



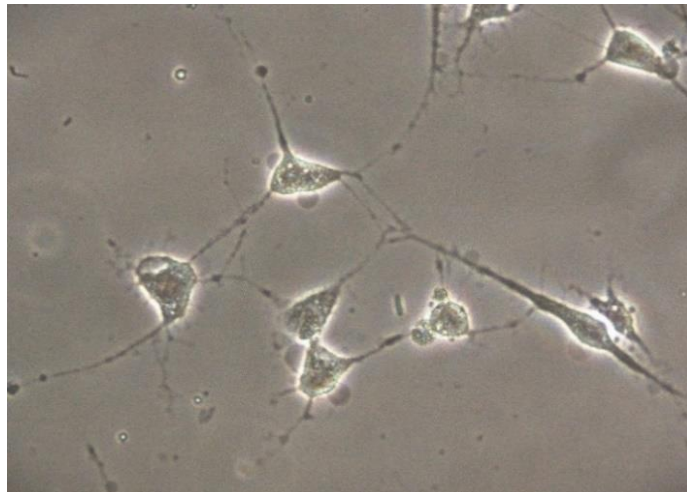
**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**

## TESIS DOCTORAL

Estudio de la implicación en la  
inmunomodulación y de la capacidad de  
transdiferenciación a neuronas de las células  
madre mesenquimales del tejido adiposo:  
Efecto del estrés oxidativo y el envejecimiento.  
Posible efecto neuroprotector en modelo de  
Parkinson



PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR, BIOMEDICINA E  
INVESTIGACIÓN CLÍNICA

RAFAEL MEDINA GUZMÁN

Sevilla, 2023





C / Profesor García González, 2.  
41012 Sevilla (España)  
Teléfono: 954557096

**Dra. Mercedes Cano Rodríguez**, Profesora Titular de la Universidad de Sevilla y **Dr. Sandro Argüelles Castilla**, Profesor Titular de la Universidad de Sevilla

**INFORMAN:**

Que **D. Rafael Medina Guzmán** ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral titulada **Estudio de la función inmunomoduladora y de la capacidad de transdiferenciación a neuronas de las células madre mesenquimales del tejido adiposo: Efecto del estrés oxidativo y el envejecimiento. Posible efecto neuroprotector en modelo de Parkinson**. Considerando que constituye trabajo de tesis doctoral, autorizamos su presentación para optar al título de Doctor.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente informe en Sevilla a 13 de enero de 2023.

**Fdo. Mercedes Cano Rodríguez**

**Fdo. Sandro Argüelles Castilla**



# AGRADECIMIENTOS

---



*“Caminante no hay camino, se hace camino al andar”*, esta frase representa gran parte de lo que ha constituido el camino para el desarrollo de esta tesis, en la que ha habido etapas muy duras y en el camino me he encontrado con grandes acompañantes, que me han apoyado y con los que he compartido todo tipo de momentos y aventuras, y a los que agradezco enormemente su contribución tanto laboral como personal.

Al inicio de la etapa, siendo un caminante inexperto coincidí con grandes corredores a los que debo hoy día el pensamiento científico y crítico necesario para desarrollar esta tarea a la que solo llamamos investigar, y que me dieron el empujón necesario para comenzar la aventura. A **Mercedes Cano**, por ser la guía y directora en este camino, no sólo en el plano laboral, sino también personal, y mostrarme la luz cuando se volvía oscuro. Durante el transcurso de la etapa, he podido tener la suerte de sumar a otro guía en mi camino, a **Sandro Argüelles**, un gran sabio y al que me faltan calificativos para definir como persona y que, gracias a todos sus consejos personales y profesionales, he podido concluir esta tesis.

A **Antonio Ayala**, por hacerme formar parte del grupo de Bioquímica y sentirme uno más de ellos. A este grupo pertenece **Mario Muñoz**, al que agradezco que me haya introducido en las técnicas, tareas y el “cacharreo” de laboratorio, y que siempre me ha tratado con gran amabilidad y respeto, y del que tuve la inmensa suerte de aprender muchas de las cosas que aparecen en esta tesis.

En el grupo de Bioquímica doy las gracias a todos aquellos con los que he compartido laboratorio y que seguían sus propios caminos de tesis, como **Ale** y **Juan**, grandes compañeros que siempre tuvieron buenos gestos conmigo y me ayudaron siempre que les pregunté, al igual que las compañeras con las que inicié el trayecto, pero siguieron sus propias sendas, como **Leila** y **Vicky**. A **Irene** por ser tan comprensiva y aportarme otro punto de vista cuando se hizo el camino un poco cuesta arriba, y que, junto a **Rocío Martínez** y **Ana Espinosa**, me ayudaron con el maravilloso campo de la estereología. Y muchas gracias, en general, a todos los profesores del departamento por hacer posible tan buen ambiente de trabajo en el laboratorio, y a los compañeros con los que he

compartido tan buenos momentos en los últimos años como **Paco** o **Jesús**, y que estoy seguro que terminarán sus propios caminos coronándose con éxito.

De mis inicios en el departamento de Bioquímica, surgió grandes amistades con personas maravillosas con las que compartí glorias y penas durante gran parte de esta etapa, y de las que aprendí a tomarme la vida con más alegría y a adoptar un sentido “mindfulness”, ir cada día con motivación y trabajar dando el máximo todos los días, a pesar de las dificultades que presenta la vida y a las que nunca sabré como agradecerles con palabras todo lo que me aportaron en esta etapa. Muchísimas gracias **Marian** e **Isa**.

Muchas gracias también a **Luis**, **Manu** y **Maite**, por todos las risas y los buenos momentos que hemos disfrutado juntos, y por la amistad que nos une en la actualidad.

También he de agradecer a todos los miembros del Departamento de Fisiología, **Fátima**, **María José**, **Álvaro**, **Claudia**, **Lola**, ... por ayudarme cuando el presupuesto no alcanza y era necesario tomar prestado algunos aparatos o reactivos. A **Pablo García**, por ser tan amable y aparte de ayudarme en el laboratorio, poder sacar tiempo para echarme una mano con la gestión administrativa relacionada con la tesis. Con especial cariño agradezco al grupo de electrofisiología, **Livia**, **Ricardo** y **Pedro**, por darme la oportunidad de trabajar con ellos en un buen ambiente y poder aprender acerca de la técnica, cuyos resultados son relevantes en esta tesis.

No puedo olvidarme de la inestimable ayuda de muchas alumnas que han pasado tanto por el departamento de Bioquímica como el de Fisiología, y que, agradezco de corazón, la dedicación y la buena voluntad para realizar todas las tareas de laboratorio y ayudarme con los experimentos. Muchas gracias a **Alicia**, **Silvia**, **Alessandra** y **Marina**.

Un punto de inflexión en el camino de mi tesis apareció a mediados de la misma, y supuso la aparición de una senda paralela, que también aportó al desarrollo de esta tesis y en la que me sentí muy acogido gracias a **Miguel Burguillos** y la colaboración con **Cerevance**, que me ha dado la oportunidad de vivir nuevas experiencias y la posibilidad de conocer a gente que considero más que amigos, y ¡qué vida esta!, he pasado con ellos la mayor parte de horas del día a día estos últimos dos años, viviendo muy buenos y malos momentos como ocurre en toda familia, tanto dentro como fuera del trabajo, y a la que siempre llevaré en mi corazón. Muchísimas gracias al artífice **Miguel**, a la



encantadora **Edel**, a la maravillosa **Alicia**, a la sublime **Elena**, y a la empoderada **Jennifer (Bazhena)**. También agradecer a todos los miembros del CITIUS tanto de Biología, **Modesto, Laura, Cristina y Bruno**, como a los de Microscopía, **Asun, Juanlu, Cristina y Miguel**, por enseñarme a manejar una gran diversidad de aparatos y por aguantar las exigencias y mostrarse siempre dispuestos a ayudar a solventar de la mejor manera posible todos los obstáculos de laboratorio.

Pero todo este camino no ha podido ser recorrido sin las personas que me han aportado a lo largo de toda mi vida la experiencia desde el lado sentimental y motivacional, y son aquellos **amigos** de mi querido pueblo **Hinojos**, donde he podido conocer a **Enrique Mateos**, quien fue el que me inició y dejó la espinita de la investigación.

Curiosamente, he de agradecer al trabajo de laboratorio y sus respectivos fallos-errores, el crecimiento desde mi plano más sentimental, ya que me ha dado la posibilidad de conocer a una persona muy especial y que me acompañó en el último trayecto del camino de la tesis, que me sostuvo la mano y me aportó serenidad, temple y paciencia en momentos de mayor agobio, dándome un empujón cuando las piernas flojeaban y perdía la orientación, ayudándome a finalizar la etapa y a comenzar otras con la máxima ilusión. Muchas gracias **Marta** por ser como eres y demostrarme que, ante las dificultades previstas, la valentía, la persistencia y el presente resuelven el futuro más inmediato.

Muchas gracias a mi **familia**. Ellos conforman los pilares fundamentales de mi vida, los que me sostienen cuando lo necesito y que me han inculcado la cultura del trabajo, de la lucha día a día, el esfuerzo, el sacrificio y a no dar nada por perdido, y que, sin ellos, esta tesis no habría concluido. Me siento muy agradecido por toda la ayuda que siempre me han dado mis padres, **Paco y Candi**, por inculcarme el cariño, el respeto y la disciplina en mi vida diaria, y a mi hermano, **José Francisco**, por enseñarme tanto y demostrarle tan poco.

Con especial cariño y recuerdo a todos los familiares que no están presentes y a aquellos que comenzaron el camino conmigo, pero por desgracia me han soltado de la mano, y que estoy seguro estarán muy orgullosos de todo lo conseguido en esta aventura. Con

especial recuerdo a mis abuelas **Bárbara** y **Benedicta**, a mi abuelo **José María** y a mis tías **Lucrecia** y **Rafaela**.

El último agradecimiento va dirigido a todo lector que se interese por la presente Tesis, al que deseo que le agrade y disfrute. Muchas gracias.



# ÍNDICE

---



	Pág.
<b>RESUMEN DE LA TESIS.....</b>	21
<b>ABREVIATURAS.....</b>	25
<b>1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....</b>	31
<b>1.1. TIPOS DE CÉLULAS MADRE Y SU IMPORTANCIA BIOLÓGICA.....</b>	31
1.1.1. Definición y clasificación de las células madre.....	31
1.1.2. Células madre adultas mesenquimales. Caracterización y propiedades biológicas.....	34
<b>1.2. CAPACIDAD INMUNOMODULADORA DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....</b>	35
<b>1.3. CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN DE LAS MSC A CÉLULAS DE OTRA LÍNEA GERMINAL: LA TRANSDIFERENCIACIÓN.....</b>	38
1.3.1. Mecanismos moleculares implicados en la transdiferenciación de MSC a neuronas.....	39
1.3.2. Funcionalidad de las neuronas formadas a partir de ADSCs.....	41
<b>1.4. EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA EDAD EN LAS CÉLULAS MADRE.....</b>	43
1.4.1. Moléculas de importancia bioquímica en las MSC y las NSC.....	45
<b>1.5. UTILIDAD TERAPÉUTICA DE LAS CÉLULAS MADRE DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSO .....</b>	49
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	54
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	57
<b>3.1. APARATOS Y ANIMALES.....</b>	59
3.1.1. Aparatos.....	59
3.1.2. Animales.....	60
<b>3.2. METODOLOGÍA.....</b>	60

3.2.1. Obtención de la fracción vascular estromal (FVE) de tejido adiposo de rata.....	60
3.2.2. Cultivo, mantenimiento y extensión del cultivo de las células de la FVE de tejido adiposo de rata.....	61
3.2.3. Separación magnética de las rADSC mediante técnica MACS.....	61
3.2.4. Recuento celular.....	63
3.2.5. Congelación y descongelación de células.....	64
3.2.6. Pruebas de multipotencialidad de las rADSC.....	64
3.2.6.A Diferenciación y detección de adipocitos.....	64
3.2.6.B Diferenciación y detección de osteoblastos.....	65
3.2.7. Ensayos de fluorescencia para determinar la unión de LPS a rADSCs.....	66
3.2.8. Cultivo y formación de esferas a partir rADSC.....	66
3.2.9. Inducción de las esferas a células similares a neuronas.....	67
3.2.10. Inmunofluorescencia de células <i>in vitro</i> .....	67
3.2.10.A. Células madre derivadas del tejido adiposo.....	67
3.2.10.B. Neuroesferas.....	67
3.2.10.C. Células similares a neuronas.....	68
3.2.11. Análisis de la fluorescencia en imágenes obtenidas en microscopio confocal.....	69
3.2.12. Experimentos de electrofisiología.....	69
3.2.12.A. Preparación de micropipetas/microelectrodos de patch-clamp.....	69
3.2.12.B. Registros electrofisiológicos de <i>patch-clamp</i> en la configuración de célula entera.....	70

3.2.12.C. Registros en fijación de corriente y análisis.....	72
3.2.13. Modelo de estrés oxidativo <i>in vitro</i> en las rADSC empleando hidroperóxido de cumeno...	74
3.2.14. Aislamiento y cuantificación de proteínas.....	75
3.2.15. Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS- PAGE)-Western Blot.....	75
3.2.16. Inducción del modelo de hemiparkinsonismo con 6- Hidroxidopamina.....	78
3.2.17. Test de rotación.....	78
3.2.18. Perfusión, congelación y cortes histológicos.....	79
3.2.19. Inmunohistoquímica de los cortes de tejido cerebral de substantia nigra.....	79
3.2.20. Análisis estereológico de células TH+ en <i>substantia nigra</i> .....	80
3.2.21. Recuento de microglia activa en la <i>substantia nigra</i> .....	81
3.2.22. Análisis estadístico.....	81
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>82</b>
<b>4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSO....</b>	<b>84</b>
4.1.1. Obtención de rADSC.....	84
4.1.2. Capacidad de diferenciación multipotente de las rADSC.....	85
<b>4.2. IMPLICACIÓN DEL TLR4 EN EL PAPEL INMUNOMODULADOR DE LAS rADSC.....</b>	<b>86</b>
4.2.1. Capacidad de captación del lipopolisacárido por las rADSC.....	87
4.2.2. Expresión de receptor TLR4 en las rADSC.....	90
<b>4.3. CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN DE rADSC A CÉLULAS MADRE NEURONALES Y CÉLULAS SIMILARES A NEURONAS.....</b>	<b>93</b>
4.3.1. Formación y detección de células madre neurales o neuroesferas.....	93



4.3.2. Formación y detección de células similares a neuronas.....	95
4.3.3 Características electrofisiológicas de las células similares a neuronas derivadas de las rADSCs.....	97
<b>4.4. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA EDAD SOBRE MOLÉCULAS IMPLICADAS EN RUTAS BIOQUÍMICAS ASOCIADAS A LA INMUNOMODULACIÓN, SUPERVIVENCIA Y TRANSDIFERENCIACIÓN DE LAS rADSC.....</b>	<b>100</b>
4.4.1. Efecto del estrés oxidativo sobre el TLR4 de las rADSC .....	100
4.4.2. Efecto del estrés oxidativo y la edad sobre SOX2 .....	102
4.4.3 Efecto del estrés oxidativo y la edad sobre eEF2 y sirt1 .....	105
<b>4.5. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> CON rADSC EN MODELO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON EN RATA.....</b>	<b>111</b>
4.5.1. Estudio de las funciones motoras mediante el uso del test de rotación.....	112
4.5.2. Análisis estereológico para cuantificación de neuronas dopaminérgicas tras la implantación de rADSC.....	113
4.5.3. Análisis del número de microglia activa tras la terapia con rADSC.....	116
<b>5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS.....</b>	<b>118</b>
<b>5.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DEL TEJIDO ADIPOSO DE RATA .....</b>	<b>120</b>
<b>5.2. IMPLICACIÓN DE TLR4 EN LA FUNCIÓN INMUNOMODULADORA DE LAS rADSC.....</b>	<b>122</b>
<b>5.3. DIFERENCIACIÓN DE LAS rADSC A CÉLULAS MADRE NEURALES Y CÉLULAS SIMILARES A NEURONAS.....</b>	<b>125</b>
<b>5.4. EFECTO DEL EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA EDAD EN MOLÉCULAS IMPLICADAS EN RUTAS BIOQUÍMICAS ASOCIADAS A LA INMUNOMODULACIÓN, SUPERVIVENCIA Y TRANSDIFERENCIACIÓN DE LAS rADSC .....</b>	<b>130</b>

5.5 ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> CON rADSC EN MODELO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON EN RATA.....	137
6. CONCLUSIONES.....	140
7. BIBLIOGRAFÍA.....	145

# RESUMEN DE LA TESIS

---



Las células madre se definen como las unidades de organización de sistemas biológicos encargadas del desarrollo y la regeneración de los tejidos y los órganos. Estas células forman poblaciones clonales con la capacidad de autorenovarse y diferenciarse a múltiples líneas celulares. Estas características hacen que las células madre sean estudiadas y empleadas cada vez con más frecuencia en el campo de la ingeniería tisular.

Las células madre derivadas del tejido adiposo (ADSC) constituyen una población de células madre mesenquimales (MSC) multipotentes aisladas del tejido adiposo adulto de fácil obtención que resultan de gran interés para la terapia celular, y por lo tanto es necesario el estudio de condiciones adversas, como el estrés oxidativo y el envejecimiento, ya que podrían verse afectadas las características terapéuticas de estas células. Las ADSC tienen la capacidad de diferenciarse a células del linaje mesodermal según los criterios establecidos por la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT), pero también se ha demostrado la habilidad para generar células madre neurales (NSC), que pertenecen al linaje ectodérmico, en un proceso conocido como transdiferenciación. Otro aspecto de interés terapéutico de las ADSC es su capacidad inmunomoduladora ante un daño, adoptando un fenotipo proinflamatorio o antiinflamatorio dependiendo del ambiente inflamatorio en el que se encuentren. El objetivo general de esta tesis es estudiar la función inmunomoduladora y la capacidad de transdiferenciación a neuronas de las células madre mesenquimales del tejido adiposo. Además, se pretende analizar como condiciones adversas como altos niveles de estrés oxidativo y el envejecimiento pueden alterar la funcionalidad de las ADSC.

En esta tesis, después de caracterizar a las ADSC según los criterios de la ISCT, se muestra como el LPS modula de la expresión de receptores Toll-like-4 (TLR4, receptor asociado con la capacidad inmunomoduladora de las ADSC que participa en la respuesta proinflamatoria). Además, se muestra como las NSC son capaces de generar células similares a neuronas que presentan características propias de neuronas como su fenotipo, marcadores de neuronas inmaduras y maduras, y propiedades electrofisiológicas. Otro aspecto importante abordado en esta tesis es el posible efecto del estrés oxidativo y la edad en las ADSC y en el proceso de transdiferenciación a NSC, en base a la expresión de SOX2, como factor de transcripción involucrado en la

autorrenovación y mantenimiento del estado multipotente de las células, al factor de elongación 2 (eEF2), que es un factor que interviene en la síntesis proteica, que es el proceso metabólico que mayor energía consume en las células, Sirt1, que es una proteína implicada en la regulación de la expresión de proteínas antioxidantes y en la supervivencia de las células y en TLR4.

Por último, en un modelo de Parkinson inducido por estrés oxidativo a corto y largo plazo tratadas con ADSC mediante trasplantes homólogos, como no se ha reportado anteriormente, y se muestra el interesante potencial neuroprotector de las ADSC y las mejoras motoras a largo plazo y el efecto inmunosupresor de la microglía a corto plazo, arrojando un papel relevante de las ADSC en la terapia celular.

# ABREVIATURAS

---





**6-OHDA** → *6-hydroxydopamine*. 6-Hidroxidopamina

**ADSCs** → *Adipose derived stem cells*. Células madre derivadas del tejido adiposo

**BDNF** → *Brain Derived Neurotrophic Factor*. Factor neurotrófico derivado de cerebro

**BMMSC** → *Bone Marrow Mesenchymal Stem cells*. Células madre mesenquimales de la médula ósea

**CAT** → *Catalase*. Catalasa

**ChAT** → *Choline Acetyl-Transferase*. Acetil-colina tranferasa

**CTCF** → *Corrected Total Cell Fluorescence*. Fluorescencia de la célula total corregida

**CXCL** → *Chemokine (C-X-C motif) ligand*. Ligando quimoquina (motivo C-X-C)

**DAB** → *Diaminobenzidine*. Diaminobencidina

**DAMP** → *Damage-associated molecular pattern*. Patrón molecular asociado a daño

**DC** → *Dendritic cells*. Células dendríticas

**DMEM** → *Dulbecco's Modified Eagle Medium*. Medio de cultivo basal

**Dkk-1** → *Dickkopf 1 WNT signaling pathway inhibitor*. Inhibidor Dickkopf1 de la vía de WNT

**DMSO** → Dimetilsulfóxido

**DPX** → *Distyrene-plasticiser-xylene*

**EDTA** → *Ethylenediaminetetraacetic acid*. Ácido etilendiaminotetraacético

**eEF2** → *eucariotic Elongation Factor 2*. Factor de elongación eucariota 2

**EGTA** → *Ethyleneglycoltetraacetic acid*. Ácido etilenglicoltetraacético

**EGF** → *Epidermal Growth Factor*. Factor de crecimiento epidermal

**ERK1/2** → *Extracellular signal-regulated kinases*. Kinasas reguladas por señales extracelulares

**ESCs** → *Embryonic Stem Cells*. Células madre embrionarias

**EV** → *Extracellular vesicles*. Vesículas extracelulares

**FBS** → *Fetal Bovine Serum*. Suero bovino fetal

**FGF** → *Fibroblast Growth Factor*. Factor de crecimiento de fibroblasto

**FITC** → *Fluorescein IsoTyoCyanate*. Fluoresceína Isotiocianato

**FVE** → Fracción vascular estromal

**GFAP** → *Glial fibrillary acidic protein*. Proteína ácida fibrilar glial

**GSH-Px** → *Glutathione Peroxidase*. Glutación peroxidasa

**GSK3β** → *Glycogen synthase kinase 3 β*. Kinasa 3 β de la glicógeno sintasa

**GVDH** → *Graft versus host disease*. Enfermedad de injerto contra el huésped

**HC** → Hidroperóxido de cumeno

**HSP** → *Heat Shock protein*. Proteína de choque térmico

**IFNγ** → Interferon gamma

**iPSCs** → *induced Pluripotent Stem Cells*. Células madre pluripotentes inducidas

**ISCT** → *International Society for Cell Therapy*. Sociedad Internacional para la Terapia Celular

**Klf4** → *Kruppel-like factor 4*. Factor Kruppel-like 4.

**LPS** → Lipopolisacáridos

**MACS** → *Magnetic-activated cell sorting*. Clasificación de células activadas magnéticamente

**MAP2** → *Microtubule-associated protein 2*. Proteína asociada a microtúbulos

**MCP1** → *Monocytes chemoattractant protein 1*. Proteína quimioatrayente de monocitos 1

**MMP** → *Matrix metalloproteinase*. Metaloproteínasa de la matriz extracelular

**MPTP** → *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*. 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

**MSCs** → *Mesenchymal stem cells*. Células madre mesenquimales

**mTOR** → *mammalian Target of Rapamycin*. Diana de la Rapamicina en células de mamíferos

**NADPH** → *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*. Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato

**NeuN** → *Neuronal Nuclei*. Marcador neuronal

**NFκβ** → *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*. Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**NLC** → *Neuron-like cell*. Célula similar a neurona

**Nox** → *NADPH oxidase*. Enzima NADPH oxidasa

**Nrf2** → *Nuclear factor-erythroid 2 related factor 2*. Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2.

**NSC** → *Neural stem cells*. Células madre neurales

**OCT3/4** → *Octamer-Binding Transcription Factor*. Factor de Transcripción de unión a Octámero

**PAF** → Paraformaldehído

**PAGE** → *Polyacrylamide gel electrophoresis*. Gel de poliacrilamida para electroforesis

**PAMP** → *Pathogen-associated molecular pattern*. Patrón molecular asociado a patógeno

**PBS** → *Phosphate buffered saline*. Tampón fosfato salino

**PD** → *Parkinson Disease*. Enfermedad de Parkinson

**RIPA** → *Radioimmunoprecipitation assay buffer*. Tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación

**ROS** → *Reactive oxygen species*. Especies reactivas de oxígeno

**RNS** → *Reactive nitrogen species*. Especies reactivas de nitrógeno

**RPM** → Rotaciones por minuto

**SDS** → *Sodium dodecil sulfate*

**Sirt1** → *Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1*. Sirtuina ( Homólogo del silenciamiento por emparejamiento de la regulación de la información 2) 1

**SN** → *Substantia nigra*

**SOD** → *Superoxide dismutase*. Superóxido dismutasa

**SOX2** → *Sex determining region Y-Box 2*. Factor de transcripción 2 de caja SRY

**TEMED** → *Tetramethylethylenediamine*

**TGF $\beta$**  → *Tumor growth factor  $\beta$* . Factor de crecimiento tumoral  $\beta$

**TH** → *Tyrosine hydroxylase*. Tirosina hidroxilasa

**TIMP1** → *Tissue inhibitor of metalloproteinases*. Inhibidor de metaloproteinasas del tejido

**TLR4** → *Toll-like receptor*. Receptores toll-like 4

**TNF- $\alpha$**  → *Tumor necrosis factor  $\alpha$* . Factor de necrosis tumoral

**TTX** → *Tetrodotoxin*. Tetrodotoxina

**VSEL** → *Very Small embryonic-like stem cells*. Células madre muy pequeñas similares a células embrionarias

**Wnt** → *Wingless-related integration site*. Sitio de integración relacionado con Wingless

# 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

### 1.1. TIPOS DE CÉLULAS MADRE Y SU IMPORTANCIA BIOLÓGICA.

Las células madre se definen como las unidades de organización de sistemas biológicos encargadas del desarrollo y la regeneración de los tejidos y los órganos. Estas células forman poblaciones clonales con la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse a múltiples líneas celulares (Bacakova et al., 2018; Dulak et al., 2015). Estas características hacen que las células madre sean estudiadas y empleadas cada vez con más frecuencia en el campo de la ingeniería tisular y en terapia celular asociadas a enfermedades degenerativas, tumores o traumas (Squillaro et al., 2016; Trounson & McDonald, 2015).

#### 1.1.1. Definición y clasificación de las células madre.

En los mamíferos, las células madre se clasifican generalmente según el potencial que presentan para diferenciarse en los diferentes tipos celulares, clasificándose en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes (Fig.1). El mayor grado de potencialidad conocido como "totipotencia" lo presenta el cigoto y los blastómeros conformados tras las primeras divisiones del cigoto, con la capacidad para desarrollar un organismo completo, y el tejido extraembrionario (Mitalipov & Wolf, 2009). La siguiente categoría la componen las células madre pluripotenciales, que pueden formar cualquier célula del cuerpo, es decir, son capaces de generar células progenitoras de las tres líneas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) durante el desarrollo embrionario, pero no forman tejidos extraembrionarios como la placenta o el cordón umbilical. Estas células se localizan en la masa interna celular del blastocisto y se denominan células madre embrionarias (Embryonic Stem Cells, ESC). A esta categoría se suma las células madres pluripotenciales inducidas (Induced Pluripotent Stem Cell, iPSC), generadas en 2006 mediante la reprogramación nuclear de fibroblastos adultos de ratón a través de la sobreexpresión de cuatro factores de transcripción: OCT3/4, SOX2, c-Myc y Klf4 (Takahashi & Yamanaka, 2006), obteniendo células con un potencial similar a las ESC. Posteriormente, se consiguió generar las iPSC a partir de células somáticas humanas (Yu et al., 2007). Sin embargo, en los siguientes años con el avance de la epigenética y otros campos relacionados con la reprogramación nuclear, se identificaron ciertas diferencias sustanciales entre las iPSC y las ESC, como la limitación

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

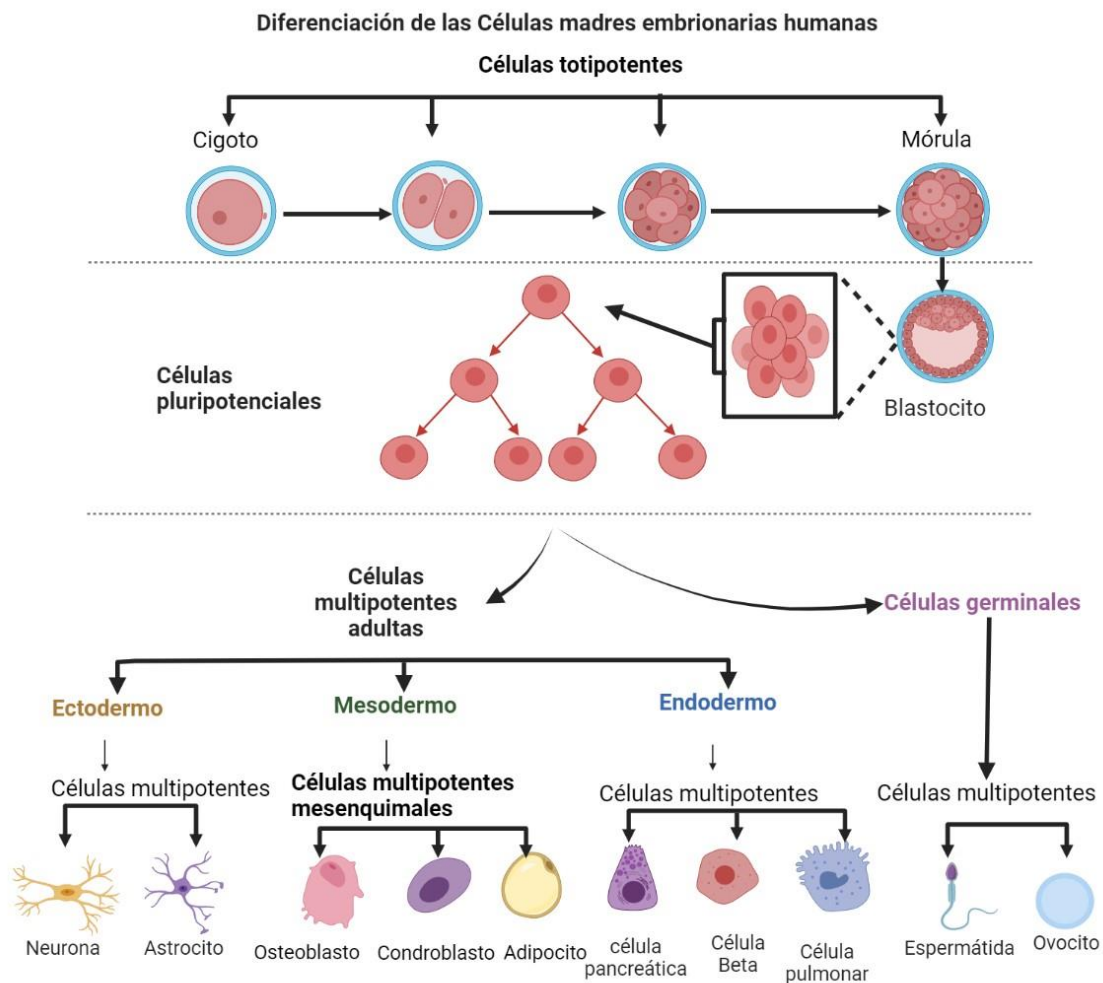
en la capacidad de diferenciación, debido a las diferentes técnicas de reprogramación genética para obtener las iPSC, que podrían repercutir en su uso en la investigación y terapias celulares (Bilic & Belmonte, 2012; Robinton & Daley, 2012).

