protocolos de medicina regenerativa	8
• Transdiferenciación Neuronal	9
○ Transdiferenciación celular	9
○ Transdiferenciación neuronal mediante factores de transcripción ...	9
• Moléculas pequeñas y su papel en la transdiferenciación neuronal ...	13
○ Moléculas pequeñas: Generalidades	13
○ Transdiferenciación neuronal por moléculas pequeñas	13
○ Principales mecanismos de acción de moléculas pequeñas en la transdiferenciación neuronal	16
• Células Troncales/Estromales Mesenquimales (MSC's) y terapia celular	19
○ Propiedades generales de MSC's.....	19
○ Fuentes de obtención de MSC's	21
○ Aplicaciones de MSC's en terapia celular	23

○	Potencial uso de MSC's en desordenes neurodegenerativos	26
•	Reprogramación y Transdiferenciación Neuronal de MSC's	27
○	Transdiferenciación neuronal de MSC's por moléculas pequeñas.	28
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	30
IV.	HIPÓTESIS	31
V.	OBJETIVOS	32
•	Objetivo general	32
•	Objetivos particulares	32
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS	33
•	Obtención de Células Troncales/Estromales Mesenquimales (MSC's)	33
•	Expansión, criopreservación y mantenimiento de MSC's	33
•	Protocolo de inducción neuronal.....	34
•	Evaluación de células necróticas	35
•	Evaluación de morfología neuronal.....	36
•	Inmunocitoquímica.....	36
VII.	RESULTADOS.....	37
•	Aislamiento y caracterización de MSC's de las fuentes adultas y neonatales	37
•	Propiedades basales de las MSC's	37
•	Inducción neuronal mediante el coctel ICFRYA en fuentes adultas y neonatales de MSC's.....	42
•	Modificación al protocolo ICFRYA.....	46
VIII.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	53

IX.	PERSPECTIVAS	59
X.	REFERENCIAS	60
XI.	MATERIAL SUPLEMENTARIO	66

PALABRAS CLAVE

Transdiferenciación directa, Células Troncales/Estromales Mesenquimales, fuentes adultas, fuentes neonatales, moléculas pequeñas, neuronas inmaduras inducidas.

ABREVIATURAS

BDNF: Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro, del inglés *Brain-Derived Neurotrophic Factor*.

BHA: Anisol Hidroxibutilado, del inglés *Butil Hidroxianisol*.

BM: Medula ósea, del inglés *Bone Marrow*.

B-ME: Beta Mercaptoetanol.

CMH II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II.

DCX: Doublocortina.

dbcAMP: Dibutil AMP cíclico.

DMSO: Dimetil Sulfóxido.

DP: Pulpa Dental, del inglés *Dental Pulp*.

EGF: Factor de crecimiento Epidermal, del inglés *Epidermal Growth Factor*.

ESC's: Células Troncales Embrionarias, del inglés *Embryonic Stem Cells*.

FBS: Suero Fetal Bovino, del inglés *Fetal Bovine Serum*.

GDNF: Factor neurotrófico derivado de la glía, del inglés *Glial Derived Neurotrophic Factor*.

GT: Tejido Gingival, del inglés *Gingival Tissue*.

hFGF₂: Factor de Crecimiento Fibroblastoide 2 humano, del inglés *human Fibroblast Growth Factor*.

HSC's: Células Troncales Hematopoyéticas, del inglés *Hematopoietic Stem Cells*.

ICC: Inmunocitoquímica, del inglés *Inmunocitochemistry*.

ICFRYA: Coctel de moléculas pequeñas conformado por I-BET151, CHIR99021, Forskolina, RepSox, Y27632 y dbcAMP.

iN: Neuronas inducidas, del inglés *induced Neurons*.

iPSC's: Células Troncales Pluripotentes inducidas, del inglés *induced Pluripotent Stem Cells*.

MAP2: Proteína Asociada a Microtúbulos tipo 2, del inglés *Microtubule-Associated Protein 2*

MSC's: Células Troncales/Estromales Mesenquimales, del inglés *Mesenchymal/Stromal Cells*.

NGF: Factor de Crecimiento Nervioso, del inglés *Nervious Growth Factor*.

NPC's: Células Progenitoras Neurales, del inglés *Neural Progenitor Cells*.

NT3: Neurotrofina 3.

PDL: Ligamento Periodontal, del inglés *periodontal Ligament*.

PLAC: Placenta

RA: Ácido retinóico, del inglés *Retinoic Acid*.

ROCK: Proteína cinasa asociada a Rho, del inglés *Rho-associated, Protein Kinase*.

SK: Dermis/Piel, del inglés *Skin*.

SNC: Sistema Nervioso Central.

TGF-β: Factor de Crecimiento Transformante beta, del inglés *Transforming Growth Factor*.

TH: Tirosin-hidroxilasa.

UCB: Sangre de Cordón Umbilical, del inglés *Umbilical Cord Blood*.

Wh.J.: Gelatina de Wharton, del inglés *Wharton's jelly*.

ZSG: Zona Subgranular.

ZSV: Zona Subventricular.

I. RESUMEN

Las investigaciones en regeneración de tejidos se han vuelto de gran interés para el tratamiento de los desórdenes neurodegenerativos. Uno de los principales retos de la medicina regenerativa en este tipo de padecimientos es determinar la o las fuentes celulares más apropiadas que generen las poblaciones neuronales para reemplazar a las células nerviosas dañadas. Las células troncales/estromales mesenquimales (MSC's) son células multipotentes, que a diferencia de otras células troncales su obtención no presenta problemas éticos y son aisladas de tejidos accesibles; además, se ha reportado su potencial para generar células con propiedades neuronales.

En el presente trabajo se comparó la capacidad de MSC's aisladas de fuentes adultas: dermis (SK-MSC's), ligamento periodontal (PDL-MSC's), tejido gingival (GT-MSC's) y pulpa dental (DP-MSC's); y neonatales: sangre de cordón umbilical (UCB-MSC's), placenta (PLAC-MSC's) y gelatina de Wharton (Wh.J.-MSC's) para transdiferenciarse en células neuronales usando un coctel específico de moléculas pequeñas compuesto por I-BET151, CHIR99021, Forskolina, RepSox, Y27632 y cAMP. Previamente determinamos que este coctel induce la generación de células con propiedades de neuronas inmaduras a partir de MSC's obtenidas de médula ósea (BM-MSC's).

Los resultados indicaron que no todas las fuentes de MSC's responden igual al coctel. En las Wh.J.-MSC's las moléculas no indujeron propiedades neuronales y solo provocaron incremento en la necrosis. Las fuentes dentales (PDL-MSC's, GT-MSC's y DP-MSC's) presentaron bajos porcentajes de morfología neuronal y reactividad para el marcador de neuronas inmaduras β -III tubulina y prácticamente no se observó reactividad para el marcador de neuronas maduras MAP2. Mientras en las MSC's aisladas de placenta, sangre de cordón umbilical y dermis, este coctel indujo un alto porcentaje de células con morfología neuronal con ramificaciones tipo dendritas y positivas para β -III tubulina; y aunque de manera limitada algunas células β -III tubulina⁺ presentaron reactividad para del marcador de neuronas

maduras MAP2. También se determinó que del coctel, I-BET151 fue la molécula más importante para inducir estos cambios neuronales. Estos resultados sugieren que es posible la transdiferenciación neuronal de MSC's de diferentes fuentes por moléculas pequeñas, pero también indican que a pesar de que las células de todas las fuentes son consideradas MSC's presentan diferencias en la respuesta a un mismo estímulo de inducción neuronal.

II. INTRODUCCIÓN

TRASTORNOS NEURODEGENERATIVOS Y MEDICINA REGENERATIVA

Los daños traumáticos al sistema nervioso central (SNC) y las enfermedades neurodegenerativas son un grupo heterogéneo de padecimientos con diferente etiopatogenia y alteraciones que tienen la característica en común de perder neuronas o células gliales de forma crónica o aguda (Jordán, 2003; Moraleda, 2011). Entre los principales trastornos neurodegenerativos destacan los accidentes cerebrovasculares, el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica, que después de las patologías tumorigénicas representan la segunda causa de muerte (INEGI, 2014).

La farmacología busca interferir los procesos neurodegenerativos mediante principios activos para retardar la sintomatología propia de la alteración en los niveles de neurotransmisores; sin embargo, no es capaz de evitar la progresión del daño y tienen poco impacto en la salud a largo plazo de los pacientes. Por lo anterior, es necesaria la búsqueda de terapias alternas (Jordán, 2003; Moraleda, 2011).

Debido a que la regeneración neuronal en adultos es muy lenta o nula, no es posible el reemplazo de las células nerviosas dañadas por mecanismos endógenos. Ante esto, la medicina regenerativa pretende usar poblaciones neuronales y/o células progenitoras neurales, generadas *in vitro*, capaces de integrarse al tejido para restaurar la funcionalidad en el SNC (Kassem, 2006; Meyer et al., 2010).

Para este fin, se han generado *in vitro* diversas poblaciones neuronales a partir de células progenitoras/troncales neurales (NPC's), células troncales embrionarias (ESC's) o de células pluripotentes inducidas (iPSC's) (Aoi et al., 2008; Levy et al., 2004; Ramos-Mandujano et al., 2014; Sisakhtnezhad and Matin, 2012; Takahashi and Yamanaka, 2006).

GENERACIÓN DE POBLACIONES NEURONALES POR CÉLULAS TRONCALES

Las células troncales son células indiferenciadas que tienen un potencial proliferativo elevado y que presentan dos características fundamentales: son capaces de autorrenovarse, es decir, formar células idénticas a las células de origen; y tienen la capacidad de generar uno o más tipos celulares que desempeñan funciones especializadas en el organismo dependiendo del sitio en que se localizan. De acuerdo con su origen, las células troncales pueden dividirse en células troncales embrionarias o somáticas (Flores-Figueroa et al., 2006; Saldívar-Santoyo H.J., 2013).

Células Progenitoras/Troncales Neurales (NPC's)

El desarrollo neuronal tiene lugar desde etapas embrionarias con la proliferación y diferenciación de células propias del tubo neural mediante el proceso de neurogénesis, el cual es sumamente activo. Se ha demostrado que también en etapas postnatales nuevas neuronas continúan generándose aunque de manera limitada y sitio-específicas, en la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo (Arias-Carrión, 2007; Pathania et al., 2010).

Para su estudio *in vitro* se ha logrado expandir NPC's de las áreas neurogénicas fetales y adultas. Las células aisladas se mantienen con suplementos libres de suero en presencia de los factores de crecimiento EGF y hFGF (Correa, 2010; Ramos-Mandujano et al., 2014). En estas condiciones, la mayoría de las células dispersas no responden y mueren, mientras que sólo una pequeña cantidad de estas (regularmente menos del 1%) logra sobrevivir y proliferar formando agregados flotantes conocidos como neuroesferas. Las células de las neuroesferas son consideradas NPC's y se caracterizan típicamente por marcadores como Nestina, CD133, Sox2, Musashi, Lex, y Pax6 (Pasantés-Morales et al., 2015). Así mismo, cuando las NPC's son cultivadas en presencia de un sustrato y suero, pero retirando los factores de crecimiento, se induce la diferenciación a los linajes

neurales: astrogli a, oligodendrogl a y neuronal (Pasantes-Morales et al., 2015; Ramos-Mandujano et al., 2014).

Las neuronas en cultivo mantienen muchas de las características descritas *in vivo*, considerando de manera general a una célula neuronal como aquella que morfológicamente desarrolla un axón simple, una larga dendrita apical y numerosas dendritas basales más cortas. Además de expresar características distintivas como los marcadores de neuronas inmaduras DCX, PSA, NCAM, β -III tubulina; y los marcadores de neuronas maduras NeuN, MAP2 y TH. Así como la presencia de receptores específicos, y corrientes de sodio excitables y conexiones sin pticas (Arias-Carrión, 2007; Campana et al., 2008; Correa, 2010).

Células Troncales Embrionarias (ESC's)

Las ESC's son obtenidas de los primeros estadios del desarrollo embrionario en la masa interna del blastocisto. Las ESC's son células pluripotentes, es decir, cada una de estas células tiene la capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares del organismo, y poseen un potencial proliferativo casi ilimitado. Para fines de neurogénesis (Flores-Figueroa et al., 2006; Mayani, 2011) las ESC's tienen un potencial uso debido a su aptitud de diferenciación en células del ectodermo. Adicionalmente, se ha demostrado en diferentes estudios que las ESC's pueden diferenciarse en precursores neurales o neuronas en las mismas condiciones de cultivo que se emplean en progenitores neurales antes descritas, adquiriendo características prácticamente indistinguibles a las neuronas provenientes de NPC's (Bjorklund et al., 2002; Cowan et al., 2005).

Células Troncales Pluripotentes inducidas (iPSC's)

Las iPSC's son generadas a partir de la reprogramación de células somáticas, y al igual que las ESC's, tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier linaje celular. La generación de estas células se consiguió en 2006 cuando Takahashi y Yamanaka demostraron que la ruta de diferenciación celular no es unidireccional y puede ser revertida a partir de prácticamente cualquier célula somática con la

sobreexpresión de un coctel definido de factores de transcripción compuesto por Oct4, Sox2, Klf4 y cMyc (llamados OSKM colectivamente). Además, no se observaron diferencias en morfología o fisiología respecto a las ESC's, por lo cual son otra opción para la generación de células neuronales (Takahashi and Yamanaka, 2006, 2016; Yang et al., 2011).

Limitaciones de las Células Troncales en protocolos de medicina regenerativa

A partir del aislamiento de NPC's se consideró su uso como una herramienta de tratamiento en desordenes neurodegenerativos; sin embargo, el uso de NPC's fetales tiene implicaciones éticas y las NPC's adultas no es posible aislarlas sin provocar un daño permanente en el donador (Martino and Pluchino, 2006; Meyer et al., 2010). Por su parte, las ESC's parecían prometedoras en el campo de la terapia celular, no obstante una vez que se emplearon estas células en modelos de ratones parkinsonianos se observó un enorme rechazo inmunológico, baja estabilidad fenotípica y escasa sobrevivencia de las células trasplantadas; además de estas complicaciones, se desencadenó un gran número de limitaciones éticas por la destrucción de un blastocisto para aislar las ESC's (Bjorklund et al., 2002; Levy et al., 2004).

Las iPSC's al ser generadas de células somáticas no presentan problemas técnicos o éticos, y tienen la capacidad de diferenciación hacia cualquier célula madura; sin embargo, la sobreexpresión ectópica de genes exógenos implica que el genoma extraño se inserte al genoma del huésped provocando entre muchos otros, problemas de tumorigenesis (Takahashi and Yamanaka, 2016; Vierbuchen et al., 2010). En consecuencia, se buscan nuevas alternativas celulares con un uso clínico más seguro.

TRANSDIFERENCIACIÓN NEURONAL

Transdiferenciación celular

Mientras que la reprogramación celular involucra varios procesos por los cuales una célula somática se induce a un estadio pluripotente o multipotente, y posteriormente se re-diferencia en una célula madura diferente a la de partida (Jung et al., 2014); la transdiferenciación o conversión celular es un tipo de reprogramación, en la cual se busca llegar a la célula madura de interés de manera directa, es decir, sin una etapa de reversión a estadios pluripotentes o intermedios. La transdiferenciación también conlleva la pérdida de marcadores y funciones del tejido original, así como la adquisición de características del tipo celular al que se compromete (Graf and Enver, 2009; Sisakhtnezhad and Matin, 2012).

La idea de que las células somáticas pueden ser interconvertibles se remonta a 30 años cuando la sobreexpresión del gen MyoD1 en fibroblastos generó células musculares (Davis et al., 1987). Utilizando el mismo principio, células de las tres capas germinales fueron convertidas a otro tipo celular de su misma capa germinal, incluso se ha logrado la conversión celular de capas trans-germinales (Figura 1a). Con la expresión exógena de factores de transcripción relacionados con el linaje neuronal, Wernig y colaboradores propusieron un modelo de conversión “de larga distancia” de fibroblastos de ratón para transdiferenciarse en células neuronales (Figura 1b) (Vierbuchen et al., 2010).

Transdiferenciación neuronal mediante factores de transcripción

Wernig demostró la transdiferenciación neuronal de células somáticas después de un riguroso análisis a partir de la expresión aleatoria de 19 genes candidatos, conocidos por tener un papel importante en el desarrollo neural o reprogramación epigenética. En dicho estudio encontraron que el gen proneural *Ascl1* *per se*, es capaz de convertir fibroblastos de ratón en células con morfología neuronal; sin embargo, éstas no expresan marcadores neuronales o actividad funcional (Figura 2). Para esto, la expresión de factores adicionales resultó crucial en la generación

de células neuronales, así entonces se determinó que el factor de transcripción de mielina tipo 1 (Myt1l) es necesario para obtener células con desarrollo de esta proteína y la expresión de algunos marcadores típicos de neuronas, mientras que Brn2 proporcionaba a las células neuronales señales basales para participar en circuitos sinápticos (Figura 1b, Figura 2). De este modo observaron que sorprendentemente, células inmaduras con morfología neuronal se obtenían tres días después de la expresión transgénica (Vierbuchen et al., 2010).

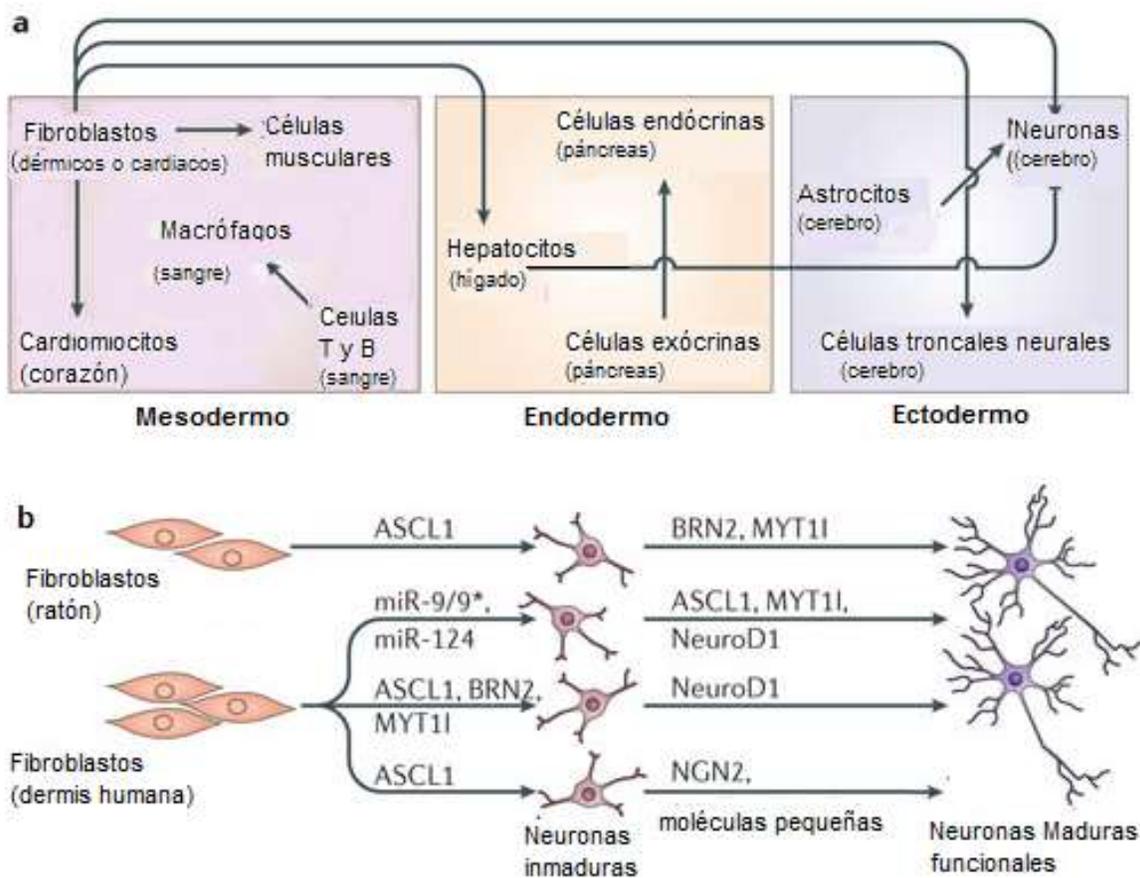


Figura 1. a) Transdiferenciación celular intra y trans-germinal mediada principalmente por factores de transcripción. b) Transdiferenciación neuronal de fibroblastos de ratón y humanos por factores de transcripción específicos. Modificado de Ladewig, 2013.