Las células madres multipotentes se originan prácticamente en todos los tejidos del cuerpo humano, hallándose en órganos como la piel, el tejido adiposo, el músculo esquelético, la médula ósea o el cerebro y en fluidos corporales como la sangre y la orina (Bacakova et al., 2018b; Dulak et al., 2015; Mundra et al., 2013) . Estas células madre, al igual que otras células madre tienen capacidad para auto-renovarse, manteniéndose en un estado indiferenciado, o para diferenciarse a diversos tipos celulares relativos a una línea germinal *in vivo* y renovar células del órgano donde residen. En los últimos años se considera que las células madre adultas multipotentes no siguen una jerarquía definida, y dependen de los requerimientos del órgano donde se encuentran, pudiéndose establecer en algunas condiciones como células unipotentes con capacidad de generar un solo tipo de célula o mantener el estado multipotente tras la división celular (Clevers, 2015; Visvader & Clevers, 2016). Además, estas células madre mesenquimales presentan plasticidad y pueden diferenciarse en ciertas condiciones a células de otra línea germinal como puede ser a las de origen ectodérmico, por ejemplo, a células madre neurales o neuroesferas (Neural Stem Cells, NSC), neuronas y astrocitos y células de origen endodérmico como las células  $\beta$  pancreáticas. Esta plasticidad representa un potencial terapéutico para enfermedades neurodegenerativas o el tratamiento de la diabetes tipo I (Xiaodong Chen et al., 2018; Lou et al., 2021). De igual forma resulta interesante que algunos grupos de investigación han conseguido aislar en tejidos adultos de ratones y humanos una población cuyo fenotipo es parecido a las células madre embrionarias y que se han denominado como células muy pequeñas similares a células embrionarias (Very Small Embryonic-like stem cells, VSEL) con capacidad para diferenciarse a células de las tres capas germinales tanto *in vitro* como *in vivo* ), y que han dado resultados positivos en tratamientos de defectos óseos en modelos murinos (Havens et al., 2014; Leppik et al., 2020). Esta población de “células pluripotentes adultas” ha originado controversia entre grupos de investigación que cuestionan la propia nomenclatura, la caracterización de dichas células, los métodos de aislamiento, y su localización en los órganos, ya que las VSEL se han estudiado principalmente en la



# 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

población de células mononucleares derivadas de la médula ósea en ratones y ratas, postulándose como una población heterogénea de células multipotentes y unipotentes que podrían originar varios tipos celulares y se desconoce cómo se regularían en otros órganos, requiriéndose por ello, un criterio más unificado que identifique a esta población de células (Dulak et al., 2015; Suszynska et al., 2014).



**Figura 1. Esquema representativo de las diferentes tipologías de células madre.** Las células totipotentes comprenden aquellas células del cigoto y estadios tempranos del desarrollo embrionario con capacidad de generar tejido embrionario y extraembrionario. Las células pluripotenciales se hallan en el interior del blastocito y son capaces de dar origen a las células pertenecientes a cualquier línea germinal (ectodermo, mesodermo, endodermo y células germinales). Dentro de cada línea germinal se encuentran las células madre multipotentes, que pueden diferenciarse a células de esa línea germinal. En esta figura se representan algunos ejemplos de cada línea germinal, siendo la línea germinal mesodérmica la encargada de establecer células como osteoblastos, condroblastos y adipocitos. Figura realizada en *Biorender.com*

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

### 1.1.2. Células madre adultas mesenquimales. Caracterización y propiedades biológicas.

Las células madres de mayor interés en clínica son las denominadas células madre adultas multipotentes, situadas en diferentes órganos adultos maduros como el tejido adiposo, el líquido sinovial, el periostio, la dermis, y tejidos embrionarios, como el cordón umbilical, la placenta y el tejido amniótico ( Bacakova et al., 2018; Sobhani et al., 2017). Se piensa que podrían hallarse en todos los órganos del cuerpo humano asociadas a pericitos en la zona subendotelial estromal actuando como células reparadoras del tejido, sustituyendo a las células dañadas (Crisan et al., 2008; da Silva Meirelles et al., 2006). Debido a su localización en el estroma adulto derivado del mesénquima, las células se conocen también como células madres multipotentes mesenquimales o simplemente células madres mesenquimales (Mesenchymal stem cell, MSC) y en el humano adulto las poblaciones más consistentes se localizan en el tejido adiposo, la médula ósea, la pulpa dental y los folículos pilosos (Bacakova et al., 2018b; Morris et al., 2004; Zuk et al., 2002). Entre ellas destacan las células derivadas del tejido adiposo y de la médula ósea debido a los numerosos estudios y ensayos clínicos que se llevan a cabo en el campo de la medicina regenerativa en humanos.

Las MSCs se han aislado y expandido *in vitro* siguiendo una gran diversidad de métodos, por lo que en 2006 fue necesario que la Sociedad Internacional para Terapia Celular (ISCT) (Dominici *et al.*, 2006) estableciera unos criterios mínimos para definir a esta población celular:

- Adherencia al plástico en condiciones estándar de cultivo
- Expresión de marcadores de superficie: CD105<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup> y CD90<sup>+</sup> y ausencia de los marcadores de superficie CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup> o CD11b<sup>-</sup>, CD79alpha<sup>-</sup> o CD19<sup>-</sup> y HLA-DR<sup>-</sup>.
- Capacidad para diferenciarse *in vitro* a adipocitos, condroblastos y osteoblastos.

Las propiedades biológicas de estas células se han estudiado como base fundamental para el desarrollo de terapias celulares y de ingeniería tisular, destacando principalmente cuatro características: la diferenciación a varias líneas celulares, la secreción de factores solubles importantes para la supervivencia y proliferación celular,

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

la capacidad de modular la respuesta inmune y la migración al lugar del daño (Squillaro et al., 2016).

### 1.2. CAPACIDAD INMUNOMODULADORA DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSC)

Las MSCs presentan capacidad para modular la respuesta inmune, la cual es dependiente del ambiente inflamatorio donde se localicen y de las moléculas relativas a este proceso fisiológico. Esta propiedad se basa en la capacidad de las MSCs de interactuar a través del contacto célula-célula o por interacción paracrina con las células del sistema inmune presentes en el sitio del daño modulando la respuesta inmunológica (Galderisi & Giordano, 2014).

En relación a los factores secretados que regulan la respuesta inmune, las MSCs presentan capacidad inmunomoduladora mediante la interacción con las células de la respuesta inmune, como las células dendríticas (DC), las natural killer (NK) y los linfocitos B y T (Xiaodong Chen et al., 2018; Galderisi & Giordano, 2014; Lou et al., 2021). En general la actividad inmunomoduladora de las MSCs se basa en el “ambiente inflamatorio” donde se localicen, presentando un papel proinflamatorio cuando se encuentra en ambientes con baja concentración de citoquinas, como, por ejemplo, en fases tempranas de la inflamación donde las citoquinas TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  se encuentran en bajos niveles. En esta situación se ha comprobado el reclutamiento de neutrófilos al lugar del daño mediante moléculas liberadas por las MSC como IL-6 o IL-8, y de linfocitos mediante la atracción con quimoquinas (CXCL-9, CXCL-10 y CXCL-11) estimulando la respuesta inmune. Cuando la concentración de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  son muy elevadas, como ocurre en fases más tardías de la inflamación, las MSCs adoptan un papel inmunosupresor, a través de su interacción con los monocitos ligados a su polarización a un fenotipo de macrófago inmunosupresor, que libera IL-10 y favorece, a su vez, la actividad de los linfocitos T reguladores promoviendo la respuesta antiinflamatoria (Bernardo & Fibbe, 2013; Galderisi & Giordano, 2014) (Fig. 2).

En 2010, Waterman basándose en esta capacidad inmunomoduladora de las MSC, determinó dos fenotipos: el proinflamatorio (MSC1) y el anti-inflamatorio (MSC2). Los

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

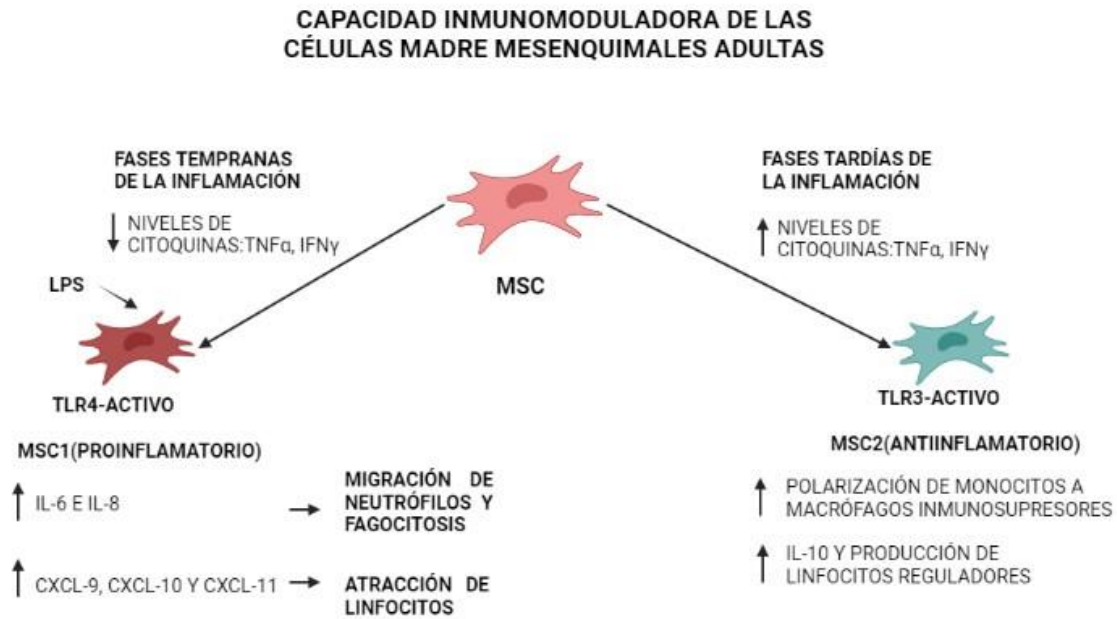
---

receptores Toll-like (TLR) 3 (TLR3) y 4 (TLR4) fueron propuestos en la hipótesis como los receptores responsables de determinar el fenotipo inmunomodulador de las MSC, estableciendo la activación de TLR3 por poly I:C en las MSCs como promotor del fenotipo anti-inflamatorio (MSC2) y la activación de TLR4 por lipopolisacáridos (LPS) como promotor del pro-inflamatorio (MSC1)(Waterman et al., 2010).

Los TLRs son glicoproteínas transmembrana de tipo I localizados en la superficie celular o en endosomas y reconocen patrones repetitivos, como patrones asociados al daño (Damage-associated molecular pattern, DAMPs) o patrones asociados a patógenos (phatogen-associated molecular pattern, PAMPs), y se encargan de llevar a cabo una respuesta sistémica que moviliza a las células inmunes innatas y adaptativas.

En las MSC, los TLRs intervienen en la respuesta a estrés inducida por el daño. Entre los agonistas de los TLRs se incluyen moléculas exógenas microbiales, como LPS, lipoproteínas o peptidoglicanos y moléculas endógenas como las proteínas de choque térmico (HSP) y moléculas de la matriz extracelular. La activación de los TLRs induce cambios en mecanismos de inmunomodulación, diferenciación, supervivencia y migración de las MSCs. En las células madre mesenquimales de tejido adiposo humano (Human adipose derived stem cell, hADSC), los TLRs que se encuentran en la membrana plasmática son el TLR1, TLR4, TLR5 y TLR6, mientras que los TLRs localizados en endosomas y lisosomas son TLR2, TLR3, TLR7 y TLR9 (Shirjang et al., 2017), en roedores se hallan desde TLR1 a TLR8, pero no TLR9 (Najar et al., 2017).

# 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES



**Figura 2. Esquema de la capacidad inmunomoduladora de las MSC.** En fases tempranas de la inflamación, las MSC adquieren un estado proinflamatorio tras la activación de TLR4, favoreciendo la migración y la respuesta inmune llevada a cabo por los neutrófilos y linfocitos. En fases tardías de la inflamación, la elevada concentración de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  provoca la producción de IL10 por macrófagos y monocitos, inhibiendo la producción de citoquinas proinflamatorias, y aumenta la actividad de los linfocitos reguladores. Figura realizada en *Biorender.com*

Resulta de gran interés como se ven afectados los diversos procesos celulares en los que interviene el TLR4 de las ADSC en condiciones de inflamación y estrés oxidativo. El origen de las ADSC también supone diferencias en el papel de TLR4, ya que en ADSC humanas un fenotipo proinflamatorio, incrementa la capacidad de diferenciación a osteocitos, promueve la migración al sitio de la lesión y aumenta la supervivencia frente al estrés oxidativo en el tejido dañado. En las ADSC de ratones, el TLR4 en cambio induce la diferenciación adipogénica tras su activación e inhibe la osteogénesis, tiene un efecto menor en la migración hacia el sitio del daño y protege a las MSC de la apoptosis inducida por el estrés oxidativo. En un estudio, se propone un mecanismo de protección frente al estrés oxidativo causado tras la activación de TLR4, y demuestran que la inyección de ADSC junto a un trasplante de grasa mejora su supervivencia a través de la inmunomodulación. Las especies reactivas de oxígeno (del inglés Reactive oxygen

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

especies, ROS) y la respuesta inflamatoria estimulan la cascada liderada por TLR4 en ADSC y la posterior activación de NFκβ que se transloca al núcleo e induce la producción de citoquinas proinflamatorias y la generación de ROS por las enzimas NADPH oxidasa (NADPH oxidase, NOX). En este modelo, el factor relacionado con el factor eritroide nuclear 2 (Nrf2) actúa como regulador de la vía iniciada por TLR4, y promueve la producción de enzimas antioxidantes e inhibe la señalización por NFκβ y la consecuente respuesta inflamatoria (Chen et al., 2016).

El efecto protector de las ADSCs también se ha estudiado en procesos de neuroinflamación, de gran relevancia en enfermedades neurodegenerativas. Las ADSC y las vesículas extracelulares (EV) producidas por éstas, son capaces de modular a la microglia. Se ha demostrado que en cocultivos de microglia activa humana con ADSC y sus EVs, las ADSCs inhiben la liberación de factores proinflamatorios por parte de la microglia activa como IL-6, IL-8 y MCP-1, a la vez que las EV estimulan la producción de factores antiinflamatorios como la IL-10 o TIMP-1 (García-Contreras & Thakor, 2021). En un estudio *in vivo* con un modelo neuroinflamatorio de Parkinson, donde se inyectó LPS en la *substantia nigra* se obtuvieron resultados muy interesantes acerca del efecto inmunomodulador de las ADSCs, ya que mostró una menor presencia de microglia activada en los animales que fueron trasplantados con rADSCs (Muñoz et al., 2019).

En base a sus características, las ADSCs presentan una mayor capacidad inmunomoduladora en comparación con otras MSCs (Ceccarelli et al., 2020), pero todavía es necesaria más investigación para determinar su potencial aplicación clínica en enfermedades asociadas a procesos inflamatorios.

### 1.3. CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN DE LAS MSC A CÉLULAS DE OTRA LÍNEA GERMINAL: LA TRANSDIFERENCIACIÓN.

La capacidad de diferenciación de las MSCs derivadas de médula ósea o tejido adiposo no solo está restringida al linaje mesodermal sino que es posible generar células relativas a otras líneas del desarrollo embrionario a través de un proceso conocido como transdiferenciación, como por ejemplo, hacia células madre neurales (NSC) del linaje ectodérmico originadas a partir de hADSC (Anghileri et al., 2008) o células similares a

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

hepatocitos a partir de MSC derivadas de la médula ósea (Kuo et al., 2008; Muñoz et al., 2018), demostrando cierta capacidad pluripotencial en estas células. También queda demostrada su capacidad de diferenciación a diferentes linajes celulares inyectándolas directamente en el organismo para la reparación de tejidos dañados como, por ejemplo, el hígado, el riñón o el páncreas en modelos animales o para la mejora articular de la rodilla en casos de osteoartritis en humanos (Galderisi & Giordano, 2014; Jo et al., 2017; Orozco et al., 2014).

### 1.3.1. Mecanismos moleculares implicados en la transdiferenciación de MSC a neuronas.

La transdiferenciación de MSC a NSC se ha realizado principalmente *in vitro* mediante el empleo de distintos factores de inducción como los factores de crecimiento y citoquinas, hormonas, factores de transcripción o pequeñas moléculas asociadas con la epigenética, donde se ha estudiado factores que se activan en este proceso como las vías de Wnt/FGF, Notch y TGF- $\beta$  (Luo et al., 2018).

La generación de neuronas a partir de las MSC requiere el proceso de transdiferenciación, ya que implica que las MSC, con potencial multipotente en el linaje mesodérmico, se diferencien hacia células madre neurales (NSC) multipotentes que pertenecen al linaje ectodérmico, y a partir de ella a células neurales como neuronas, oligodendrocitos, células de Schwann o astrocitos (Luo et al., 2018). Las células similares a neuronas se han conseguido tanto de la población de MSC del tejido adiposo humano como de las células obtenidas de la fracción vascular estromal (FVE) (Anghileri et al., 2008; Faustini et al., 2010; Petersen, Zenchak, Lossia & Hochgeschwender, 2018).

El grupo de factores transcripcionales implicados en la autorrenovación de las ESC y de las MSCs, también se han visto implicados en la proliferación, mantenimiento y diferenciación de las NSC. Durante el desarrollo embrionario, SOX2, Oct4 y Nanog mantienen la pluripotencialidad de las ESC, pero también se ha observado que intervienen en definir el linaje germinal. SOX2 actúa como promotor del linaje neuroectodérmico, mientras que Oct4 y Nanog participan en la especificación del linaje

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

mesodérmico, estableciéndose SOX2 como un factor clave en la regulación de la iniciación y diferenciación neural de las células madres neurales (S. Zhang & Cui, 2014).

Por otro lado, SOX2 también juega un papel importante en la conservación de las propiedades de las células madre neurales tanto *in vitro* como *in vivo*. SOX2 tiene una expresión elevada en las NSC para mantener su capacidad de proliferación, que disminuye tras la diferenciación post-mitótica a neuronas o células gliales (Cavallaro et al., 2008; S. Zhang & Cui, 2014). Sin embargo, SOX2 parece tener especial relevancia en la diferenciación, ya que *in vitro* se ha demostrado que las células con deficiencias de SOX2 presentan una arborización reducida y no muestran marcadores de neuronas maduras como MAP2, NeuN o Calretinin. Estos defectos pueden ser recuperados tras la transfección de lentivirus portadores de SOX2 en estados iniciales (proliferativos) pero no en estados tardíos (post-mitóticos) de la diferenciación. Las células deficientes de SOX2 coexpresan tanto marcadores de diferenciación neurales ( $\beta$ -tubulina) como marcadores de diferenciación gliales (GFAP). La administración ectópica de SOX2 en las células deficientes, reprime la expresión de GFAP, por lo que actúa como represor de la diferenciación hacia las células gliales en las NSC. Por otra parte, en los experimentos *in vivo* la deficiencia de SOX2 se traduce en la reducción del número de neuronas GABAérgicas en la corteza de ratones neonatos y en el bulbo olfatorio de ratones adultos, mostrando anormalidades en la morfología y la migración (Cavallaro et al., 2008).

En terapia celular hay ejemplos de tratamiento con NSC transdiferenciadas *in vitro* a partir de MSC humanas con resultados significativamente positivos en modelos murinos de isquemia cerebral, en los cuales se recupera la funcionalidad cerebral tras el daño isquémico (Heo et al., 2013). En modelos de enfermedad neurodegenerativa como el Parkinson, se han observado diferencias en los efectos producidos según el método empleado para cultivar las MSCs humanas. Así, la inyección de neuroesferas formadas a partir de las MSC, no mejora ni los síntomas funcionales ni motores, en cambio sí se observa una mejora en los síntomas motores cuando se inyectan MSC inducidas cultivadas en monocapa (Berg et al., 2015).

La transdiferenciación *in vitro* presenta ciertas desventajas para su uso en terapias de enfermedades neurodegenerativas como la escasa supervivencia y la incapacidad de



## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

proliferación de las neuronas maduras, por lo que supone un inconveniente para el posterior trasplante *in vivo*. Por ello, la estrategia alternativa para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas es la transdiferenciación *in vivo*, que persigue la conversión directa a neuronas en el paciente. En este sentido, se ha conseguido generar neuronas empleando técnicas como la inyección de fibroblastos o astrocitos inducibles reprogramados genéticamente una vez trasplantadas en el cerebro (Mollinari et al., 2018), o inyectando ADSC directamente en zonas cerebrales como la *substancia nigra*, donde se diferenciaron a neuronas dopaminérgicas (Muñoz et al., 2018; Muñoz et al., 2019). Sin embargo, en estos trabajos no se determina la funcionalidad de las neuronas diferenciadas a partir de las ADSC, siendo preciso una mayor investigación sobre la capacidad de diferenciación de las ADSC a neuronas funcionales.

### 1.3.2. Funcionalidad de las neuronas formadas a partir de ADSCs

La electrofisiología es esencial en la determinación de las propiedades biológicas de las neuronas. Este campo comprende el estudio de las propiedades eléctricas como los cambios de voltaje y las corrientes iónicas que tienen lugar en las células o en órganos completos.

En una publicación se reunieron los trabajos científicos enfocados en la diferenciación de las MSC a neuronas y los cambios en características particulares (principalmente morfología, expresión de ARNm y proteínas), propiedades electrofisiológicas y las funciones sinápticas (J. Liu et al., 2012). En relación con las propiedades electrofisiológicas de las MSCs previas a la diferenciación neurogénica, los estudios con MSCs en ratas y humanos aisladas de la médula ósea y cordón umbilical registraron diferentes corrientes de salida y de entrada  $K^+$ , canales de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  o corrientes rectificadoras de  $K^+$ , pero en ninguno de los estudios se observó los característicos canales dependientes de voltaje de  $Na^+$  necesarios para producir potenciales de acción.

En las MSC sometidas a la diferenciación neuronal, la revisión de Liu et al. recoge los cambios morfológicos en las células, que presentan aspectos morfológicos característicos de neuronas como cuerpos celulares refractivos y la presencia de múltiples prolongaciones, así como la expresión de marcadores específicos neuronales

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

como Nestina o MAP2. En el ámbito de la electrofisiología, las neuronas obtenidas por métodos de inducción con reactivos químicos, factores de crecimiento, transfección o co-cultivos con neuronas granulares del cerebelo reportaron cambios respecto a las MSC no diferenciadas en el potencial de membrana en reposo, el incremento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ , y la aparición de corrientes dependientes de voltaje, pero no se llegaron a registrar potenciales de acción (J. Liu et al., 2012). Resulta de gran interés el estudio realizado con co-cultivos con neuronas granulares del cerebelo, en el que las neuronas derivadas de las MSC son sensibles a neurotransmisores como GABA, glicina, serotonina o glutamato, así como también el disparo de potencial de acción de un solo pico (Wislet-Gendebien et al., 2005). Sin embargo, esta publicación solo agrupa los estudios realizados con MSC derivadas de médula ósea y cordón umbilical, pero no de aquellas derivadas del tejido adiposo.

En un estudio se realizó una comparativa entre las MSCs derivadas de la médula ósea y del tejido adiposo de ratas, en la que destacó las ventajas de la población derivada del tejido adiposo. Estas células presentaban mayor capacidad proliferativa, y las neuroesferas derivadas tenían una mayor capacidad de expansión y diferenciación que aquellas derivadas de la médula ósea. Las neuronas derivadas de las ADSC presentaron mayor cantidad de marcadores neurales como el factor de crecimiento de nervio (NGF) o el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) que las neuronas derivadas de células madre mesenquimales de médula ósea (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSC). Las neuronas derivadas de ambas poblaciones de MSC presentaban marcadores de astrocitos (GFAP), neuronas inmaduras ( $\beta$ -tubulina III), neuronas maduras (MAP2) y de células precursoras de oligodendrocitos (GalC) (H. T. Zhang et al., 2012). En otro estudio más reciente, donde se comparan distintos medios de inducción neural en MSC derivadas de tejido adiposo humano, se reportó la expresión de marcadores neurales colinérgicos (ChAT) y dopaminérgicos (TH) en las neuronas obtenidas tras la diferenciación (Marei et al., 2018). No obstante, en ambos estudios no se registraron las propiedades electrofisiológicas de las células neurales obtenidas de dichas MSC.

De los artículos publicados donde se indagó en la electrofisiología de las ADSC destaca el trabajo realizado por Anghileri et al. en 2008, en el cual a partir de ADSC humanas

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

obtuvieron células similares a neuronas empleando un medio de diferenciación con BDNF y ácido retinoico, donde la morfología y la inmunocitoquímica revelaron características neurales como la forma elongada con protusiones con dos o tres procesos celulares, o la presencia de marcadores neurales de neuronas inmaduras como nestina o de neuronas maduras como el receptor GABA de neuronas GABAérgicas o la tirosin-hidroxilasa de neuronas dopaminérgicas, así como la ausencia de marcadores gliales. La electrofisiología de dichas neuronas resultó en la presencia de corrientes rectificadoras de  $K^+$  y corrientes de  $Na^+$  sensibles a TTX, lo que indica cierta actividad similar a la de las neuronas, aunque no se pudieron detectar potenciales de acción (Anghileri et al., 2008).

### 1.4. EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA EDAD EN LAS CÉLULAS MADRE

Las capacidades de proliferación y diferenciación de las células madre mesenquimales (MSC) se comprometen con la edad y con el estrés oxidativo, lo cual podría afectar la eficacia de la terapia celular. Por ello, es de especial importancia investigar acerca del contexto biológico en el que estas se encuentren para estimar su posible uso clínico.

El estrés oxidativo se define como el efecto producido por el desbalance entre la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS) y de nitrógeno (Reactive Nitrogen species, RNS) en células y tejidos, y la capacidad de los sistemas biológicos para detoxificar estos productos reactivos (Finkel & Holbrook, 2000; Liguori et al., 2018; Pizzino et al., 2017).

Las ROS se producen mediante procesos endógenos y exógenos. Los procesos endógenos se podrían clasificar según la procedencia, distinguiéndose entre reacciones enzimáticas o no enzimáticas. Las reacciones no enzimáticas incluyen aquellas donde el oxígeno reacciona con moléculas orgánicas o cuando las células se exponen a radiaciones ionizantes. Sin embargo, la fuente principal de ROS son las reacciones enzimáticas, y más concretamente el intercambio de electrones producidos durante la respiración celular de las mitocondrias, donde del complejo I (NADH-deshidrogenasa) y el complejo III (ubiquinona- citocromo c reductasa) serían los generadores fundamentales. En la respiración celular, la coenzima Q recibe electrones del complejo

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

I y los cede al citocromo c mediante la acción del complejo III. La coenzima Q presenta un estado intermedio con un electrón desapareado ( $\cdot Q^-$ ) que puede ser cedido a las moléculas de oxígeno, formando radicales superóxidos ( $\cdot O_2$ ) (Finkel & Holbrook, 2000). En el citosol, el radical superóxido se forma a través de enzimas como las NADPH oxidasas, las xantinas oxidasas o las peroxidasas. Este radical libre puede ser dismutado a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por la enzima superóxido dismutasa (SOD). El  $H_2O_2$  no se considera un radical libre al no tener electrón desapareado, pero su interacción con el  $\cdot O_2$  en reacciones como la de Fenton, produce iones hidroxilo ( $\cdot OH$ ) que es el radical libre más reactivo que interactúa con los fosfolípidos de las membranas celulares y con proteínas (Liguori et al., 2018).

En cuanto a las especies reactivas de nitrógeno, éstas derivan de las moléculas de óxido nítrico (NO) sintetizadas *in vivo* por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), formándose moléculas como el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) en la reacción con peróxido de hidrógeno, el dióxido nítrico ( $NO_2^-$ ) o el nitrosil ( $NO^+$ ). El óxido nítrico se considera un radical libre por sus características, pero la reactividad con las moléculas biológicas es baja debido a su capacidad de difusión como gas y la consecuente inactivación por la hemoglobina (Pourova et al., 2010). Los radicales libres son contrarrestados por mecanismos celulares antioxidantes enzimáticos o no enzimáticos. La defensa primordial la componen la enzima superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), que descompone el  $H_2O_2$  en moléculas de agua y oxígeno, y la Glutación peroxidasa (GSH-Px) que transforman radicales hidroxilos y peróxidos a formas no tóxicas mediante la oxidación del glutatión. Entre las moléculas antioxidantes no enzimáticas se encuentra el  $\alpha$ -tocoferol, las vitaminas A y C, o el  $\beta$ -caroteno entre otras.

En condiciones fisiológicas, un nivel bajo de ROS es esencial para procesos biológicos como la fosforilación de proteínas, la activación de varios factores de transcripción, la apoptosis, la inmunidad o la diferenciación. Sin embargo, niveles altos resultan perjudiciales y provoca daños en biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, que puede ser cuantificados a través de diversos biomarcadores y que resultan de gran interés para la clínica (Frijhoff et al., 2015). Estos altos niveles de ROS se traduce en la aparición y desarrollo de diversas enfermedades, como diabetes y enfermedades cardiovasculares o metabólicas entre otras (Pizzino et al., 2017).

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

Ligado al daño producido por las especies oxidativas surgió en los años 50s una teoría del estrés oxidativo propuesta por Harman, y que ha sido revisada continuamente, que plantea la hipótesis de la pérdida de funcionalidad con el envejecimiento debida a la acumulación de daño estructural oxidativo debido al efecto de las ROS y las NOS en las macromoléculas (ADN, lípidos, proteínas, ...)(Viña et al., 2013).

Hay varios trabajos que detallan los efectos de las ROS, las NOS y el envejecimiento sobre las MSC, como son la disminución de la capacidad de autorrenovación, el aumento de la senescencia celular, la potenciación de la diferenciación hacia adipocitos, la reducción de la diferenciación hacia osteoblastos y la inhibición de la capacidad inmunomoduladora de las MSC (Denu & Hematti, 2016; Liguori et al., 2018). Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a estos procesos no están definidos completamente en las MSC, por lo que se necesita más investigación.

### 1.4.1. Moléculas de importancia bioquímica en las MSC y las NSC.

El conocimiento de los mecanismos moleculares que rigen el destino de las células madre nos aporta información clave sobre la capacidad dual de las MSC en la autorrenovación y proliferación o la diferenciación hacia algún tipo celular concreto, determinando la capacidad regenerativa de las MSC. Estos estados celulares son importantes ya que implica que se mantenga una población de células madre en los tejidos adultos con la capacidad de regenerar o proteger a los tejidos dañados. Alteraciones en estos mecanismos podrían provocar envejecimiento prematuro o tumores. De entre las distintas moléculas implicadas en estos mecanismos destacamos:

#### **Sirtuina (Sirt1):**

Sirt1 es una deacetilasa tipo III de histonas/proteínas que regula diversos mecanismos, participando en la condensación de histonas o en la represión transcripcional de algunos genes. Entre los factores de transcripción que reprime se encuentra el factor nuclear  $\kappa\beta$  (NF-  $\kappa\beta$ ), que regula la secreción de factores proinflamatorios como IL-6, IL-8 y MMP o deacetila factores asociados con la protección ante el estrés oxidativo y la senescencia, como por ejemplo, la regulación positiva de FOXO-3 (Forkhead box class O 3), que participa en la transcripción de genes antioxidantes como el de catalasa o SOD (Yao & Rahman, 2012).

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

En relación con las células madre, no se conoce bien la implicación de Sirt1 en su supervivencia frente a situaciones adversas. Sin embargo, cada vez hay más evidencias de que SIRT1 desempeña un papel importante en la determinación del destino celular de las MSC (Chen et al., 2014). Por otro lado, se ha descrito que Sirt1 también participa en las NSC como un represor epigenético que promueve la diferenciación en las NSC maduras a células progenitoras neurales adultas, inhibiendo a su vez la proliferación y autorrenovación de estas células. Esto se ha demostrado en experimentos *in vivo* con NSC adultas en el hipocampo de ratones donde modelos knockout (KO) de Sirt1 presentaron más NSC y células progenitoras neuronales adultas, mostrando un aumento de la autorrenovación respecto al modelo control (Ma et al., 2014). Esta implicación de Sirt1 en los procesos de diferenciación junto con su función en la supervivencia celular sugiere esta molécula se puede sufrir cambios durante el envejecimiento o en ambientes de estrés oxidativo en las MSC.

### **SOX2:**

La proteína SOX2, también conocida como SRY-box 2 (de sus siglas en inglés *Sex determining Region Y-box 2*), es un factor de transcripción cuya función es esencial en el mantenimiento de la autorrenovación de las células madre embrionarias no diferenciadas. Además, SOX2 es uno de los factores de transcripción clave en la inducción de la pluripotencialidad de las células madre.

La capacidad de autorrenovación en las células madre embrionarias pluripotentes es ilimitada, a diferencia de las células madre adultas multipotentes, pero debido al rechazo inmune en trasplantes de las ESC y a los inconvenientes éticos, los mecanismos de autorrenovación han sido estudiados principalmente en líneas de iPSC. Numerosos experimentos han demostrado que los factores de transcripción SOX2, Oct4 y Nanog son esenciales para mantener la pluripotencialidad de las ESC (Jaenisch & Young, 2008; Omole & Fakoya, 2018) y para la inducción de células somáticas adultas en la formación de iPSC humanas en el 2007 (Yu et al., 2007). Estos factores regulan cientos de genes en las ESC estableciendo una red de transcripción de genes que son activados y otros que son inactivados durante el desarrollo embrionario. Los genes activados están relacionados con el mantenimiento de la capacidad pluripotencial de las ESC, mientras que los genes inactivados son principalmente factores de transcripción encargados de

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

la diferenciación y la definición del linaje germinal (Fig. 3) (Omole & Fakoya, 2018). A su vez, SOX2, Oct4 y Nanog se autorregulan uniéndose a sus propios promotores formando un bucle de retroalimentación positiva (Jaenisch & Young, 2008).

En las MSCs, SOX2 regula directamente la expresión de DKK1, proteína que regula la señalización de Wnt, y como consecuencia determina el linaje de diferenciación de estas (Fig. 3). En cuanto a la señalización por Wnt, existen dos vías; la vía canónica y la vía no canónica. En la vía canónica, GSK3 $\beta$  junto con otros factores inhiben a  $\beta$ -catenina, impidiendo que ésta se transloque al núcleo y regule la transcripción. Cuando proteínas como Wnt3a se une a los receptores de forma autocrina o paracrina, se inhibe GSK3 $\beta$ , y se libera la  $\beta$ -catenina que se desplaza al interior del núcleo y regula la transcripción génica de factores como SOX2, favoreciendo la proliferación celular y el mantenimiento de la potencialidad de la célula madre e inhibiendo otros mecanismos como por ejemplo la diferenciación osteogénica en BMMSC (Baksh & Tuan, 2007; Kolf et al., 2007) (Fig.3).

Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), también se han descrito como factores que intervienen en la autorrenovación y mantenimiento de la potencialidad de las células madres, siendo FGF-2 uno de los más empleado para la proliferación en los cultivos *in vitro* de las MSC (Zaragosi et al., 2006; Cheng et al., 2020;) y de las NSC transdiferenciadas a partir de las MSC (Anghileri et al., 2008; Darvishi et al., 2017; Peng et al., 2019). En cultivos de ADSC humanas, se ha comprobado que FGF2 estimula la proliferación de las células en pases iniciales, mediante la activación de la vía mitogénica de ERK1/2 o como factor multipotencial induciendo a SOX2 (Fig.3). En pases más tardíos del cultivo celular, se demostró que hubo senescencia celular debido al daño en el ADN acumulado tras las múltiples divisiones celulares y al aumento de la expresión de p21 (que es un marcador de senescencia) como respuesta al daño (Cheng et al., 2020).

Por otro lado, SOX2 interacciona también con c-Myc y CiclinaD (proteínas que intervienen en el ciclo celular) y afecta también a la proliferación y progresión del ciclo celular de las MSC (S. Park et al., 2012). Esto nos indica la función dual de SOX2 en la regulación de la progresión celular y la determinación del destino celular en las células madre mesenquimales que no tiene las células madre embrionarias.

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

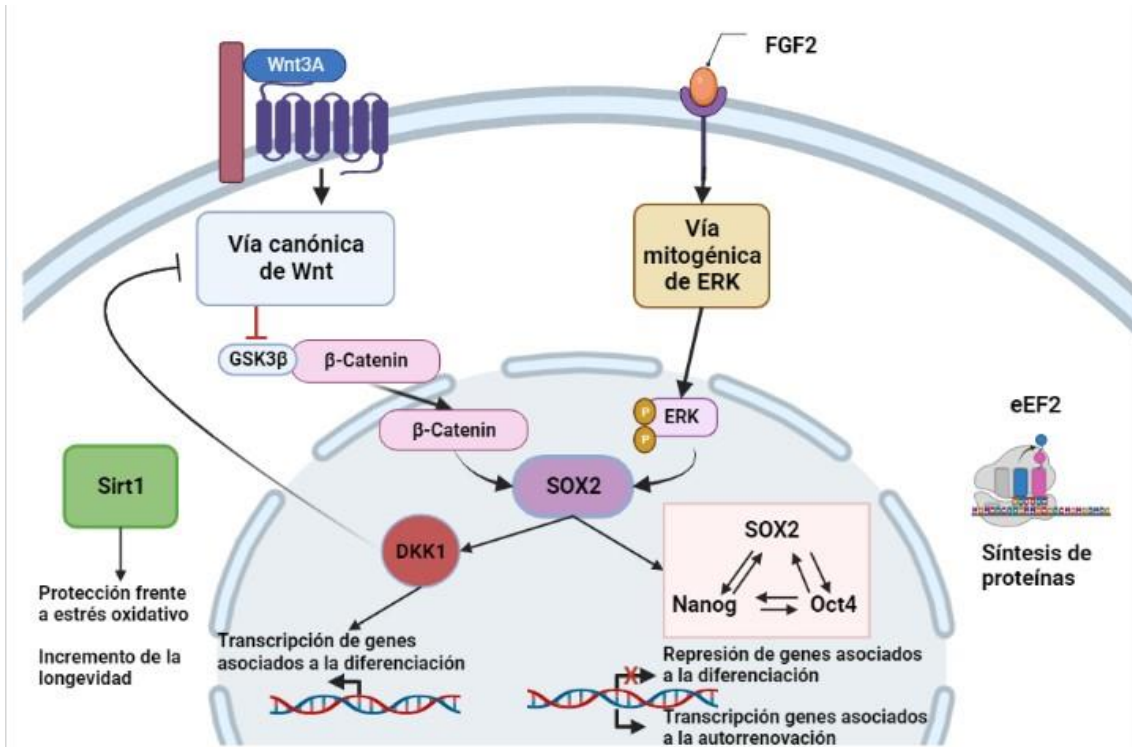
En las NSC, SOX2 no tendría un papel dual como ocurre en las MSC, y participaría en la autorrenovación y mantenimiento del estado multipotencial, disminuyendo considerablemente tras iniciar la diferenciación a células neurales (Cavallaro et al., 2008; S. Zhang & Cui, 2014)

### **Factor de elongación eucariótico 2 (eEF2):**

Otro de los mecanismos de importancia biológica en las MSC es la síntesis de proteínas. Este es un proceso que requiere una gran cantidad de energía y que con la edad se pueden producir defectos en las células y contribuir al mal plegamiento de proteínas y su acumulación. Una de las proteínas más relevantes en la síntesis proteica es el factor de elongación eucariótico 2 (eEF2), el cual participa en la elongación de las proteínas durante el desplazamiento del ribosoma sobre el ARNm (Fig. 3), y que se ha visto que disminuye tanto en el envejecimiento como en procesos de estrés oxidativo (Arguelles et al., 2011; Ayala et al., 1996). En las NSC adultas, el eEF2 se ve afectado según la demanda celular, siendo de baja expresión si las células son quiescentes o en altos niveles si las células están activas y más propensas para la división y la diferenciación celular (Baser et al., 2017), de ahí la importancia de los niveles de eEF2 en las NSC para la neurogénesis adulta y su posible uso en la terapia celular.

En resumen, las moléculas descritas Sirt1, SOX2 y eEF2, entre otros, están implicados en procesos de autorrenovación, diferenciación y supervivencia de importancia en las MSC y las NSC, como la síntesis de proteínas, la capacidad regenerativa, la diferenciación y la defensa ante el estrés oxidativo. Esto hace que sea prioritario la investigación acerca de cómo afecta el estrés oxidativo y la edad a dichas moléculas en MSC y NSC para evaluar la potencialidad terapéutica de estas células.





**Figura 3. Vías de señalización implicadas en mecanismos de interés terapéutico de las células madre mesenquimales mediante la regulación de la transcripción génica.** La vía canónica de Wnt y la vía iniciada por FGF2, activa a los factores de transcripción SOX2, NANOG y Oct4, que se encargan de la transcripción de genes asociados a la proliferación y autorrenovación de las células madre, mientras reprimen genes asociados con la diferenciación a algún tipo celular. Entre los genes transcritos se encuentra el propio SOX2, que es capaz de inducir la diferenciación a través de la interacción de DKK1 y la inhibición de la vía de Wnt, adquiriendo un papel dual. El eEF2 es un factor implicado en la elongación de las proteínas, y es esencial para la síntesis proteica y la homeostasis celular. Sirt1 es una deacetilasa que actúa como factor de defensa frente al estrés oxidativo y el incremento de la longevidad. Figura realizada en *Biorender.com*.

## 1.5. UTILIDAD TERAPÉUTICA DE LAS CÉLULAS MADRE DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSO (ADSC).

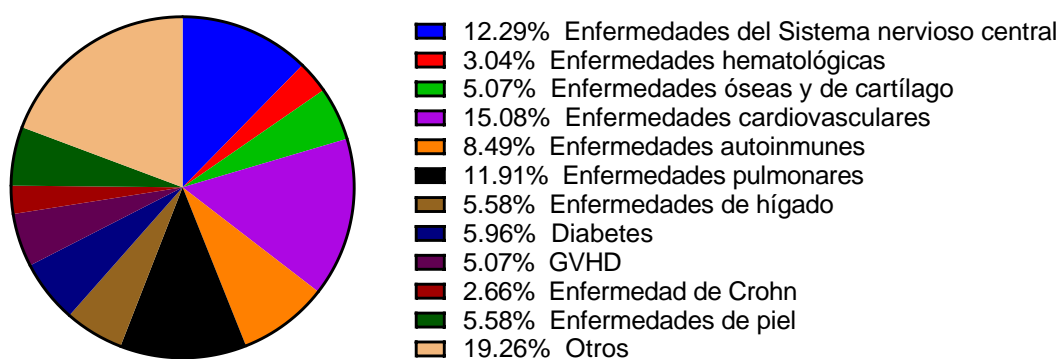
Entre los distintos tipos de células madre descritas, las células adecuadas para la terapia celular serían las células madre totipotentes o pluripotenciales (derivadas del embrión o inducidas) debido a su capacidad para generar cualquier tipo de célula humana. Pero estas células presentan importantes desventajas como la formación de teratomas o las limitaciones éticas para su uso (Mundra et al., 2013). Los ensayos clínicos realizados en humanos con estos tipos de células han sido para tratar enfermedades oculares, pancreáticas y neurodegenerativas mediante células progenitoras derivadas de las ESCs

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

o células madre neurales partenogénicas, por lo que no se han tratado directamente con células pluripotenciales propiamente dichas (Trounson & McDonald, 2015). Por ello, las células candidatas a los ensayos clínicos son las células madre adultas multipotentes, aunque presenten mayor limitación para generar diferentes tipos de células.

Las células madre adultas más empleadas en medicina regenerativa son las células madre multipotentes mesenquimales cuya función está ligada a los requerimientos del órgano hospedador y se encuentra vinculada a los vasos sanguíneos en la región subendotelial estromal. Los ensayos clínicos registrados en *clinicaltrials.gov* demuestran la importancia de las células madre mesenquimales donde a fecha de 28 de septiembre de 2022 hay 789 estudios en fase clínica 2,3 y 4 con la búsqueda de “mesenchymal stem cells”. De los cuáles, 274 estudios están relacionados con la búsqueda de “bone marrow mesenchymal stem cells” (BMMSC) y 138 con la búsqueda de “adipose derived mesenchymal stem cells” (ADSC). Correlacionando la búsqueda de “Mesenchymal stem cells” y las condiciones de los ensayos clínicos clasificados por categorías se obtiene la siguiente gráfica (Fig. 4):

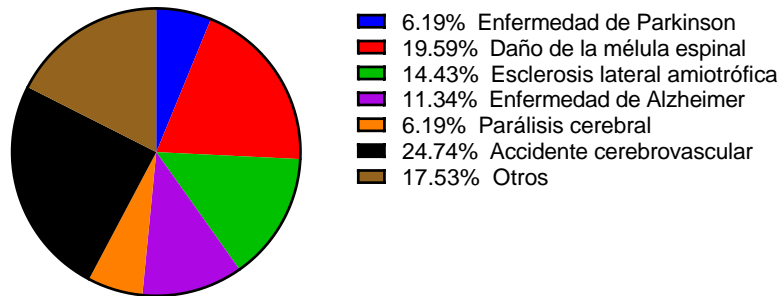
### Ensayos clínicos en fase II, III y IV con MSC



**Figura 4.** Gráfica que representa los ensayos clínicos en Fase 2, 3 y 4 registrados en *clinicaltrials.gov* empleando MSC. Registrado el 28 de septiembre de 2022. GVHD (del inglés, graft versus host disease, enfermedad del injerto contra el huésped)

Entre las categorías destaca la numerosa cantidad de estudios clínicos sobre las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades del sistema nervioso central, donde se engloban algunas enfermedades neurodegenerativas (Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Alzheimer y Esclerosis Lateral Amiotrófica) (Fig. 5):

### Ensayos clínicos con MSC en enfermedades del sistema nervioso central



**Figura 5.** Gráfica que representa los ensayos clínicos realizados con MSC en enfermedades que afectan el Sistema nervioso Central. Registrado el 28 de septiembre de 2022.

En estos estudios se observan ciertas diferencias entre las BMMSC y las ADSC, predominando ensayos clínicos que reflejan un mayor uso de las BMMSC. Sin embargo, el aislamiento de esta población celular se realiza a través de técnicas invasivas y dolorosas y se obtienen muy pocas células madre, por lo que es necesario la búsqueda de alternativas. Las ADSC presentan un perfil fenotípico y genotípico similar a las BMMSC, pero se obtienen a través de procedimientos menos invasivos como la liposucción de la grasa subcutánea, aislándose una mayor cantidad de células cuando se cultivan *in vitro* (Fernandes et al., 2018).

Por otro lado, la población de MSC de la médula ósea, presenta ciertas diferencias con la población aislada del tejido adiposo, como la capacidad de diferenciación a adipocitos, condrocitos y osteocitos, presentando las ADSC un mayor potencial de diferenciación a adipocitos que a condrocitos y osteocitos en comparación con las BMSC (Yoshimura et al., 2007). Para definir a las poblaciones de células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo, la Federación Internacional de terapéutica y ciencia del tejido adiposo (iFATS) y la Sociedad internacional para la terapia celular (ISCT) definió en el 2013 los criterios mínimos para establecer la población de la fracción vascular estromal (FVE) y la población adherente de células estromales/madres. Se definieron varias poblaciones celulares extraídas del tejido adiposo con sus respectivos marcadores de superficie: las células derivadas directamente de la fracción estromal (FVE), la población de células

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

adherentes estromales derivadas de tejido adiposo (ASC) y las células madre mesenquimales (MSC). A diferencia de las MSCs derivadas de la médula ósea, las MSCs derivadas del tejido adiposo son positivas para el marcador CD36 y negativas para CD106 (Bourin et al., 2013).

Actualmente, en el ámbito de la investigación, se emplean las ADSC en una gran variedad de enfermedades como posible terapia celular, obteniendo resultados positivos en diversas enfermedades. En relación a las enfermedades neurodegenerativas, las ADSC se han utilizado en modelos de Alzheimer, Huntington y Parkinson (Bacakova et al., 2018). Como se muestra en la figura 5, los ensayos clínicos con la enfermedad de Parkinson tienen un menor porcentaje de desarrollo que otras enfermedades neurológicas, poniendo de manifiesto la necesidad de llevar a cabo más investigación con las MSC como posible terapia celular para esta enfermedad.

La enfermedad de Parkinson está asociada al envejecimiento celular, donde aparecen disfunciones mitocondriales del complejo I responsables por ejemplo del aumento de especies reactivas de oxígeno que promueven la muerte de las neuronas dopaminérgicas (M. T. Lin & Beal, 2006). Se han desarrollado modelos murinos que mimetizan las distintas condiciones de la enfermedad de Parkinson (la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo), como por ejemplo la inyección intraperitoneal de MPTP en ratones, la inyección intracraneal de 6-OHDA en la *substantia nigra* en ratas (Deumens et al., 2002; Meredith & Rademacher, 2011) o la neuroinflamación en modelos que emplean LPS (Herrera et al., 2000; Muñoz et al., 2019). En algunos trabajos se han utilizado las hADSC en xenotrasplantes con el modelo de 6-OHDA de ratas como posible terapia celular, obteniéndose resultados prometedores, como el efecto neuroprotector en la *substantia nigra* o la mejora de las funciones motoras y cognitivas (Berg et al., 2015; Schwerk et al., 2015).

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

En resumen, existen poblaciones de MSC residentes en la médula ósea y en el tejido adiposo que presentan ciertas diferencias en cuanto a su potencial de diferenciación y en la expresión de marcadores de superficie, siendo, por lo general, las técnicas de aislamiento de las células madre derivadas de tejido adiposo menos invasivas que las de médula ósea. Esto hace a la población de ADSC más idónea para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como se ha demostrado en modelos animales, siendo la enfermedad de Parkinson una de las posibles dianas futuras de la investigación clínica para el desarrollo de terapias celulares en humanos

## 2. OBJETIVOS

---



El tejido adiposo es una fuente abundante de células madre y es de gran importancia para la terapia celular, con un papel relevante en la ingeniería tisular y en medicina regenerativa. Sin embargo, todavía se desconocen muchos aspectos de la biología básica para determinar su potencial real en terapia celular como puede ser la posibilidad de generar células neurales a partir de las ADSC y su uso en enfermedades neurodegenerativas.

Por ello, el objetivo general de esta tesis fue estudiar, por un lado, la implicación de las rADSC en la inmunomodulación y, por otro, la capacidad de transdiferenciación a neuronas de las rADSC *in vitro*, y ver como se afectan estas funciones por el estrés oxidativo y por la edad, y examinar su posible efecto neuroprotector en un modelo de Parkinson.

Para alcanzar estos objetivos generales se desarrollaron los siguientes objetivos específicos fueron:

2.1. Caracterizar células madre derivadas del tejido adiposo adulto de rata determinando si cumplen las características de cultivo y diferenciación establecidas por la ISCT para las MSC.

2.2. Estudiar la interacción entre LPS y las rADSCs, y determinar los cambios en la expresión del TLR4 y su posible implicación en la función inmunomoduladora.

2.3. Establecer la diferenciación de las rADSCs a células madre neurales y a neuronas *in vitro* y estudiar sus propiedades electrofisiológicas y funcionalidad.

2.4. Determinar el efecto del estrés oxidativo y la edad en moléculas implicadas en diversas rutas bioquímicas de importancia en la capacidad de inmunomodulación, supervivencia y transdiferenciación de las rADSCs a células madre neurales.

2.5. Examinar los efectos terapéuticos y reparadores de las rADSCs sobre un modelo de enfermedad de Parkinson inducido por estrés oxidativo en ratas.



# 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---



#### 3.1. APARATOS Y ANIMALES

##### 3.1.1. Aparatos

- Campana de flujo laminar horizontal Telstar AH-100 (Telstar, Bristol, USA).
- Autoclave JP. - Selecta (JP Selecta, Barcelona, Spain).
- Centrífugas Eppendorf Mod. 5804R y 5810R (Eppendorf, Hamburg, Germany).
- Filtros celulares Cell Strainer de 40 µm (Becton Dickinson, NJ, USA).
- Frascos de cultivo Corning Flask T25 y T75 (Corning, NY, USA).
- Incubador RS Biotech Galaxy R (New Brunswick Scientific, Enfield, USA).
- Viales criogénicos Corning criotube (Corning, NY, USA).
- Congelador Nalgene Cryo Freezing Container (Mr. Frosty) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).
- Contador celular Countess® Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific, Logan, UT, USA).
- Equipo de electrofisiología: bomba peristáltica (Harvard Apparatus) , calentador con termostato (TC 324B; Warner), Nikon Eclipse FN1 equipado con una óptica de contraste interferencial diferencial para visualizar infrarrojo (IR-DIC), y una cámara WAT-902H2 Ultimate, micromanipulador monitorizado (Sutter MP-225), amplificador MultiClamp 700B (Multiclamp 700B, Axon Instruments, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), convertidor análogo – digital Digidata 1550), programa pCLAMP 10 (Molecular Devices)
- Separación magnética MACS® Separators (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany).
- Lector de placas Microplate Reader ASYS UVM340 (Biochrom, Cambridge, UK).
- Microscopio Nikon Eclipse TS500 equipado con un sistema de análisis de imagen Nikon digital Sight DS-U3 (Nikon, Tokio, Japan).
- Microscopio confocal Zeis LSM7 DUO para imágenes de fluorescencia confocal (Zeiss, Jena, Germany).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

-Microscopio Olympus BX61 para la obtención de imágenes en campo claro y estereología (Olympus, Allentown, USA).

- Estereotáxico para trepanación craneal (Kopf Instruments, Tujunga, CA, EEUU).

- Bomba de reperfusión Mod. Thermo Scientific FH100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

#### 3.1.2. Animales

Se emplearon para los estudios ratas macho de la raza Wistar, de un peso comprendido entre 300 y 500 g, mantenidas en un medio de temperatura constante de  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ , humedad relativa del 60%, con un ciclo de luz-oscuridad de 12h, y acceso libre a comida y agua.

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las «Guidelines of the European Union Council» (86/609/EU), siguiendo las regulaciones europeas (Directiva 63/2010/UE) y españolas (RD 53/2013) para el uso de animales de laboratorio, y fueron aprobadas por el Comité Ético de la Universidad de Sevilla.

#### 3.2. METODOLOGÍA.

##### 3.2.1. Obtención de la fracción vascular estromal (FVE) de tejido adiposo de rata.

La extracción del tejido adiposo de rata Wistar se realizó en campana de flujo laminar dentro de una cabina aislada en condiciones de esterilidad. El tejido adiposo se extrae de regiones localizadas en las zonas inguinales, ventrolaterales y dorsomediales. El animal es previamente anestesiado con Hidrato de Cloral al 6% (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), a una dosis 6 ml/Kg. El tejido aislado, se traspasó a un disco de cultivo con PBS (tampón fosfato salino, pH 7.2), donde se microseccionaron los lóbulos de grasa mecánicamente en trozos más pequeños y se lavó tres veces en PBS para limpiar sangre o pelos residuales. Luego se recogió en un Falcon de 50 ml (aprox. 10 ml de grasa) en 10 ml de PBS. Posteriormente se añadió Colagenasa I (Colagenasa NB4G, Serva, Islandia, NY, USA) a una concentración con actividad enzimática de 0.3 U/ml (U= Unidades Wünsch). Se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación durante unos 60 -90 min. Cada 30 min se pipeteaba con de una pipeta de 10 ml para facilitar la digestión del tejido. Una vez

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

completada la digestión del tejido se añadió medio de cultivo DMEM (Advanced Dubelcco's Modified Eagle Medium; A-DMEM, Gibco, Grand Island, NY), con FBS al 10% (Fetal Bovine Serum, Biowest) para detener la actividad de la colagenasa y se centrifugó a 600g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en 5 ml de DMEM +10% FBS + 1% penicilina/estreptomicina, que se filtró a través de una membrana de nylon de 40 µm de tamaño de poro a un tubo de 50 ml. El volumen filtrado se centrifugó a 300g durante 10min para obtener finalmente la Fracción vascular estromal (FVE) como pellet.

#### **3.2.2. Cultivo, mantenimiento y extensión del cultivo de las células de la FVE de tejido adiposo de rata.**

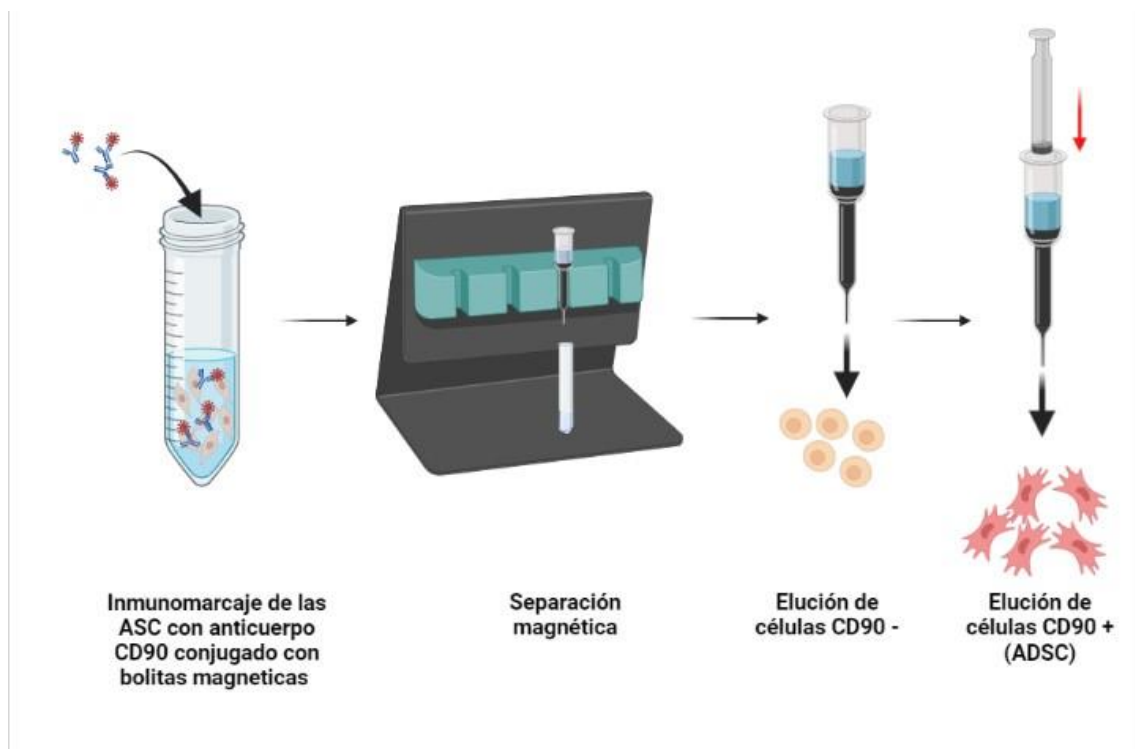
La FVE conseguida tras seguir el protocolo de obtención (Apartado 2.2.1), fue resuspendida en medio de cultivo y se cultivó en un volumen de 10 ml de medio de cultivo en frascos de 75 cm<sup>2</sup> de superficie. Estos frascos se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y humedad relativa del 95 % para promover la expansión y crecimiento de las células. A las 24 horas se cambió el medio de cultivo completamente, y a las 48 -72 horas los cultivos alcanzaron el 80 % de confluencia. En este punto, las células se despegaron del plástico mediante Tripsina-EDTA 1X en PBS (Biowest), añadiendo el volumen suficiente para recubrir el fondo del frasco (3 ml), incubándose a 37°C durante 3 min- 5 min y tras la observación en el microscopio, se golpeaba con suavidad los frascos para asegurar que todas las células estaban completamente despegadas. Se recogieron las células en suspensión, se añadió medio de cultivo para neutralizar la actividad de la tripsina y se centrifugó a 300g durante 10 minutos para obtener el pellet con las células madre. Este pellet se volvió a resuspender en medio de cultivo y a centrifugar a 300g para lavar e inactivar completamente la tripsina. Las células se dividieron en varios frascos o placas de cultivo dependiendo del ensayo que se realizara.

#### **3.2.3. Separación magnética de las rADSC mediante técnica MACS.**

Para aislar las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo de rata (Adipose Derived Stem Cell, rADSC) de las células obtenidas a partir de la FVE, se empleó

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

la técnica MACS © (Magnetic Cell Sorting) que se basa en la separación de las células adheridas a micropartículas magnéticas (MACS-microbeads) cubiertas de una matriz biodegradable, de aproximadamente 50 nm de tamaño (Miltenyi *et al.*, 1990, Grützkau and Radbruch, 2010). Se utilizaron microbeads que llevaban incorporadas el anticuerpo que reconoce el marcador de superficie celular CD90.1 (Thy-1 Cell surface antigen) de las rADSC. Este “etiquetado” magnético permite la adhesión de las células a una columna sometida a un potente campo magnético, mientras que las células que no presentan este marcador pasan a través de ella. Tras retirar la columna del campo magnético, las rADSC eluyen empleando presión sobre la columna. (Fig. 6)



**Figura 6. Esquema del marcaje y separación magnética de las rADSCs.** Las rADSCs son inmunomarcadas con el anticuerpo anti CD90.1 conjugado a partículas magnéticas, que se adhieren a una columna colocada en un campo magnético. Las células CD90.1 negativas eluyen tras utilizar un tampón específico, y las células madre CD90.1 positivas se obtienen tras aplicar presión positiva en la columna apartada del campo magnético. Figura realizada en *Biorender.com*

Cuando las alcanzaron el 100 % de confluencia en el frasco, fueron levantadas según el protocolo del apartado 2.2.2, y el pellet obtenido se resuspendió en 90  $\mu$ l de tampón de lavado (autoMACS Rinsing Solution, Miltenyi-Biotec) cada  $1 \cdot 10^6$  células. Se añadió 10  $\mu$ l de Anti CD90.1 microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) (Dilución

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

1/10) y se incubó durante 15 min a 4°C. Posteriormente, se lavó con 1 ml de tampón de lavado y se centrifugó a 300g durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 500 µl de tampón de lavado, para su posterior separación magnética.