Más adelante, ensayos de maduración también en fibroblastos de ratón se llevaron a cabo para obtener un estadio funcional en las células neuronales inducidas. Para esto se realizó la combinación de los factores anteriormente mencionados con otras combinaciones, entre los cuales OLIG2 y Zic1 incrementaron la eficiencia de conversión neuronal y adicionalmente mantuvieron la estabilidad de las neuronas inducidas. Cabe destacar que diferentes estudios reportan que aunque hay diversos factores que permiten mejorar la inducción neuronal, se ha establecido que el pool de Brn2, Ascl1 y Myt1l (BAM) son suficientes para obtener neuronas inducidas (Li et al., 2009; Pang et al., 2011; Vierbuchen et al., 2010). En contraste a la generación de poblaciones neuronales por iPSC, las neuronas inducidas por factores de transcripción a partir de fibroblastos de ratón pueden generarse de una manera más rápida y no requieren pasar por estadios de proliferación celular, lo que implica una condición más favorable para los cambios epigenéticos en la transdiferenciación (Hong et al., 2009; Ladewig et al., 2013; Li et al., 2009; Vierbuchen et al., 2010).

Al igual que en los experimentos desarrollados en fibroblastos de ratones, los factores BAM se introdujeron en fibroblastos fetales humanos, generando células neuronales inmaduras. Realizando una examinación con 20 factores adicionales en combinación aleatoria con BAM, se encontró que la introducción de NeuroD1 como factor de transcripción consigue la generación de células neuronales inducidas funcionales (Figura 1b). Estas células expresaron una variedad de marcadores neuronales incluyendo β -III tubulina, MAP2, NeuN, Sinapsina, y propiedades funcionales propias de neuronas (Figura 2) (Lu et al., 2002; Qiang et al., 2011).

Sin embargo, así como cuando se induce células somáticas a células troncales pluripotentes, el uso de genes exógenos en la transdiferenciación directa es una desventaja para su aplicación en medicina regenerativa. Recientemente, se observó que en esta reprogramación de fibroblastos con factores de transcripción, la inducción neuronal puede ser mejorada por compuestos que regulan algunas vías de señalización conocidos como moléculas pequeñas, las cuales se ha reportado que son capaces de sustituir a los factores en la etapa de maduración. Por ejemplo,

al transfectar fibroblastos con Neurog2 adicionando algunas de estas moléculas al cultivo la inducción neuronal mejora, y estudios posteriores demuestran que no solamente hay una mejor transdiferenciación sino que puede reemplazar el uso de genes exógenos (Figura 1b) (Gascon et al., 2016).

Propiedad	Criterio Específico	Grado de Transdiferenciación
Característica morfología neuronal	Arborización dendrítica compleja	iN reprogramación parcial, iN inmaduras
Expresión de múltiples marcadores neuronales	β III tubulina, MAP2, NeuN, Tau, Synapsina	
Desarrollo de un estable potencial de membrana	-50mV a -70mV	
Generación de un potencial de acción singular	Membrana estereotípica con respuesta de corriente de voltaje	
Potencial de acción espontáneo y repetitivo		
Expresión de NT funcionales receptores	Corriente de membrana con respuesta a neurotransmisores	iN completamente reprogramadas, iN maduras.
Función post-sináptica	Cambio espontáneo de PSCs en co-cultivo primario de neuronas	
Plasticidad sináptica	Facilitación o depresión a corto plazo	

Figura 2. Criterios básicos para la generación de células neuronales inducidas en diferentes estadios de maduración. Modificado de Yang et. al. 2011

MOLÉCULAS PEQUEÑAS Y SU PAPEL EN LA TRANSDIFERENCIACIÓN NEURONAL.

Moléculas pequeñas: Generalidades

Las moléculas pequeñas tienen un peso menor a 800 Da, lo que permite su rápida difusión a través de las membranas celulares. Estas moléculas, mediante su interacción con proteínas blanco, activan o inhiben vías de señalización en algunos casos funcionando como modificadores epigenéticos para incidir en la expresión de genes. Los efectos de las moléculas pequeñas pueden ser reversibles, lo que permite un control temporal o permanente sobre la función de las redes de señalización dependiente de la concentración aplicada, esto último puede ser una ventaja importante para cualquier desarrollo clínico futuro (Jung et al., 2014; Zhang et al., 2012).

Transdiferenciación neuronal por moléculas pequeñas

En 2015, Li et. al., retomó el estudio de Wernig para llevar a cabo la transdiferenciación neuronal en fibroblastos embrionarios de ratón expresando únicamente el factor de transcripción Ascl1. Conservando la expresión de Ascl1 observó que un coctel de cuatro moléculas: Forskolina, ISX9, CHIR99021 y SB4331542 (Tabla 1), resultaba suficiente para reemplazar al resto de los factores previamente utilizados, obteniendo células neuronales inmaduras con un rendimiento >30%. Al probar otras moléculas pequeñas determinó que con la adición de la molécula I-BET151 (Tabla 1) ya no es necesario la expresión de Ascl1; ya que esta molécula es capaz de sustituir las funciones de Ascl1, alcanzando incluso un rendimiento de transdiferenciación >90% considerando las células con morfología neuronal/ β -III tubulina⁺. Además confirmó que las neuronas inducidas generadas expresaban propiedades funcionales típicas de neuronas maduras (Li et al., 2015).

En el mismo año Hu y colaboradores, sugieren la transdiferenciación directa de fibroblastos humanos en neuronas inducidas a partir de la adición de

combinaciones de moléculas pequeñas, hasta formar un coctel de siete: VPA, CHIR99021, RepSox, Forskolina, SP600125, Gö6983, Y27632 (Tabla 1). Las células inducidas mostraron reactividad para marcadores de neuronas inmaduras, maduras y funcionales; además de actividad electrofisiológica similar a neuronas ilustradas previamente en la figura 2 (Hu et al., 2015). Meses después, Zang et. al., reporta la capacidad de transdiferenciación de astrocitos en neuronas inducidas funcionales mediante la activación transcripcional de NeuroD1 y NEUROG2, por un coctel de nueve moléculas pequeñas compuesto por: LDN193189, SB4331542, TTNBP, TZV, CHIR99021, VPA, DAPT, SAG y Purmorfamina (Tabla 1). En este último estudio se propone que las moléculas provocan la iniciación de una etapa de regulación epigenética en las células gliales, lo cual les obliga a reprogramarse para convertirse en células neuronales (Zhang et al., 2015).

Las ventajas que implica la capacidad de generar células neuronales sin manipulación genética, sugiere un potencial uso en el campo de la medicina regenerativa con un menor riesgo, por lo tanto, el uso de moléculas pequeñas resulta una herramienta prometedora en la reprogramación celular (Jung et al., 2014).

Tabla 1 Moléculas pequeñas utilizadas en la transdiferenciación neuronal de células somáticas sin manipulación genética por factores exógenos

MOLÉCULA	VÍA/PROTEÍNA BLANCO	REFERENCIAS
cAMP	Activación de cAMP	(Aguilera-Castrejon et al., 2017)
CHIR99021	Inhibidor de GSK3	(Aguilera-Castrejon et al., 2017)(Hu et al., 2015; Li et al., 2015; Zhang et al., 2015)
DAPT	Inhibidor de Nocht	(Zhang et al., 2015)
Forskolina	Activación de cAMP	(Aguilera-Castrejon et al., 2017)(Hu et al., 2015; Li et al., 2015)
Gö6983	Inhibidor de PKC	(Hu et al., 2015)
I-BET151	Inhibidor de proteínas de la familia BET	(Aguilera-Castrejon et al., 2017)(Li et al., 2015)
ISX9	Activación de Ca ²⁺	(Li et al., 2015)
LDN193181	Inhibidor de ALK2, ALK3 y ALK6	(Zhang et al., 2015)
Purmorphamina	Activación de Shh	(Zhang et al., 2015)
RepSox	Inhibidor de TGF-β, reemplazo de SOX2	(Aguilera-Castrejon et al., 2017)(Hu et al., 2015)
SAG	Activación de Shh	(Zhang et al., 2015)
SB4331542	Inhibidor de ALK4, ALK5 y ALK7	(Li et al., 2015; Zhang et al., 2015)
SP600125	Inhibidor de JNK	(Hu et al., 2015)
TTNBP	Activación del ácido retinóico	(Zhang et al., 2015)
TZV	Inhibidor de ROCK	(Zhang et al., 2015)
VPA	Inhibidor de HDAC	(Hu et al., 2015; Zhang et al., 2015)
Y27632	Inhibidor de ROCK	(Aguilera-Castrejon et al., 2017)(Hu et al., 2015)

Principales mecanismos de acción de moléculas pequeñas en la transdiferenciación neuronal.

En los estudios de transdiferenciación neuronal se propone que las moléculas pequeñas tienen la capacidad de instruir a una célula somática a destino neuronal por la regulación de diferentes vías moleculares (Figura 3). Esta transdiferenciación directa, ha demostrado que incluso no es necesario pasar por un estado proliferativo para convertir a una célula somática en neurona, de hecho la sobreexpresión del activador de ciclo celular c-Myc reduce considerablemente la eficiencia de conversión de fibroblastos (Fishman et al., 2015). Esto apoya la observación de que los inhibidores de bromodominios BET como I-BET151, mejoran la transdiferenciación neuronal mediada por moléculas pequeñas, ya que estos compuestos son capaces de arrestar el ciclo celular por inhibición de Myc (Gallagher et al., 2014).

En la transdiferenciación, los modificadores epigenéticos (Figura 3) como el ácido valpróico, butirato de sodio, I-BET151, entre otros, juegan un papel crucial en la regulación de expresión de genes y/o la reorganización de la cromatina. El inhibidor I-BET151 por ejemplo, desestabiliza el estado de partida de las células mediante la reducción de expresión de genes fibroblastoides para favorecer la inducción de las células de interés. Sin embargo, se necesita de otras moléculas implicadas en la neurogénesis para desencadenar la transdiferenciación neuronal (Figura 3) (Babos and Ichida, 2015; Li et al., 2016; Li et al., 2015).

La mayoría de los protocolos de reprogramación o transdiferenciación neuronal incluyen inhibidores de GSK-3 y Smad, los cuales se han reportado como activadores de genes neuronales (NCAM1, DCX, MAP2 y varios determinantes neurogénicos como *Ascl1* o *NeuroG2*) durante los cambios de destino celular (Figura 3bb (Hu et al., 2015). Sumado a esto, estudios indican que los activadores del cAMP intracelular (Tabla 1) son capaces de facilitar la transdiferenciación de células somáticas en neuronas inducidas (Deng et al., 2006).

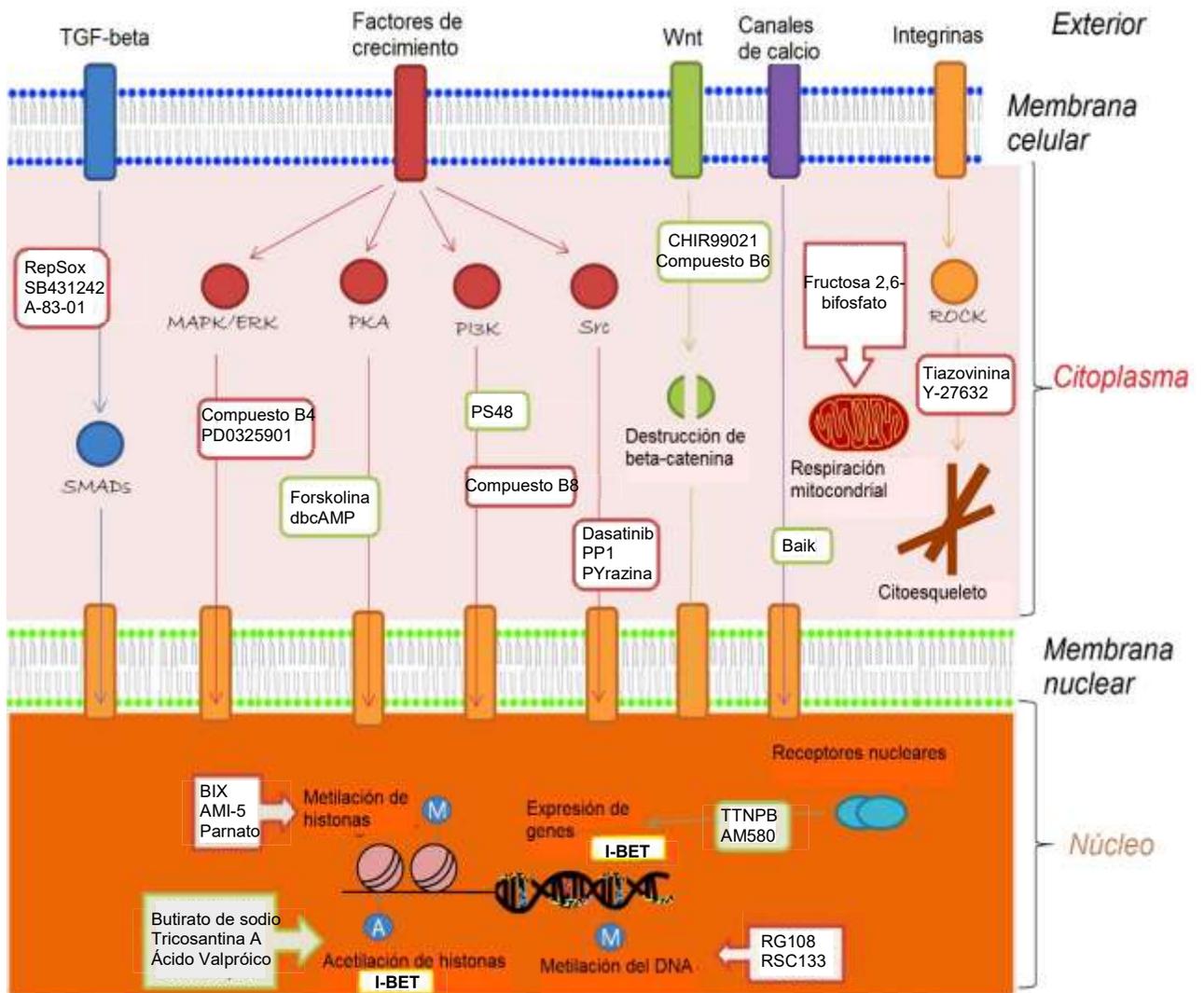


Figura 3. Principales mecanismos de acción de las moléculas pequeñas mediante inhibición o activación de vías de señalización durante la inducción neuronal de células somáticas. En recuadros verdes se observan las moléculas activadoras, mientras que en los rojos se encierran las moléculas inhibidoras de alguna vía en específico; por otro lado, en recuadros amarillos se encuentra el principal regulador epigenético I-BET151. M= Metilación, A= Acetilación. Modificado de Jung, et al. 2014.

Otro punto importante en la transdiferenciación basada en moléculas pequeñas, ha sido el uso de los inhibidores para bloquear la actividad de la proteína cinasa asociada a Rho, también conocida como inhibidores de ROCK (Tabla 1, Figura 3) (Aguilera-Castrejon et al., 2016, 2017; Hu et al., 2015; Zhang et al., 2015). Durante el desarrollo neuronal, las moléculas de la familia Rho regulan la diferenciación neuronal, la migración y el desarrollo de neuritas (Cappello, 2013; Govek et al., 2005). *In vitro*, los inhibidores de ROCK promueven la diferenciación de células troncales embrionarias en neuronas induciendo también el crecimiento de neuritas (Hu et al., 2015). No obstante, de acuerdo con el papel de las vías Rho durante la embriogénesis, la inhibición de ROCK también mejora la supervivencia neuronal durante la transdiferenciación (Zhang et al., 2015).

CÉLULAS TRONCALES/ESTROMALES MESENQUIMALES Y TERAPIA CELULAR

Propiedades generales de las MSC's

El estudio de las MSC's comenzó a finales de los años 60's extendiéndose a finales de los 70's con los trabajos de Friedenstein y colaboradores, quienes describieron por primera vez una población de células adherentes en la médula ósea, las cuales formaban parte del estroma medular que dan origen al microambiente hematopoyético (Figura 4) (Parekkadan and Milwid, 2010).



Figura 4. Breve historia de las células troncales mesenquimales.
Modificado de Parekkadan, 2010.

Al ser determinadas por primera vez en el estroma medular, las MSC's se nombraron Células Estromales Mesenquimales. Sin embargo, más tarde se encontró que tales células están presentes en casi todos los tejidos, por lo cual se propuso reemplazar el término estromal por el de troncal, considerando a éstas poblaciones como Células Troncales Multipotentes (Mayani, 2011). Generalmente las MSC's se definen como células adherentes al plástico con morfología fibroblastoide, que desarrollan unidades formadoras de colonias, y con alta capacidad de proliferación y autorrenovación (Friedenstein et al., 1974). Sin embargo, hasta el momento no se ha definido un marcador único para identificar a las MSC's, por ello la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) ha establecido que estas poblaciones celulares obtenidas *in vitro*, deben cumplir con ciertas características para que puedan ser consideradas como MSC's (Castro-Manrreza, 2015). Para fines de investigación, la ISCT determinó tres criterios para definir a las MSC's: I) Adherencia al plástico, II) expresión de antígenos específicos de superficie de membrana y III) potencial multipotente de diferenciación (Dominici et al., 2006).

La expresión de antígenos de superficie de membrana, permiten una identificación rápida de las poblaciones de MSC's, se propone que estas células deben expresar básicamente: CD105, CD73 y CD90. Además, para asegurar que las poblaciones no son confundidas con células hematopoyéticas, es importante considerar los marcadores para los cuales deben ser negativos: CD45 (marcador leucocitario), CD34 (marcador de progenitores hematopoyéticos primitivos), CD14 y CD11 (comúnmente encontrados en monocitos) (Arevalo-Romero, 2007; Deans and Moseley, 2000; Dominici et al., 2006).