Para la separación magnética, la columna situada en el campo magnético se humedeció con 3 ml de tampón de lavado, y se hizo pasar la solución celular. La columna se lavó tres veces con 3 ml de tampón para que eluyan aquellas células que no hayan quedado adheridas (células no marcadas). Para recoger las células marcadas y retenidas en la columna, se retiró la columna del campo magnético, se añadió 5 ml de tampón de lavado y con ayuda de la presión positiva ejercida sobre la columna se recogieron las células en un tubo de 15 ml, que se centrifugó a 300g durante 10 minutos y se recogió el pellet que contiene las células marcadas, el cual se resuspendió en 5 ml de medio de cultivo y se incubó hasta alcanzar una confluencia del 80%. Se realizaron sucesivos pases hasta alcanzar la población de células necesarias para los experimentos. Después del aislamiento inmunomagnético, las células se contaron en un contador.

#### 3.2.4. Recuento celular

El conteo de las células se realizó en cada uno de los pases de las células para evaluar la morfología y viabilidad de las células. Sólo se cuentan las células viables para determinar el número de células vivas en los ensayos llevados a cabo. Se utilizó tanto el contador celular Countess® Automated Cell Counter (Countess Invitrogen, Thermo Fisher) como la cámara de Neubauer, y se utilizó el Trypan Blue para determinar el número de células viables, ya que es un reactivo lipofílico que penetra las membranas de las células muertas viéndose éstas oscuras bajo el microscopio invertido Nikon Eclipse TS500, y las células vivas tienen una refringencia destacada. La prueba se lleva a cabo por triplicado mezclando la suspensión celular con el Trypan Blue al 0.4 % (Thermo Scientific, Logan, UT, USA) en una proporción 1:1, utilizando 10 µl de la mezcla para el conteo de las células y determinando la concentración en células/ml.

#### 3.2.5. Congelación y descongelación de células

Las células que no se utilizaron a corto plazo se congelaron en nitrógeno líquido. La criopreservación evita daños o la entrada en senescencia o envejecimiento en las células madre provocado por la sucesión de las divisiones celulares. Para ello, las células se diluyen en 1 ml de medio de criopreservación constituido por DMEM con FBS al 20 % y 1% de antibióticos y Dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 % como agente crioprotector. Las células se almacenaron en crioviales para su posterior congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  paulatina durante 24h en el recipiente Mr Frosty. Después de las 24 h, las células se conservaron en el nitrógeno líquido a  $-200^{\circ}\text{C}$ .

Para la descongelación, los crioviales se descongelaron rápidamente sumergiéndolos en el baño a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos. Posteriormente, en la campana de flujo, se añadió gota a gota 5 ml de medio completo con suero y se centrifugó a 300 g durante 5 min. El sobrenadante se descartó, y las células se volvieron a diluir en medio completo para su posterior cultivo en frascos de  $75\text{ cm}^2$ .

#### 3.2.6. Pruebas de multipotencialidad de las rADSC

De acuerdo al Comité de la Sociedad Internacional de Terapia Celular, otra de las características que presentan las células madre mesenquimales es su capacidad para diferenciarse a adipocitos, osteoblastos y/o condrocitos. Para esta prueba, las células se sometieron a pruebas de multipotencialidad:

##### 3.2.6.A. Diferenciación y detección de adipocitos

En placas de 6 pocillos se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  las células a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/ml en un volumen final de 2 ml del medio StemXVivo (R&D System, Minneapolis, MI, USA). Tres días después, tras alcanzar el 100 % de confluencia, se cambió el medio por medio StemXVivo con suplementos de diferenciación adipogénica que contiene el kit (1% de suplementos en el medio StemXVivo). El medio suplementado se cambió cada 2-3 días en un periodo total de 14 días. Los adipocitos diferenciados no proliferan, ya que dedican su energía a la formación de las vacuolas lipídicas. Una vez finalizado el periodo de diferenciación, se retiró el medio de inducción a adipocitos y se lavó dos veces con 1



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

ml de PBS. Luego las células se deshidrataron y fijaron con metanol frío, añadiendo 1 ml/pocillo a temperatura ambiente durante 5 min, y se procedió a la detección.

Los adipocitos formados presentaban morfología redondeada y vacuolas lipídicas. Se preparó una solución lipofílica compuesta de 0.5 % Reactivo Oil Red O (Sigma-Aldrich, Sant Louis, MO, USA) en isopropanol. Posteriormente, se diluyó la solución lipofílica 3:2 en agua desionizada, obteniéndose una disolución final del Reactivo Oil Red O del 0.3 %. Se filtró utilizando filtros de jeringa de 0.22  $\mu\text{m}$  y se añadieron 2 ml por pocillo en la placa de 6 pocillos, agitando la placa en un agitador orbital suavemente durante 20 min. Se retiró el medio de tinción, y se lavaron dos veces con agua bidestilada. La diferenciación se observó en el microscopio de fase invertida, detectando las vacuolas teñidas de rojo.

#### **3.2.6.B. Diferenciación y detección de osteoblastos.**

Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos a una densidad de  $5 \cdot 10^4$  células/ml en un volumen final de 2 ml del medio StemXVivo (R&D System, Minneapolis, MI, USA). Tras alcanzar el 50-70 % de confluencia en 1-2 días, se retiró el medio y se añadió el medio de inducción a osteoblastos (5% de suplementos osteogénicos en StemXVivo). La inducción se mantuvo durante 14-21 días, renovando el medio cada 3-4 días. Tras la inducción, se lavaron dos veces los pocillos con 1 ml de PBS y se fijaron con metanol frío durante 5 min. Se retiró el metanol y se lavó dos veces con agua bidestilada y se procedió a la detección de osteoblastos.

Los osteoblastos presentan una morfología cuboidal y se tiñeron con una solución de tinción compuesta por el reactivo SIGMA FAST BCIP/NBT (Sigma-Aldrich, Sant Louis, MO, USA) disuelto en agua bidestilada. BCIP sufre una hidrólisis enzimática, en presencia de la fosfatasa alcalina de los osteoblastos, originando un precipitado azul-púrpura, que junto a la reducción de NBT (sal de tetrazolio), origina un precipitado azul púrpura, insoluble en agua. La cantidad de precipitado coloreado formado aumenta linealmente con el número de osteoblastos.

Se añadió 1 ml del reactivo de tinción de osteoblastos por pocillo, y se agitaron suavemente en un agitador orbital durante 10 min. Se aspiró el sobrenadante y se lavó

dos veces con agua bidestilada. Las células teñidas se observaron en el microscopio de fase invertida.

#### **3.2.7. Ensayos de fluorescencia para determinar la unión de LPS a rADSCs**

Las células se tripsinizaron, se contaron con Trypan Blue y transfirieron a placas de 96 pocillos en distintas cantidades (5.000, 10.000 o 15.000 células/pocillo) y se dejaron cultivando según el tiempo del ensayo durante 24 h en medio de cultivo y condiciones estándar. Pasado este tiempo, se retiró el medio y se añadieron distintas concentraciones de LPS-FITC derivado de la estirpe de *E.coli* O111:B4 diluido en medio de cultivo sin FBS (0, 10, 100, 250, 500 o 1.000 ng LPS FITC/ml medio). Las placas se dejaron incubando durante distintos tiempos, según el tratamiento (1, 6 o 24 h). El medio se retiró, se añadió nuevo medio de cultivo sin FBS y se midió la fluorescencia a 528 nm en un lector de microplacas Synergy HTX (BioTek, Vermont) utilizando el programa Gen5 (BioTek).

#### **3.2.8. Cultivo y formación de esferas a partir rADSC.**

Las células madre derivadas de la fracción estromal fueron cultivadas en un medio de inducción para la formación de esferas, compuesto de DMEM/F12 sin suero que fue suplementado con 20 ng/ml de Epidermal growth factor (EGF, Miltenyi), 20 ng/ml de Fibroblast growth factor (FGF, Miltenyi) y 2% B27 (Gibco™). Las células fueron cultivadas a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/ml en placas de 6 pocillos que contenían agarosa gelificada al 0.5 % para evitar la adherencia al plástico. Las esferas se forman rápidamente, y se pueden observar a las 12 h de cultivo. Las esferas se mantienen en cultivo cambiando parcialmente el medio cada 3-4 días.

Para los ensayos de inducción de estrés oxidativo con el hidroperóxido de cumeno, las esferas se obtuvieron cultivando las células a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en el MFE en placas de 24 pocillos.

#### 3.2.9. Inducción de las esferas a células similares a neuronas.

Las esferas fueron disgregadas mecánicamente pipeteando arriba y abajo con puntas amarillas hasta observar que no se formaba precipitado (aproximadamente 150 veces). Tras comprobar la viabilidad de las células mediante el conteo en cámara de Neubauer, se cultivaron en placas de pocillos con poly-L-Lysine 0.1% (Sigma, St. Louis, MO, USA) a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/ml. El medio para la inducción a neuronas estaba compuesto de Neurobasal Medium, 2% B27 (Gibco™) y 10 ng/ml del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, Miltenyi). La adhesión de las células se podía observar después de 1 h de cultivo. Para el mantenimiento de las células se cambiaba parcialmente el medio de cultivo cada 3-4 días.

#### 3.2.10. Inmunofluorescencia de células *in vitro*.

##### 3.2.10.A. Células madre derivadas del tejido adiposo

Las rADSC se cultivaron sobre coverslips en placas de 12 pocillos con una densidad de 100.000 células/ml. Tras los tratamientos con LPS, las células se lavaron con PBS 2 veces y se fijaron con PAF 4 % durante 20 min a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS y se bloqueó con suero fetal bovino al 1 % en PBS-Tritón al 0.2 %. Después del bloqueo, las células se incubaron con el anticuerpo primario en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 ° C. La dilución utilizada para el anticuerpo de TLR4 fue de 1/100 (Santa Cruz Biotechnology, Texas). Al día siguiente, se lavaron los coverslips 3 veces con PBS, y se incubó con el anticuerpo secundario antirratón (Alexa fluor 488, 1/500), Hoechst (1/1000) y Tritón 0.25 % en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con PBS y se realizó el montaje colocando los coverslips en portas con medio de montaje Dako, sellándose los coverslips con laca de uñas.

##### 3.2.10.B. Neuroesferas.

La inmunofluorescencia de las esferas flotantes se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Sasaki (2010) con algunas modificaciones. En este protocolo no se aplica en ningún caso centrifugación, ya que puede dañar la estructura de las esferas, y es

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

aconsejable colocar una gran cantidad de esferas y dejar que precipiten durante 5 minutos al fondo del pocillo en los pasos de lavado, bloqueo y fijación. Las esferas se pueden perder cuando se aspira con la pipeta y por ello se colocaba el PBS o el medio aspirado en otro pocillo por si se perdían una gran cantidad de esferas por error. Las esferas se transfirieron a placas de 12 pocillos con los coverslips y se observaron en el microscopio para verificar que se localizan en el fondo del pocillo, y se aspiró con cuidado el medio, apoyando la punta de la pipeta sobre la pared. De esta misma forma, se lavó 3 veces con PBS y se fijaron posteriormente con paraformaldehído 4 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron otros tres lavados con PBS, y se bloqueó con suero fetal bovino a 1 % durante 1h. El anticuerpo primario anti-Nestina producido en ratón se preparó en una solución con suero al 10 % y tritón al 0.25 % a una dilución de 1/500 y se incubó toda la noche a 4 ° C. Al día siguiente, se lavaron 3 veces con PBS, y se incubó con el anticuerpo secundario (Alexa fluor 555, 1/500), Hoechst (1/1000) y Tritón 0.25 % en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con PBS y se realizó el montaje colocando los coverslips en portas con medio de montaje Dako y se selló con laca de uñas.

#### 3.2.10.C. Células similares a neuronas.

Los coverslips se lavaron dos veces con PBS, añadiéndolo al pocillo suavemente. Posteriormente, se fijaron las células en metanol/acetona 1:1 durante 10 min a -20°C. Se lavaron dos veces con PBS, y se bloqueó con suero fetal bovino al 1 % en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron dos veces, y se incubó con el anticuerpo primario de ratón anti- Nestina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; 1/200) o de conejo Anti- MAP2 (Sigma-Aldrich, Madrid, España; 1/200), en una solución de bloqueo con suero fetal bovino al 10 % y Tritón X-100 a 0.25 % durante toda la noche en una cámara húmeda a 4 °C.

Al día siguiente, los coverslips se lavaron tres veces con PBS, y se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa 488 anti-conejo (Sigma-Aldrich, Madrid, España; 1/500) y Alexa 555 anti-ratón (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; 1/200), en PBS con 0.25 % Tritón X-100 y Hoescht (Sigma-Aldrich, Madrid, España; 1/2000) durante 1 h en la cámara húmeda a temperatura ambiente. Después se lavaron dos veces en PBS y en

agua, y se montó con medio de montaje para fluorescencia (Dako Colorado Inc., Fort Collins, USA). Las muestras se visualizaron en el microscopio confocal (Zeiss LSM7 DUO). Como control negativo, los anticuerpos primarios se sustituyeron por suero no inmune.

#### **3.2.11. Análisis de la fluorescencia en imágenes obtenidas en microscopio confocal.**

El análisis de fluorescencia de TLR4 en las rADSC se realizó con el software *Fiji* siguiendo el método de fluorescencia celular total corregida (CTCF), en el que las células de las fotos tomadas de las inmunofluorescencias fueron seleccionadas mediante una herramienta de selección libre. Una vez establecidos los parámetros de medida, se obtenía de cada célula la intensidad del área integrada y la media del valor de grises. Luego aplicando la fórmula:  $CTCF = \text{Intensidad del área integrada} - (\text{área de la célula seleccionada} \times \text{Media de la fluorescencia del background})$ . El background fue sustraído seleccionando una región donde no se hallaba ninguna célula. La cuantificación se llevó a cabo tomando imágenes al azar.

#### **3.2.12. Experimentos de electrofisiología**

##### **3.2.12.A. Preparación de micropipetas/microelectrodos de patch-clamp.**

Las micropipetas de *patch* se obtuvieron utilizando un estirador de pipetas vertical (PC-10, Narishige; Fig. 4.1.G) a partir de tubos de vidrio de borosilicato de 1 mm de grosor con capilar interno (diámetro interno 0,6, diámetro externo 1 mm; Narishige GD-1). Para los experimentos de fijación de corriente, las micropipetas se rellenaron con una solución de gluconato de potasio (datos en mM): 120 K-gluconato, 10 KCl, 10 fosfocreatina, 2 MgATP, 0,3 NaGTP, 0,1 EGTA, 10 ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]etanosulfónico (HEPES). Esta solución se ajustó a pH 7,3 con KOH. Sólo se utilizaron aquellas micropipetas que cumplieron los siguientes requisitos: 1) punta firme; 2) bordes romos no cortantes; 3) disminución progresiva del diámetro desde el cono hasta la punta; y 4) que dieran lugar a microelectrodos de resistencia entre 5-7 M $\Omega$  para fijación de corriente y de entre 3-5 para fijación de voltaje. La figura 4.1.H ilustra en la parte inferior un electrodo de patch que cumple visualmente todas las características

para un buen registro, y en la parte superior otro que sería directamente descartado por su aspecto.

#### **3.2.12.B. Registros electrofisiológicos de *patch-clamp* en la configuración de célula entera.**

Los coverslips con las células similares a neuronas se transfirieron a la cámara de registro (Fig. 4.2.A-B) dónde se perfundieron con LCR artificial oxigenado (pH 7,4; 33°C) con una bomba peristáltica (Harvard Apparatus) a una tasa de 1 mL/min (Fig. 7.1.F). El LCR artificial se mantuvo durante todo el proceso de perfusión a  $33^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$  mediante un calentador con termostato (TC 324B; Warner). Las células similares a neuronas se visualizaron usando un microscopio Nikon Eclipse FN1 equipado con una óptica de contraste interferencial diferencial para visualizar infrarrojo (IR-DIC), y una cámara WAT-902H2 Ultimate (Fig. 4.2.A). Para el estudio se utilizaron dos objetivos: un objetivo de 4X de aire para localizar la zona de registro y un objetivo de inmersión en líquido de 40x para localizar las neuronas a registrar (Fig. 4.2.B). Las células neurales se seleccionaron según su morfología, con el cuerpo y las prolongaciones características de estas células (Fig. 7.2.D).

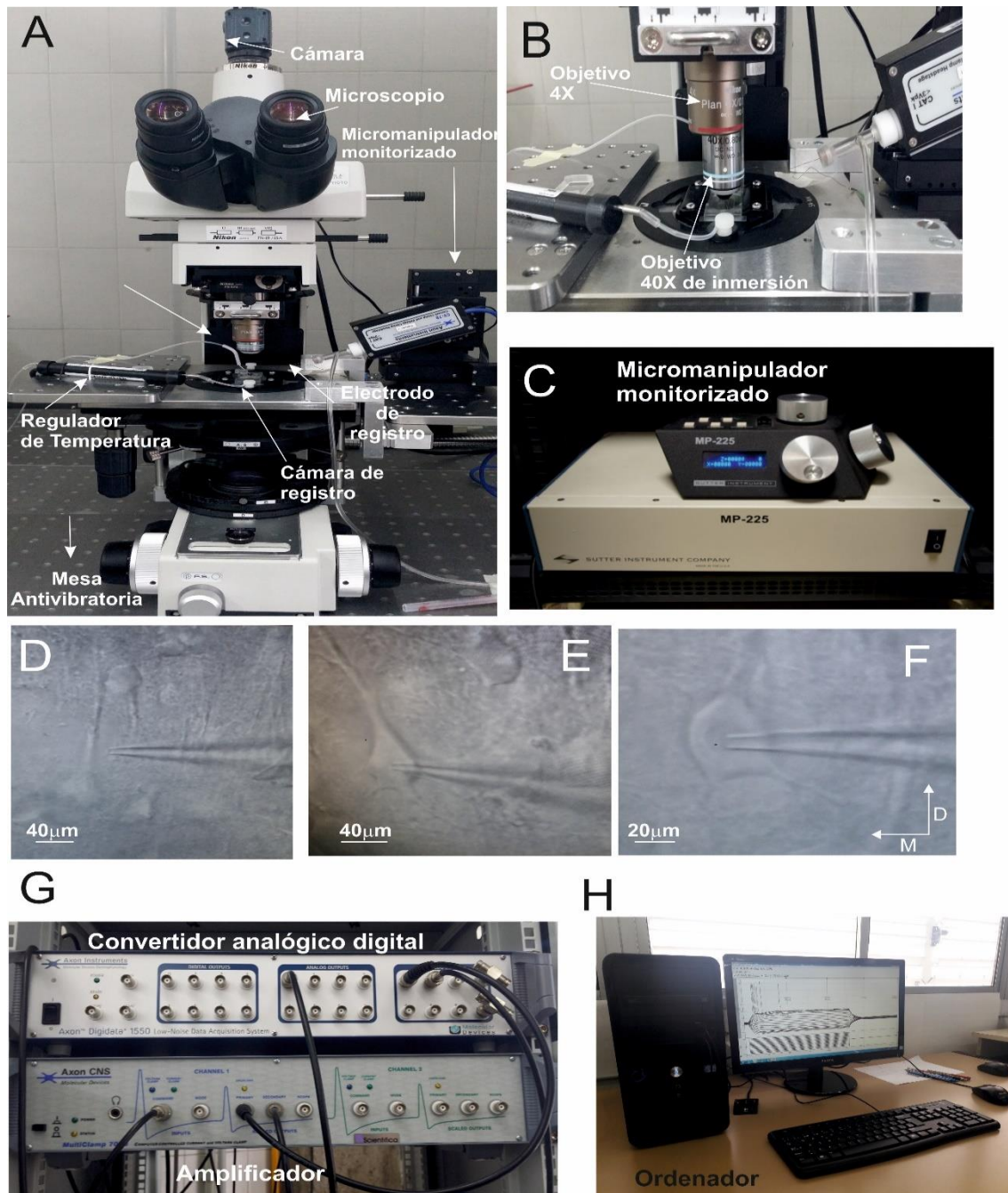
Los registros se realizaron en la configuración de *whole-cell* o célula entera. En esta configuración el interior de la pipeta queda en contacto directo con el citoplasma, permitiendo estudiar la corriente o la diferencia de voltaje que existe a través de toda la membrana celular. El primer paso para la obtención de la citada configuración consiste en aproximar, con un micromanipulador monitorizado (Sutter MP-225; Fig. 4.2.C), la punta de la pipeta a la superficie de la membrana (Fig. 4.2.D). Es conveniente que a la pipeta se le aplique una ligera presión positiva para evitar que le entre solución extracelular y que se ensucie o bloquee, lo que imposibilitaría la formación posterior del sello. A continuación, la pipeta se va acercando al soma de la célula a registrar (Fig. 4.2.E) y cuando aparece un halo blanco en la superficie del soma (Fig. 4.2.F) se suprime la presión positiva y se aspira levemente hasta que exista una adhesión perfecta entre el exterior de la pipeta y la membrana de la célula. Se dice entonces que se ha formado un sello de alta resistencia o giga-sello (denominado así porque la resistencia obtenida y

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

monitorizada en el ordenador es de entre 1 y 100 gigaOhms, Fig. 4.2.G-H). En este momento nos encontramos en la configuración de *cell-attached* o célula adherida, siendo necesario aplicar una ligera succión adicional para conseguir que el sello se rompa y que el interior de la pipeta entre en contacto con el citoplasma. Los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo utilizando el amplificador MultiClamp 700B (Multiclamp 700B, Axon Instruments, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) (Fig. 4.2.G). Solo los registros obtenidos con pipetas con una resistencia de acceso entre 5 y 20 M $\Omega$  se aceptaron para su posterior análisis. Las corrientes capacitivas rápidas debidas al circuito RC constituido por la membrana celular se compensaron mediante el software del Multiclamp 700B en un 50-70%, al igual que los producidos por la micropipeta que se compensaron de forma automática tras la formación del Gigasello. Los registros se pasaron por un filtro de baja frecuencia a 2-10 kHz y los datos obtenidos se digitalizaron a 20 kHz con un convertidor análogo – digital Digidata 1550 (Fig. 4.2.G) y se adquirieron usando el programa pCLAMP 10 (Molecular Devices). Los datos se almacenaron en un ordenador (TTL computer con Intel inside Core i3; Fig. 4.2.H) y posteriormente se analizaron utilizando el software Clampfit 10.4 (Molecular Devices)

#### 3.2.12.C. Registros en fijación de corriente y análisis.



**Figura 7. Sistemas de visualización, registro y almacenamiento de la señal electrofisiológica.** A. Fotografía ilustrando los equipos necesarios para la visualización de las células y los accesorios de registro para *patch-clamp*. B. Objetivos utilizados para el estudio y cámara de registro. C. Micromanipulador monitorizado. D-F. Imágenes mostrando la aproximación del electrodo a la superficie del soma de las neuronas seleccionadas. En la foto D = dorsal, y M = medial. G-H. Fotografías ilustrando los equipos utilizados para el registro y almacenamiento de la señal electrofisiológica.



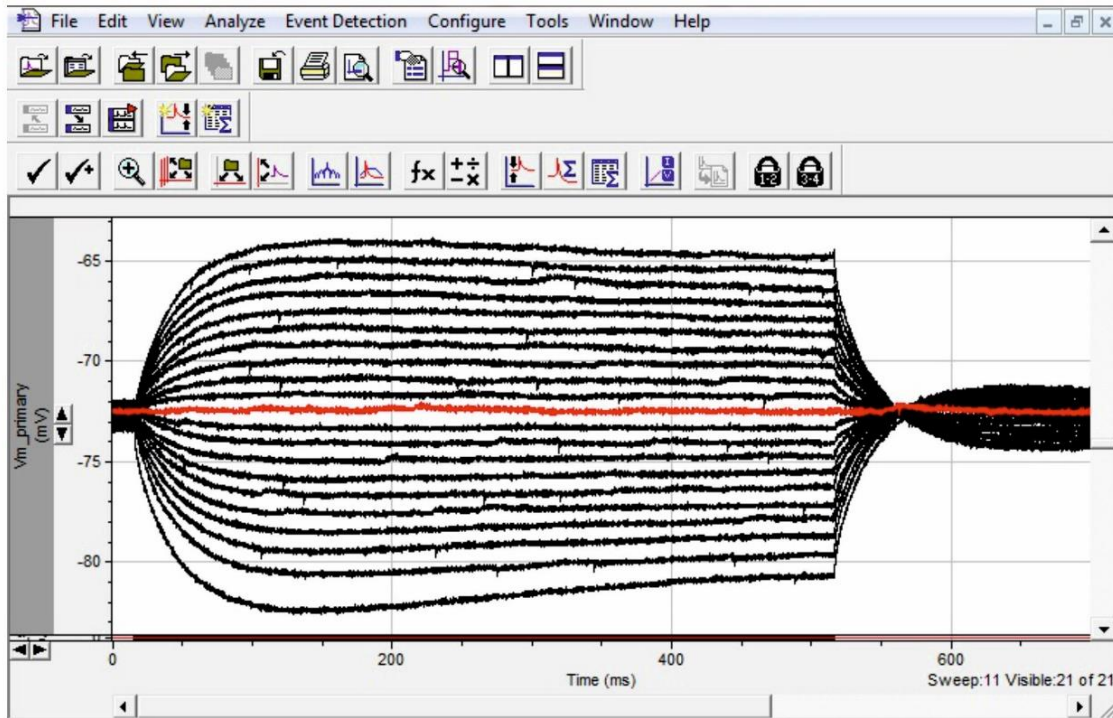
### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

Los parámetros que se registraron y cuantificaron fueron los siguientes: capacitancia celular, potencial de membrana de reposo, resistencia de membrana (resistencia de entrada), y la posible reobase, y potencial de acción.

El potencial de membrana en reposo se midió como la diferencia entre los potenciales intracelulares y extracelulares tras la extracción del electrodo de registro de la célula. La resistencia de entrada, a la que referimos como resistencia de membrana o simplemente resistencia, se determinó mediante la inyección de pulsos cuadrados de corriente positivos y negativos (500 ms, 1 Hz; con incrementos de 5 pA; Fig. 8) y se calculó como la pendiente de la relación existente entre corriente y voltaje (relación  $I-V$ ). Cuando hubo evidencias de una rectificación de voltaje, o sag, el valor de voltaje usado para el cálculo de la resistencia fue el valor alcanzado en el pico de voltaje. La reobase, que se define como la mínima corriente inyectada (pulso cuadrado de 100 ms, 1 Hz; incrementos de 5 pA) que genera un potencial de acción en el 50% de los casos, se determina aplicando pulsos de corriente despolarizantes (100 ms, 1Hz, en pasos de 10 pA).

En los experimentos de fijación de corriente, todas las células similares a neuronas incluidas en los análisis mostraron un potencial de membrana de reposo estable de al menos -60 mV. El electrodo se balanceó de forma periódica durante el registro para eliminar la posible modificación en la resistencia del electrodo. Los registros que mostraron deterioro en alguna propiedad electrofisiológica durante los estudios control fueron descartados.



**Figura 8. Análisis de los parámetros electrofisiológicos usando el software Clampfit 10.4.** En esta figura podemos observar el análisis de la resistencia de entrada de una célula similar a neurona. En ella se observa la respuesta en voltaje a pulsos cuadrados de corriente positiva y negativa de 500 ms de duración. En rojo aparece representado el cero o línea base del potencial de membrana de la neurona

#### 3.2.13. Modelo de estrés oxidativo *in vitro* en las rADSC empleando hidroperóxido de cumeno

El ensayo de estrés oxidativo inducido por hidroperóxido de cumeno (HC) *in vitro* se realizó cuando las rADSC alcanzaron el 90 % de confluencia en los frascos T75 en fases P2-P4. Se cambió el medio de los frascos (DMEM + 10% FBS) por medio sin suero con HC a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , previamente utilizada en nuestro laboratorio con efectos oxidantes con escasa reducción de la viabilidad celular en las rADSC (Muñoz et al., 2020). La incubación con HC duró 1 h en el incubador a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$ . Tras el tiempo de incubación, se retiró el medio, se lavó con PBS y se levantaron las células con Tripsina, para su posterior recuento y cultivo para formación de esferas a una densidad de  $1 \cdot 10^6$  células/ml en el MFE. Para el grupo control el medio de cultivo se cambió por medio sin suero. Las muestras de las rADSCs no tratadas y tratadas con HC, se obtuvieron de las células que se levantaron previamente al cultivo de formación de esferas.

#### 3.2.14. Aislamiento y cuantificación de proteínas

La extracción de proteínas se realizó tras levantar con tripsina y centrifugar las células a 300g 5 min, se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet con PBS dos veces, centrifugando en cada lavado. Posteriormente, se retiró el PBS y se añadió el tampón de lisis RIPA (150mM NaCl, 20mM TRIS Base, 1mM EGTA, 1% NP40, 2,5mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM EDTA y 1% Deoxycolato sódico). Luego, se sonicaron utilizando pulsos cortos del sonicador UP-50H a amplitud del 80 % y ciclos de 0.5 y se mantuvieron en hielo 15 min, agitando intermitentemente con el vórtex. Finalmente, se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante que contiene las proteínas. Las muestras de proteínas se congelaron a – 20°C hasta su uso.

La cuantificación de las proteínas se realizó mediante el ensayo BCA (Thermo Scientific, Logan, UT, USA). Este ensayo se basa en la reducción de Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>1+</sup> por proteínas en un medio alcalino con la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva del ión cuproso (Cu<sup>1+</sup>) por ácido Bicinconínico (BCA). La absorbancia del ensayo se determinó a 562 nm utilizando el lector de placas Microplate Reader ASYS UVM340 y se interpoló a una recta patrón realizada con albúmina sérica bovina (BSA) con una concentración proteica conocida.

#### 3.2.15. Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS- PAGE)-Western Blot.

La separación de proteínas por electroforesis se hizo empleando geles de 10 % de acrilamida para proteínas > 40 KDa y geles del 12 % de acrilamida para proteínas < 40 KDa, en un sistema de electroforesis Mini-Protean II (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Los reactivos y volúmenes utilizados para los geles se muestran en la tabla 1.

El buffer de electroforesis que se utilizó estaba compuesto de 25 mM Tris/HCl, 190 mM Glicina y 0,1% SDS. Las muestras se disolvieron en el tampón de carga Laemmli Buffer 4x (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y β-mercaptoetanol al 5 %, y se calentaron a 95 °C durante 5 min para desnaturalizarlas. La electroforesis se llevó a cabo con una intensidad constante fijada de 30 mA/gel en geles de 1.5 mm.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

<b>Tabla 1. Reactivos utilizados para la preparación de geles para electroforesis</b>			
Reactivos	Gel de resolución Volumen 10 ml (1 gel de grosor 1,5mm)		Gel de empaquetamiento Volumen 10 ml
	10%	12%	4%
Concentración de acrilamida % (w/v)			
Solución Acrilamida/Bis (30%)	3,3 ml	4,0 ml	1,3 ml
1,5 M Tris/HCl, 0.4% SDS, pH 8.8 Buffer	2,5 ml	2,5 ml	
0,25 M Tris/HCl, 0.25% SDS, pH 6.8 Buffer			2,5 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
APS 20 %	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl
Agua	4,1 ml	3,4 ml	6,1 ml

Una vez finalizada la electroforesis se transfirieron las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa utilizando el sistema TransBlot Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). El buffer de transferencia se preparó con 25 mM Tris/HCl, 190 mM Glicina y 20% Metanol, y se fijó a un voltaje constante de 60 V durante 2 h. Después de la transferencia, se detectaron las proteínas de interés con los anticuerpos específicos, siguiendo el siguiente protocolo:

- Tinción de las membranas con una solución de Rojo Ponceau (0.2 % de Rojo Ponceau en ácido tricloroacético (TCA) al 3 %) reversible que nos indica si la transferencia se realizó adecuadamente.
- Se lavó la membrana con agua miliQ para retirar el rojo Ponceau de la membrana.
- Para evitar uniones inespecíficas, se bloquea la membrana con leche o BSA al 5 % (dependiendo del anticuerpo utilizado) en TBS-T (20mM Tris/HCl, 500 mM NaCl y 0,05 % de Tween 20) a temperatura ambiente 1 h en agitación suave.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

- Incubación con el anticuerpo primario disuelto en la solución de bloqueo toda la noche a 4°C.
- Al día siguiente, se hacen tres lavados en TBS-T en agitación moderada de 10 minutos cada uno.
- Incubación con el anticuerpo secundario conjugados con HRP correspondiente (Dilución 1/1000-1/5000) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación moderada.
- Tres lavados en TBS-T de 10 min en agitación moderada.
- Revelar la membrana, incubándola con la solución con el kit Clarity Western ECL substrate (Bio Rad, Hercules, CA, USA) y se detecta la señal con el dispositivo de generación de imágenes (Amersham Imager 600).
- La densidad óptica de las bandas se analizó con el software ImageJ (NIH).

**Tabla 2. Especies de los huéspedes, dilución, peso molecular y marca de los anticuerpos primarios utilizados en el Western Blot**

Proteínas/ antígenos	Especies huéspedes	Dilución	Peso molecular	Marca
SIRT1	Conejo	1:1000	120 kDa	Cell Signaling
SOX2	Conejo	1:5000	35 kDa	Abnova
eEF2	Conejo	1:1000	95 kDa	Abyntec Biopharma
$\beta$ -actin	Ratón	1:5000	43 kDa	Sigma-Aldrich
$\alpha$ Tubulin	Ratón	1:3000	52 kDa	Sigma-Aldrich
TLR4	Ratón	1:500	98 kDa	Santa Cruz Biotechnology, Texas

#### 3.2.16. Inducción del modelo de hemiparkinsonismo con 6- Hidroxidopamina

Para la inducción del modelo de hemiparkinsonismo, se utilizaron los siguientes grupos: Grupo control (N= 4), ratas lesionadas con 6-OHDA (N=3) (Grupo 6-OHDA) y ratas lesionadas con 6-OHDA tratadas con células madres (N=3) (Grupo 6-OHDA + rADSC). Los animales se anestesiaron con Isoflurano (IsoFlo, Abbot House, Berkshire, UK) en una cámara. Tras anestesiarlo se colocaron en un aparato estereotáxico y se trepanó el cráneo para posteriormente inyectar la 6-OHDA en la substantia nigra de uno de los hemisferios en los grupos 6-OHDA y 6-OHDA + ADSC. Para las coordenadas de la substantia nigra se tomó como referencia el Atlas de cerebro de *Paxinos y Watson (1986)* en la posición - 5,4 mm antero-posterior (AP),  $\pm$  1,8 mm medio-lateral (ML) y + 8,3 mm dorso-ventral (DV) respecto a bregma. Las células madres del grupo 6-OHDA +ADSC se inyectaron en el cuerpo estriado del grupo de ratas tratadas en las coordenadas + 6.4 mm AP,  $\pm$  3 mm ML y + 0.5 mm DV. La inyección se hizo con la jeringa Hamilton Neurosyringe 700/1700 (Sigma-Aldrich, Sant Louis, MO, USA) y para reducir los daños causado por el procedimiento se introdujo la aguja lentamente, se mantuvo 4 min y se inyectó 1 ml de 6-OHDA con un flujo de 0.5 ml/min y 1.5 ml de la solución de células madres ( $10^5$  células/ml) a un flujo de 0.4 ml/min. La aguja se sacó 5 min después de la inyección.

#### 3.2.17. Test de rotación

A los grupos de ratas lesionadas con 6-OHDA y lesionadas con 6-OHDA y tratadas con células madres se les administró D-amphetamine hemisulphate salt (Sigma-Aldrich, Sant-Louis, MO, USA) disuelta en una solución salina. Inicialmente se administró una dosis de 3 mg/kg para evaluar si las ratas giraban. En el caso de que no girasen más de 4 vueltas por minuto, las ratas se apartaron del experimento. Para el test de rotación, se administró 4 mg/kg a los animales, los cuáles fueron previamente habituados al entorno, y se colocaron sobre un recipiente libre de distracciones a temperatura ambiente. Tras 5 minutos, se contaron el número de giros que realizaban en un sentido durante 5 minutos. El test de rotación inicial se llevó a cabo una semana después de la lesión. Los test de rotación posteriores con las ratas que presentaron un

comportamiento giratorio se iniciaron 45 días después de la lesión y se realizaron cada 15 días durante cuatro meses.

#### **3.2.18. Perfusión, congelación y cortes histológicos.**

Las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral 6% inyectado intraperitonealmente, y se perfundieron a través del Ventrículo izquierdo con una solución salina (NaCl 0.9%) para lavar el sistema circulatorio. Posteriormente se fijaron los tejidos con una solución de Paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato NaHPO<sub>4</sub> y sacarosa al 5 %. Una vez fijados los tejidos, se seccionó la cabeza de la rata, y se extrajo el cerebro con ayuda de tijeras y pinzas. Los cerebros se dejaron durante un día en paraformaldehído al 4 %, y se pasaron a un gradiente de sacarosa al 10 %, 20 % y 30 %, hasta que los cerebros precipitaban progresivamente al fondo del frasco.

Para la congelación, se sumergieron los cerebros en Isopentano brevemente y se congelaron a -80 °C. Para los cortes histológicos de interés se tomó como referencia las imágenes del Atlas de Paxinos y Watson, realizando cortes de 25 µm de grosor.

#### **3.2.19. Inmunohistoquímica de los cortes de tejido cerebral de *substantia nigra***

La inmunohistoquímica se realizó siguiendo los pasos del KIT IHC Detection de Abcam, con algunos pasos adicionales.

Los portaobjetos con los cortes de tejido cerebral se calentaron en una placa calefactora a 37° C durante 30 min y se delimitaron con una circunferencia marcada con un rotulador hidrófobo (DAKO pen). Posteriormente, los portaobjetos colocados en un rack se sumergieron en una cubeta con citrato sódico que a su vez se introdujo en una jarra de plástico con agua, sin que ésta entrase en la cubeta. La jarra con la cubeta que contenía los portas se calentó en el microondas a 500 W durante 4 min 2 veces, cambiando el agua de la jarra y el citrato. Luego, se realizó tres lavados de 10 minutos con PBS. Seguidamente, se bloquearon las peroxidasas endógenas colocando los portaobjetos en horizontal en una cámara húmeda utilizando una solución “Hydrogen Peroxide block” suministrada por el kit durante 10 min. Los portaobjetos se lavaron dos

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

veces en PBS durante 10 min y se les añadió el “Protein Block” durante 10 min en la cámara húmeda para bloquear proteínas inespecíficas que puedan interactuar con el anticuerpo primario. El anticuerpo primario utilizado fue el anti-tirosin-hidroxilasa (TH) diluido 1/300 en PBS, con FBS al 10 % y Tritón X-100 al 0.25 %. y OX-6. Tras añadir la solución con el anticuerpo primario a los portaobjetos colocados en la cámara húmeda, éstos se incubaron toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, los portaobjetos se colocaron en el rack dentro de la cubeta y se lavaron tres veces en PBS durante 10 min. A continuación, los portaobjetos se incubaron en cámara húmeda con el anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo y ratón proporcionado por el Kit durante 30 min a Temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con PBS, y se añadió la solución “Streptavidin Peroxidase” del kit durante 10 min a Temperatura ambiente. Seguidamente, se preparó una solución de Diaminobencidina (DAB), compuesta por el cromógeno (“DAB chromogen” proporcionado por el kit), y el sustrato de la DAB (“DAB substrate” proporcionado por el kit), se mezcló con el Vortex y se añadió a los tejidos y se incubó entre 1-3 minutos. Se lavaron dos veces con PBS, y se deshidrataron siguiendo la secuencia: Etanol 50%, 70 % y 90 % durante 5 min en cada uno, Etanol 100 % 10 minutos, y Xileno 30 segundos. Para el montaje, se añadió DPX, se cubrieron los portaobjetos con cubreobjetos rectangulares y se dejaron secar 48 h, antes de observarlos en el microscopio.

#### 3.2.20. Análisis estereológico de células TH+ en *substantia nigra*

El recuento de células TH+ en la *substantia nigra* se llevó a cabo empleando el análisis estereológico de ambas *substantias nigras* por separado, al tratarse de un modelo con diferencias unilaterales, considerándose ipsilateral el lado correspondiente a la zona de inyección de la 6-OHDA y el contralateral como la *substantia nigra* opuesta. El análisis se llevó a cabo tomando distintos cortes coronales del cerebro donde se localiza la *substantia nigra* separados entre sí una distancia de 6 cortes de 25  $\mu\text{m}$  de grosor, es decir, 150  $\mu\text{m}$ , muestreando de esta forma el 20 % de la *substantia nigra* total. A partir del recuento de puntos Cavalieri localizados dentro de las *substantias nigras* acotadas mediante el uso de la herramienta de dibujo, el área de dichos puntos ( $\mu\text{m}^2$ ), el grosor



de los cortes (25  $\mu\text{m}$ ) y la serie de cortes que separa uno de otro (6), se obtiene el volumen total aproximado de la substantia nigra. Las células TH+ se contaron a través de frames de 15000  $\mu\text{m}^2$  dispuestos al azar. La relación entre las células TH+ respecto al volumen en  $\text{mm}^3$  se calculó en base al volumen de substantia nigra y las células TH+ previamente calculados.

#### **3.2.21. Recuento de microglia activa en la *substantia nigra***

La microglia activa presente en los cortes de cada grupo animal (Control, 6-OHDA y 6-OHDA+rADSC) después de 10 días fue inmunomarcada mediante la técnica inmunohistoquímica ya descrita, con el anticuerpo anti-OX-6 que reconoce el complejo de histocompatibilidad II presente en la microglia activada (De Pablos et al., 2013). Para el recuento de microglía se usó el software Análisis Imaging (Soft Imaging System GMBH, MÜNSTER, Alemania) acoplado a una cámara Polaroid DMC (Polaroid, Cambridge, MA) incorporada a un microscopio óptico Leika (Leika Mikroskopie, Wetzlar, Alemania). A cada hemisferio de cada corte, se le atribuyeron 5 regiones aleatorias con una dimensión de 1000  $\mu\text{m}^2$  (40 x 25  $\mu\text{m}$ ) y se procedió al recuento de las células OX-6 positivas bajo el objetivo de 40X.

#### **3.2.22. Análisis estadístico**

Las gráficas se muestran como la media  $\pm$  error estándar. Para los análisis estadísticos se utilizó el programa GraphPadPrism Version 5.03 (Graph Pad Software). La evaluación estadística se realizó mediante varios test estadísticos, empleando el test de ANOVA-de dos vías, seguido por el test de Tukey para comparar diferentes grupos de datos, y el test de Dunnet para comparar diferentes grupos de datos con un grupo control. El test t de student se aplicó para comparar grupos no pareados. Se consideró significativo un valor de  $p \leq 0.05$ .

# 4. RESULTADOS

---

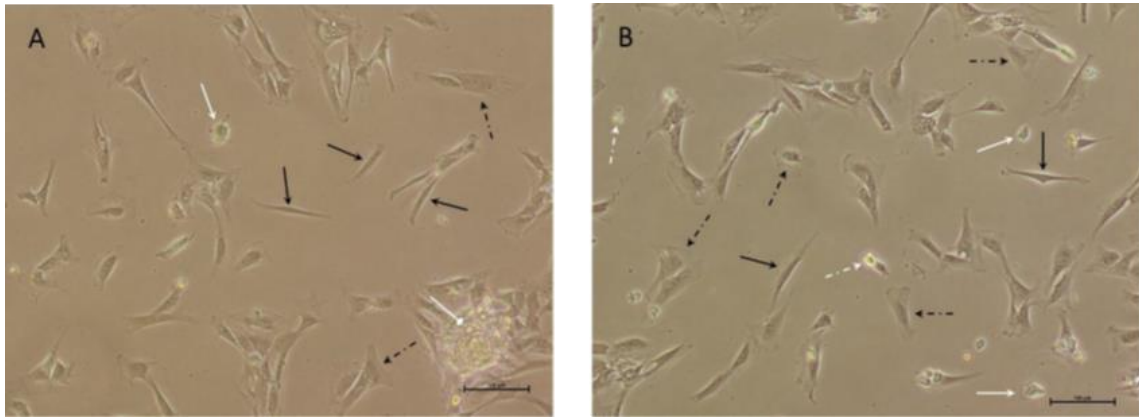


### 4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSO.

#### 4.1.1. Obtención de rADSC

El aislamiento y expansión de las células madre derivadas del tejido adiposo es crucial para obtener una población celular homogénea y acorde a los criterios establecidos por la ISCT (Dominici et al., 2006). Existen diferentes métodos para el aislamiento de células madre siendo común la práctica de cultivar las células derivadas de la fracción vascular estromal (FVE) (Freitas et al., 2014). En nuestro caso, tras 2-4 días de cultivo de la FVE, solo se mantuvieron las células adheridas a la superficie del frasco de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, desechando aquellas que permanecían flotando.

Pruebas de citometría previas realizadas por nuestro grupo de investigación, demostraron que la separación magnética utilizando el anticuerpo CD90.1 es eficaz para el aislamiento de las células madre derivadas del tejido adiposo, mostrando en la citometría marcadores positivos para CD90 y CD29, y marcadores negativos para CD11b, CD45 y CD34, (Muñoz et al., 2018). Por tanto, las células adheridas se pasaron a través de la columna para hacer separación magnética y aislar las células madre mesenquimales (Fig. 9). Al observar al microscopio de fase invertida las células cultivadas, éstas muestran poblaciones de células adheridas al plástico con diferentes morfologías, abundando células fusiformes y otras células de mayor tamaño con una morfología más aplanada (indicadas con flechas negras continuas y discontinuas, respectivamente (Fig. 9 **A** y **B**). Las células flotantes no adheridas, presentan una morfología circular con cierta refringencia a la luz (indicadas con flechas blancas, Fig. 9 **A** y **B**).

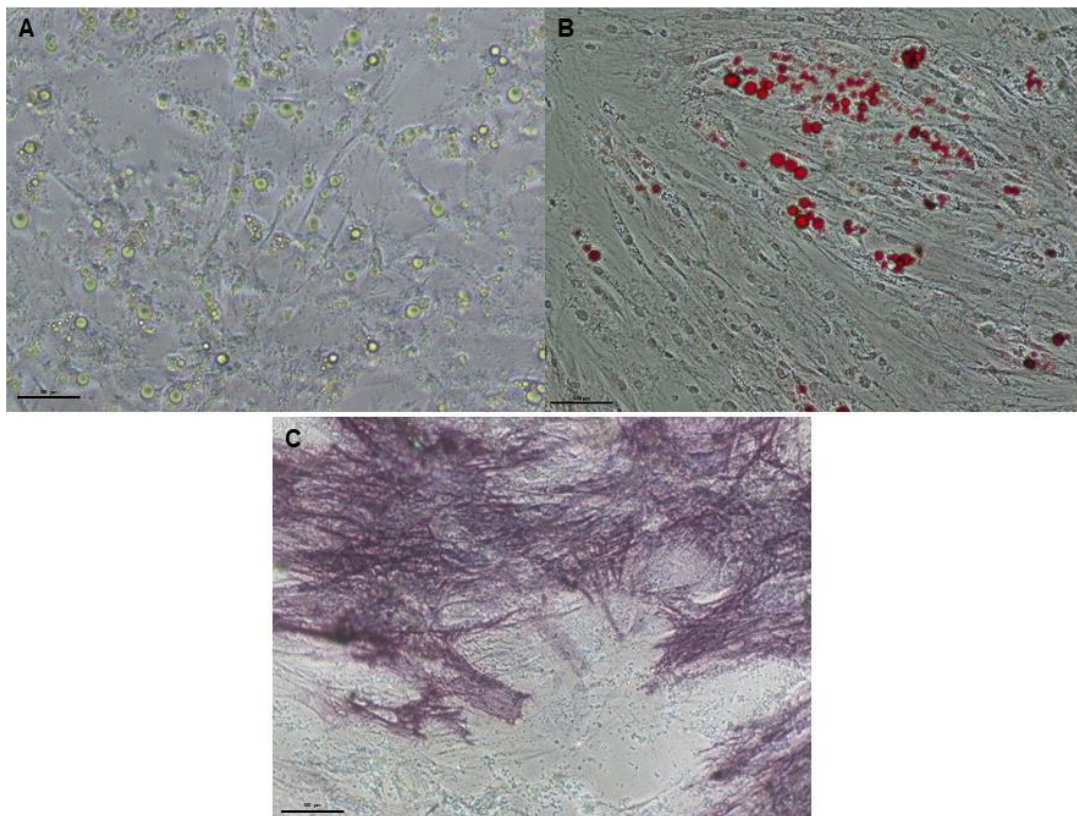


**Figura 9. Morfología de las rADSCs en cultivos de la FVE de primer pase (P1).** Las fotografías **A)** y **B)** fueron tomadas en un microscopio de fase invertida con un objetivo 10x. Las flechas negras señalan células adheridas al plástico, las continuas las de morfología fusiforme y las negras discontinuas señalan células aplanadas. Las flechas blancas continuas señalan células adheridas pequeñas y redondeadas, y las flechas blancas discontinuas señalan células flotantes. La barra de escala equivale a 100  $\mu\text{m}$ .

Las poblaciones de estas células adherentes son las que se utilizaron en los experimentos *in vitro* e *in vivo*, y que se denominaron como células madre derivadas de tejido adiposo de rata (rADSC).

### 4.1.2. Capacidad de diferenciación multipotente de las rADSC

Otro de los criterios establecidos para la consideración de células madre mesenquimales es su capacidad para diferenciarse al menos a adipocitos, condrocitos y/o osteoblastos. Tras llevar a cabo los protocolos de diferenciación a adipocitos y osteoblastos de la población celular adherida al plástico, se observaron vesículas lipídicas citoplasmáticas características de adipocitos (Fig. 10.A) que fueron teñidas con Oil-Red-O (Fig. 10.B), y la tinción de color azul púrpúreo por acción de la fosfatasa alcalina de osteoblastos derivados de las rADSC (Fig. 10.C)



**Figura 10. Pruebas de multipotencialidad de las células madre derivadas del tejido adiposo. A)** células con vesículas lipídicas citoplasmáticas características de adipocitos. **B)** Vesículas lipídicas teñidas de rojo con el reactivo Oil-Red-O. **C)** Células teñidas con el reactivo BCIP/NBT que dan color azul-purpúreo a osteoblastos. Imágenes tomadas en microscopio de fase invertida con el objetivo 10x. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

Teniendo en cuenta la eficacia de la citometría en estudios previos y las capacidades de adhesión al plástico y de diferenciación multipotencial a adipocitos y osteoblastos, se consideran que las células obtenidas son células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo o rADSC.

### 4.2. IMPLICACIÓN DEL TLR4 EN EL PAPEL INMUNOMODULADOR DE LAS rADSC

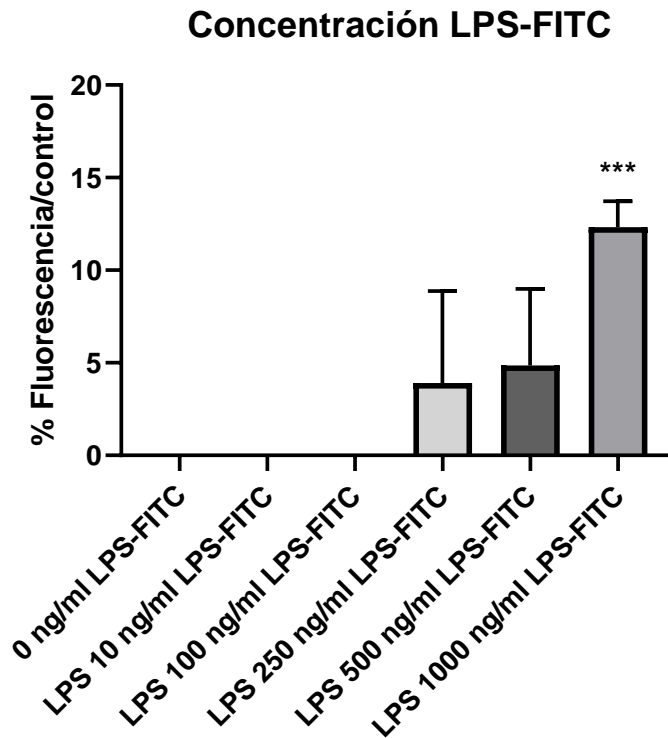
En base a un modelo neuroinflamatorio *in vivo* en ratas realizados previamente en nuestro grupo de investigación, se observó un efecto neuroprotector de las rADSC en la *substantia nigra* disminuyendo la activación microglial y previniendo la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (Muñoz et al., 2019). En base a estos resultados, se

propuso la hipótesis de que parte de este efecto se podría deber a la posible interacción directa entre el LPS y las rADSC a través de su receptor TLR4.

### **4.2.1. Capacidad de captación del lipopolisacárido por las rADSC.**

Para estudiar la captación del LPS por las rADSC, se llevaron a cabo distintos ensayos en cultivos de rADSC empleando el LPS conjugado con moléculas fluorescentes FITC, optimizando distintas variables de los ensayos como la concentración del LPS, el tiempo de incubación y el número de células empleadas en el estudio, y descartar el posible efecto de adhesión de LPS al plástico.

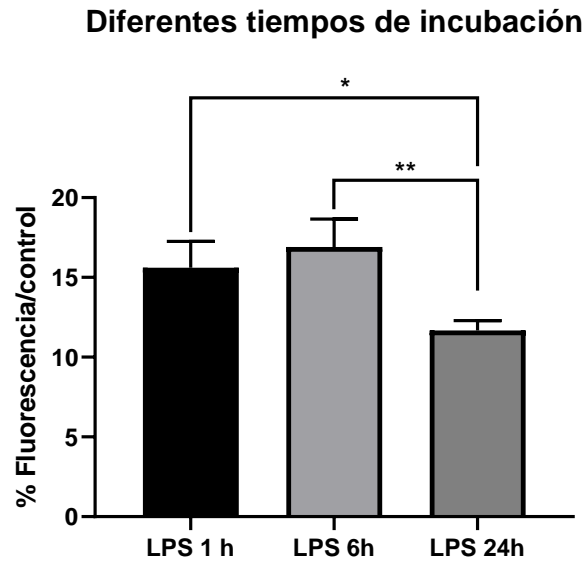
En primer lugar, en el ensayo realizado con diferentes concentraciones de LPS-FITC y 1 h de incubación con 10.000 células demostró que hay diferencia significativa tras el análisis de varianzas empleando el test de Dunnet y comparar las distintas concentraciones de LPS-FITC con los valores control (LPS-FITC 0 ng/ml). El porcentaje de fluorescencia unida a las rADSCs con 1000 ng/ml de LPS-FITC demostró una diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) tras la captación del 12.33 % de fluorescencia (Fig. 11). A concentraciones de 250 y 500 ng/ml no se obtuvieron diferencias significativas, pero se aprecia un incremento en la fluorescencia captada por las rADSC. En este sentido, en los siguientes experimentos se optó por utilizar las concentraciones más altas de LPS-FITC y aumentar el número de células y el tiempo de exposición.



**Figura 11. Porcentaje de LPS-FITC unido a rADSCs en función de la concentración del ligando.** Para el experimento se utilizaron 10.000 células. El tratamiento con LPS-FITC duró 1 h. Los grupos no muestran diferencia estadística entre ellos ( $p < 0,05$ ).  $N=3$  para 10, 250 y 500, 100 y 1.000 ng/ml. Test de Dunnet, comparando los distintos grupos respecto a la condición LPS 0 ng/ml ( $p < 0,001$ ).

En segundo lugar, se realizó un ensayo de unión de fluorescencia con 1.000 ng/ml de LPS-FITC y 10.000 células/pocillo variando la duración del tratamiento (Fig. 12). En estos experimentos se observó diferencias significativas en el porcentaje de LPS-FITC que se une a las células para los distintos tiempos ensayados tras el ANOVA y las múltiples comparaciones entre los distintos grupos utilizando el test de Tukey. Las células tratadas 1 y 6h presentaron diferencias significativas con las células tratadas 24h, habiendo un 3.9 % mayor de fluorescencia (1.33 veces) a 1h y un 5.32 % de fluorescencia mayor a 6h (1.44 veces) ( $p < 0,05$ ). Consecuentemente, para los siguientes experimentos se decidió usar una hora de incubación, que además es el tiempo que más se encuentra en la literatura científica para activar al TLR4 de las rADSC.



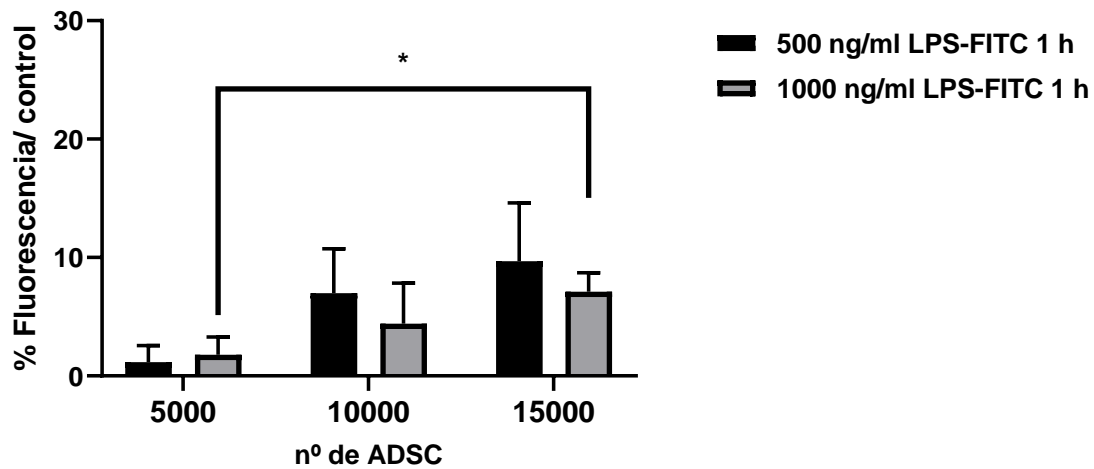


**Figura 12. Porcentaje de LPS-FITC unido a rADSCs en función del tiempo de incubación.** Las células se incubaron durante 1 (N=3), 6 (N=3) y 24 h (N=3). Para el ensayo se utilizaron 10.000 células y una concentración de LPS-FITC de 1.000 ng/ml. Los grupos de 1 y 6 h muestran diferencia significativa con el grupo de 24h. ANOVA (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

En tercer lugar, el ensayo incubando 1 h con las concentraciones más altas de LPS-FITC, 500 y 1.000 ng/ml, y diferente número de células, demostró diferencias significativas a la mayor concentración de LPS-FITC (1000 ng/ml) con la mayor densidad celular (15.000 células/pocillo). Se realizó un ANOVA de 2 vías, utilizando el test de Tukey para comparar los distintos grupos, y se confirma la diferencia en el porcentaje de fluorescencia con el incremento del número de células, como se puede observar en la Figura 13, donde a una concentración de 1000 ng/ml de LPS-FITC, el grupo de 15000 células por pocillo presenta un aumento de 5.34 % (4 veces) respecto al grupo de 5000 células ( $p < 0.05$ ).

En la gráfica se aprecia el incremento de la media en la fluorescencia en relación al incremento del número de células para las concentraciones 500 y 1000 ng/ml de LPS-FITC.

## Densidad celular



**Figura 13. Porcentaje de unión de LPS-FITC a rADSCs respecto al control (LPS 0 ng/ml) frente al número de células.** Los datos se han obtenido agrupando los porcentajes de fluorescencia de 500 y 1.000 ng/ml para las distintas cantidades de células. Los grupos muestran diferencias significativas dependiendo del número de células. ANOVA de dos vías (\* $p < 0,05$ ).  $N=3$  para todos los grupos.

Con estos resultados, se deduce que concentraciones de 1000 ng/ml de LPS con un tiempo de incubación de 1h, causa un incremento en la capacidad de unión de LPS a las rADSC, correlacionado con el número de rADSC presentes.

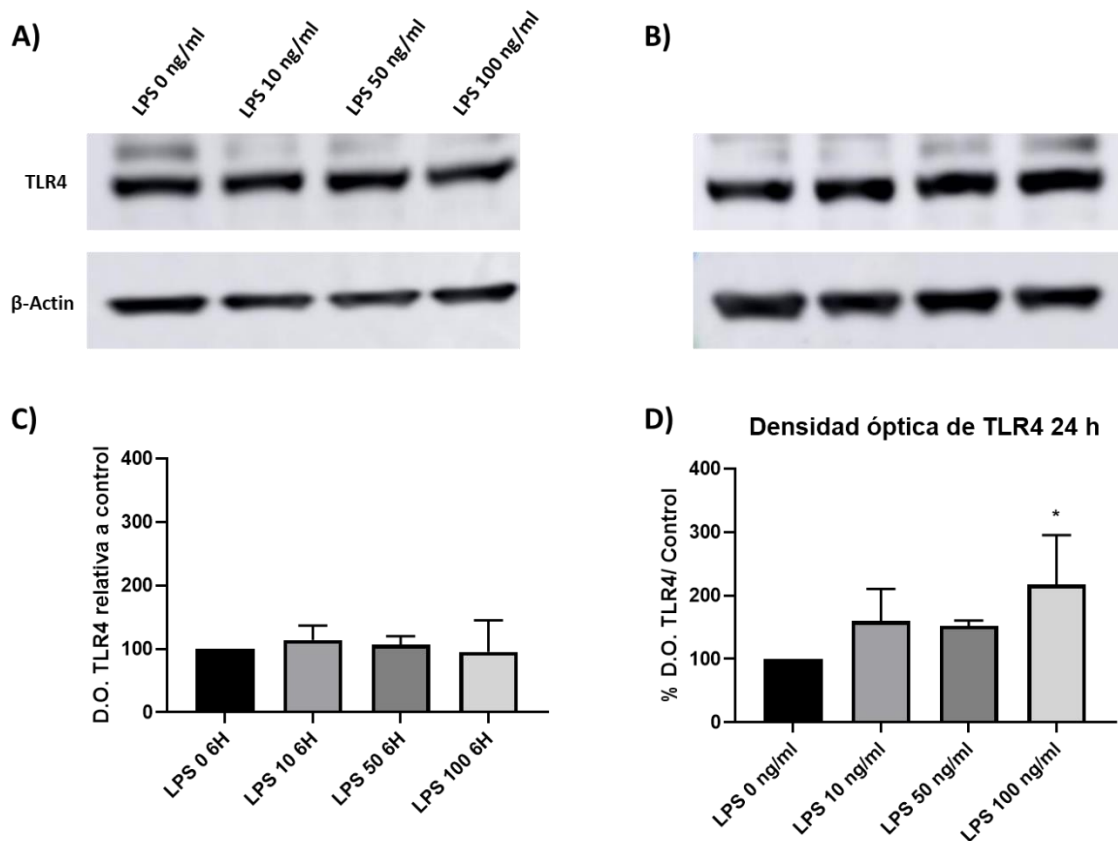
#### 4.2.2. Expresión de receptor TLR4 en las rADSC.