La propiedad funcional que identifica de forma única a la mayoría de MSC's es su capacidad de diferenciación. Por lo tanto, utilizando las condiciones estándar de cultivo *in vitro* para diferenciación de tejidos de se debe demostrar la diferenciación de las células hacia osteoblastos, adipocitos y condroblastos (mesengénesis) (Castro-Manrreza, 2015; Dominici et al., 2006).

Cabe destacar que una característica importante de las MSC's, es la expresión basal de marcadores de neuronas y de progenitores neurales, particularmente β -III tubulina y nestina. Se ha demostrado que las MSC's aunque provienen del mesodermo continúan su desarrollo en el neuroepitelio durante la embriogénesis, particularmente en la cresta neural, sitio donde se desarrollan para entrar en circulación y dirigirse a todos los tejidos posibles incluyendo la médula ósea. Por consiguiente, se piensa que por eso las MSC's adquieren algunos de los marcadores propios de células neurales (Battula et al., 2008; Foudah et al., 2013; Minguell et al., 2005).

Fuentes de obtención de MSC's

En la etapa adulta, las MSC's existen dentro de la médula ósea como precursoras de los componentes del tejido conectivo que actúan principalmente como elementos de apoyo a la hematopoyesis. Las MSC's del nicho medular han sido las más estudiadas, descartando la idea de su limitación funcional con la hematopoyesis e incrementando las posibilidades de su aplicación terapéutica (Jones and McGonagle, 2008). Sin embargo, a pesar de que la médula ósea se ha establecido como la fuente primaria de MSC's, debido a la naturaleza invasiva de aspiración y su difícil sondeo *in vivo*, se han realizado numerosos estudios para identificar otras fuentes de MSC's para fines clínicos.

Fuentes alternas de MSC's se han confirmado a partir de los mismos criterios utilizados en médula ósea (adherencia al plástico, marcadores de superficie y diferenciación trilineal) en diferentes tejidos u órganos como dermis, líquido sinovial, folículos pilosos, hígado, cerebro, tejido adiposo, pulpa dental, ligamento periodontal, tejido gingival, regiones del cordón umbilical, líquido amniótico, placenta, entre otros (Figura 5) (Castro-Manreza et al., 2014; da Silva Meirelles et al., 2006; Ledesma-Martinez et al., 2016; Merino-Gonzalez et al., 2016; Parekkadan and Milwid, 2010; Wagner et al., 2005).

Pese a que las fuentes celulares anteriormente mencionadas son consideradas MSC's existen diferencias entre cada una de ellas, destacando la

afinidad al linaje de diferenciación. Investigaciones recientes indican que las MSC's derivadas de médula ósea, periostio, y tejidos dentales poseen un mayor potencial osteogénico respecto a muchas otras fuentes; mientras que las células de tejido adiposo y dermis, tienen un elevado potencial adipogénico, por mencionar algunas (Via et al., 2012).

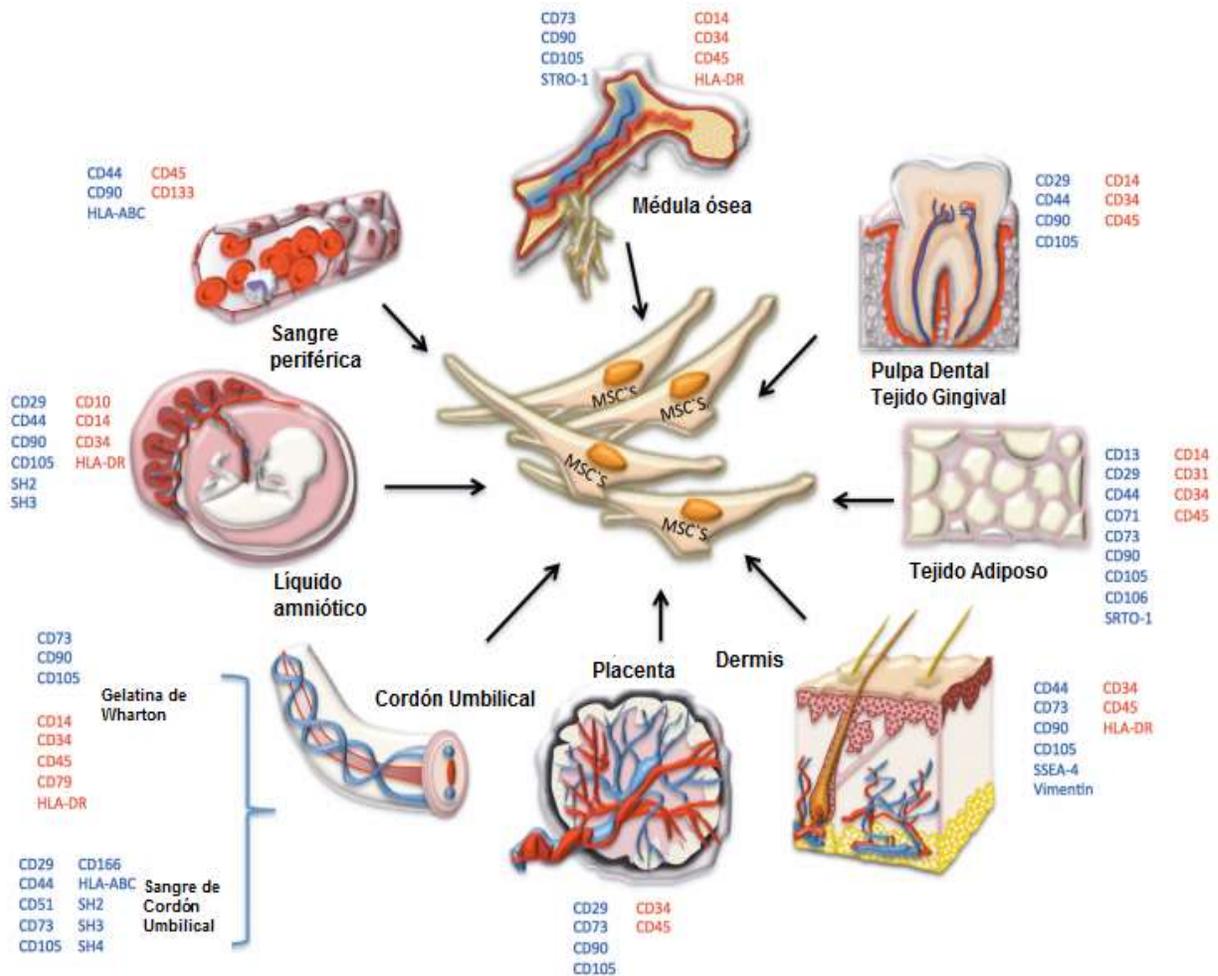


Figura 5. Tejido de origen y fenotipo de de MSC's. De fuentes neonatales se pueden identificar MSC's de cordón umbilical, placenta y líquido amniótico; de fuentes adultas se observan MSC's de médula ósea, tejidos dentales, tejido adiposo, dermis y sangre periférica. Marcadores de superficie con niveles altos en azul y con niveles bajos en rojo. Modificado de: Merino-González et al., 2016.

Aplicaciones de las MSC's en terapia celular

Las MSC's poseen varias ventajas para su aplicación en terapia celular debido a su fácil acceso, pocas limitaciones éticas, alta capacidad proliferativa y fácil expansión, amplio potencial de diferenciación y efectos inmunomodulatorios. Sumado a esto, diversos estudios reportan que su trasplante no induce tumorigenesis ni otros efectos adversos en los pacientes, y se ha demostrado la sobrevivencia incluso hasta 137 meses después de su trasplante (Castro-Manrreza and Montesinos, 2015; Flores-Figueroa et al., 2006).

Existen algunos mecanismos que confieren mayores beneficios en el trasplante de las MSC's. Uno de ellos es el efecto trófico, mediado por su migración preferencial a sitios de lesión produciendo diferentes factores reguladores. Se ha observado que las MSC's contribuyen directamente a la reparación de tejidos secretando un gran número de moléculas que incluyen glucoproteínas solubles de matriz extracelular, factores de crecimiento, citocinas o quimiocinas. Los efectos tróficos de las MSC's 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's se encuentran factores neuroprotectores como BDNF, GDNF, SHH, NGF, FGF2, además de factores pro-angiogénicos indispensables para la regeneración tisular (Flores-Figueroa et al., 2006; Kuroda et al., 2011).

Por lo anterior, se ha propuesto que las MSC's actúan como fábricas de moléculas bioactivas que promueven y soportan la regeneración natural en sitios de daño tisular (Caplan and Correa, 2011). Además, se han descrito en años recientes los efectos inmunomodulatorios e inmunosupresorios de las MSC's. Estas células son capaces de suprimir la activación y proliferación de linfocitos, así como de células NK e interferir con la maduración y función de células dendríticas. Sumado a esto, presentan una baja expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y nula expresión de moléculas del CMH II (Castro-Manrreza and Montesinos, 2015; Montesinos et al., 2009; Si et al., 2011).

Actualmente se utilizan las MSC's en numerosas pruebas clínicas. En los últimos siete años, se ha reportado cerca de 40 padecimientos que involucran la restauración del organismo en 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, leucodistrofia metacromática, anemia, asma, fallo renal agudo, lupus, autismo, quemaduras y regeneración de piel (Caplan and Correa, 2011; Si et al., 2011)

Finalmente, se podría considerar otro potencial mecanismo a la capacidad de las MSC de diferenciarse a células del ectodermo y del endodermo (Figura 6). Reportes sugieren que entre las células en las cuales pueden diferenciarse se encuentran las endoteliales, del músculo cardíaco y esquelético, hepatocitos, células neuronales, de la glía, pancreáticas y epiteliales, por mencionar algunas (Mayani, 2011; Parekkadan and Milwid, 2010; Si et al., 2011).

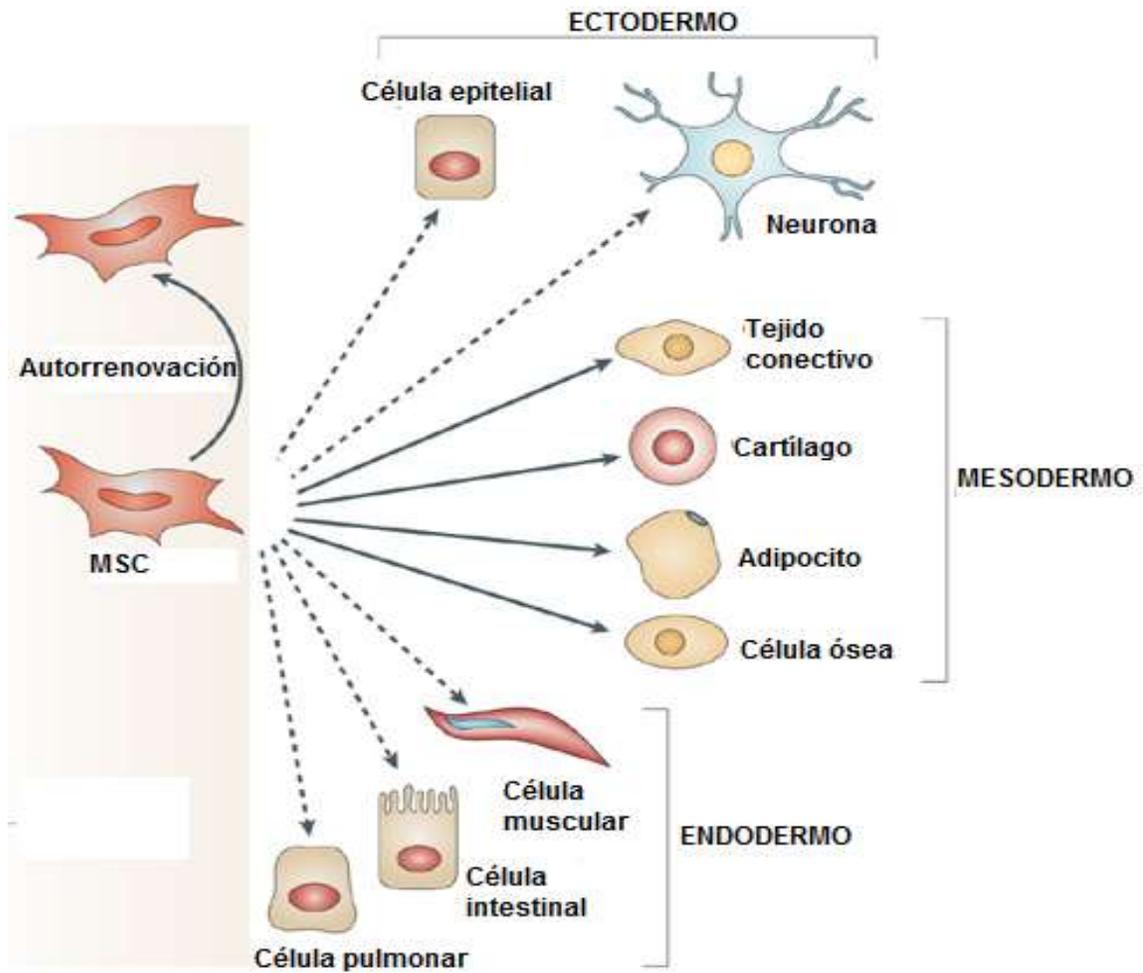


Figura 6. Plasticidad y transdiferenciación de diferenciación de las MSC's en células maduras de las tres capas germinales. Modificado de Uccelli, 2008.

Potencial uso de MSC's en desordenes neurodegenerativos

En los últimos años, las MSC's han sido propuestas como una estrategia terapéutica contra desordenes neurodegenerativos como los accidentes cerebrovasculares el Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y esclerosis múltiple. La propuesta del uso de las MSC's en estas patologías, surge de dos propiedades que se han observado en estas células: i) su potencial capacidad para transdiferenciarse en células neuronales, y ii) sus efectos neuroprotectores e inmunomodulatorios. Además, reportes indican que tanto *in vitro* como *in vivo* que las MSC's producen factores neurotróficos y de crecimiento que inducen la regeneración del tejido neuronal dañado; en general, favorecen las condiciones del tejido ectodérmico por la regulación de la inflamación, reduciendo incluso las señales de apoptosis. Así mismo, se ha demostrado que las MSC's mejoran la sintomatología en modelos de trastornos psiquiátricos como la depresión (Colpo et al., 2015; Herrera-Arozamena et al., 2016; Tfilin et al., 2010).

REPROGRAMACIÓN Y TRANSDIFERENCIACIÓN NEURONAL DE MSC's

En diferentes investigaciones se han sugerido protocolos para la inducción neural de MSC's. En los primeros estudios se incluyeron agentes químicos, así mismo, MSC's fueron expuestas a factores neurotróficos que favorecen la diferenciación neuronal, o bien usando co-cultivos con NPC's o células de la glía.

En 2004 Herman y cols., sugieren la conversión de MSC's en células con características de progenitores neurales utilizando condiciones similares a las empleadas para la propagación de NPC's. En este caso las células fueron cultivadas como estructuras similares a neuroesferas, expresando marcadores del neuroectodermo temprano como nestina. En tal trabajo las células fueron diferenciadas posteriormente a células neuronales con el uso de ácido retinoico, BDNF y FBS, con lo que se observó la presencia de algunos marcadores de neuronas maduras como MAP2 (Hermann et al., 2004). Entre otros estudios se encuentra la generación de neuroesferas a partir de BM-MSCs, Fu y colaboradores demostraron que estos agregados en co-cultivo con astrocitos primarios son capaces de desarrollar células GFAP⁺ (astrocitos), GalC⁺ (oligodendrocitos) y β -III tubulina⁺ (neuronas); éstas últimas con prolongaciones axonales y dendríticas (Fu et al., 2008).

También se sugiere que es posible generar directamente células del SNC a partir de hBM-MSCs mediante condiciones específicas de cultivo y la adición de citocinas o inductores químicos. En el 2000 se reportó que MSC's humanas y murinas pueden adoptar un fenotipo neural después de algunas horas cultivadas en medio libre de suero con BHA, DMSO o β -ME, detectando por inmunocitoquímica marcadores como nestina, TrkA y enolasa específica de neuronas (Deng et al.) (Woodbury et al., 2000). En el mismo año Sánchez Ramos reportó la obtención de células aparentemente neuronales generadas de BM-MSCs cultivadas en presencia de EGF o BDNF, o bien, mediante co-cultivo con células mesencefálicas de ratón (Sanchez-Ramos et al., 2000). Después de estos resultados, muchas

investigaciones han reportado la diferenciación neuronal de MSC's sugiriendo el uso de agentes que incrementan el AMPc intracelular (Deng et al., 2001). Sin embargo, se ha puesto en duda si el uso de agentes químicos pueden llevar realmente a una diferenciación neuronal de células somáticas, dado que estudios posteriores comprobaron que la morfología neuronal adquirida se debe a la disrupción del citoplasma que deja largas proyecciones asemejando neuritas; así mismo esto se acompaña del incremento de proteínas neuronales por estrés o a causa del incremento del antígeno por unidad de área en el momento de la retracción (Lu et al., 2004; Neuhuber et al., 2004).

Transdiferenciación neuronal de MSC's por moléculas pequeñas

Alexanian y colegas reportaron la transdiferenciación neuronal de MSC's con las moléculas pequeñas tricostatina, BrcAMP, dorsomorfina, rolipram y SB431542, consiguiendo una inducción parcial. De manera adicional demostró la capacidad de las células obtenidas para generar mejoras en aspectos histológicos y de comportamiento en modelos animales de lesiones de médula espinal (Alexanian, 2015; Alexanian et al., 2013). Sin embargo, en estos estudios no se exploraron otras moléculas pequeñas y las propiedades neuronales no indican una verdadera transdiferenciación.

En un estudio previo al presente trabajo, utilizamos la estrategia empleada en astrocitos y fibroblastos (Hu et al., 2015; Li et al., 2015; Zhang et al., 2015), y después de una pre-selección de 22 moléculas propusimos un coctel para la inducción neuronal de BM-MSCs. Utilizando medio neuronal específico y adicionando seis moléculas: I-BET151, CHIR99021, Forskolina, RepSox, Y27632 y cAMP (Tabla 1), seleccionadas por ensayos de eliminación de acuerdo a su eficiencia de conversión. Se observaron resultados muy favorables para transdiferenciación neuronal con una eficiencia de conversión >60% considerando a las células con morfología tipo neuronal y positivas para el marcador de neuronas inmaduras β -III tubulina. Las células obtenidas mostraron reactividad para β -III tubulina y MAP2, así como incremento en la expresión de genes neuronales;

además, se demostró que el cambio morfológico al igual que la expresión de marcadores no fue por contracción celular sino por extensión, observando prolongaciones alargadas con ramificaciones en los extremos. Con lo anterior, reportamos la generación de neuronas inmaduras inducidas de BM-MSC (iiNBM-
MSC) (Aguilera-Castrejon et al., 2017).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Los daños traumáticos al Sistema Nervioso Central (SNC) así como las diversas enfermedades neurodegenerativas son provocados por la degeneración y/o muerte neuronal. A diferencia de otros tejidos adultos, en el SNC la renovación de las células afectadas es muy lenta o nula; sumado a esto, los tratamientos actuales tienen poco impacto en la salud a largo plazo de los pacientes y no detienen la progresión del daño. Por lo anterior, la búsqueda de mejores opciones terapéuticas se mantiene constante. Una de las más prometedoras estrategias consiste en restaurar las células dañadas mediante el trasplante de poblaciones neuronales generadas *in vitro*; sin embargo, varias de las fuentes celulares propuestas presentan problemas técnicos, éticos y/o un potencial riesgo en el paciente.