A raíz de los resultados obtenidos en la interacción entre LPS y las rADSCs, se estudió el papel de TLR4 en dicha interacción, ya que este receptor es uno de los principales receptores de LPS, e interviene en la activación de  $\text{NF}\kappa\beta$  y la posterior transcripción de citoquinas proinflamatorias, y por lo tanto en la generación del fenotipo proinflamatorio de las MSC (Xiaosong Chen et al., 2016; Waterman et al., 2010).

Para determinar la expresión de TLR4 tras la estimulación con LPS, se llevaron a cabo cuantificaciones de la expresión proteica mediante análisis de Western blots y de inmunofluorescencia de las rADSC tratadas con LPS a concentraciones comprendidas entre 0 y 100 ng/ml y tiempos de incubación de 6 y 24h.

## 4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el western blot muestran diferencias en la expresión de TLR4 en función de la concentración de LPS utilizada en el tratamiento a distintos tiempos. Así, en la cuantificación de la densidad óptica de las bandas se observa un incremento de TLR4 con el aumento de la concentración de LPS, siendo significativamente mayor, más de dos veces respecto al control, a una concentración de 100 ng/ml de LPS a las 24h (Fig. 14).

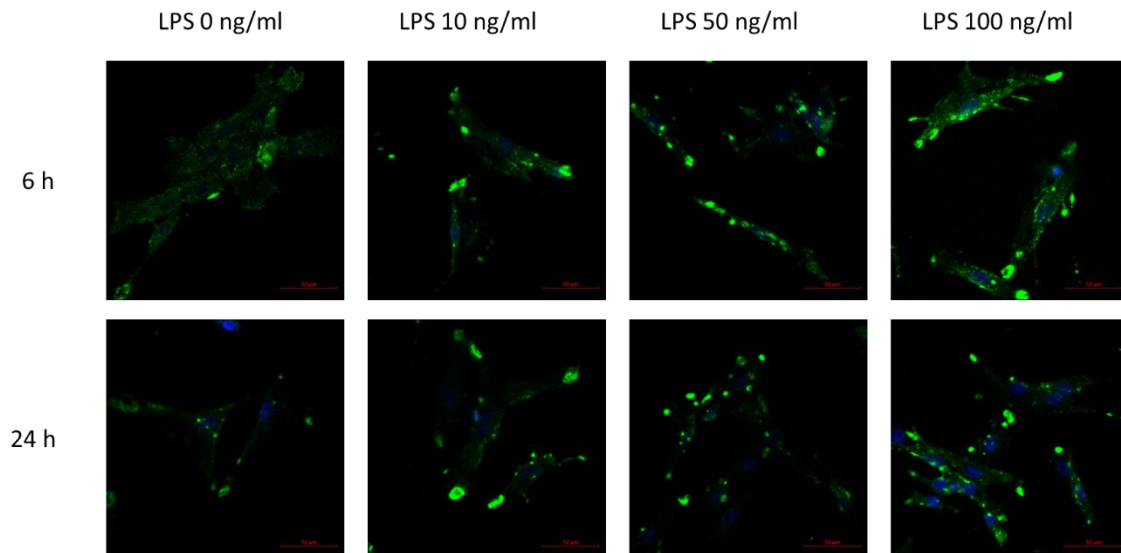


**Figura 14. Análisis de la densidad óptica relativa de TLR4 respecto a LPS 0 ng/ml. A) y B)** Bandas de TLR4 (98 KDa) y  $\beta$ -Actina (42 KDa). **C) y D)** Gráficas del porcentaje de densidad óptica relativa al grupo LPS 0 ng/ml. Se observa diferencia significativa con LPS 100 ng/ml a 24 h. ANOVA (\*  $p < 0.05$ ).

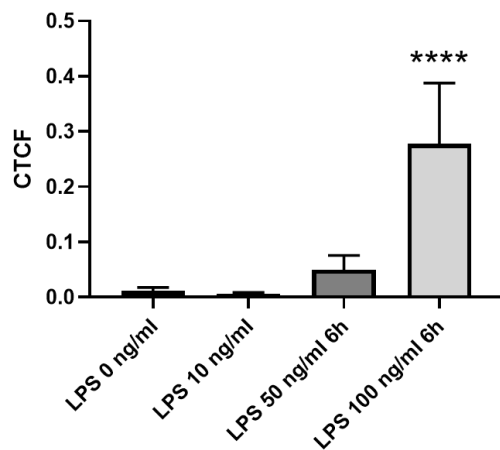
De la misma manera, el análisis de la inmunofluorescencia mostró un aumento de la señal conforme se incrementó la concentración de LPS. Tras el análisis de cuantificación de la fluorescencia en imágenes tomadas al azar el aumento fue significativo a la concentración de 100 ng/ml, tanto a 6 como a 24 h de incubación con LPS (Fig. 15).

A)

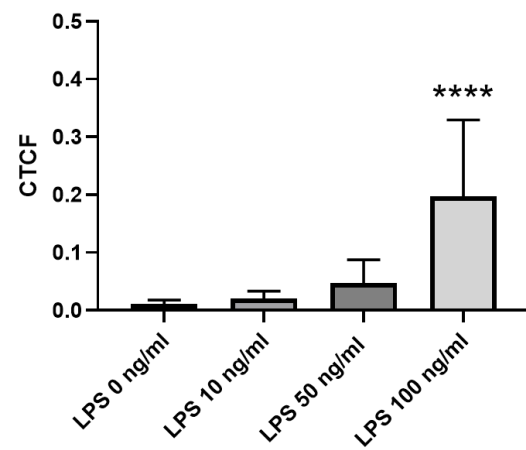
## 4. RESULTADOS



**B) Fluorescencia TLR4 con LPS 6h**



**C) Fluorescencia TLR4 con LPS 24h**



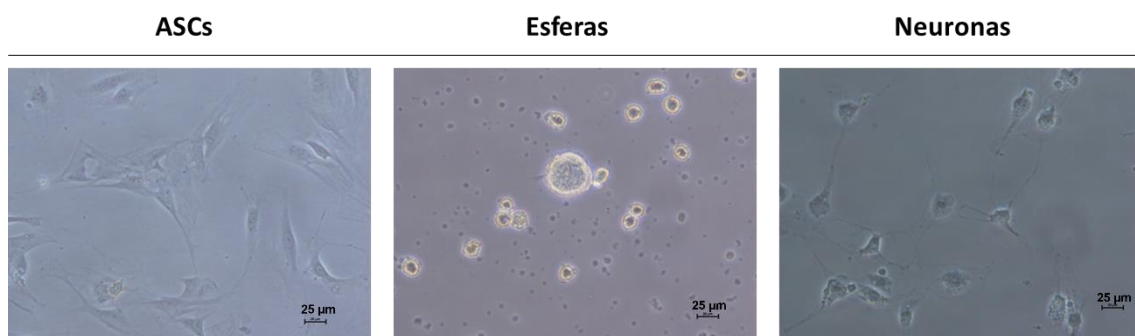
**Figura 15. Inmunofluorescencia de TLR4 en las rADSC. A).** Las células tratadas durante 6 y 24 h a diferentes concentraciones de LPS (0, 10, 50 y 100 ng/ml). **B).** Cuantificación de la fluorescencia de TLR4 en rADSC en las distintas condiciones a 6h y **C)** 24h. La fluorescencia de TLR4 a una concentración de 100 ng/ml presenta diferencias significativas respecto al control tanto a 6h como a 24h de tratamiento ( $p < 0.001$ , indicado con \*\*\*\*). CTCF: Fluorescencia celular total corregida. Los datos se obtuvieron de 4 imágenes al azar por condición obtenidas con un objetivo de 20x.

Estos resultados nos indican que las rADSC responden a la exposición con LPS aumentando la expresión de TLR4. Este hecho podría explicar la implicación de TLR4 en la respuesta inmonomoduladora de las rADSC.

### 4.3. CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN DE rADSC A CÉLULAS MADRE NEURONALES Y CÉLULAS SIMILARES A NEURONAS

A pesar de que el mecanismo molecular que subyace en la diferenciación de las rADSCs a neuronas no está bien establecido, se ha propuesto un modelo basado en similitudes moleculares entre la diferenciación neuronal de rADSC y la neurogénesis adulta. Por ello se han utilizado marcadores característicos de cada estadio de la diferenciación neuronal, tales como la Nestina, que es un reconocido marcador de proteínas de filamento intermedio de células madre neurales (NSC) presentes en el desarrollo y en sistema nervioso central adulto (Suzuki et al., 2010), y la proteína asociada al microtúbulo MAP2ab (H. T. Zhang et al., 2012) que interactúa con la actina filamentosa de neuronas adultas maduras.

Desde un punto de vista morfológico, tras la observación al microscopio en campo claro, en la Figura 16 se ven las diferencias en la forma celular durante el proceso de diferenciación de las rADSCs a neuronas. Así, las rADSC muestran características morfológicas típicas de la población de células madre. Las neuroesferas se observan como células redondeadas aglutinadas en diferentes tamaños y, por último, las neuronas se muestran como células con prolongaciones propias del fenotipo neuronal.



**Figura 16: Cambios morfológicos durante el proceso de transdiferenciación.** Aspecto morfológico de las rADSC, las esferas o NSC y de las neuronas formadas a partir de ellas. Barra de escala: 25 µm

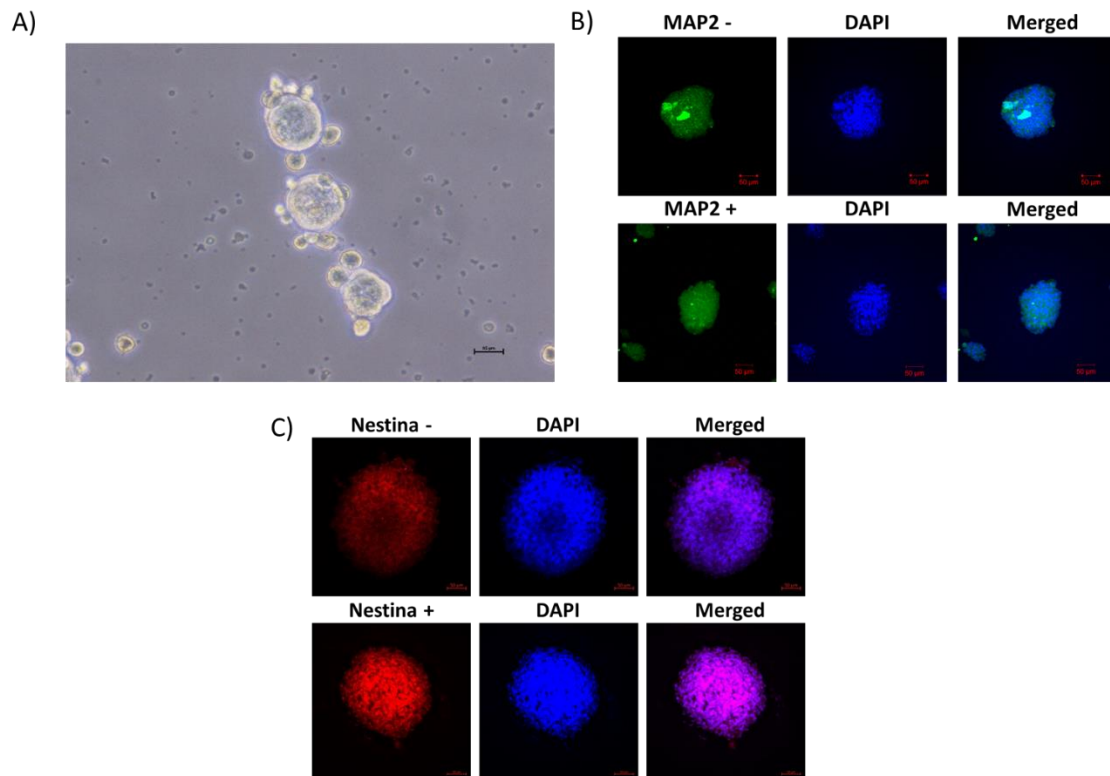
#### 4.3.1. Formación e identificación de células madre neurales o neuroesferas.

Como puede observarse en las imágenes de campo claro de la Figura 17.A, se distinguen agrupaciones celulares de morfología redondeada con el centro un tono más oscuro que

## 4. RESULTADOS

la periferia, presentando diversos diámetros, comprendidos entre 25  $\mu\text{m}$  y 75  $\mu\text{m}$ , que se corresponde con la morfología típica de las neuroesferas.

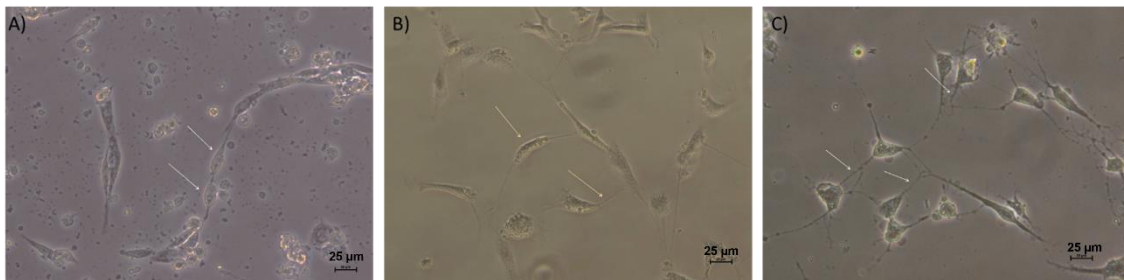
Para determinar que las rADSCs se habían transformado en neuroesferas se realizaron los marcajes con Nestina y MAP2 mediante inmunofluorescencia. Se detectó el marcador de célula madre neural Nestina (rojo), el cual apareció con mayor intensidad en las esferas respecto al control. En el centro se observa una mayor intensidad en la señal de fluorescencia debido a la mayor densidad de células (Fig. 17.C). Estos resultados nos confirmaron que estas agrupaciones de células eran neuroesferas. Para corroborar el hecho de que las células estaban en fase de inmadurez y no en un estado de diferenciación más avanzado se realizó un marcaje con MAP2 que confirmó que las células no eran neuronas maduras, ya que eran negativas para este marcador (Fig. 17.B).



**Figura 17. Inmunofluorescencia de esferas formadas a partir de células derivadas de la fracción estromal del tejido adiposo. A)** Esferas de 7 días en cultivo con diámetros comprendidos entre 25 y 75  $\mu\text{m}$ . En un objetivo de 20x (Barra de escala: 25  $\mu\text{m}$ ). **B)** Imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencia de las esferas usando el marcador de neuronas adultas MAP2. El control se realizó con el Anticuerpo secundario Alexa Fluor 555 (rojo). **C)** Imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencia de las esferas usando el marcador de célula madre neural Nestina. El control se realizó con el Anticuerpo secundario AlexaFluor 488(verde). (Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ ).

### 4.3.2. Formación y detección de células similares a neuronas

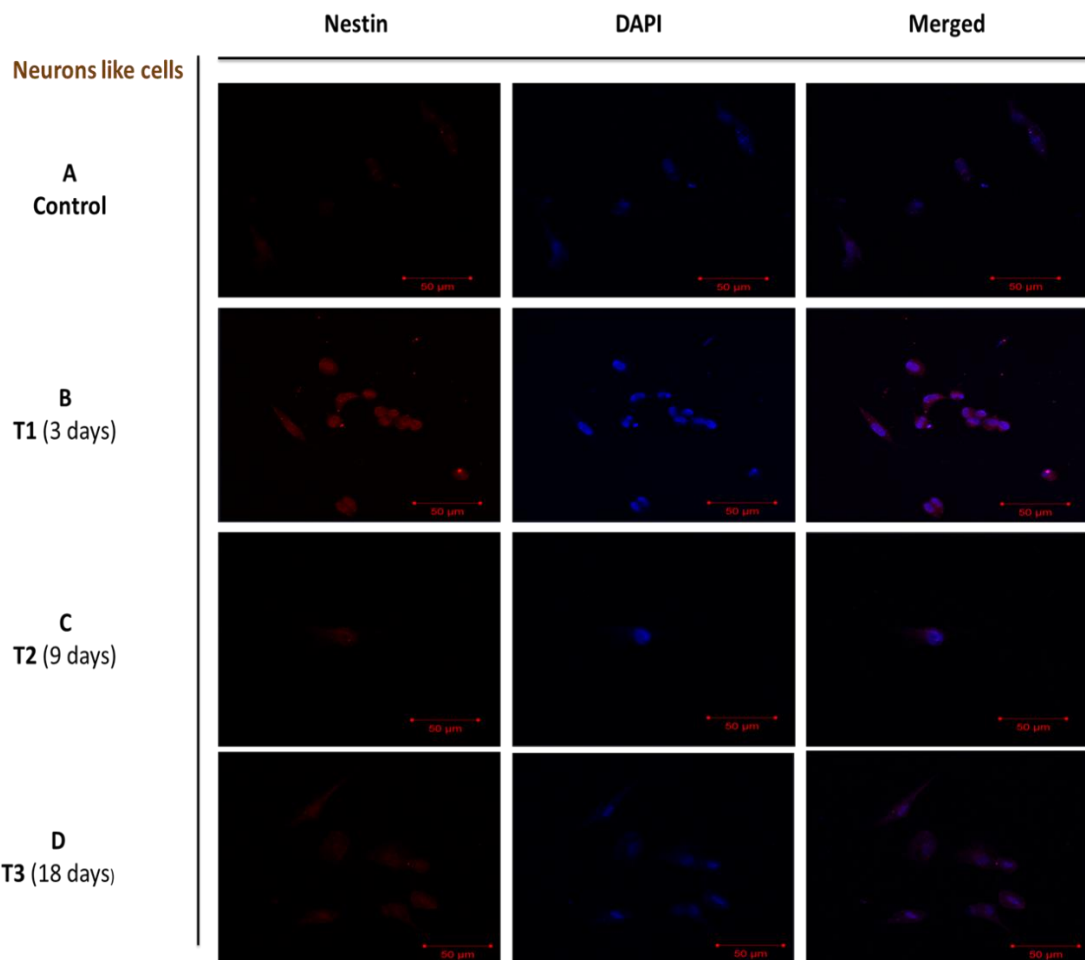
Durante el proceso de diferenciación a neuronas, se tomaron imágenes en el microscopio óptico de las células similares a neuronas (NLC) en diferentes momentos del proceso. A los tres días de cultivo, estas células presentan una morfología bipolar característica, con prolongaciones cortas, sin observarse contactos visibles entre ellas (Fig. 18. A). A los 14 días, las NLC presentan un cuerpo más alargado, y prolongaciones más extensas, siendo más visibles las conexiones entre las células (Fig. 18. B). A los 25 días, las NLC presentan un cuerpo más grande y redondeado, y las conexiones entre las células están más ramificadas identificándose incluso conexiones entre células (Fig. 18.C).



**Figura 18. Imágenes en microscopio óptico de las células similares a neuronas (NLC) a distintos días en cultivos. A)** Imagen de NLC en cultivo de 3 días. Presentan un cuerpo alargado y prolongaciones cortas. **B)** Imagen de NLC en cultivo 14 días. Las flechas indican un cuerpo mayor y las conexiones con células vecinas. **C)** Imagen de NLC en cultivo 25 días. Las flechas indican las conexiones ramificadas con células vecinas que presentan. (Barra de escala: 25 µm)

Mediante la detección por inmunofluorescencia con los marcadores de Nestina y MAP2 en las células similares a neuronas (NLC) originadas a partir de las neuroesferas, se pudo observar el proceso de diferenciación.

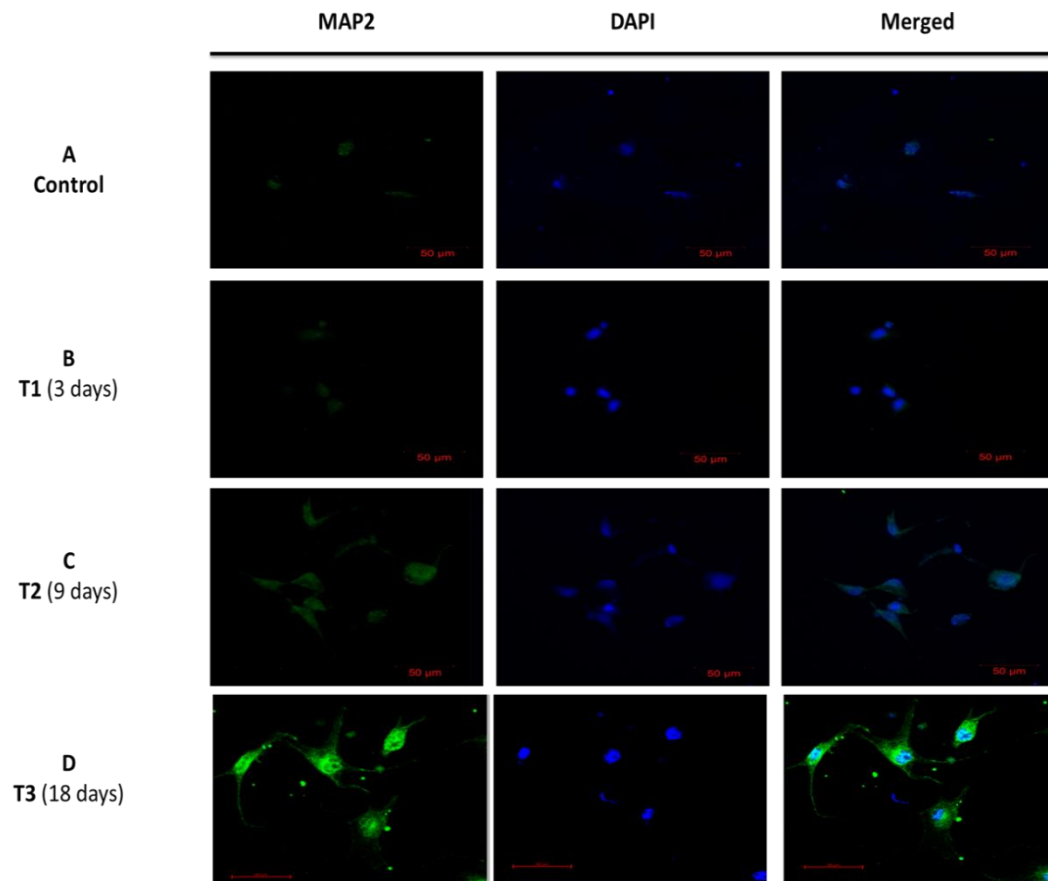
El marcaje con Nestina sigue siendo positivo a los 3 días de cultivo tras la exposición de las neuroesferas al medio de inducción neuronal lo que nos indicó que, a pesar de tener las células cierta morfología neuronal, aún seguían estando en un estado inmaduro de diferenciación a neuronas. Este marcaje fue disminuyendo la intensidad conforme avanzaba el tiempo de cultivo, desapareciendo prácticamente a los 9 y 18 días, lo que nos indicó que las células estaban perdiendo el estado indiferenciado (Fig. 20).



**Figura 20. Expresión del marcador Nestin en NLC a distintos días en cultivo de diferenciación neural. A)** Control con Hoechst sin anticuerpo primario anti-Nestin. **B)** Expresión de Nestin en células en 3 días en cultivo de diferenciación a neuronas. **C)** Expresión de Nestin en células en 9 días en cultivo de diferenciación neural. **D)** Expresión del marcador Nestin en células en 18 días en cultivo de diferenciación neural.

El inmunomarcaje con MAP2 mostró que a los 18 días de cultivo en medio de diferenciación neuronal las células dieron una señal positiva en comparación con el control y con las células en cultivo de 3 y 9 días. Este incremento progresivo del marcaje con MAP2 con el tiempo de cultivo indica que las células empiezan a presentar características neuronales que se corresponden a un fenotipo de neurona madura como se observa en la figura 21D.

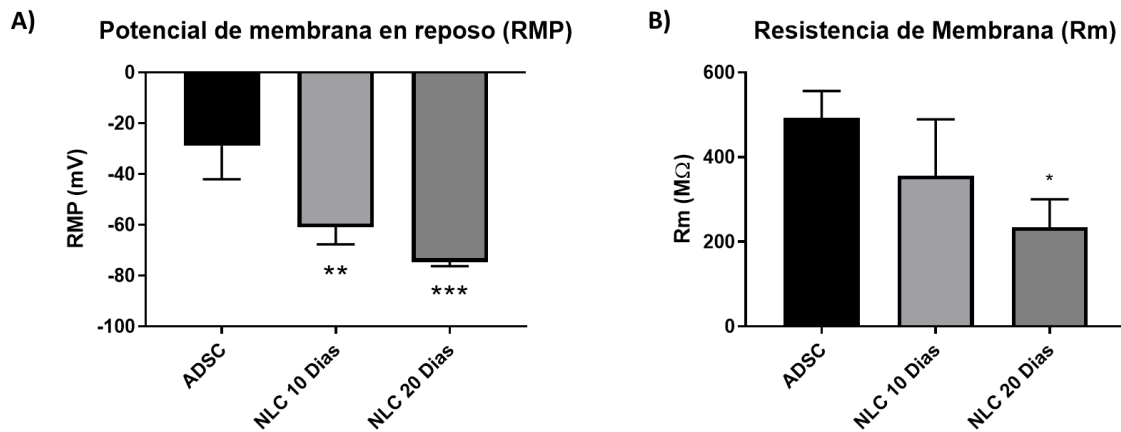




**Figura 21. Expresión del marcador MAP2 en NLC en diferentes días de cultivo. A)** Control de las NLC, con Hoechst y sin anticuerpo primario anti-MAP2. **B)** Expresión del marcador MAP2 en células en cultivo en medio de diferenciación durante 3 días. **C)** Expresión de MAP2 en células en cultivo en medio de diferenciación neuronal durante 9 días. **D)** Expresión de MAP2 en células en cultivo en medio de diferenciación neuronal durante 18 días.

#### 4.3.3 Características electrofisiológicas de las células similares a neuronas derivadas de las ADSCs

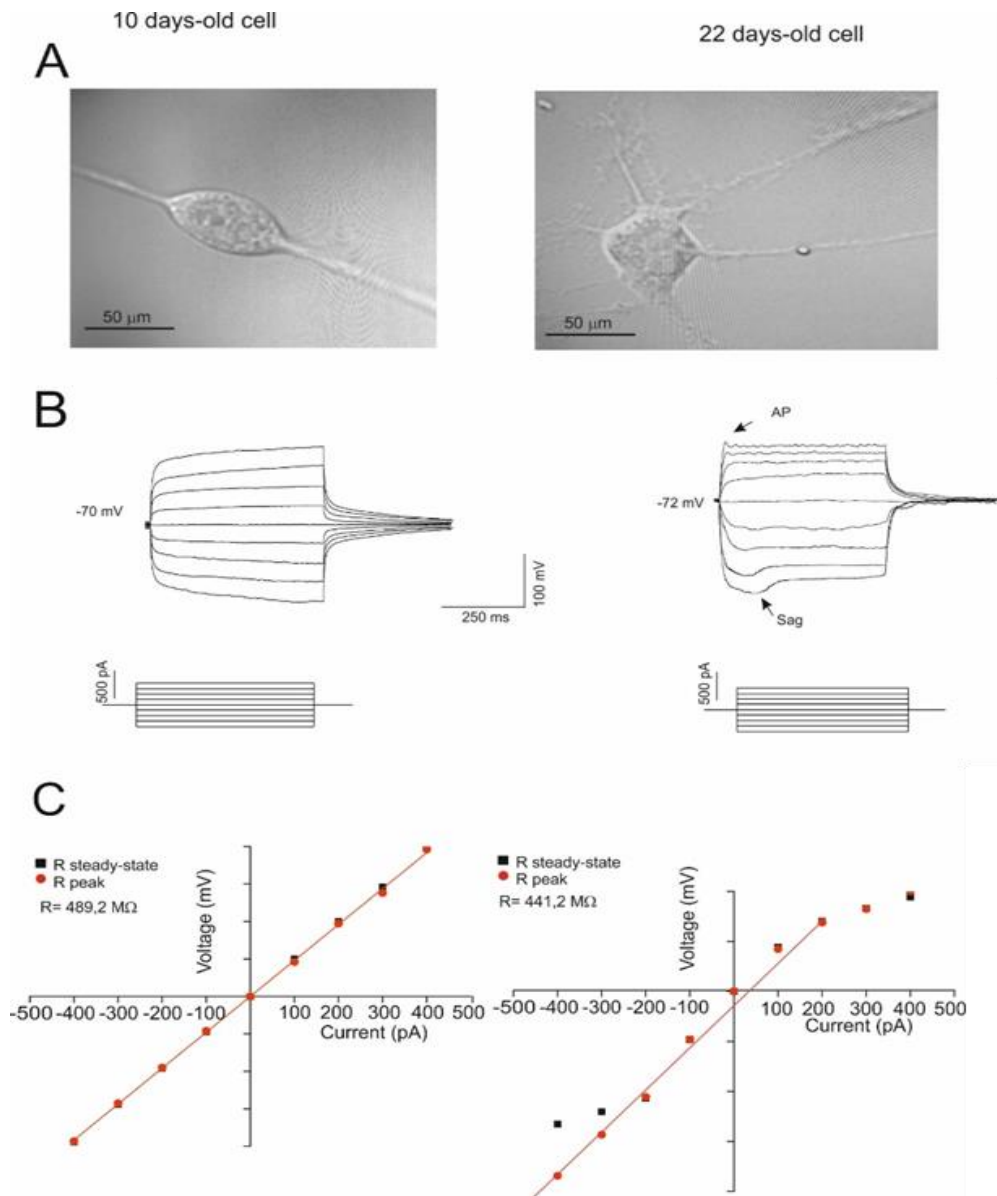
En primer lugar, se midió el potencial de reposo tanto de las rADSC indiferenciadas como de las NLC de las dos edades. Como se puede observar en la figura 22.A el potencial de membrana en reposo se va hiperpolarizando de forma significativa en células de 10 días hasta potenciales similares a los de neuronas adultas en las células de 20 días. Respecto a la resistencia de membrana se observa que disminuye de forma significativa en las NLC de 20 días hasta un valor característico de neuronas maduras (Fig. 22.B).



**Figura 22. Comparación de las propiedades electrofisiológicas pasivas de las ADSC con las de NLC de 10 y 20 días. A) Potencial de membrana en reposo en las NLC a los 10 (\*\* y 20 días (\*\*\*) respecto a las ADSC (N=3,  $p < 0.05$ ). B) Resistencia de membrana de las NLC a los 10 y 20 días respecto a las ADSC, (N=3, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).**

Como se ha visto en el apartado anterior, la diferenciación a células similares a neuronas fue evolucionando con el tiempo de cultivo, presentando características morfológicas de neuronas con cuerpo redondeado y estructuras similares a axones y dendritas, como se muestra en la figura 23.A, en la que se muestra una célula a los 10 días de cultivo con morfología bipolar característica de neuroblastos y otra a los 22 días con morfología de neurona (NLC) con soma redondeado y varias dendritas principales (Fig 23.B).

Para determinar la actividad fisiológica de estas células se realizaron experimentos de electrofisiología con la técnica de patch-clamp. Los registros electrofisiológicos mediante patch-clamp de la célula completa que se obtuvieron muestran diferencias entre las células de distintas edades (10 y 22 días) en la respuesta a los pulsos de corriente despolarizantes e hiperpolarizantes. La NLC (22 días) presenta un sag característico de neuronas en el voltaje a corrientes hiperpolarizantes, y un pico a corrientes positivas sin llegar a disparar un potencial de acción (Fig. 23.B). La resistencia de membrana, representada como la recta en la gráfica de potencial de membrana frente a intensidad de la corriente, también es diferente entre los dos tipos de células, siendo menor en la NLC de mayor edad (Fig. 23.C).



**Figura 23. Propiedades anatómicas y electrofisiológicas de las NLC. A)** Imágenes tomadas en el microscopio con contraste por infrarrojos de una célula con 10 días de diferenciación, y de otra célula con 22 días de diferenciación. **B)** Cambios en el potencial de membrana de la célula a pulsos de corriente. La célula de 22 días de diferenciación (derecha) presenta Sag a corrientes hiperpolarizantes (señalado con una flecha como Sag), pero no dispara potencial de acción (señalado con una flecha como AP). **C)** Representación de las respuestas del voltaje a los pulsos de corriente administrado. La pendiente de la recta representa la resistencia de la célula.

Estos resultados nos indican que las células de 22 días se encuentran en una fase más avanzada en la diferenciación neuronal, aunque parece que aún no han llegado a una maduración completa, ya que se pudo registrar el potencial de acción tras una estimulación eléctrica, pero éste no llega a ser el típico de neuronas maduras.

Con estos resultados, se evidencia que las rADSC pueden dar lugar a una población de células madre neuronales (NSC) o neuroesferas y estas a su vez tienen capacidad de generar células similares a neuronas.

#### **4.4. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA EDAD SOBRE MOLÉCULAS IMPLICADAS EN RUTAS BIOQUÍMICAS ASOCIADAS A LA INMUNOMODULACIÓN, SUPERVIVENCIA Y TRANSDIFERENCIACIÓN DE LAS rADSC.**

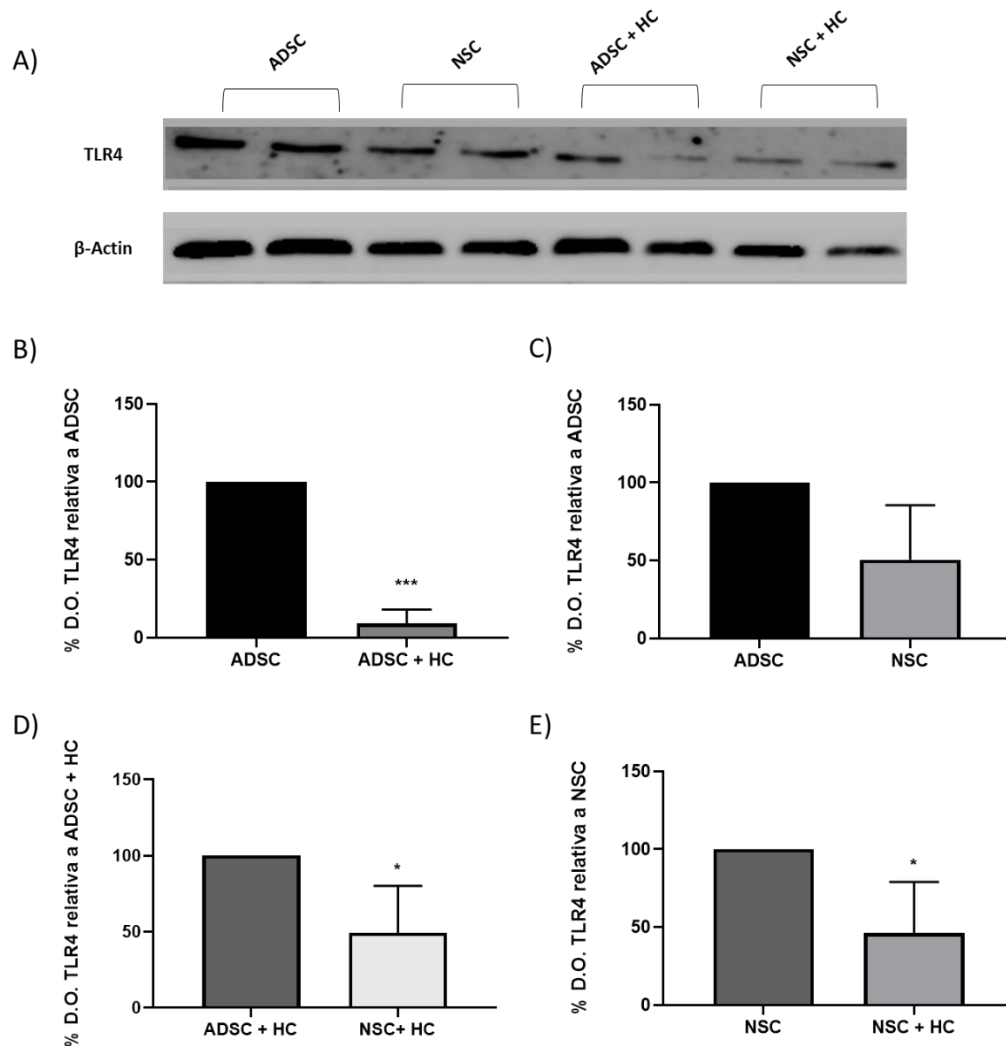
El objetivo de la terapia celular es reparar, reemplazar y regenerar tejidos dañados por procesos inflamatorios, degeneración u otros tipos de daños asociados a patologías o el envejecimiento. En estas situaciones las células madre pueden encontrar un entorno con altos niveles de estrés oxidativo, y por ello es necesario el estudio de su efecto sobre las ADSC y los procesos en las que están implicadas. Por ello, se llevaron a cabo experimentos *in vitro* en los que se sometieron a estrés oxidativo a las rADSC usando el hidróperóxido de cumeno (HC) como agente oxidante, para evaluar cómo estas condiciones afectan a moléculas implicadas en propiedades de relevancia en terapia celular como la inmunomodulación, la longevidad o la capacidad de autorrenovación y de diferenciación de las ADSCs, así como a las neuroesferas o células madre neuronales (NSC) obtenidas tras la transdiferenciación.

##### **4.4.1. Efecto del estrés oxidativo sobre el receptor TLR4 de las rADSC.**

Uno de nuestros objetivos fue estudiar si la expresión de TLR4, como receptor implicado en la respuesta pro-inflamatoria en las rADSCs, se ve afectado en condiciones de estrés oxidativo. Para ello se cuantificó su expresión proteica en condiciones de estrés oxidativo tanto en las rADSC como en las neuroesferas (NSC). Como podemos apreciar en la figura 24.B, los resultados muestran un descenso en la expresión de TLR4 del 90.8 % en las ADSCs tratadas con HC respecto a las ADSC no tratadas. En el mismo sentido,

## 4. RESULTADOS

las NSC derivadas de ADSC tratadas con HC respecto a NSC formadas a partir de células no tratadas, presentan una disminución del 54 % (Fig. 24.E). Entre las ADSC y las NSC no resultaron diferencias significativas (Fig. 24.C). En cambio, cuando las ADSC se diferencian en condiciones de estrés oxidativo si hay una disminución significativa de la expresión de TLR4 (Fig. 24.D)



**Figura 24. Efecto del estrés oxidativo sobre la expresión del receptor TLR4 en rADSCs y neuroesferas.**

**A)** Imagen tomada de las bandas TLR4 (98 kDa) y actina (42 kDa) como control de carga. **B)** Gráfico de barras donde cada valor obtenido es el porcentaje de densidad óptica y el valor de la muestra ADSC se establece en 100%. **ADSC:** células madre derivadas del tejido adiposo; **NSC:** neuroesferas generadas de ADSC; **ADSC+HC:** ADSC células tratadas con HC; **NSC+HC:** neuroesferas generadas de ADSC tratadas con HC \*Significativo  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$

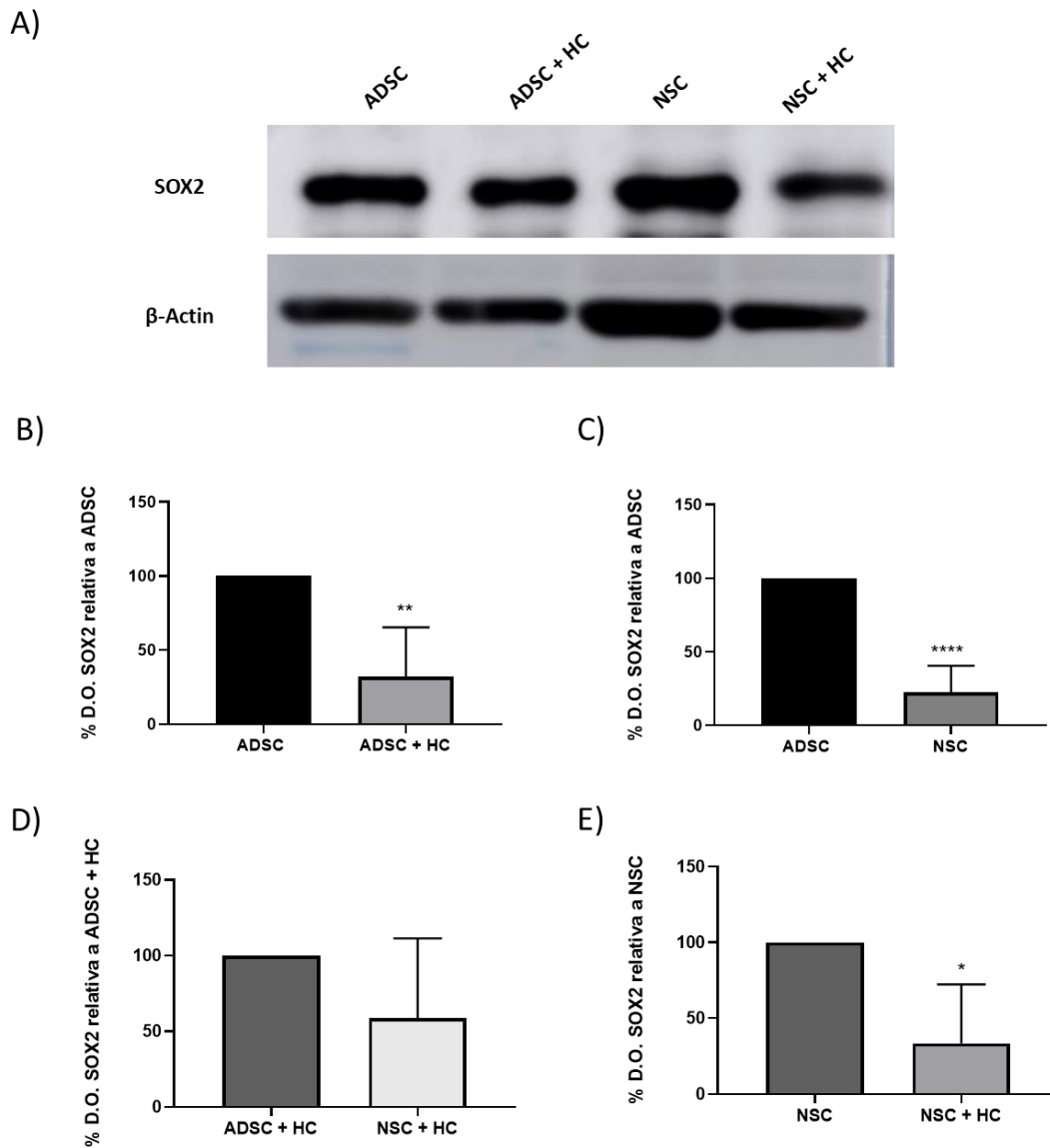
En conjunto, estos resultados nos indican que el estrés oxidativo inducido por el HC reduce el TLR4 tanto en las ADSC, como en las esferas derivadas de las ADSC tratadas con HC. Sin embargo, en condiciones normales, durante la transdiferenciación de ADSC a NSC no existe una diferencia significativa en la expresión de TLR4.

### **4.4.2. Efecto del estrés oxidativo y la edad sobre SOX2.**

SOX2 está altamente correlacionado con la autorrenovación de las MSCs y su capacidad para mantener un estado multipotencial, junto a otros factores como Nanog y Oct4, en las MSC adultas (Jaenisch & Young, 2008). Por otro lado, SOX2 promueve durante el desarrollo embrionario el linaje neuroectodérmico, a diferencia de Nanog y Oct4, y en las NSC adultas se encarga de mantener un estado proliferativo de las mismas (S. Zhang & Cui, 2014).

Mediante la cuantificación de la densidad óptica de las bandas obtenidas en las membranas de Western blot en experimentos independientes, se observó que el estrés oxidativo inducido por el hidroperóxido de cumeno, afectó a los niveles de SOX2, disminuyendo considerablemente tanto en las ADSC tratadas con HC en comparación con las ADSC no tratadas (67.8 %) (Fig. 25.B), como en las neuroesferas derivadas de células madre tratadas con HC respecto a las esferas no tratadas (disminuye 66.5 %) (Fig. 25.E). Este resultado nos indicaría una posible disminución en la capacidad proliferativa de las neuroesferas a causa del estrés oxidativo.

Por otro lado, los niveles de SOX2 son más altos en las muestras de rADSCs que en las neuroesferas, observándose una reducción de este factor en un 73.36 % (Fig. 25.C), lo que muestra que la expresión de SOX2 se reduce en la transdiferenciación a células madre neurales. En condiciones de estrés oxidativo esta diferencia no se aprecia probablemente porque los niveles de SOX2 en las ADSC tratadas con HC es muy bajo de partida (Fig. 25.D).



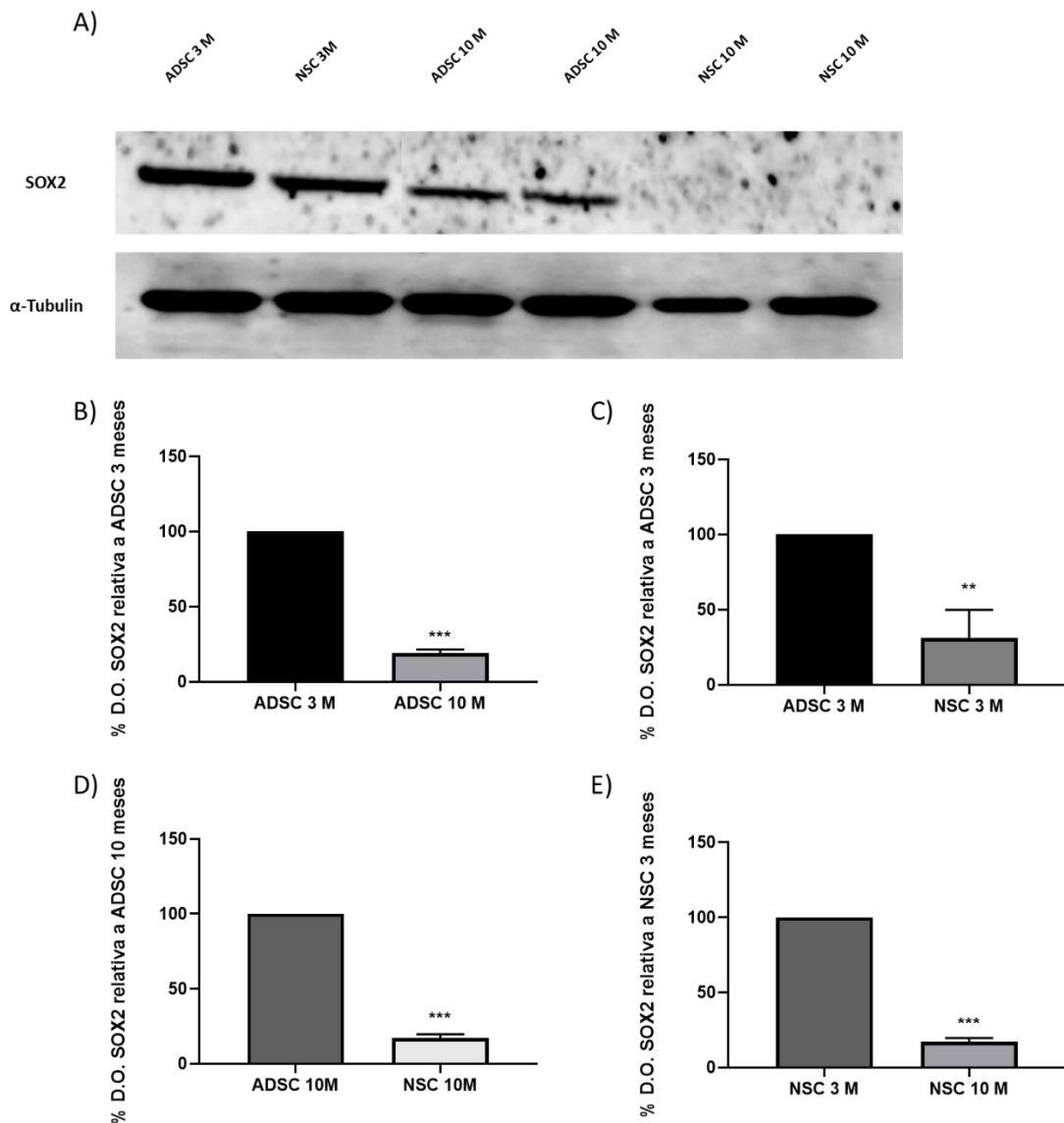
**Figura 25. Efecto del estrés oxidativo sobre la expresión de SOX2 en rADSCs y neuroesferas. A)** Imagen tomada de las bandas SOX2 (35 kDa) y actina (42 kDa) como control de carga. **B)** Gráfico de barras donde cada valor obtenido es el porcentaje de densidad óptica y el valor de la muestra ADSC se establece en 100%. **ADSC:** células madre derivadas del tejido adiposo; **NSC:** neuroesferas generadas de ADSC; **ADSC+HC:** ADSC células tratadas con HC; **NSC+ HC:** neuroesferas generadas de ADSC tratadas con HC. \*Significativo  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Por otra parte, se analizó el efecto de la edad sobre SOX2 comparando ADSC y NSC derivadas de animales de 3 y 10 meses.

Los resultados muestran que SOX2 tiende a disminuir con la edad tanto en rADSC como en las neuroesferas. Así, la expresión de SOX2 en ADSC de ratas de 10 meses es 80.96% más baja que en las de 3 meses (Fig. 26.B). En el proceso de transdiferenciación, se mostraron resultados significativos respecto a los niveles de SOX2, ya que disminuyen

## 4. RESULTADOS

tanto en NSC de 3 meses como de 10 meses respecto a las ADSC (Fig.26. C y D), resultando mayor la disminución en las NSC de 10 meses (82.78 %) (Fig. 26. E). Esto sugiere que con la edad disminuyen la potencialidad y la capacidad de autorrenovación de las rADSC y de las neuroesferas.



**Figura 26. Efecto de la edad sobre la expresión de SOX2 en rADSCs y neuroesferas. A)** Imagen tomada de las bandas SOX2 (35 kDa) y tubulina (52 kDa) como control de carga. **B)** Gráfico de barras donde cada valor obtenido es el porcentaje de densidad óptica y el valor de la muestra ADSC se establece en 100%. **ADSC 3M:** células madre derivadas del tejido adiposo de ratas de 3 meses; **NSC 3M:** neuroesferas generadas de ADSC de ratas de 3 meses; **ADSC 10M:** ADSC de ratas de 10 meses; **NSC 10M** neuroesferas generadas de ADSC de ratas de 10 meses. \*\* Significativo  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

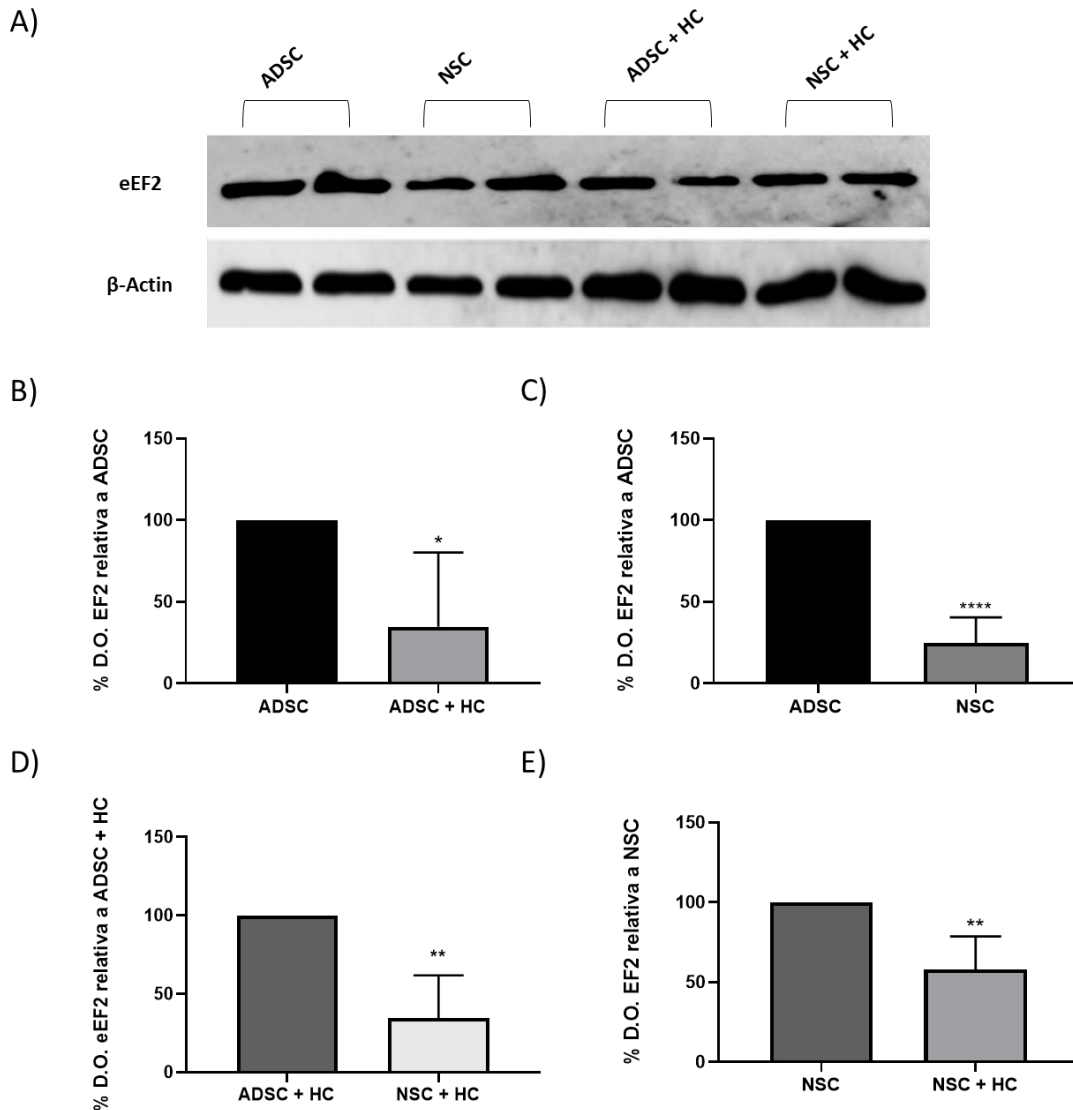


### 4.4.3 Efecto del estrés oxidativo y la edad sobre eEF2 y Sirt1.

Si el objetivo final de las rADSC es su uso clínico, su "robustez" bioquímica en términos de reparación debe ser óptima para que contribuyan a la reparación de los tejidos dañados. Por ello, las proteínas que también se han estudiado son eEF2 y Sirt1, debido a su relevancia en procesos básicos del metabolismo celular como es la síntesis proteica o la supervivencia celular, respectivamente. Se ha estudiado el efecto del estrés oxidativo y de la edad sobre la expresión de estas proteínas.

Inicialmente, se estudió el efecto del estrés oxidativo *in vitro* en células tratadas con HC sobre la expresión de eEF2. Los resultados muestran que los niveles de eEF2 disminuyen en células madre sometidas a estrés oxidativo hasta un 65 % con respecto a las células no tratadas (Fig. 27.B). En relación con las neuroesferas derivadas de las células madre, éstas presentan una disminución significativa del eEF2 en un 75 % respecto a las células madre mostrando que el proceso de transdiferenciación afecta los niveles de esta proteína (Fig. 27. C). En condiciones de estrés oxidativo, se aprecia que también hay una disminución en la transdiferenciación de los niveles de eEF2 en las neuroesferas derivadas de ADSC tratadas con HC, suponiendo una disminución de 62.5 % respecto a la media (Fig. 27.D).

La comparación entre las neuroesferas sometidas a estrés oxidativo con las neuroesferas no tratadas, también demostró una reducción significativa de un 42 % del eEF2 debido al estrés oxidativo (Fig. 27. E).

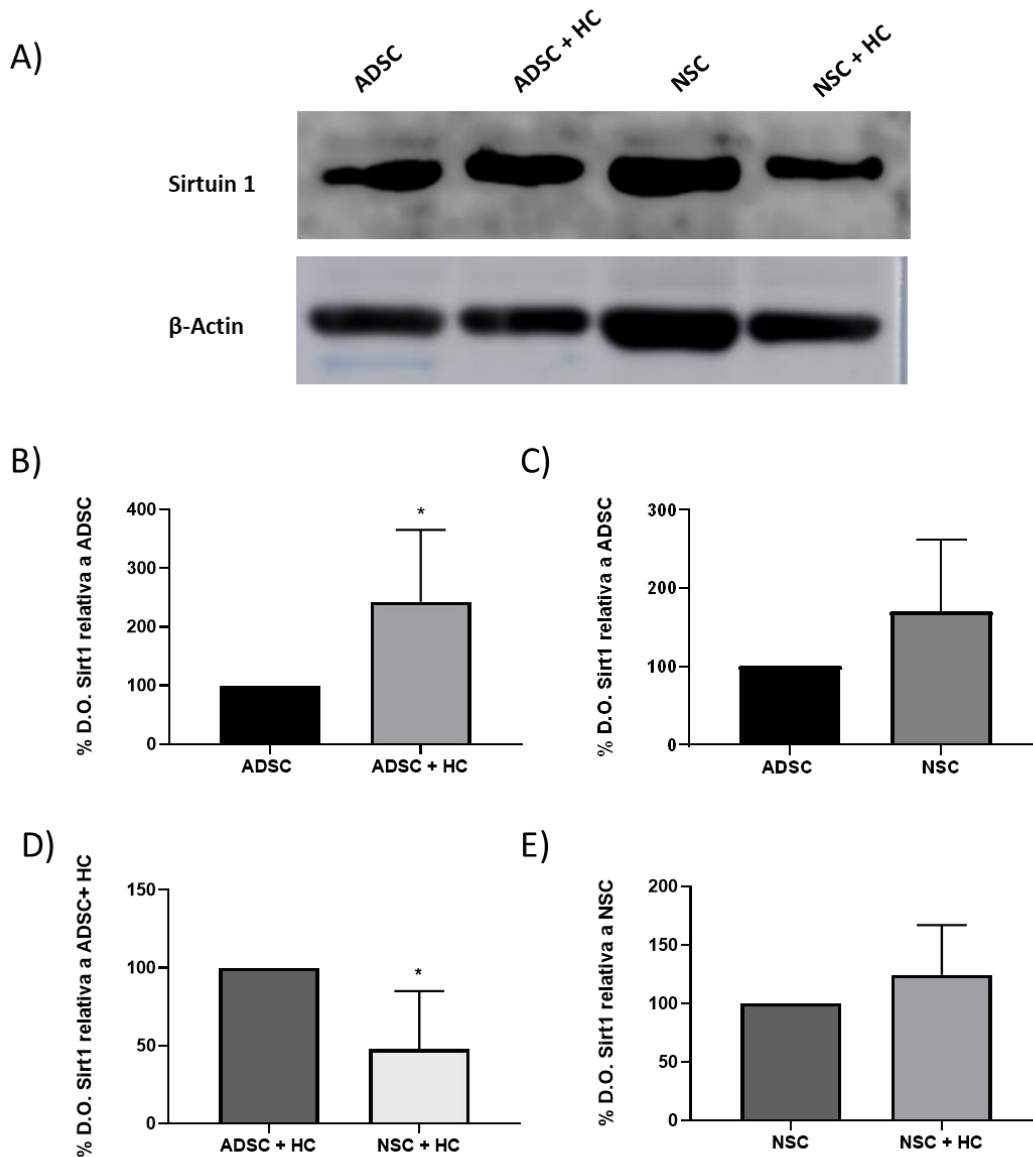


**Figura 27. Efecto del estrés oxidativo sobre la expresión de eEF2 en rADSCs y neuroesferas. A)** Imagen tomada de las bandas eEF2 (95 kDa) y actina (42 kDa) como control de carga. **B)** Gráfico de barras donde cada valor obtenido es el porcentaje de densidad óptica y el valor de la ADSC se establece en 100%. **ADSC:** células madre derivadas del tejido adiposo; **NSC:** neuroesferas generadas de ADSC; **ADSC+HC:** ADSC células tratadas con HC; **NSC+HC:** neuroesferas generadas a partir de ADSC tratadas con HC. \*Significativo  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

Otra proteína relevante en los mecanismos implicados en la longevidad y supervivencia celular, incluyendo vías relacionadas con el sistema antioxidante es Sirt1. Ésta actúa como deacetilasa de histonas, y participa en la activación de genes protectores ante el estrés oxidativo y la senescencia (Yao & Rahman, 2012). Además, también participa en el proceso de diferenciación de las NSCs, donde Sirt1 participa como sensor del estado metabólico celular y regula los procesos de autorrenovación y diferenciación de las NSC (Ma et al., 2014).

Cuando se determinó su expresión en las distintas condiciones experimentales los resultados muestran que, cuando se somete a las células al tratamiento con HC observamos que se estimula la expresión de Sirt1 un 140 % en las rADSC (Fig. 28.B).

En condiciones normales la expresión de Sirt1 no presentan cambios significativos en las NSC en relación con las rADSC, es decir, que durante el proceso de transdiferenciación de rADSC a neuroesferas la expresión de Sirt1 se mantiene en los mismos niveles (Fig. 28.C). En cambio, las neuroesferas formadas a partir de células de las rADSC sometidas a estrés oxidativo con HC, presentaron una disminución del 52 % en su media (Fig. 28.D). Es decir, parece que la expresión de Sirt1 en NSC derivadas de ADSC tratadas con HC, baja hasta niveles similares de expresión de las neuroesferas no sometidas a estrés oxidativo como se puede apreciar en la Figura 28.E, en la que no se observan diferencias significativas entre ellas.