Recientemente, se ha reportado la generación de neuronas maduras y funcionales a partir de fibroblastos empleando solo compuestos químicos conocidos como moléculas pequeñas. Aunque los resultados son prometedores para su aplicación en desordenes neurodegenerativos aún se busca el o los protocolos óptimos y/o las células de origen más adecuados. Las células troncales/estromales mesenquimales (MSC's) son células multipotentes obtenidas de tejidos adultos y fuentes neonatales clínicamente accesibles y su uso no representa problemas éticos, lo que les ha conferido un especial interés clínico y de investigación. Con la finalidad de encontrar la fuente de MSC's más apropiada para generar células con propiedades neuronales, el presente estudio comparó la transdiferenciación neuronal por moléculas pequeñas de MSC's obtenidas de tejidos adultos así como de tejidos neonatales.

IV. HIPÓTESIS

Combinaciones de moléculas pequeñas poseen la capacidad de inducir transdiferenciación neuronal de células somáticas sin requerir la transfección de factores exógenos. Sin embargo, es necesario identificar la o las fuentes celulares más adecuadas para inducir la conversión neuronal y/o a aquellas fuentes con mayor potencial para protocolos clínicos en desordenes del sistema nervioso. Las MSC's son un grupo de células multipotentes presentes en numerosos tejidos, su aislamiento no representa problemas éticos y son consideradas de fácil acceso. Para ser determinadas como MSC's, las células de las diferentes fuentes comparten características entre sí, como la adherencia al plástico, presencia de marcadores de superficie y su diferenciación trilineal. Sin embargo, también se han reportado diferencias como su capacidad de proliferación y diferenciación; e incluso su potencial de troncalidad, el cual se ha visto incrementado en las fuentes neonatales. Por lo tanto, es posible que al inducir transdiferenciación neuronal con moléculas pequeñas las MSC's presenten mayor o menor potencial dependiendo de su origen, y de este modo será posible seleccionar la o las fuentes con la mayor capacidad para generar de células neuronales.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Inducir y comparar la transdiferenciación neuronal de Células Troncales/Estromales Mesenquimales (MSC's) de fuentes adultas y neonatales por un coctel específico de moléculas pequeñas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Cultivar, expandir y criopreservar las diferentes fuentes adultas y neonatales de MSC's.
- Evaluar las propiedades neuronales basales en las diferentes fuentes de MSC's.
- Determinar si un coctel específico de moléculas pequeñas induce propiedades neuronales en MSC's obtenidas de fuentes adultas y neonatales.
- Para cada tipo de MSC's optimizar el protocolo de inducción para incrementar las propiedades neuronales.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las Células Troncales/Estromales Mesenquimales (MSC's)

Las MSC's de fuentes neonatales: sangre de cordón umbilical (UCB-MSC's), placenta (PLAC-MSC's) y gelatina de Wharton (Wh.J-MSC's); y de fuentes adultas: dermis (SK-MSC's), ligamento periodontal (PDL-MSC's), tejido gingival (GT-MSC's) y pulpa dental (DP-MSC's) fueron obtenidas por el laboratorio del Dr. Juan José Montesinos en el Hospital Centro Médico Nacional Siglo XXI. Las muestras celulares aisladas por su adherencia fueron proporcionadas una vez que se determinó por el grupo del Dr. Montesinos la presencia/ausencia de los marcadores CD105, CD90, CD73, CD13, HLA-I, HLA-II, CD45, CD34, CD31 y CD14; así como su capacidad de diferenciación trilineaje (adipocitos, osteoblastos y condrocitos) (Castro-Manreza and Montesinos, 2015; Castro-Manreza, 2014; Montesinos et al., 2009). De cada fuente fueron proporcionadas tres muestras biológicas.

Expansión, criopreservación y mantenimiento de las MSC's

Se obtuvieron tres muestras de MSC's de cada una de las fuentes. Las células fueron cultivadas en medio completo (DMEM bajo en glucosa, SFB, glutamina, gentamicina y penicilina/estreptomicina), que fue cambiado por medio fresco cada 72 horas. Las resiembras se realizaron cuando el cultivo alcanzó el 80-90% de confluencia. Para ello las células se lavaron con PBS y se disgregaron mediante la adición de tripsina 0.05%-EDTA 0.53 mM (Gibco® BRL, Rockville, MD, USA) e incubando por 5 minutos a 37° C, la tripsina fue inactivada con medio completo; posteriormente fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos y re-suspendidas en medio completo. En cada resiembra, y previo a congelar o iniciar algún ensayo, se cuantificó el número celular empleando una cámara de Neubauer; así como la viabilidad por exclusión al colorante azul tripano. En cada crio-vial se adicionaron entre 200×10^3 a 1000×10^3 de células, previamente re-suspendidas en medio completo con DMSO (10%), y se colocaron en una cámara de isopropanol

que se almacenó en un ultracongelador a -70°C por 24 horas. Finalmente, los crioviales fueron almacenados en un tanque de nitrógeno líquido hasta su uso.

Protocolo de inducción neuronal

Para cada una de las muestras se siguió el mismo protocolo de inducción neuronal (Figura 7). Se colocó en placas de 48 pozos una capa de sustrato (fibronectina $20\mu\text{g}/\text{mL}$ /gelatina 0.1%) y se incubó durante 24 horas. Pasado este tiempo se plaquearon las células en medio completo a una densidad de 20×10^3 células/ cm^2 y se mantuvieron en incubación 24 horas más. El medio de cultivo fue reemplazado por medio de inducción neuronal con el plus del coctel de moléculas pequeñas (día cero de inducción), lavando previamente con medio basal DMEM/F12 (Gibco® BRL, Rockville, MD, USA). Para observar el efecto únicamente del medio neuronal sobre las MSC's, se utilizó una densidad celular de 2×10^3 células/ cm^2 sin adicionar moléculas pequeñas. El medio fue sustituido cada cuatro días.

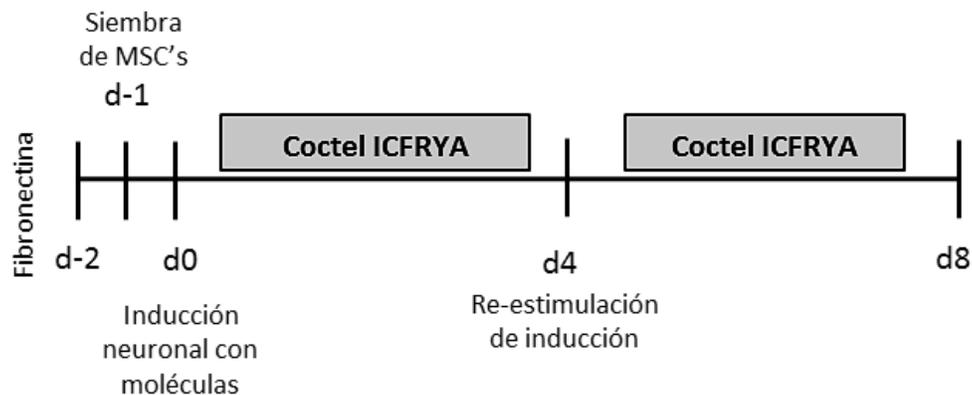


Figura 7. Esquema general del protocolo de inducción neuronal

- Medio de inducción neuronal suplementado: N2 suplemento [1X] (Gibco®), B27 suplemento [1X] (Gibco®), NB: Neurobasal [1:2] (Gibco® BRL, New York, USA), DMEM/F12 [1:2] (Gibco® BRL, New York, USA), Glutamax [1X], Aminoácidos no esenciales [1X], hFGF [20ng/mL] (Gibco®).
- Moléculas pequeñas: Las moléculas utilizadas para el coctel fueron adquiridas en Sigma-aldrich® y utilizadas en diferentes concentraciones. En los casos señaladas se realizaron modificaciones en la concentración de algunas moléculas.

Molécula	Abreviatura	[]	[modificación]
I-BET151	I	1μM	2μM
CHIR99021	C	20μM	-
FORSKOLIN	F	50μM	75μM
RepSox	R	1μM	-
Y-27632	Y	5μM	-
dbcAMP	A	100μM	-

Evaluación de células necróticas

Al término de la incubación se adicionó yoduro de propidio (PI) [2μg/mL] directamente en el medio, para marcar a las células necróticas. Se obtuvieron las imágenes a partir de un microscopio de epifluorescencia directa Olympus IX71 con un objetivo 10X, usando el software QCapture Pro 6.0 y el análisis se realizó utilizando el software ImageJ. Se contabilizaron las células PI⁺ y se determinó el porcentaje de necrosis calculado como la proporción de células necróticas entre el número de células totales.

Evaluación de morfología neuronal

Para determinar la morfología neuronal se utilizaron las imágenes capturadas para evaluar necrosis; pero para obtener sus porcentajes solo se consideraron las células negativas para PI. Para esto, se tomó en cuenta a las células bipolares con prolongaciones tipo axonales y ramificaciones similares a dendritas.

Inmunocitoquímica

Después del periodo de incubación establecido para cada experimento, las células fueron fijadas en la misma placa de cultivo con MeOH durante 10 minutos y lavadas continuamente por tres cambios de PBS, posteriormente se realizaron lavados (3 veces, 5 min c/u) con PBS/0.1% BSA, las células fueron bloqueadas con una solución de PBS/BSA 0.1% + 10% suero normal de cabra (SNC) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación, e incubadas toda la noche a 4 °C con los siguientes anticuerpos primarios: conejo anti MAP-2 policlonal [1:500], ratón anti- β III tubulina monoclonal [1:1000], (ambos de SantaCruz Biotechnology). Posteriormente se lavaron (3 veces, 5 min c/u) con PBS/BSA 0.1% + Tween 0.1% y se incubaron durante 1 hr. con el anticuerpo secundario correspondiente: cabra anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 488 [1:1000] o cabra anti-IgG de conejo conjugado a Alexa 568 [1:300] (Molecular Probes, Life Technologies). Los núcleos se tiñeron utilizando 2 μ g/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 un determinado marcador se determinó en relación al número total de núcleos teñidos con Hoechst. Se consideró como neuronas inmaduras inducidas a aquellas que además de ser β -III tubulina positivas tuvieran morfología neuronal.

VII. RESULTADOS

Aislamiento y caracterización de MSC's de las fuentes adultas y neonatales.

Las MSC's fueron obtenidas de diferentes tejidos de donantes sanos (Tabla suplementaria 1). Las fuentes neonatales, fueron aisladas de sangre de cordón umbilical (UCB-MSC's), placenta (PLAC-MSC's) y gelatina de Wharton de cordón umbilical (Wh.J.-MSC's); así como las fuentes adultas de dermis (SK-MSC's), ligamento periodontal (PDL-MSC's), tejido gingival (GT-MSC's) y pulpa dental (DP-MSC's) (Tabla suplementaria 1); de cada una de las fuentes fueron proporcionadas tres muestras biológicas por el laboratorio del Dr. Juan José Montesinos, una vez que se determinó la presencia de altos porcentajes de los marcadores de membrana CD105, CD90, CD73, CD13 y HLA-I y bajos porcentajes de HLA-II, CD45, CD34, CD31 y CD14 (Tabla suplementara 2); y la capacidad de diferenciación trilineaje en adipocitos, osteoblastos y condrocitos (Tabla suplementaria 3, Figura suplementaria 1). Estas evaluaciones demostraron que las MSC's obtenidas de cada una de las fuentes cumplieron con los requerimientos básicos para ser consideradas MSC's (Dominici et al., 2006).

Propiedades basales de las MSC's

Las MSC's de todas las fuentes fueron cultivadas en medio completo donde se expandieron para su uso y criopreservación. En todos los casos se observó una viabilidad superior al 97% independientemente del pase y tiempo de doblaje de la fuente celular (Tabla 2); cabe destacar que las condiciones basales de las MSC's no cambiaron después de la criopreservación o respecto al número de resiembras. En los cultivos estándar de las MSCs no se observaron células necróticas (PI+) y se mantuvo la característica morfología fibroblastoide detectando solo ligeras variaciones entre las fuentes (Figura 8). Se clasificó a las células provenientes de SK-MSC's y PLAC-MSC's como tipo lamelopodia; mientras que para las fuentes de

MSC's de tejidos dentales se observó en su mayoría células tipo lamelopodia-filopodia (Hernández-Estévez, 2012). Finalmente, UCB-MSC's fue similar a Wh.J.-MSC's en una morfología triangular; sin embargo, en las muestras de Wh.J.-MSCs se detectó una morfología heterogénea en tamaño y forma.

Tabla 2. Condiciones de las MSC's en cultivo estándar.

FUENTE CELULAR	TIEMPO DE DOBLAJE (horas)	PASE UTILIZADO	VIABILIDAD
UCB-MSC's	85.71±2.18	3-5	>97%
PLAC-MSC's	35.82±5.2	3-5	>97%
WH.J. -MSC's	45.28±3.1	3-5	>97%
SK-MSC's	34.78±2.18	3-5	>97%
PDL-MSC's	38.70±2.18	3-5	>97%
GT-MSC's	33.3±2.18	3-5	>97%
DP-MSC's	34.78±3.7	3-5	>97%

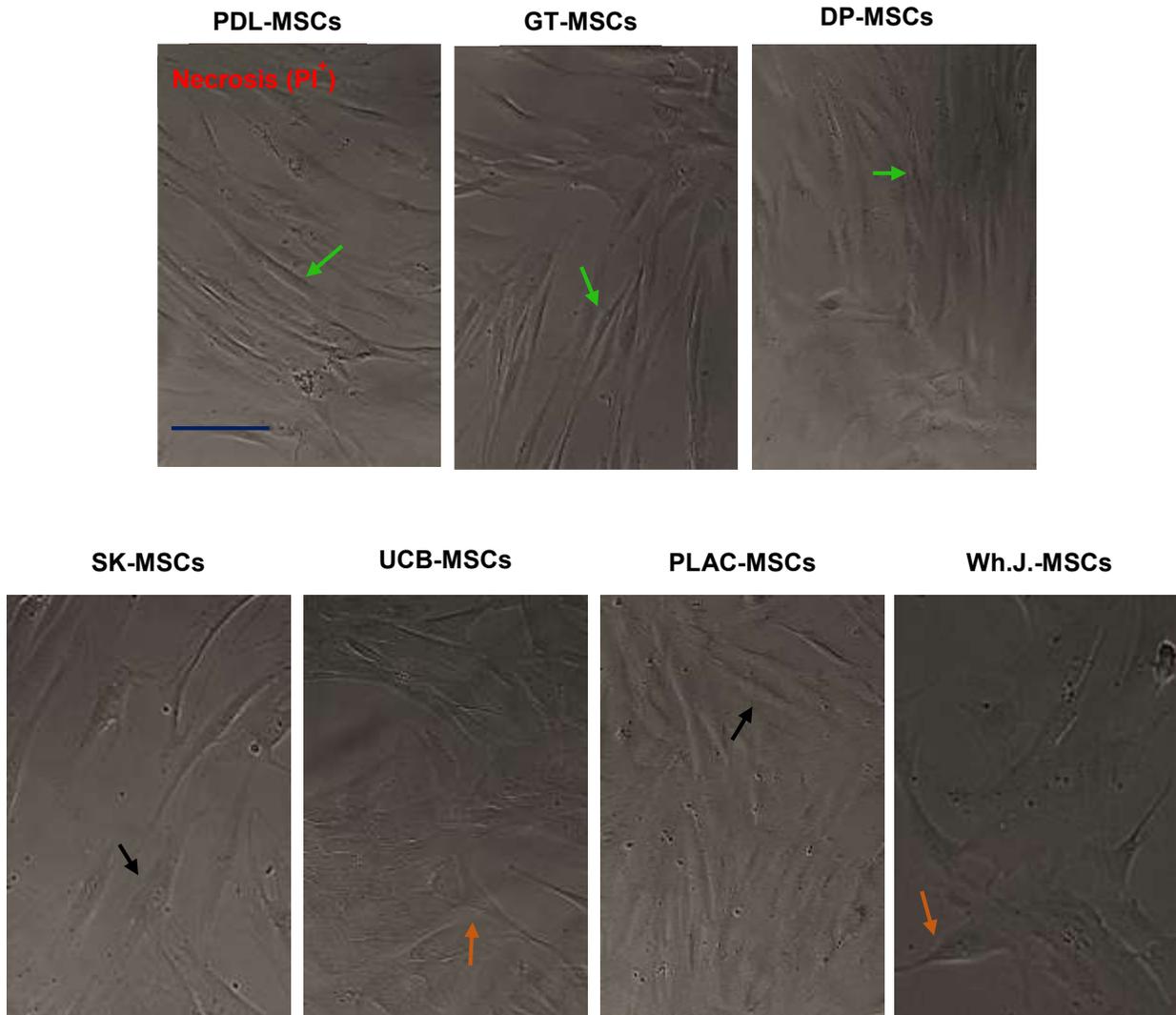


Figura 8. Tipos de morfología fibroblastoide de MSC's de fuentes adultas y neonatales cultivadas en medio basal: Se indica con flechas negras la morfología Lamelopodia-lamelopodia, con flechas verdes morfología lamelopodia-filopódia y con flechas naranjas la morfología triangular. No se observaron células necróticas en los cultivos. Barra de escala 100µM.

Células bipolares con prolongaciones amplias y/o ramificadas consideradas como morfología neuronal no se observaron en los cultivos con FBS en ninguna de las fuentes (Figura 8 y 9); y aunque todas las muestras presentan una ligera reactividad para el marcador de neuronas inmaduras β III-tubulina no se detectaron células positivas para el marcador de neuronas maduras MAP2 (Figura 9).

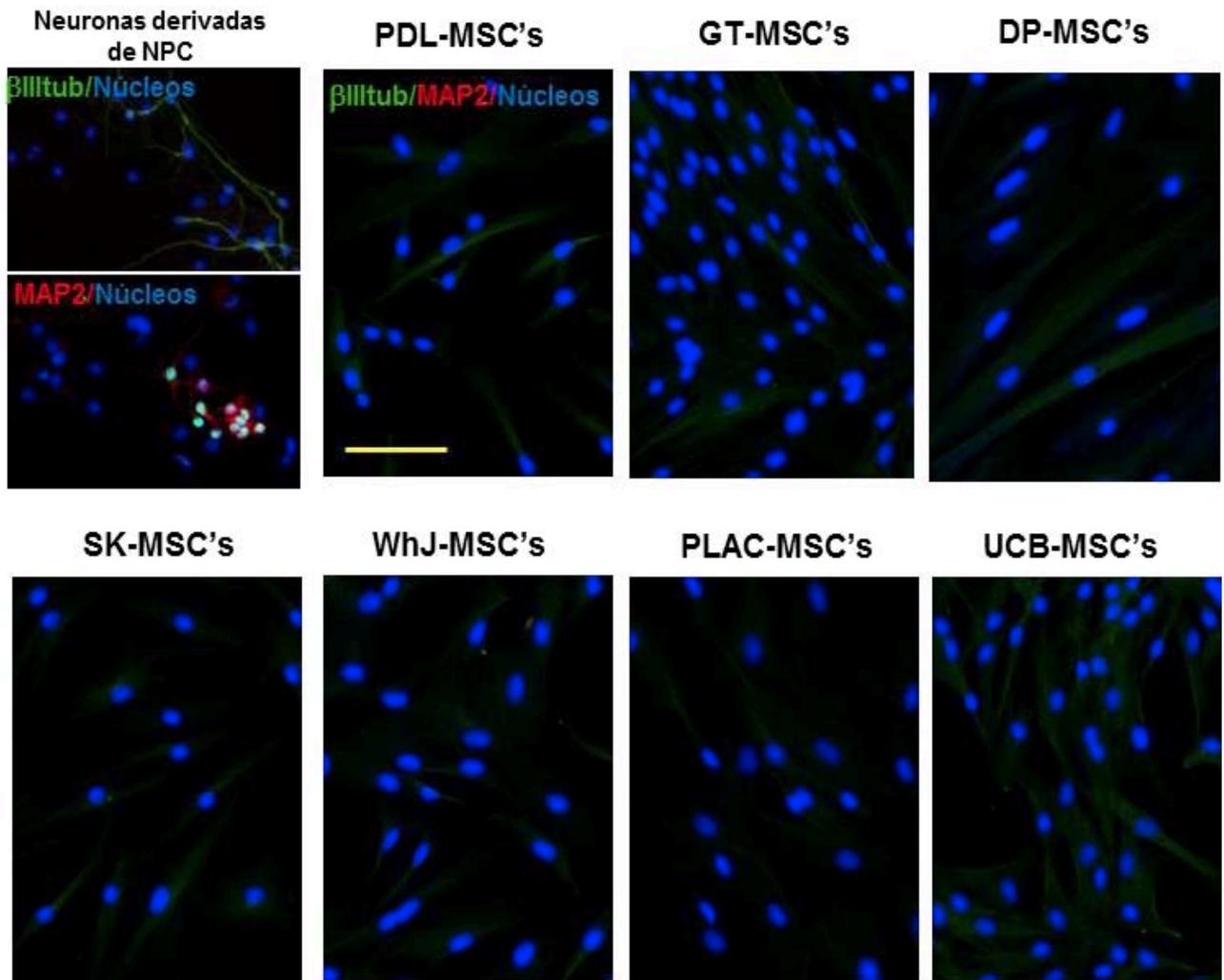


Figura 9. *Propiedades neuronales basales de MSC's de fuentes adultas y neonatales en condiciones de cultivo estándar, nótese que pese a la reactividad basal del marcador β III-Tub, no se presenta MAP2. En la primera imagen, se observan células neuronales diferenciadas provenientes de progenitores neurales como control positivo para los marcadores de neuronas. Barra de escala 100 μ M*

En el protocolo de inducción neuronal la fibronectina, los suplementos N2/B27 y el hFGF no provocaron efecto en las MSC's que pudiera sugerir inducción neuronal (figura 10). Las células conservaron la morfología fibroblastoide, no se incrementó la reactividad para β -III tubulina y no se observaron células positivas para MAP2.

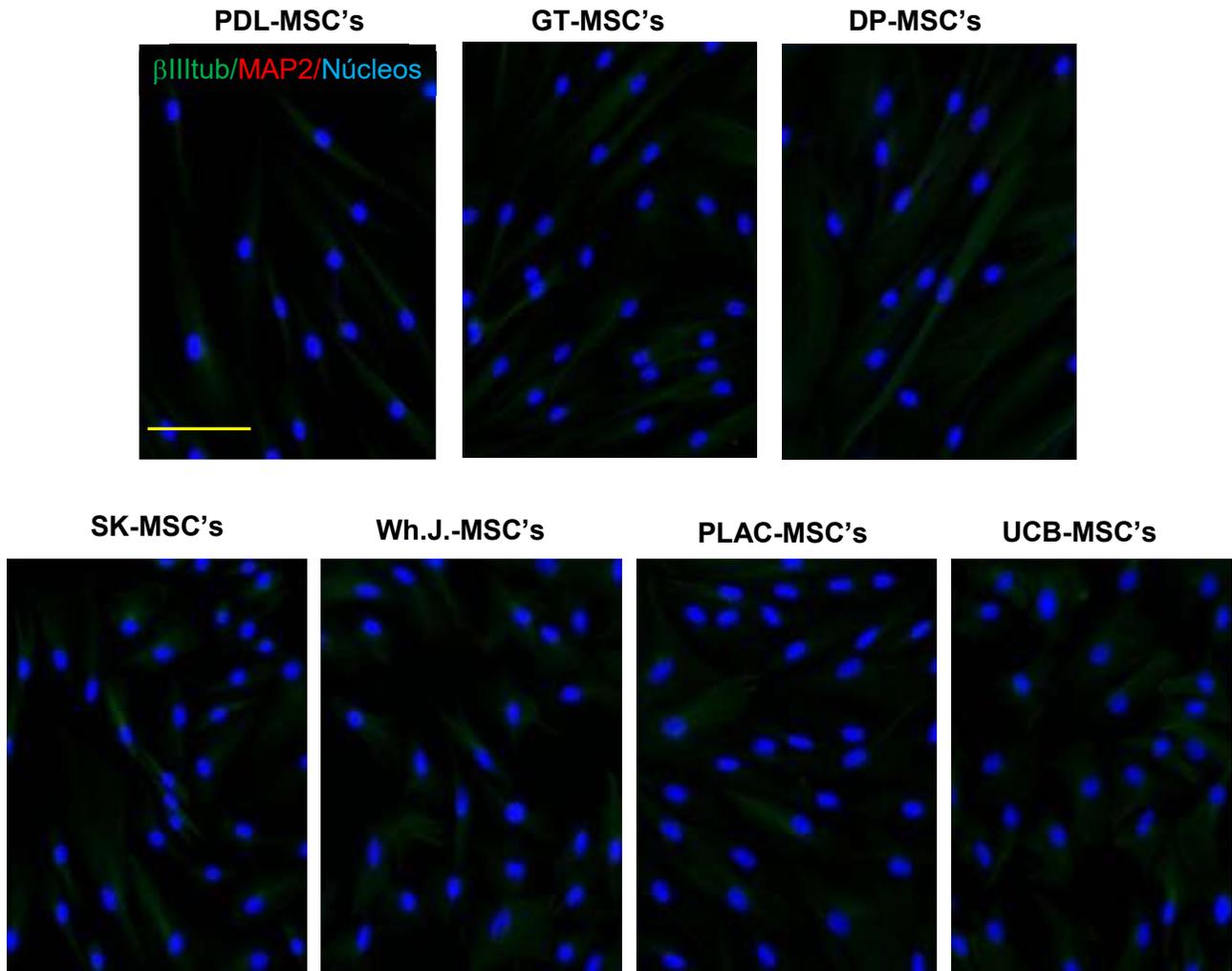


Figura 10. Propiedades neuronales de MSC's de fuentes adultas y neonatales en condiciones de medio neuronal sin la adición de moléculas pequeñas, se observa reactividad basal para β III-Tub aunque no así para MAP2. Barra de escala 100 μ M

Inducción neuronal mediante coctel ICFRYA en fuentes adultas y neonatales de MSCs

Nuestros resultados previos indican que la combinación de moléculas pequeñas ICFRYA (I-BET151 1 μ M, CHIR99021 20 μ M, forskolin 50 μ M, RepSox 1 μ M, Y-27632 5 μ M, y dbcAMP 100 μ M) induce en BM-MSCs una morfología tipo neuronal (60%) con reactividad para los marcadores neuronales β -III tubulina (65%) y MAP2 (12%); aunque también se observa un 33% de muerte por necrosis (Aguilera-Castrejon et al, 2017) (tabla 3). La capacidad de inducción neuronal de este coctel específico fue evaluada en MSCs de las otras fuentes adultas y de las fuentes neonatales.

En Wh.J.-MSCs la estimulación con el coctel indujo 30% de necrosis pero no provocó cambios morfológicos o en la reactividad de los marcadores neuronales (Tabla 3 y figura 11). En las MSCs de tejidos dentales aunque también hubo necrosis (31-39%) se cuantificó un 10.7, 15.9 y 31.3% de células con morfología neuronal y positivas para β -III tubulina en PDL-, DP- y GT-MSCs respectivamente. Sin embargo, el porcentaje de células MAP2⁺ fue muy bajo, básicamente solo se detectaron en GT-MSCs (1.8%) y su reactividad no se extiende hacia las prolongaciones (Tabla 3, figura 11).

Este coctel generó los porcentajes más altos de células con morfología neuronal y positivas para β -III tubulina en SK- (46.9 %), en UCB- (63.3%) y en PLAC-MSCs (85.7%) (Tabla 3, figura 12). Mientras que en SK- y PLAC-MSCs la población MAP2⁺ fue menor al 2%, en UCB-MSCs el porcentaje alcanzó un 16.7% e incluso se detectó reactividad en las extensiones celulares; sin embargo, en esta fuente la necrosis fue mayor al 80% (Tabla 3).

Tabla 3. Propiedades neuronales de las MSC's de fuentes adultas y neonatales después del periodo de inducción con el coctel ICFRYA. Tomando como referencia las BM-MSC's, se presentan los resultados de menor a mayor efecto considerando para esto a las células β III-Tub+ con presencia de morfología neuronal.

FUENTE CELULAR	Necrosis (%)	Morfología neuronal (%)	Células β III-tub ⁺ (%)	Células β III-tub ⁺ /MAP2 ⁺ (%)
BM-MSCs (Aguilera-Castrejon, et. al. 2017)	33±7.5	60±5.5	65±7.0	12±3.0
Wh.J.-MSC's	30.9±8.9	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
PDL-MSC's	31.7±16.9	29.6±26.3	10.7±7.7	0.0±0.0
DP-MSC's	39.7±19.6	16.0±9.4	15.9±11.8	0.3±0.3
GT-MSC's	32.5±2.8	9.5±2.4	31.3±5.2	1.8±0.6
SK-MSC's	28.8±4.8	19.3±4.5	46.9±6.8	0.7±0.5
UCB-MSC's	82.9±5.2	66.8±5.4	63.3±5.1	16.7±8.4
PLAC-MSC's	59.0±2.4	58.8±5.7	85.7±5.3	1.8±0.6



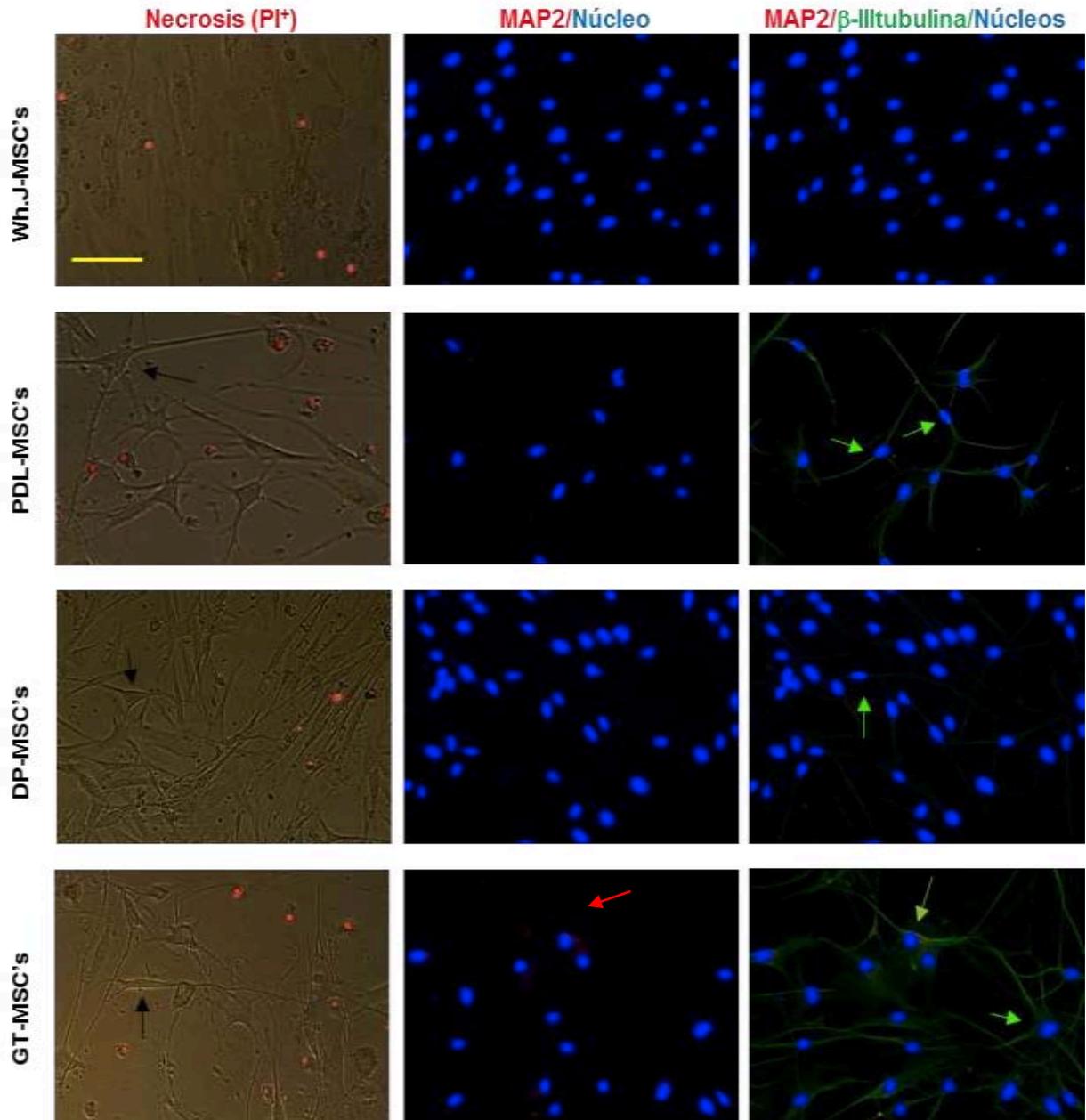


Figura 11. Propiedades neuronales de las MSC's de fuentes con bajo efecto después de la inducción con moléculas pequeñas ICFRYA y representación de muerte por necrosis con células PI⁺ (campo claro). Se indica para cada caso células representativas para: morfología neuronal (flechas negras), MAP2⁺ (flechas rojas) β -III⁺ (flechas verdes). Las células provenientes de gelatina de Wharton no mostraron inducción neuronal. Barra de escala 100 μ M.

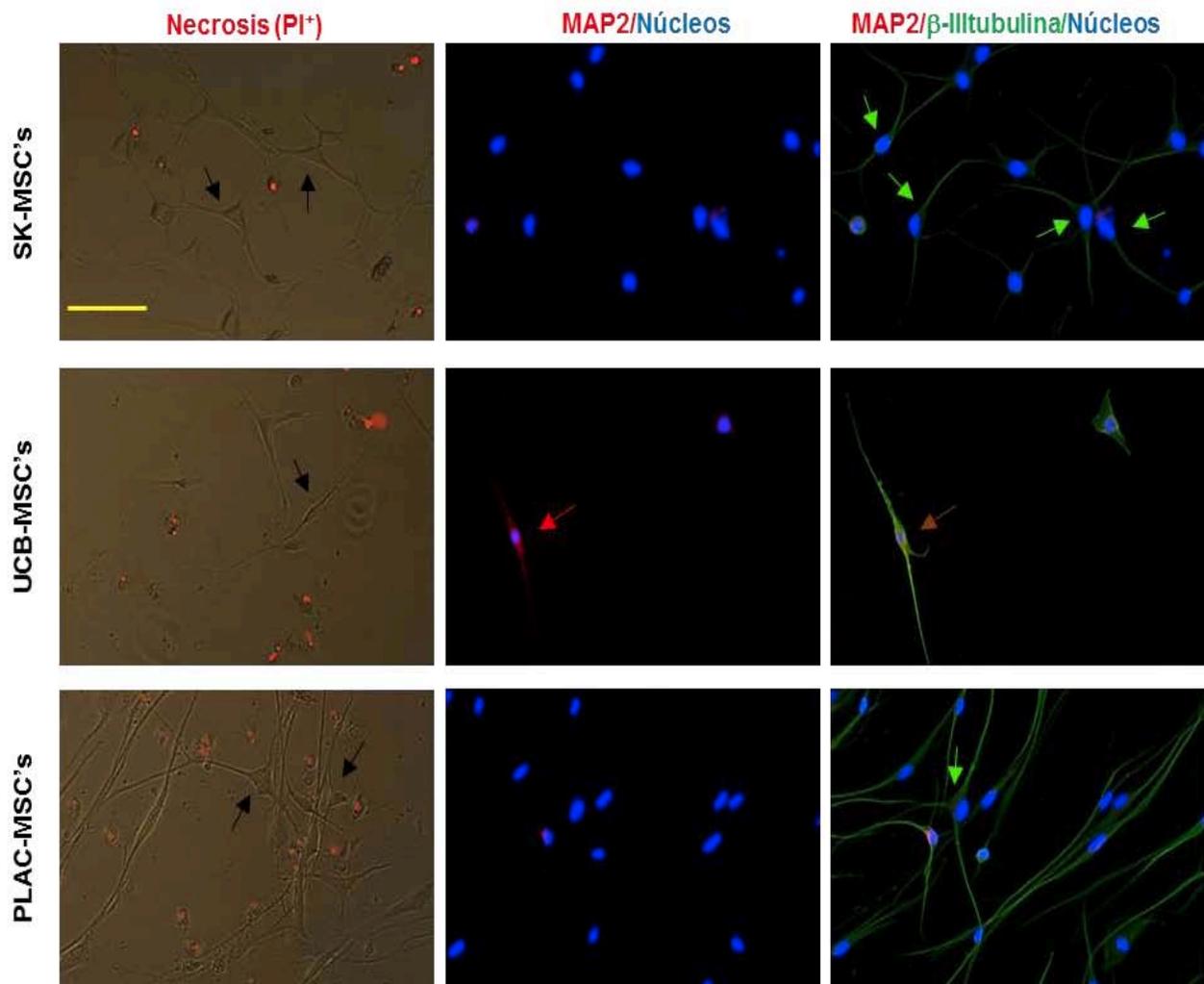


Figura 12. Propiedades neuronales de las MSC's de fuentes con efecto elevado después de la inducción con moléculas pequeñas ICFRYA y representación de muerte por necrosis con células PI⁺ (campo claro). Se indica para cada caso células representativas para: morfología neuronal (flechas negras), MAP2⁺ (flechas rojas), β -III⁺ (flechas verdes) y la colocalización MAP2/ β -III (flechas naranja). En UCB, las células pocas células que se encontraron viables por campo se mostraban deterioradas. Barra de escala 100 μ M.

Modificación al protocolo ICFRYA

En BM-MSCs, I-BET151 fue la molécula más relevante para inducir propiedades neuronales (Aguilera-Castrejon et al, 2017). En las otras fuentes en ausencia de I-BET151 la morfología neuronal, la reactividad para los marcadores e incluso la necrosis fueron fuertemente reducidas o eliminadas (Tabla 4 – 6). Así mismo, Forskolina es ampliamente usada en estudios de diferenciación o trans-diferenciación neuronal (Masserdotti et al., 2016). Considerando lo anterior, y que estas moléculas han sido empleadas a concentraciones más elevadas, se buscó mejorar los parámetros neuronales incrementando de 1 a 2 μ M y de 50 a 75 μ M la concentración de I-BET151 y Forskolina, respectivamente.

Al modificar la concentración de una o ambas moléculas en las muestras de Wh.J-MSC's (Tabla 4) se incrementó la necrosis hasta un 60% pero no se observaron cambios que indicaran inducción neuronal (Figura 13, tabla 4). Mientras que en PDL-, DP- y GT-MSC's las modificaciones al protocolo aumentan los parámetros neuronales; sin embargo, las células β -III tubulina⁺ nunca fueron mayores al 33% (Tabla 5). La mejor inducción para PDL- y DP-MSCs fue I-BET 2 μ M/Forskolina 75 μ M, y Forskolina 75 μ M para GT-MSCs (Figura 14A-C). Resaltando que en las GT-MSCs presentaron 4.5% de células MAP2⁺ y en algunos casos su reactividad se asoció a las prolongaciones. La muerte por necrosis también aumentó, pero en GT-MSCs se evaluó la mayor citotoxicidad (88% de necrosis) cuando se incrementaron ambas moléculas en el coctel (Tabla 5, figura 14C).

Tabla 4. Modificaciones aplicadas al protocolo de inducción neuronal ICFRYA en las tres muestras de Wh. J.-MSC's. Se resalta en amarillo el protocolo de inducción convencional y en rojo el aumento de la concentración en I-BET y Forskolina. En ninguna de las condiciones se observó cambio hacia el linaje neuronal.

CONDICIONES EVALUADAS	Necrosis (%)	Morfología neuronal (%)	Células β -III tub+ (%)	Células MAP2+ (%)	Núm. Células/pozo ICC
Wh.J.-MSC's					
ICFRYA	30.9±8.9	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	62.7±10.6
CFRYA (NO I-BET151)	23.2±7.3	1.9±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0	84.2±9.8
ICFRYA (I-BET151↑ 2 μ M)	56.5±9.8	0.3±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0	28.6±2.0
ICFRYA (FORSKOLINA↑ 75 μ M)	43.9±16.1	0.0±0.0	0.5±0.2	0.0±0.0	36.0±3.1
ICFRYA (I-BET151↑ 2 μ M FORSKOLINA↑ μ M75)	61.7±4.5	0.2±0.2	1.3±0.8	0.0±0.0	17.0±1.5

Wh.J.-MSC's: Inducción neuronal día 8. ICFRYA (2 μ M I-BET151, 75 μ M FORSKOLINA)

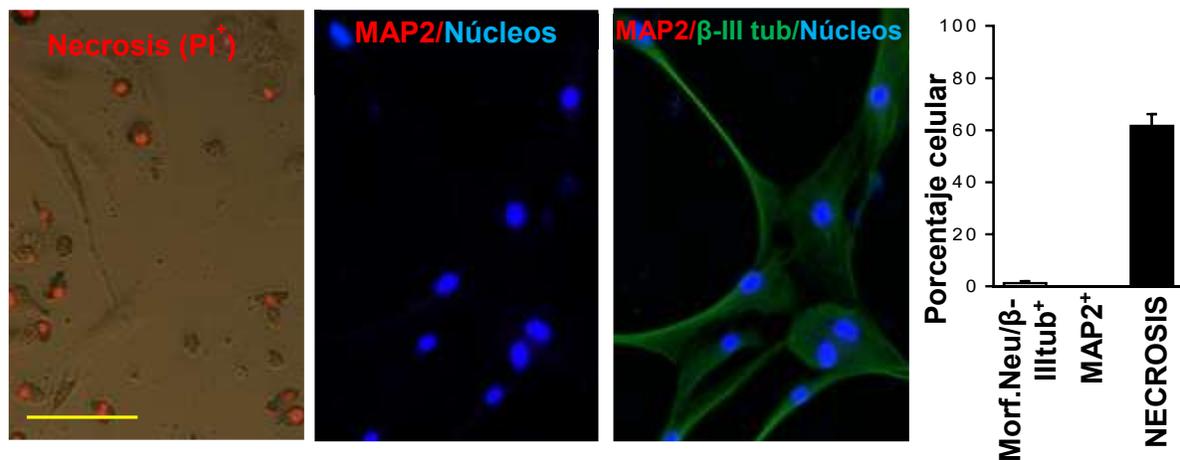
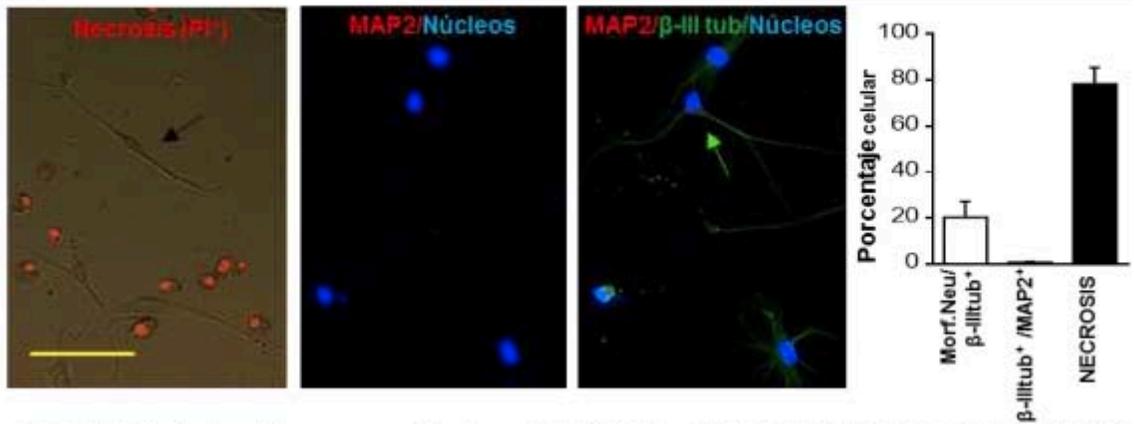


Figura 13. Modificación del protocolo de inducción ICFRYA con aumento en la concentración de I-BET y Forskolina y representación de muerte por necrosis con células PI+ (campo claro). Como se observa, no se presentan indicios de inducción neuronal para ninguno de los criterios evaluados. Barra de escala 100 μ M.

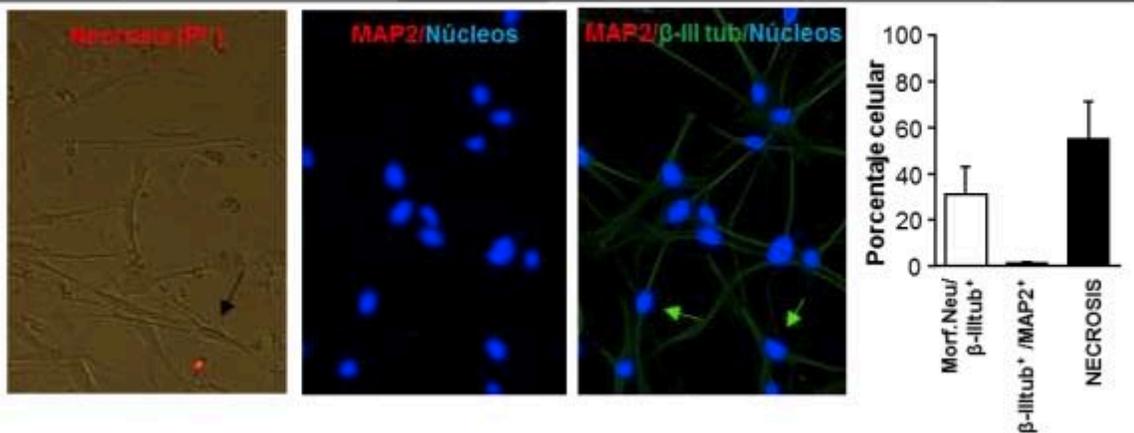
Tabla 5. Modificaciones aplicadas en las tres muestras de fuentes dentales (efecto intermedio). Se resalta con amarillo el protocolo convencional y con verde la condición con mejores resultados obtenidos del aumento de la concentración de las moléculas I-BET y/o Forskolina.

CONDICIONES EVALUADAS	Necrosis (%)	Morfología neuronal (%)	Células β -III tub+ (%)	Células MAP2+ (%)	Núm. Células/pozo ICC
PDL-MSC's					
ICFRYA	31.7±16.9	29.6±26.3	10.7±7.7	0.0±0.0	52.9±15.2
CFRYA (NO I-BET151)	23.4±20.6	12.5±12.5	3.1±3.1	0.0±0.0	108.3±30.1
ICFRYA (I-BET151↑ 2μM)	53.4±8.5	34.3±19.5	15.9±7.9	0.7±0.7	36.9±9.2
ICFRYA (FORSKOLINA↑ 75μM)	46.6±5.3	21.8±7.2	12.0±6.6	0.0±0.0	30.5±6.4
ICFRYA (I-BET151↑ 2μM FORSKOLINA↑ μM75)	78.3±7.2	56.4±6.2	20.4±6.8	0.7±.04	15.0±3.3
DP-MSC's					
ICFRYA	39.7±19.6	16.0±9.4	15.9±11.8	0.3±0.3	81.7±32.2
CFRYA (NO I-BET151)	15.0±14.6	1.5±1.5	0.9±0.5	0.0±0.0	121.5±40.6
ICFRYA (I-BET 151↑ 2μM)	43.8±20.3	32.8±15.6	22.4±11.7	1.4±1.0	64.0±32.8
ICFRYA (FORSKOLINA↑ 75μM)	46.2±19.3	32.2±14.7	23.5±11.8	0.5±0.5	67.9±24.8
ICFRYA (I-BET151↑ 2μM FORSKOLINA↑ μM75)	54.9±15.9	32.5±13.7	30.9±11.9	1.2±0.6	48.0±20.3
GT-MSC's					
ICFRYA	32.5±2.8	9.5±2.4	31.3±5.2	1.8±0.6	45.8±9.8
CFRYA (NO I-BET151)	1.8±0.5	0.2±0.1	5.2±1.2	0.0±0.0	139.0±32.6
ICFRYA (I-BET151↑ 2μM)	51.7±9.1	13.1±0.6	34.6±1.5	3.4±0.4	29.7±7.3
ICFRYA (FORSKOLINA↑ 75μM)	48.9±5.8	17.6±5.4	32.9±3.0	4.3±1.3	32.1±6.8
ICFRYA (I-BET151↑ 2μM FORSKOLINA↑ μM75)	88.0±5.3	35.5±6.8	N.D.	N.D.	N.D.

A PDL-MSC's: Inducción neuronal día 8. ICFRYA (2 μ M I-BET151, 75 μ M FORSKOLINA)



B DP-MSC's: Inducción neuronal 8 días. ICFRYA (2 μ M I-BET151, 75 μ M FORSKOLINA)



C GT-MSC's: Inducción neuronal día 8. ICFRYA (75 μ M FORSKOLINA)

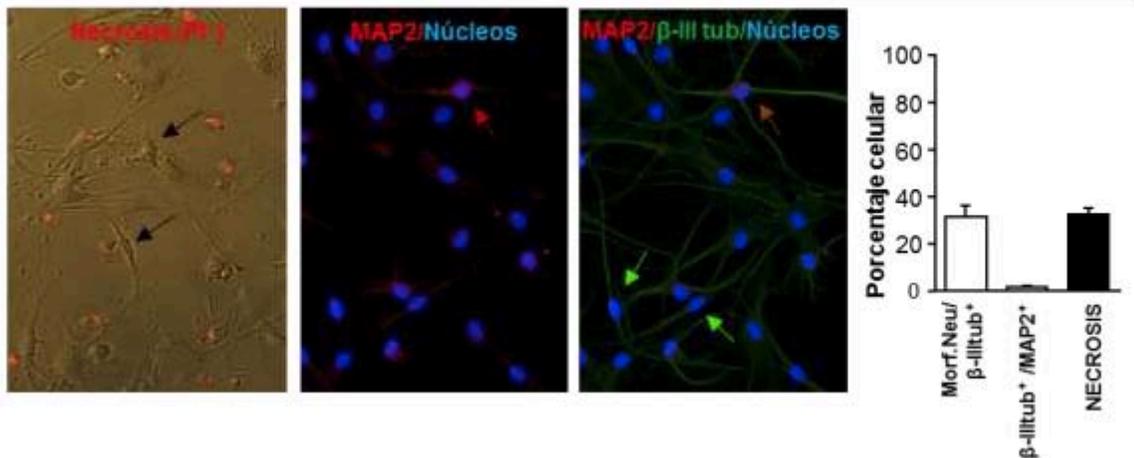


Figura 14. Condiciones más favorables para la inducción en las MSC's de fuentes dentales y representación de muerte por necrosis con células PI+ (campo claro). Se indica para cada caso las células representativas para: morfología neuronal (flechas negras), MAP2+ (flechas rojas), β -III+ (flechas verdes) y co-localización MAP2/ β -III (flechas naranja). Barra de escala 100 μ M.

En el caso de PLAC-MSCs al aumentar la concentración de I-BET151 o de Forskolina no se observó una mejor inducción (Tabla 6), pero al aumentar la concentración de ambas moléculas los cultivos se observaron tan deteriorados desde los primeros días que no se pudo hacer el análisis cuantitativo. Por lo que el coctel original ya descrito (Tabla 6, figura 15A) se consideró como la mejor condición.

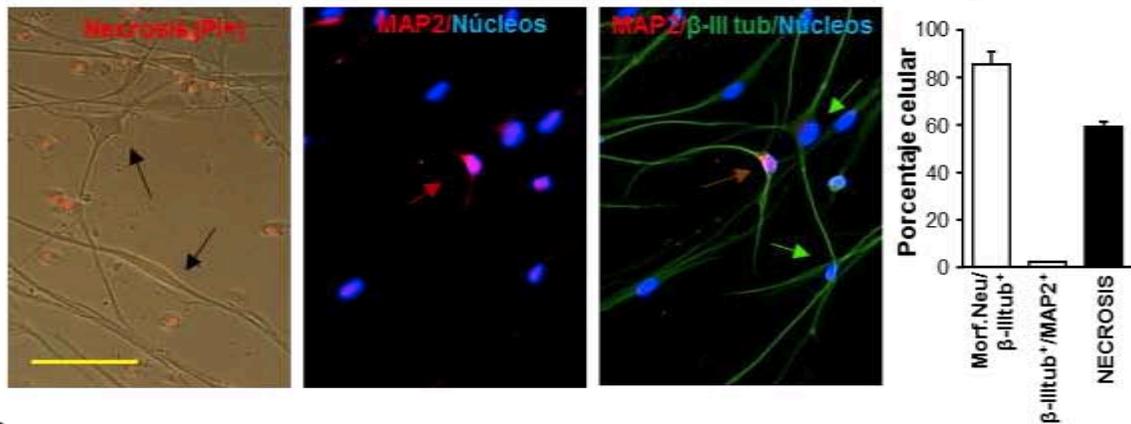
Debido a los resultados obtenidos al día 8 (Tabla 2, figura 12), el efecto del coctel en las UCB-MSCs se monitoreó durante el tiempo de cultivo. A partir del segundo día se observaron células con morfología neuronal que incrementaron al día cuatro, y solo al modificar la concentración en ambas moléculas se observó un alto porcentaje de células maltratadas en los cultivos (dato no mostrado). Por lo anterior, se evaluó el efecto del incremento de cada molécula a los 4 días de cultivo (Tabla 6). Con la concentración 2 μ M de I-BET151 se detectaron 83.1% y 4.5% de células positivas para β III tubulina y MAP2, respectivamente (Tabla 6); además, las prolongaciones fueron más alargadas y complejas, e incluso con reactividad para MAP2 (Figura 15B).

En las MSCs provenientes de dermis, tanto en I-BET151 2 μ M como en la condición I-BET151 2 μ M/Forskolin 75 μ M presentaron altos porcentajes de células β III tubulina positivas (78-79%) y entre el 10.7-12.5% de células MAP2 positivas; pero la necrosis fue ligeramente mayor cuando se incrementaron ambas moléculas (Tabla 6). Como se observa en la figura 15C, y al igual que en UCB-MSCs, en la condición de I-BET151 2 μ M la morfología es más compleja y la reactividad de MAP2 está asociada a las prolongaciones celulares.

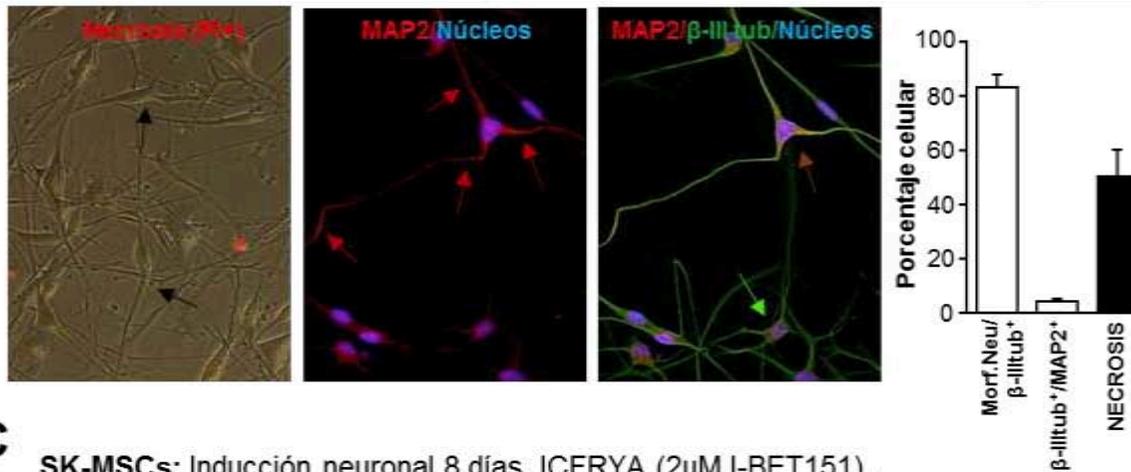
Tabla 6. Modificaciones en las concentraciones del coctel ICFRYA para la optimización de la inducción neuronal en fuentes con efecto elevado. Se resalta el protocolo de inducción inicial (amarillo) y la condición de inducción más favorable para cada una de las fuentes (verde).

CONDICIONES EVALUADAS	Necrosis (%)	Morfología neuronal (%)	Células β -III tub + (%)	Células MAP2 + (%)	Núm. Células/pozo ICC
PLAC-MSCs					
ICFRYA	59.0±2.4	58.8±5.7	85.7±5.3	1.8±0.6	16.3±4.1
CFRYA (NO I-BET151)	27.2±7.0	0.7±0.3	1.2±0.3	0.0±0.0	71.8±10.0
ICFRYA (I-BET↑ 2 μ M)	64.1±4.5	54.8±8.4	86.6±3.2	1.6±0.8	11.0±4.9
ICFRYA (FORSKOLINA↑ 75 μ M)	64.0±9.4	61.1±4.9	87±3.1	1.3±0.7	10.4±3.9
UCB-MSCs					
ICFRYA 8d	82.9±5.2	66.8±5.4	63.3±5.1	16.7±8.4	2.3±0.2
CFRYA (NO I-BET151) 8d	2.3±0.9	1.2±0.9	3.6±2.8	0.0±0.0	106.6±11.5
ICFRYA 4d	35.7±11.9	65.2±0.4	81.3±4.9	2.6±0.5	41.8±10.7
CFRYA (NO I-BET151) 4d	6.4±2.0	0.6±0.3	1.6±0.9	0.0±0.0	91.4±8.7
ICFRYA (FORSKOLINA↑ 75 μ M) 4d	49.9±10.2	57.1±5.5	75.2±9.2	1.5±0.3	36.2±9.9
ICFRYA (I-BET151↑ 2 μ M) 4d	45.7±11.4	55.3±6.7	83.1±4.9	4.5±0.8	30.3±6.2
SK-MSCs					
ICFRYA	28.8±4.8	19.3±4.5	46.9±6.8	0.7±0.5	35.9±3.8
CFRYA (NO I-BET151)	0.9±0.4	0.1±0.1	0.1±0.1	0.0±0.0	145.6±10.6
ICFRYA (FORSKOLINA↑ 75 μ M)	58.7±7.4	51.5±6.6	64.5±4.1	4.4±1.7	20.1±4.5
ICFRYA (I-BET151↑ 2 μ M)	55.3±7.2	35.1±3.0	78.0±5.7	12.5±3.8	16.3±4.4
ICFRYA (I-BET151↑ 2 μ M FORSKOLINA↑ μ M75)	65.2±6.2	55.9±7.5	79.8±2.5	10.7±4.8	12.9±4.5

A PLAC-MSCs: Inducción neuronal 8 días. ICFRYA



B UCB-MSCs: Inducción neuronal 4 días. ICFRYA (2μM I-BET151).



C SK-MSCs: Inducción neuronal 8 días. ICFRYA (2μM I-BET151).

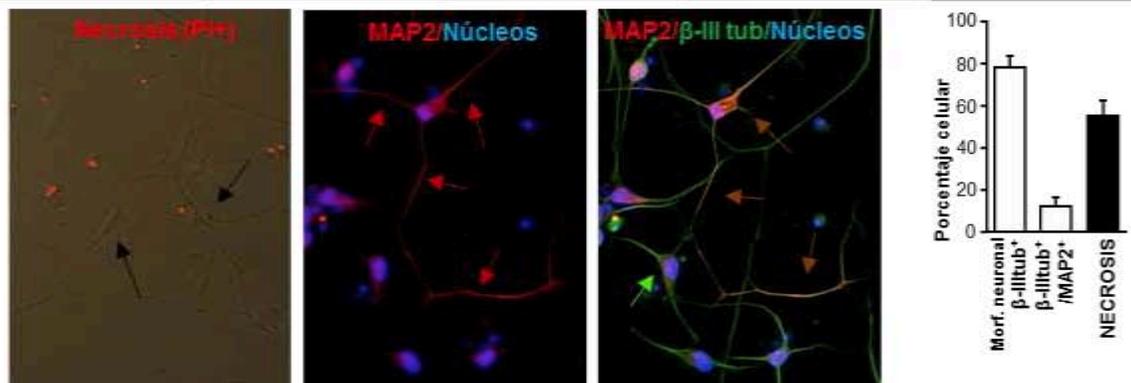


Figura 15. Condiciones más favorables para la inducción en las MSC's de fuentes con efecto elevado y representación de muerte por necrosis con células PI+ (campo claro). Se indica para cada caso las células representativas para: morfología neuronal (flechas negras), MAP2+ (flechas rojas), β-III+ (flechas verdes) y co-localización MAP2/ β-III (flechas naranja). Barra de escala 100μM.

VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En esta investigación, se observó que MSC's obtenidas de diferentes fuentes no respondieron de la misma manera a un estímulo específico de inducción neuronal con moléculas pequeñas. En nuestro estudio previo, reportamos que la transdiferenciación neuronal parcial de BM-MSC's se llevó a cabo por un coctel de moléculas pequeñas denominado por sus componentes como ICFRYA (Aguilera-Castrejon et al., 2016, 2017). Este coctel fue probado en siete diferentes fuentes de MSC's, induciendo propiedades neuronales muy evidentes en PLAC-, UCB- y SK-MSC's; por otro lado, en las fuentes de DP-, PDL- y GT-MSC's la inducción fue de menor magnitud; mientras que, en Wh.J.-MSC's no se observaron cambios que indicaran una posible inducción neuronal.

En diferentes reportes se establece que la transdiferenciación neuronal consiste en la generación de poblaciones neuronales a partir de células somáticas no neurales; esto ya ha sido comprobado mediante la sobreexpresión de factores de transcripción. Cabe destacar que las células obtenidas por estos protocolos son consideradas neuronas inducidas ya que i) adquieren morfología neuronal, ii) expresan genes asociados al linaje de destino y iii) presentan actividad electrofisiológica (Sisakhtnezhad and Matin, 2012).

A diferencia de lo anterior, varios grupos de investigación reportan la transdiferenciación neuronal, sin la transfección de genes exógenos, de MSC's de diversas fuentes; obteniendo células con morfología tipo neuronal con reactividad para marcadores propios de células neuronales. Sin embargo, debido a los protocolos de inducción y criterios de evaluación, estos resultados han sido fuertemente cuestionados ya que: i) los tiempos de inducción son muy breves para la generación de células neuronales, variando entre 7-48 horas, ii) algunos de los estimulantes químicos usados como B-ME, BHA o DMSO inducen estrés que provoca contracción citoplasmática, dejando rastros de pequeños filamentos que se reportan como dendritas, y iii) la reactividad a algunos marcadores neuronales se observa mal localizada (Barnabe et al., 2009). Ante esto, se ha demostrado que la

contracción celular propicia que la mayor reactividad sea consecuencia de la cantidad de antígeno por unidad de área, más que por un incremento en la proteína, como puede ser el caso de β -III tubulina un antígeno presente en las MSC's en condiciones basales. En el caso de NeuN, un antígeno neuronal nuclear, es común que en estos reportes su reactividad se localice en el citoplasma (Barnabe et al., 2009).

Solo hasta los últimos años, grupos de investigación independientes han dado evidencias sólidas de transdiferenciación neuronal, sin transfección de genes; en fibroblastos murinos y humanos (Hu et al., 2015; Li et al., 2015), e incluso en astrocitos humanos (Hu et al., 2015; Zhang et al., 2015). En estos estudios, se consiguió la transdiferenciación a partir de la regulación por moléculas pequeñas de vías de señalización. Para lograrlo, probaron numerosas combinaciones de moléculas para seleccionar un coctel específico que indujera las propiedades neuronales para cada tipo celular.

Con base en estos reportes, en nuestro estudio anterior seleccionamos 22 moléculas pequeñas implicadas en la diferenciación y especificación neuronal. Después de probar múltiples combinaciones, determinamos que el coctel I-BET151, CHIR99021, Forskolina, RepSox, Y-27632 y dbcAMP (ICFRYA) induce células con propiedades de neuronas inmaduras a partir de BM-MSCs. En tal estudio demostramos que la morfología obtenida no fue consecuencia de contracción, sino de extensión celular; además, se observó que las propiedades neuronales fueron adquiridas gradualmente durante el tiempo de inducción. De nuestro coctel, CHIR99021 y RepSox se han utilizado en otros estudios para la reprogramación celular y/o diferenciación neuronal (Masserdotti et al., 2016); mientras que Y-27632, Forskolina y dbcAMP están mayormente implicadas en la sobrevivencia celular, así como en mejorar la inducción neuronal (Zhang et al., 2012). Además, se determinó que I-BET151 fue la molécula más importante para inducir las propiedades neuronales en las BM-MSCs (Aguilera-Castrejon et al., 2017).

En el presente trabajo, observamos que bajo las mismas condiciones antes aplicadas en BM-MSCs, en las MSC's de gelatina de Wharton, el coctel ICFRYA

no provocó algún cambio asociado con alguna propiedad neuronal. En las MSC's de tejidos dentales, se observaron propiedades neuronales en porcentajes relativamente bajos entre 20% a 32% de células β -III tubulina⁺ con morfología neuronal bipolar sencilla, y prácticamente no se observó reactividad para el marcador de neuronas maduras MAP2. Mientras que, en PLAC-, SK- y UCB-MSCs el coctel indujo un elevado porcentaje de células bipolares que incrementaron la reactividad para β -III tubulina (78-86%) y en algunos casos con extensiones ramificadas: y aunque en un porcentaje bajo, (1.8-12.5%) algunas células β -III tubulina⁺ presentaron reactividad asociada a las extensiones para el marcador de neuronas maduras MAP2. Estas propiedades coinciden con la obtención de neuronas inducidas por factores de transcripción (Vierbuchen et al., 2010) o por moléculas pequeñas (Hu et al., 2015; Li et al., 2015; Zhang et al., 2015). De esta forma podemos sugerir que las MSC's obtenidas de PLAC, UCB y SK al ser estimuladas con el coctel ICFRYA, podrían ser clasificadas como neuronas inmaduras inducidas (iIN).

En contraste con muchos estudios donde se sugiere que las MSC's de fuentes neonatales al tener un menor grado de compromiso poseen mayor troncalidad y plasticidad (Flores-Figueroa et al., 2006; Montesinos et al., 2009; Parekkadan and Milwid, 2010; Rastegar et al., 2010; Wagner et al., 2005), en esta investigación la inducción neuronal por el coctel ICFRYA no se favoreció por el origen neonatal de las MSC's; tal es el caso de las MSC's de Gelatina de Wharton las cuales no presentaron inducción neuronal ante el coctel ICFRYA, destacando que al igual que UCB-MSCs, las Wh.J.-MSCs provienen del cordón umbilical. Sin embargo, ante el protocolo de transdiferenciación neuronal utilizado, estas células poseen efectos extremos.

Estudios comparativos han demostrado que de manera cuantitativa existen diferencias entre las MSC's incluso en las mismas propiedades que las caracterizan (Castro-Manrreza et al., 2014; Via et al., 2012; Wagner et al., 2005), cuestión que podría justificar la respuesta diferencial en las MSC's en este trabajo. Por consiguiente, será necesario probar nuevas combinaciones y/o moléculas para

seleccionar el o los cocteles que induzcan propiedades neuronales en las fuentes donde el efecto fue bajo o nulo.

Como se observó en todas las fuentes de MSC's, la necrosis es un factor presente en la inducción neuronal, durante este periodo se presentaron niveles importantes de muerte celular a pesar de que el coctel posee una molécula de sobrevivencia (Y27632); sin embargo, la necrosis no fue proporcional a la inducción neuronal.

Es importante mencionar que reportes indican que durante el proceso de neurogénesis también hay un estrés asociado a la diferenciación neuronal *in vivo* que favorece la diferenciación de NPC's en neuronas. Así mismo, en sistemas *in vitro* también se ha observado que la muerte celular es elevada en la diferenciación neuronal (Pasantes-Morales et al., 2015); Además, otros estudios afirman que independientemente del proceso, es indispensable pasar por una etapa de estrés y muerte debido a la regulación epigenética, para llegar al desarrollo de neuronas (Li et al., 2016).

Cuando se emplean compuestos químicos como las moléculas pequeñas para inducir transdiferenciación, es relevante considerar que la toxicidad depende si bien de las concentraciones y efectos del agente, puede ser en mayor medida del tipo celular. En las Wh.J.-MSC's este coctel provocó elevados porcentajes de necrosis que no se asociaron con inducción neuronal, lo que podría indicar que las propiedades neuronales en las otras fuentes fueron consecuencia de una inducción neuronal y no así de un estrés químico inespecífico

La necesidad de un coctel de moléculas está reportada en los estudios de transdiferenciación neuronal. Aunque estos estudios coinciden en que se requiere un modificador epigenético (I-BET151) y reguladores de vías de señalización, las combinaciones de las moléculas son específicas para cada tipo celular por ejemplo para astrocitos, fibroblastos, o como en nuestro estudio sobre las MSC's obtenidas de diferentes fuentes, las cuales a pesar de ser un mismo tipo celular presentan un efecto diferencial ante un coctel de específico.

Lo anterior indica que es necesario promover el efecto sinérgico de diferentes mecanismos de regulación para conseguir el fenotipo y la expresión génica de células neuronales. Para esto, la molécula CHIR99021 que comúnmente es utilizada para la generación de células trocales pluripotentes, posee la característica de favorecer la expresión endógena de genes neuronales mediante la activación de la vía Wnt e inhibición de GSK-3 β . Adicionalmente, el aumento del cAMP intracelular dado por Forskolina y el mismo cAMP, además de beneficiar la especificación neuronal, impulsa las funciones metabólicas de otras moléculas como I-BET151 y CHIR99021 (Jung et al., 2014).

Al igual que en fibroblastos de ratón (Li et al., 2015), en BM-MSCs (Aguilera-Castrejon et al., 2017) y muy recientemente en astrocitos humanos (Gao et al., 2017) I-BET151 fue muy relevante para la inducción neuronal en las fuentes que presentaron respuesta al coctel, otorgando mejores resultados a MSCs de PLAC, UCB y SK. Además, observamos que I-BET151 también es capaz de mejorar la inducción neuronal de acuerdo a su concentración. Esta molécula es considerada funcionalmente como un regulador epigenético; su actividad principal consiste en desplazar a componentes de la cromatina conocidos como bromodominios (BRD3 y BRD4). Se propone que estos bromodominios tienen la función de mantener la memoria epigenética de la célula original por lo que su inhibición favorecería a la transdiferenciación (Muller et al., 2011). Además, I-BET151 también inhibe la función de los genes c-Myc lo que provoca un arresto en el ciclo celular; este arresto está asociado positivamente a la transdiferenciación neuronal (Li et al., 2016; Taniguchi, 2016).

Sin embargo, si únicamente se adiciona I-BET151 no hay inducción neuronal ni muerte celular, mismo efecto que se obtiene al no agregar I-BET durante la preparación del coctel de moléculas pequeñas. Esto sugiere que para el proceso de transdiferenciación se requiere además de la modulación epigenética, la activación o inhibición de vías de señalización implicadas en la diferenciación y/o especificación neuronal. Funciones previamente descritas para las otras moléculas del coctel: Forskolina y dbcAMP (incremento en los niveles de AMP cíclico),

CHIR99021 (inhibición de GSK3/beta catenina), RepSox (inhibición de SMADs) y Y27632 (inhibición de ROCK).

En este trabajo, los resultados indicaron que en comparación con las BM-MSCs, el coctel ICFRYA induce principalmente en UCB- y SK-MSCs características neuronales importantes para un potencial desarrollo de células neuronales. Se observó que estas dos fuentes de MSCs obtuvieron una morfología neuronal más compleja y definida respecto a las otras, además de poseer mayor intensidad en la expresión de marcadores propios de neuronas. Sin embargo, entre estas dos fuentes celulares, las UCB-MSCs tienen la capacidad de obtener las propiedades neuronales previamente mencionadas en un periodo de inducción de cuatro días, lo que les confiere cierta ventaja ante a las SK-MSCs.

Si bien, existen reportes que señalan la complejidad de obtención de UCB-MSCs, representando una décima parte de lo que se recupera de los aspirados de médula ósea (Montesinos et al., 2009), el proceso de extracción representa técnicas no invasivas ya que el cordón umbilical es un tejido de desecho. Por lo tanto, al ser una fuente accesible y presentar resultados favorables a la inducción neuronal, las UCB-MSCs sugieren un potencial uso para la generación de poblaciones neuronales en terapia celular.

Obtener poblaciones neuronales *in vitro* usando fuentes celulares que no representen problemas éticos o técnicos, y que sean adecuadas para protocolos de trasplante es uno de los principales retos en las terapias de remplazo celular para desórdenes neurodegenerativos. Explorar la transdiferenciación neuronal de las MSCs usando protocolos sólidos de inducción nos dará evidencias de la capacidad real de las MSCs para generar poblaciones neuronales. Con los estudios comparativos entre las fuentes de MSCs se podrá considerar su accesibilidad, sus propiedades *in vitro*, así como su potencial de transdiferenciación para proponer a la o las poblaciones de MSCs más adecuadas para potenciales tratamientos en estos desordenes neurodegenerativos.

IX. PERSPECTIVAS

La transdiferenciación neuronal implica la generación de neuronas maduras y funcionales a partir de células somáticas no neurales. En este estudio, las moléculas pequeñas indujeron propiedades neuronales en MSC's siendo las SK- y UCB- MSC's las fuentes con la mejor respuesta; sin embargo, el bajo porcentaje de células MAP2 positivas indican que las células generadas solo se pueden considerar como neuronas inmaduras. Por consiguiente, para obtener neuronas maduras y funcionales los siguientes objetivos del trabajo estarán encaminados a I) mejorar o mantener la viabilidad celular durante la inducción neuronal con moléculas/condiciones que inhiban los diferentes procesos de muerte celular, II) probar protocolos de maduración neuronal que incluyan factores neurotróficos, cocultivos con células gliales, medios condicionados y otras moléculas implicadas en la expresión de genes neuronales, III) determinar la maduración neuronal detectando antígenos asociados a neuronas maduras, así como evaluar los cambios en la expresión de genes neuronales, y IV) evaluar la actividad electrofisiológica de las células obtenidas como parámetro de diferenciación neuronal funcional. Con lo anterior, se pretende establecer un protocolo de inducción y la fuente celular más adecuada para generar poblaciones neuronales maduras y funcionales con la finalidad de proponer alternativas de terapia celular para desordenes del sistema nervioso.

X. REFERENCIAS

- Aguilera-Castrejon, A., Pasantés-Morales, H., Montesinos, J.J., Cortes-Medina, L.V., Castro-Manrreza, M.E., Mayani, H., Ramos-Mandujano, G., 2017. Improved Proliferative Capacity of NP-Like Cells Derived from Human Mesenchymal Stromal Cells and Neuronal Transdifferentiation by Small Molecules. *Neurochemical research* 42, 415-427.
- Alexanian, A.R., 2015. Epigenetic modulators promote mesenchymal stem cell phenotype switches. *The international journal of biochemistry & cell biology* 64, 190-194.
- Alexanian, A.R., Liu, Q.S., Zhang, Z., 2013. Enhancing the efficiency of direct reprogramming of human mesenchymal stem cells into mature neuronal-like cells with the combination of small molecule modulators of chromatin modifying enzymes, SMAD signaling and cyclic adenosine monophosphate levels. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45, 1633-1638.
- Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., Yamanaka, S., 2008. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321, 699-702.
- Arevalo-Romero, J.A.P.-G., D. M.; Rodríguez-Pardo, V. M., 2007. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *NOVA*
- Arias-Carrión, O.-B., R.; Druker-Colín, 2007. Neurogénesis en el cerebro adulto. *Revisión en Neurociencia* 9, 541-550.
- Babos, K., Ichida, J.K., 2015. Small Molecules Take a Big Step by Converting Fibroblasts into Neurons. *Cell stem cell* 17, 127-129.
- Barnabe, G.F., Schwindt, T.T., Calcagnotto, M.E., Motta, F.L., Martinez, G., Jr., de Oliveira, A.C., Keim, L.M., D'Almeida, V., Mendez-Otero, R., Mello, L.E., 2009. Chemically-induced RAT mesenchymal stem cells adopt molecular properties of neuronal-like cells but do not have basic neuronal functional properties. *PloS one* 4, e5222.
- Battula, V.L., Treml, S., Abele, H., Buhning, H.J., 2008. Prospective isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human placenta using a frizzled-9-specific monoclonal antibody. *Differentiation; research in biological diversity* 76, 326-336.
- Bjorklund, L.M., Sanchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I.Y., McNaught, K.S., 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2344-2349.
- Campana, A.D., Sanchez, F., Gamboa, C., Gomez-Villalobos Mde, J., De La Cruz, F., Zamudio, S., Flores, G., 2008. Dendritic morphology on neurons from prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens is altered in adult male mice exposed to repeated low dose of malathion. *Synapse* 62, 283-290.
- Caplan, A.I., Correa, D., 2011. The MSC: an injury drugstore. *Cell stem cell* 9, 11-15.
- Cappello, S., 2013. Small Rho-GTPases and cortical malformations: fine-tuning the cytoskeleton stability. *Small GTPases* 4, 51-56.
- Castro-Manrreza, M.E., Mayani, H., Monroy-Garcia, A., Flores-Figueroa, E., Chavez-Rueda, K., Legorreta-Haquet, V., Santiago-Osorio, E., Montesinos, J.J., 2014. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: a

- comparative in vitro analysis of their immunosuppressive properties against T cells. *Stem cells and development* 23, 1217-1232.
- Castro-Manrreza, M.E., Montesinos, J.J., 2015. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *J Immunol Res* 2015, 394917.
- Castro-Manrreza, M.E.M.J., 2014. Células troncales mesenquimales: potencial de terapia celular en trasplante de células troncales hematopoyéticas. *El Residente* 9, 66-73.
- Castro-Manrreza, M.E.M.J., 2015. Células troncales mesenquimales: biología y uso en el trasplante de células hematopoyéticas. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*.
- Colpo, G.D., Ascoli, B.M., Wollenhaupt-Aguiar, B., Pfaffenseller, B., Silva, E.G., Cirne-Lima, E.O., Quevedo, J., Kapczinski, F., Rosa, A.R., 2015. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative and psychiatric disorders. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 87, 1435-1449.
- Correa, G.L., Marines, 2010. Análisis morfológico del proceso de diferenciación in vitro de neuronas del hipocampo. *Investigación Clínica* 4, 501-518.
- Cowan, C.A., Atienza, J., Melton, D.A., Eggan, K., 2005. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 309, 1369-1373.
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C., Nardi, N.B., 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science* 119, 2204-2213.
- Davis, R.L., Weintraub, H., Lassar, A.B., 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987-1000.
- Deans, R.J., Moseley, A.B., 2000. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 28, 875-884.
- Deng, J., Petersen, B.E., Steindler, D.A., Jorgensen, M.L., Laywell, E.D., 2006. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. *Stem cells* 24, 1054-1064.
- 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, 148-152.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Fishman, V.S., Shnyder, T.A., Orishchenko, K.E., Bader, M., Alenina, N., Serov, O.L., 2015. Cell divisions are not essential for the direct conversion of fibroblasts into neuronal cells. *Cell cycle* 14, 1188-1196.
- Flores-Figueroa, E., Montesinos, J.J., Mayani, H., 2006. [Mesenchymal stem cell; history, biology and clinical application]. *Rev Invest Clin* 58, 498-511.
- Foudah, D., Redondo, J., Caldara, C., Carini, F., Tredici, G., Miloso, M., 2013. Human mesenchymal stem cells express neuronal markers after osteogenic and adipogenic differentiation. *Cellular & molecular biology letters* 18, 163-186.
- Friedenstein, A.J., Deriglasova, U.F., Kulagina, N.N., Panasuk, A.F., Rudakowa, S.F., Luria, E.A., Ruadkow, I.A., 1974. Precursors for fibroblasts in different

- populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 2, 83-92.
- 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, 1109-1121.
- Gallagher, S.J., Mijatov, B., Gunatilake, D., Gowrishankar, K., Tiffen, J., James, W., Jin, L., Pupo, G., Cullinane, C., McArthur, G.A., Tummino, P.J., Rizos, H., Hersey, P., 2014. Control of NF- κ B activity in human melanoma by bromodomain and extra-terminal protein inhibitor I-BET151. *Pigment cell & melanoma research* 27, 1126-1137.
- Gao, L., Guan, W., Wang, M., Wang, H., Yu, J., Liu, Q., Qiu, B., Yu, Y., Ping, Y., Bian, X., Shen, L., Pei, G., 2017. Direct Generation of Human Neuronal Cells from Adult Astrocytes by Small Molecules. *Stem cell reports*.
- Gascon, S., Murenu, E., Masserdotti, G., Ortega, F., Russo, G.L., Petrik, D., Deshpande, A., Heinrich, C., Karow, M., Robertson, S.P., Schroeder, T., Beckers, J., Irmiler, M., Berndt, C., Angeli, J.P., Conrad, M., Berninger, B., Gotz, M., 2016. Identification and Successful Negotiation of a Metabolic Checkpoint in Direct Neuronal Reprogramming. *Cell stem cell* 18, 396-409.
- Govek, E.E., Newey, S.E., Van Aelst, L., 2005. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes & development* 19, 1-49.
- Graf, T., Enver, T., 2009. Forcing cells to change lineages. *Nature* 462, 587-594.
- 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, 4411-4422.
- Hernández-Estévez, E.H., 2012. Análisis comparativo de la morfología, inmunofenotipo y capacidad de diferenciación de las células troncales mesenquimales provenientes de médula ósea, placenta y vena de cordón umbilical., *Biología del desarrollo*. UNAM, México p. 105.
- Herrera-Arozamena, C., Marti-Mari, O., Estrada, M., de la Fuente Revenga, M., Rodriguez-Franco, M.I., 2016. Recent Advances in Neurogenic Small Molecules as Innovative Treatments for Neurodegenerative Diseases. *Molecules* 21.
- Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., Yamanaka, S., 2009. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 460, 1132-1135.
- Hu, W., Qiu, B., Guan, W., Wang, Q., Wang, M., Li, W., Gao, L., Shen, L., Huang, Y., Xie, G., Zhao, H., Jin, Y., Tang, B., Yu, Y., Zhao, J., Pei, G., 2015. Direct Conversion of Normal and Alzheimer's Disease Human Fibroblasts into Neuronal Cells by Small Molecules. *Cell stem cell* 17, 204-212.
- INEGI, 2014. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA.
- Jones, E., McGonagle, D., 2008. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology* 47, 126-131.
- Jordán, J., 2003. Avances en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. *Farmacología* 22, 9.
- Jung, D.W., Kim, W.H., Williams, D.R., 2014. Reprogram or reboot: small molecule approaches for the production of induced pluripotent stem cells and direct cell reprogramming. *ACS chemical biology* 9, 80-95.

- Kassem, M., 2006. Stem cells: potential therapy for age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1067, 436-442.
- 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? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 59, 369-378.
- Ladewig, J., Koch, P., Brustle, O., 2013. Leveling Waddington: the emergence of direct programming and the loss of cell fate hierarchies. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14, 225-236.
- Ledesma-Martinez, E., Mendoza-Nunez, V.M., Santiago-Osorio, E., 2016. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem cells international* 2016, 4709572.
- 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. *J Mol Neurosci* 24, 353-386.
- Li, H., Collado, M., Villasante, A., Strati, K., Ortega, S., Canamero, M., Blasco, M.A., Serrano, M., 2009. The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature* 460, 1136-1139.
- Li, J., Ma, J., Meng, G., Lin, H., Wu, S., Wang, J., Luo, J., Xu, X., Tough, D., Lindon, M., Rioja, I., Zhao, J., Mei, H., Prinjha, R., Zhong, Z., 2016. BET bromodomain inhibition promotes neurogenesis while inhibiting gliogenesis in neural progenitor cells. *Stem cell research* 17, 212-221.
- Li, X., Zuo, X., Jing, J., Ma, Y., Wang, J., Liu, D., Zhu, J., Du, X., Xiong, L., Du, Y., Xu, J., Xiao, X., Wang, J., Chai, Z., Zhao, Y., Deng, H., 2015. Small-Molecule-Driven Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Functional Neurons. *Cell stem cell* 17, 195-203.
- 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, 174-191.
- Lu, Q.R., Sun, T., Zhu, Z., Ma, N., Garcia, M., Stiles, C.D., Rowitch, D.H., 2002. Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* 109, 75-86.
- Martino, G., Pluchino, S., 2006. The therapeutic potential of neural stem cells. *Nature reviews. Neuroscience* 7, 395-406.
- Masserdotti, G., Gascon, S., Gotz, M., 2016. Direct neuronal reprogramming: learning from and for development. *Development* 143, 2494-2510.
- Mayani, H., 2011. Células troncales y medicina regenerativa: conceptos básicos, estado actual y perspectivas futuras., Primera ed.
- Merino-Gonzalez, C., Zuniga, F.A., Escudero, C., Ormazabal, V., Reyes, C., Nova-Lamperti, E., Salomon, C., Aguayo, C., 2016. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Angiogenesis: Potencial Clinical Application. *Frontiers in physiology* 7, 24.
- Meyer, A.K., Maisel, M., Hermann, A., Stirl, K., Storch, A., 2010. Restorative approaches in Parkinson's Disease: which cell type wins the race? *J Neurol Sci* 289, 93-103.
- Minguell, J.J., Fierro, F.A., Epanan, M.J., Erices, A.A., Sierralta, W.D., 2005. Nonstimulated human uncommitted mesenchymal stem cells express cell markers of mesenchymal and neural lineages. *Stem cells and development* 14, 408-414.
- Montesinos, J.J., Flores-Figueroa, E., Castillo-Medina, S., Flores-Guzman, P., Hernandez-Estevez, E., Fajardo-Orduna, 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, 163-176.
- Moraleda, J.M.M.B., Joaquín Gómez-Espuch, Francisca Iniesta, Virginia Hurtado, Miguel Ángel Pérez-Espejo, Francisco Javier Rodríguez-Lozano, Salvador Martínez, 2011. Terapia con células madre en enfermedades neurodegenerativas. *Revista de Hematología* 12, 144-148.
- Muller, S., Filippakopoulos, P., Knapp, S., 2011. Bromodomains as therapeutic targets. *Expert reviews in molecular medicine* 13, e29.
- 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.
- Pang, Z.P., Yang, N., Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Fuentes, D.R., Yang, T.Q., Citri, A., Sebastiano, V., Marro, S., Sudhof, T.C., Wernig, M., 2011. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* 476, 220-223.
- Parekkadan, B., Milwid, J.M., 2010. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng* 12, 87-117.
- Pasantes-Morales, H., Ramos-Mandujano, G., Hernandez-Benitez, R., 2015. Taurine enhances proliferation and promotes neuronal specification of murine and human neural stem/progenitor cells. *Advances in experimental medicine and biology* 803, 457-472.
- Pathania, M., Yan, L.D., Bordey, A., 2010. A symphony of signals conducts early and late stages of adult neurogenesis. *Neuropharmacology* 58, 865-876.
- Qiang, L., Fujita, R., Yamashita, T., Angulo, S., Rhinn, H., Rhee, D., Doege, C., Chau, L., Aubry, L., Vanti, W.B., Moreno, H., Abeliovich, A., 2011. Directed conversion of Alzheimer's disease patient skin fibroblasts into functional neurons. *Cell* 146, 359-371.
- Ramos-Mandujano, G., Hernandez-Benitez, R., Pasantes-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.
- Rastegar, F., Shenaq, D., Huang, J., Zhang, W., Zhang, B.Q., He, B.C., Chen, L., Zuo, G.W., Luo, Q., Shi, Q., Wagner, E.R., Huang, E., Gao, Y., Gao, J.L., Kim, S.H., Zhou, J.Z., Bi, Y., Su, Y., Zhu, G., Luo, J., Luo, X., Qin, J., Reid, R.R., Luu, H.H., Haydon, R.C., Deng, Z.L., He, T.C., 2010. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World J Stem Cells* 2, 67-80.
- Saldívar-Santoyo H.J., F.-G.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.
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T.B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D.R., Sanberg, P.R., 2000. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Experimental neurology* 164, 247-256.
- 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.
- Sisakhtnezhad, S., Matin, M.M., 2012. Transdifferentiation: a cell and molecular reprogramming process. *Cell and tissue research* 348, 379-396.

- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2016. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nature reviews. Molecular cell biology* 17, 183-193.
- Taniguchi, Y., 2016. The Bromodomain and Extra-Terminal Domain (BET) Family: Functional Anatomy of BET Paralogous Proteins. *Int J Mol Sci* 17.
- Tfilin, M., Sudai, E., Merenlender, A., Gispan, I., Yadid, G., Turgeman, G., 2010. Mesenchymal stem cells increase hippocampal neurogenesis and counteract depressive-like behavior. *Molecular psychiatry* 15, 1164-1175.
- Via, A.G., Frizziero, A., Oliva, F., 2012. Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources. *Muscles, ligaments and tendons journal* 2, 154-162.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Sudhof, T.C., Wernig, M., 2010. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463, 1035-1041.
- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W., Ho, A.D., 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 33, 1402-1416.
- 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 neuroscience research* 61, 364-370.
- Yang, N., Ng, Y.H., Pang, Z.P., Sudhof, T.C., Wernig, M., 2011. Induced neuronal cells: how to make and define a neuron. *Cell stem cell* 9, 517-525.
- Zhang, L., Yin, J.C., Yeh, H., Ma, N.X., Lee, G., Chen, X.A., Wang, Y., Lin, L., Chen, L., Jin, P., Wu, G.Y., Chen, G., 2015. Small Molecules Efficiently Reprogram Human Astroglial Cells into Functional Neurons. *Cell stem cell* 17, 735-747.
- Zhang, Y., Li, W., Laurent, T., Ding, S., 2012. Small molecules, big roles -- the chemical manipulation of stem cell fate and somatic cell reprogramming. *Journal of cell science* 125, 5609-5620.

XI. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla suplementaria 1. Edad y género de los donantes de MSC's de las diferentes fuentes. Todas las muestras fueron obtenidas de pacientes sanos.

TEJIDOS DE OBTENCIÓN DE MSC's	MUESTRA 1		MUESTRA 2		MUESTRA 3	
	EDAD	SEXO	EDAD	SEXO	EDAD	SEXO
LIGAMENTO PERIODONTAL	28	F	28	F	30	F
TEJIDO GINGIVAL	12	F	12	F	30	F
PULPA DENTAL	11	F	11	F	30	F
DERMIS	18	F	22	M	34	M

SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL	25	X	26	X	22	X
PLACENTA	25	X	23	X	27	X
GELATINA DE WARTON DE CORDÓN UMBILICAL	32	X	19	X	27	X

} Edad de la madre

Tabla suplementaria 2. Propiedades de MSC's, caracterización por antígenos específicos de membrana. Se señala en verde los marcadores propios de mesenquimales y en rojo los hematopoyéticos.

MARCADOR DE MEMBRANA	UCB- MSC's	PLAC- MSC's	Wh.J- MSC's	SK- MSC's	PDL- MSC's	GT- MSC's	DP- MSC's
CD105	91.7±0.88	93.7±0.88	89.3±2.96	96.4±2.90	95.8±3.96	99.7±0.08	92.0±7.6
CD90	77.0±3.51	80.0±5.77	93.3±2.85	97.2±1.31	99.6±0.17	99.7±0.19	99.8±0.13
CD73	95.3±1.45	97.3±0.88	91.7±2.19	88.8±4.98	98.2±1.73	99.8±0.04	98.9±0.32
CD13	96.7±0.88	98.7±0.33	ND	96.6±2.58	99.4±0.41	99.8±0.03	96.1±0.283
HLA-I	87.7±4.33	92.3±1.20	65.7±15.7	15.0±6.70	54.5±28.4	63.0±31.3	53.5±26.5
HLA-II	0.67±0.33	0.3±0.33	0.00±0.00	0.45±0.26	1.32±1.22	1.26±0.25	0.11±0.07
CD45	0.33±0.33	0.3±0.33	0.33±0.33	0.99±0.43	0.11±0.06	0.06±0.06	0.07±0.05
CD34	0.67±0.33	0.7±0.33	0.67±0.67	1.42±0.68	0.05±0.18	-0.03±0.13	0.07±0.03
CD31	0.00±0.00	0.3±0.33	0.33±0.33	1.04±0.41	0.37±0.07	0.25±0.13	0.26±0.21
CD14	0.33±0.33	0.3±0.33	ND	0.81±0.28	0.12±0.08	0.02±0.02	0.03±0.05

Tabla suplementaria 3. Propiedades de MSC's, caracterización por capacidad de diferenciación trilineaje

FUENTE DE MSC's	ADIPOGÉNESIS			CONDROGÉNESIS			OSTEOGÉNESIS		
	M 1	M 2	M 3	M 1	M 2	M 3	M 1	M 2	M 3
PLACENTA	(+)	(+)	(+)	(++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)	(+++)
SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL	(+)	(+)	(+)	(++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)	(+++)
GELATINA DE WHARTON	(+)	(+)	(+)	(++)	(++)	(++)	(+++)	(+++)	(+++)
DERMIS	(+)	(++)	(+)	(++)	(++)	ND	(+)	(++)	(+)
PULPA DENTAL	(+)	(+)	(+)	(+++++)	(+++++)	(+++)	(+++++)	(+++++)	(+++)
TEJIDO GINGIVAL	(++)	(++)	(++)	(+++++)	(+++++)	(+++)	(+++++)	(+++++)	(+++)
LIGAMENTO PERIODONTAL	(++)	(++)	(+)	(+++++)	(+++++)	(++)	(+++++)	(+++++)	(++)

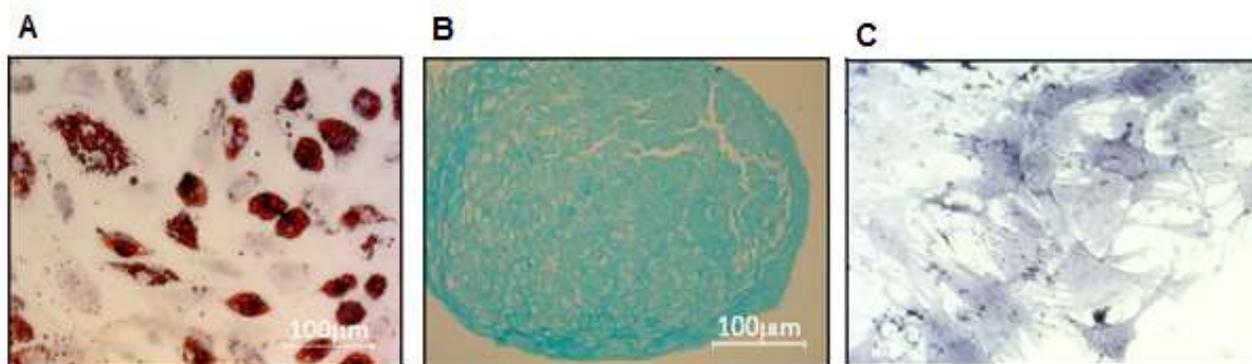


Figura suplementaria 1. Proceso de diferenciación trilineaje de MSC's (adipogénica, osteogénica y condrogénica) realizado en el Hospital Centro Médico Nacional SXXI. A. Diferenciación adipogénica con tinción de rojo oleoso; B. Diferenciación condrogénica con el método de fijación de micromasa y tinción con azul alciano; C. Diferenciación osteogénica con técnica de fosfatasa alcalina.