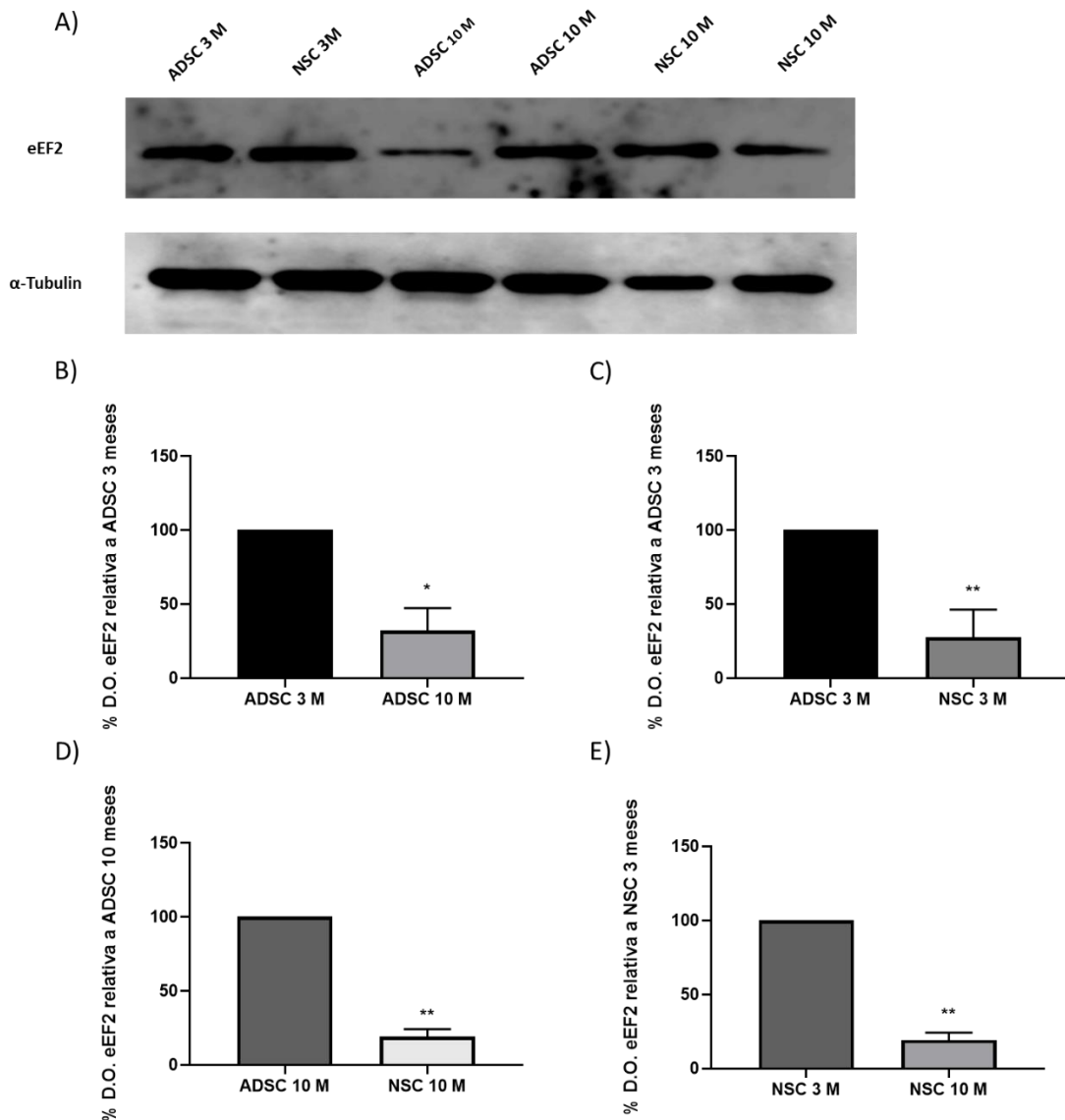
**Figura 28. Efecto del estrés oxidativo sobre la expresión de Sirt1 en rADSCs y neuroesferas. A)** Imagen tomada de las bandas Sirt1 (120 kDa) y actina (42 kDa) como control de carga. **B)** Gráfico de barras donde cada valor obtenido es el porcentaje de densidad óptica y el valor de la muestra ADSC se establece en 100%. **ADSC:** células madre derivadas del tejido adiposo; **NSC:** neuroesferas generadas de ADSC; **ADSC+HC:** ADSC células tratadas con HC; **NSC+HC:** neuroesferas generadas a partir de ADSC tratadas con HC. \*Significativo  $p < 0.05$

Cuando se mide la expresión de eEF2 en ADSC obtenidas de ratas de distintas edades (3 y 10 meses), también se observa una disminución de los niveles de eEF2, tanto en las rADSC obtenidas de ratas de 10 meses que se reduce un 67 % (Fig. 29.B) como en las neuroesferas diferenciadas a partir de ellas en las que prácticamente la expresión de

## 4. RESULTADOS

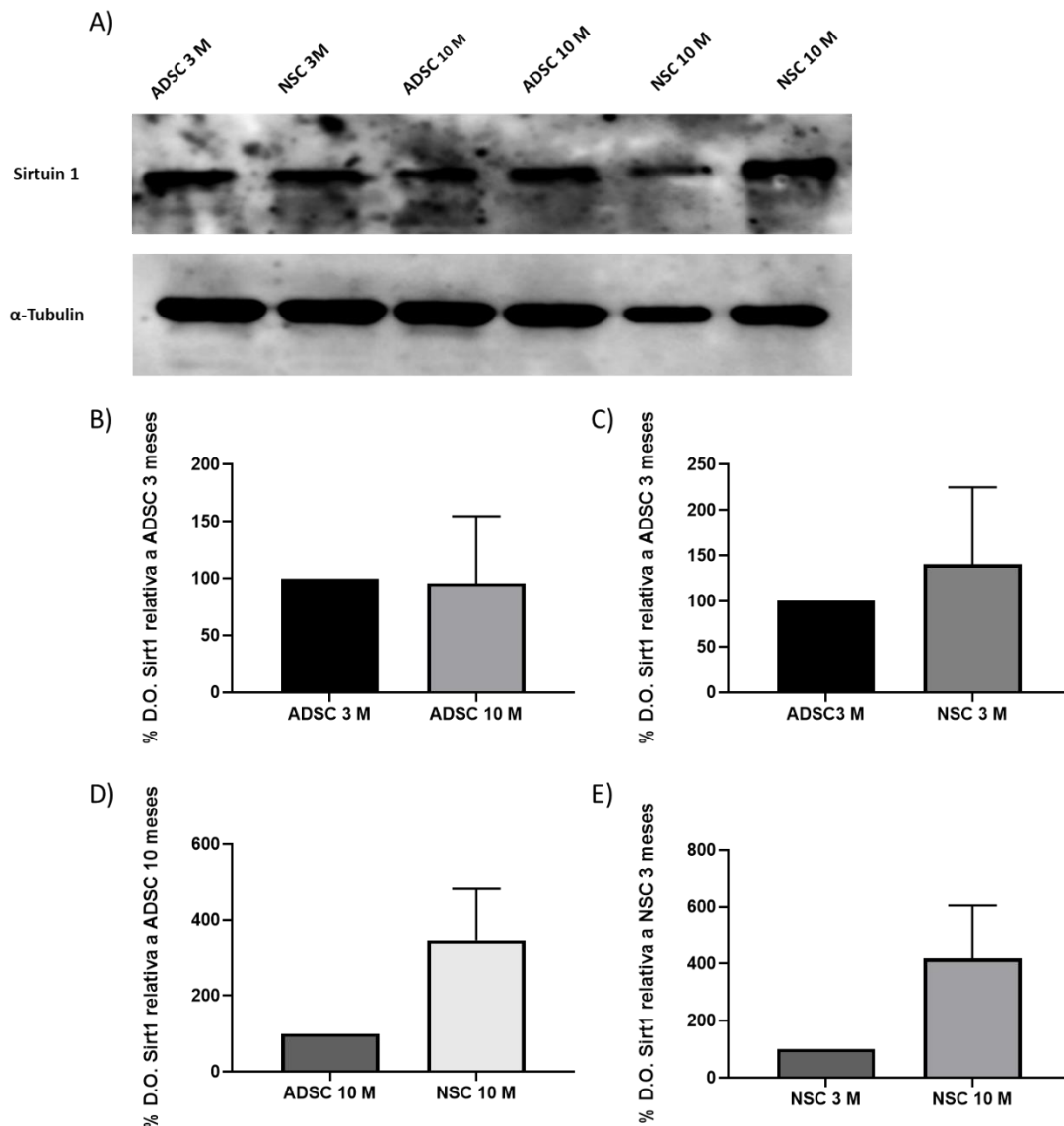
eEF2 se reduce un 80% con respecto a los niveles de EF2 de neuroesferas de 3 meses (Fig. 29.E).

Por otro lado, en condiciones normales los niveles de eEF2 durante la diferenciación no varían (Fig. 29.C). En cambio, en ratas de 10 meses si existe una disminución significativa en los niveles de eEF2 en las neuroesferas formadas a partir de rADSCs (Fig. 29.D).



**Figura 29. Efecto de la edad sobre la expresión de eEF2 en rADSCs y neuroesferas. A)** Imagen tomada de las bandas eEF2 (95 kDa) y actina (42 kDa) como control de carga. **B)** Gráfico de barras donde cada valor obtenido es el porcentaje de densidad óptica y el valor de la muestra ADSC se establece en 100%. **ADSC 3M:** células madre derivadas del tejido adiposo de ratas de 3 meses; **NSC 3M:** neuroesferas generadas a partir de ADSC de ratas de 3 meses; **ADSC 10M:** ADSC de ratas de 10 meses; **NSC 10M** neuroesferas generadas de a partir de ADSC de ratas de 10 meses. Test de student\*Significativo  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

Con respecto al efecto de la edad sobre la expresión de Sirt1, los datos muestran que no hay cambios significativos en su expresión en rADSC de 10 meses en comparación con las de 3 meses (Fig. 30.A y B). Después de la transdiferenciación de rADSC de 3 meses y 10 meses a neuroesferas (Fig. 30.C y D) tampoco se observan diferencias significativas, aunque sí parece que hay cierta tendencia a un aumento de la expresión de Sirt1 en las neuroesferas de 10 meses (Fig. 30.E), pero tampoco fue significativa.



**Figura 30. Efecto de la edad sobre la expresión de Sirt1 en rADSCs y neuroesferas.** A) Imagen tomada de las bandas Sirt1 (120 kDa) y tubulina (52 kDa) como control de carga. B) Gráfico de barras donde cada valor obtenido es el porcentaje de densidad óptica y el valor de la muestra ADSC se establece en 100%. % **ADSC 3M**: células madre derivadas del tejido adiposo de ratas de 3 meses; **NSC 3M**: neuroesferas generadas a partir de ADSC de ratas de 3 meses; **ADSC 10M**: ADSC de ratas de 10 meses; **NSC 10M** neuroesferas generadas a partir de ADSC de ratas de 10 meses.

#### 4.5. ESTUDIOS *IN VIVO* CON rADSC EN MODELO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON EN RATA.

Los resultados mostrados hasta ahora nos dan idea de la capacidad inmunomoduladora y de diferenciación a neuronas *in vitro* de las rADSC, y también como éstas pueden verse afectadas por estrés oxidativo o la edad, que son aspectos importantes a tener en cuenta para llevar a cabo terapias celulares. Del mismo modo, para estudiar la capacidad terapéutica de las rADSC es necesario el planteamiento *in vivo* de modelos que nos dé

información acerca de la capacidad terapéutica tras su trasplante en tejidos envejecidos o dañados por estrés oxidativo. Para ello, se hizo un estudio de terapia celular usando las rADSCs en un modelo de enfermedad de Parkinson basado en un daño oxidativo neuronal provocado con 6-OHDA en la sustancia nigra. Se realizó una lesión unilateral en la SN de las ratas con 6-OHDA a las que se les realizó seguidamente un trasplante homólogo de rADSC CD90+, obtenidas por marcaje y aislamiento magnético (Muñoz-Pinto et al., 2019), en el núcleo estriado como se describe en materiales y métodos. En estos grupos de animales se realizaron test funcionales de rotación desde la intervención hasta 4 meses después de la operación, así como análisis estereológicos para cuantificar neuronas dopaminérgicas.

### **4.5.1. Estudio de las funciones motoras mediante el uso del test de rotación.**

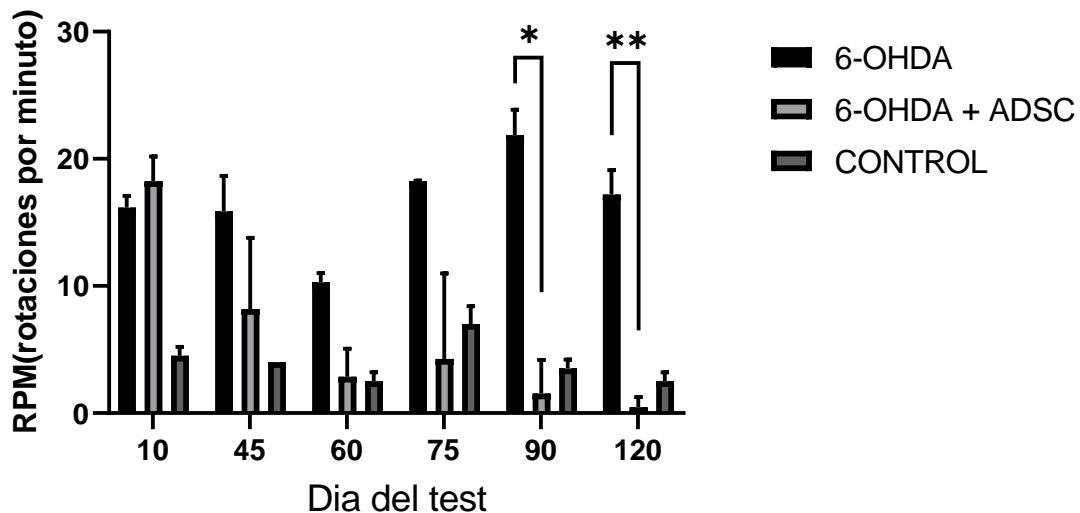
Se realizó un estudio comportamental llamado “test de rotación”, para detectar desde un punto de vista funcional el daño y/o recuperación que tenían los animales. En el test se cuantificaron los giros ipsilaterales, es decir, hacia el lado donde se produjo la lesión, de 3 grupos de animales: Control, lesión unilateral con 6-OHDA en SN, y lesión unilateral con 6-OHDA en SN con rADSC en el estriado del hemisferio opuesto.

Los tests de rotación se realizaron en los animales 10 días después de ser operados y en diferentes momentos hasta los 4 meses. La finalidad de este estudio es analizar el comportamiento del animal tratado con rADSC respecto a los no tratados y ver la posible recuperación motora tras el implante de rADSC.

En la Figura 31 se observa que 10 días después de la operación las ratas lesionadas con 6-OHDA en uno de los hemisferios mostraron un incremento en el número de vueltas en comparación con las ratas controles y apenas se ve mejoría en los animales lesionados y tratados con las rADSC. Sin embargo, se observa una clara disminución del número de giros ipsilaterales en los animales trasplantados con rADSCs conforme pasa el tiempo después de la operación, llegando a ser semejante al grupo control después de 90 días.



Así, a los 10 días tras la operación, se observa una media de 16.6 rotaciones por minuto (RPM) en el grupo 6-OHDA (n=3) y de 18.2 RPM en el grupo de 6-OHDA + ADSC (n=3), suponiendo una disminución del 49 %, mientras que, tras cuatro meses, en el último test se registró una media de 17.2 RPM en el grupo 6-OHDA y 0.46 RPM en el grupo 6-OHDA+ADSC, que supone una disminución significativa en el número de rotaciones por minuto de un 97.4 %.



**Figura 31.** Test de rotación realizado a distintos días después de la operación intracraneal en los grupos control, 6-OHDA y 6 OHDA tratados con ADSC. Obsérvese la diferencia significativa en el grupo 6-OHDA respecto al grupo de 6-OHDA+ADSC en el número de giros respecto al tiempo. (Test de two-ways ANOVA, \*Significativo  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ,  $n = 3$  en todos los grupos).

### 4.5.2. Análisis estereológico para cuantificación de neuronas dopaminérgicas tras la implantación de rADSC.

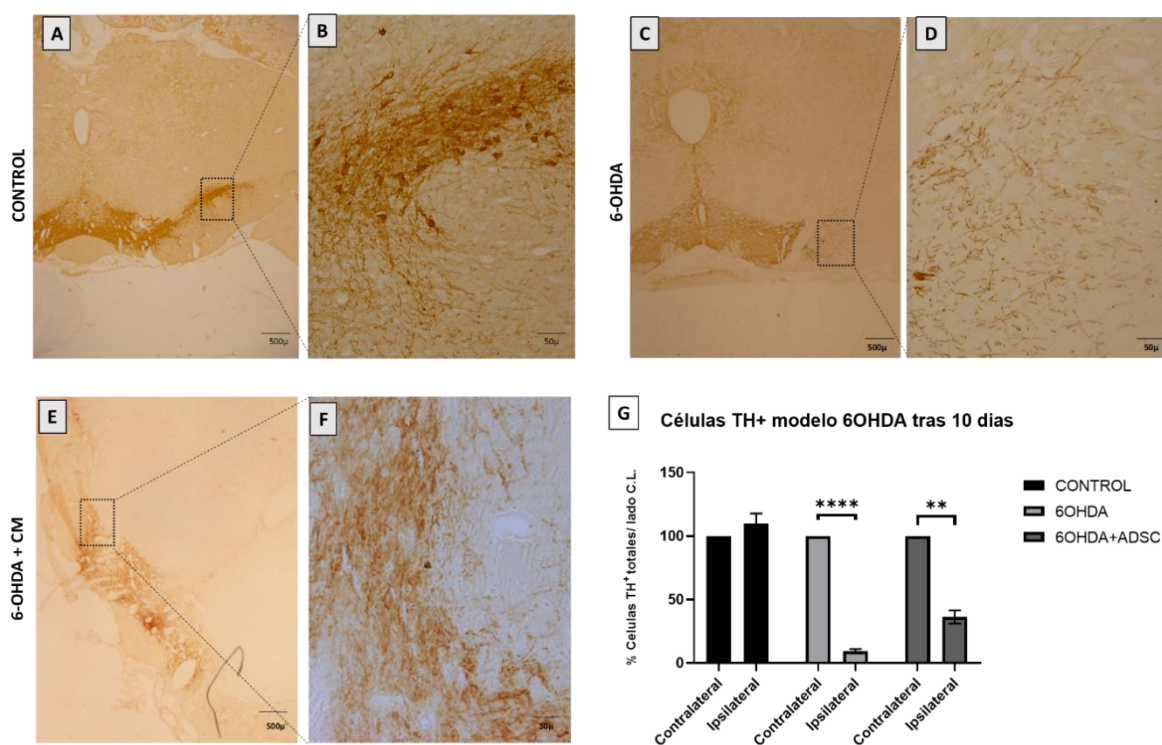
Para realizar el análisis estereológico se llevaron a cabo tinciones inmunohistoquímicas a los 10 días y a los 4 meses después de la operación, y se cuantificaron el número de neuronas positivas al anticuerpo TH de los grupos de roedores controles, de las ratas modelos de PD (inyectadas con 6-OHDA) y de los roedores lesionados y sometidos a terapia celular con ADSC (6-OHDA+rADSC).

La tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de catecolaminas, es un marcador de neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso central. Como se puede observar en la Figura 32, en los ensayos inmunohistoquímicos realizados en los cortes

## 4. RESULTADOS

histológicos obtenidos 10 días después de la operación podemos apreciar una disminución en el número de células TH positivas totales en relación con su lado contralateral en las ratas lesionadas con la 6-OHDA (Fig. 32.C y D) y comparado con la situación control (Fig. 32 A y B). Sin embargo, en el grupo de ratas que tras el daño con 6-OHDA fueron tratadas con rADSC (Fig. 32.E y F), podemos observar que la pérdida neuronal es menor.

La cuantificación del número de neuronas positivas para TH nos mostró que a los 10 días después de la operación un 95,52% de neuronas se vieron disminuidas en las ratas dañadas con 6-OHDA en comparación con el control, mientras que en las ratas dañadas y tratadas con rADSCs la pérdida de neuronas fue menor, un 74% (Fig. 32.G). Esto indica que en las ratas tratadas se evitó la pérdida de un 21,52% de las neuronas dopaminérgicas.

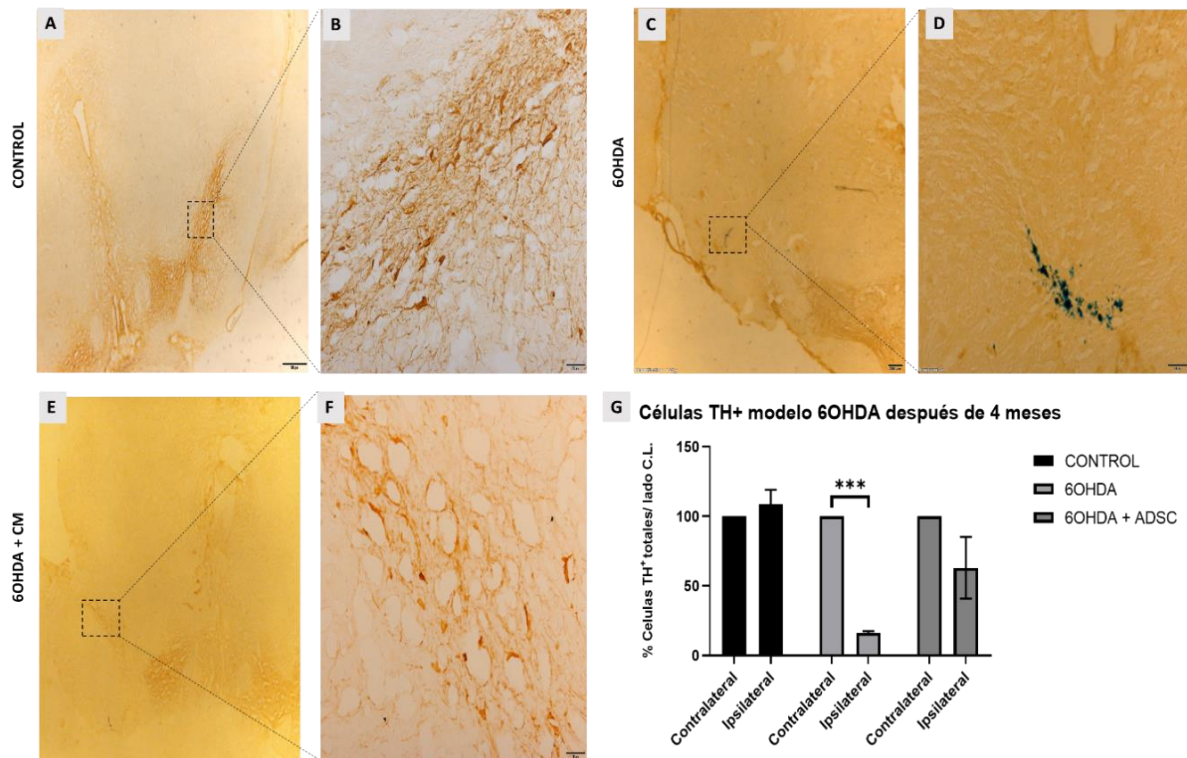


**Figura 32 Análisis estereológico del porcentaje de neuronas dopaminérgicas TH-positivas totales en el modelo de 6-OHDA después de 10 días.** A-G. Imágenes obtenidas en microscopio óptico, tras la realización de una inmunohistoquímica para TH revelada con DAB. Las imágenes **A)** y **B)** corresponden al grupo control, **C)** y **D)** corresponden al grupo de 6-OHDA, **E)** y **F)** corresponden al grupo 6-OHDA + rADSC. La barra de escala es de 500  $\mu$ m, y en la imagen aumentada es de 200  $\mu$ m. **G:** Diagrama de barras que representa el porcentaje de células TH + frente al lado contralateral a la lesión  $\pm$  desviación estándar de cada grupo de animales. (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  Test de two-ways ANOVA,  $n = 3$  de cada

Cuando los ensayos inmunohistoquímicos se realizaron a los 4 meses se observó que los animales lesionados seguían presentando muy pocas neuronas TH en SN (Fig. 33 C y D), con respecto al lado contralateral y a la situación control (Fig 33 A y B). Mientras que los animales lesionados y tratados con células madre parecían haber recuperado gran parte de la población neuronal en la SN que había sido lesionada con la 6-OHDA (Fig. 33 E y F), como muestra el marcaje azul que se aplica junto con la 6-OHDA (Fig. 33 E)

La cuantificación de neuronas TH positivas después de cuatro meses mostró que el grupo lesionado con 6-OHDA seguía presentando una disminución de neuronas dopaminérgicas de un 80 % respecto al lado contralateral. Sin embargo, en el grupo de las ratas tratadas con 6-OHDA y rADSCs, la disminución de neuronas, no fue significativa, respecto al lado contralateral fue del 35%, indicándonos que hay recuperación del 45% de neuronas TH+ tras tratar con rADSC (Fig. 33 G).

Estos resultados muestran un importante efecto neuroprotector de las rADSC en la neurodegeneración de la *substantia nigra* a corto y largo plazo basado en el número de neuronas dopaminérgicas, siendo más evidente esta protección a los 4 meses. Además, esta recuperación del número de neuronas va acompañado de una mejora en la función motora de los animales que empieza a detectarse a los 3 meses tras el tratamiento.



**Figura 33. Análisis estereológico del porcentaje de neuronas dopaminérgicas TH-positivas totales en el modelo de 6-OHDA después de 4 meses.** A-G. Imágenes obtenidas en microscopio óptico, tras la realización de una inmunohistoquímica para TH revelada con DAB. Las imágenes **A)** y **B)** corresponden al grupo control, **C)** y **D)** corresponden al grupo de 6-OHDA, **E)** y **F)** corresponden al grupo 6-OHDA + rADSC. La barra de escala es de 500  $\mu$ m, y en la imagen aumentada es de 200  $\mu$ m. **G):** Diagrama de barras que representa el porcentaje de células TH + frente al lado contralateral a la lesión  $\pm$  desviación estándar de cada grupo de animales (\*\* $p < 0.001$ , test de two-ways ANOVA) ( $n=3$  en cada grupo).

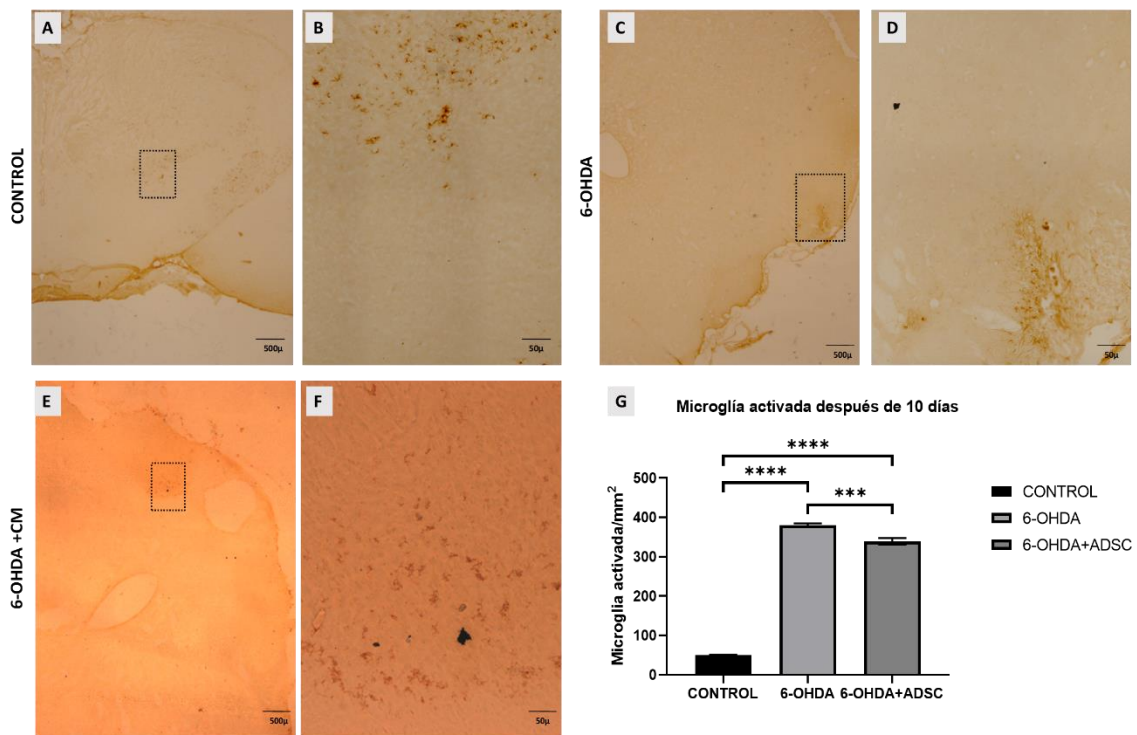
#### 4.5.3. Análisis del número de microglía activa tras la terapia con rADSC.

La microglía en respuesta a ciertos daños cerebrales, ya sean estímulos inmunológicos o inflamatorios, sufre importantes cambios morfológicos y metabólicos, formando la denominada microglía activada (Nimmenrjahn et al., 2005). Con el objetivo de estudiar el grado de activación de la microglía en la SN en respuesta al daño oxidativo se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica contra el MHC II, usando el anticuerpo OX-6, que marca exclusivamente la microglía activada.

Se realizaron pruebas inmunohistoquímicas, en las que se cuantificaron la cantidad de microglía activada de los grupos de roedores controles, modelos de PD (6-OHDA) y de los roedores modelo de PD tratados con rADSC (6-OHDA+rADSC) a los 10 días después de la operación. La determinación inmunohistoquímica de microglía activada con 6-OX

## 4. RESULTADOS

nos mostró que en animales dañados en SN con 6-OHDA, hay activación microglial a los 10 días (Fig. 34 C y D) comparada con la situación control (Fig. 34 A y B), y que esa activación fue algo menor en animales dañados y tratados con rADSC (Fig. 19, E y F). Cuando se cuantificó el número de microglías activadas observamos que en las ratas dañadas con 6-OHDA el número de microglia activada fue de aproximadamente 3x veces mayor que en los controles, y que cuando los animales se tratan con rADSC hay una disminución significativa del 13,58% respecto a las que solo tienen daño con 6-OHDA (Fig. 34 G).



**Figura 34. Determinación del número de microglías activas.** A-H Imágenes obtenidas en microscopio óptico, tras la realización de una inmunohistoquímica para 6-OX revelada con DAB. Las imágenes A) y B) corresponden al grupo control, C) y D) corresponden al grupo de 6-OHDA, E) y F) corresponden al grupo 6-OHDA + rADSC. La barra de escala de color blanco es de 500 μm, y la de color negro es de 200 μm. G): Diagramas de barras que representan el nº de microglia activada /mm<sup>2</sup> ± desviación estándar, frente a cada grupo de animales. \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.00001 (n=3 en cada grupo)

# 5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

---



El estudio de las características biológicas básicas de las células madre mesenquimales derivadas de tejidos adultos es de gran importancia para conocer los beneficios terapéuticos potenciales, especialmente prometedores para enfermedades asociadas al envejecimiento, de gran impacto en la actualidad, como las neurodegenerativas. De hecho, el conocimiento de su funcionamiento es fundamental para mejorar futuros tratamientos clínicos ya que los esfuerzos hechos hasta ahora no permiten que sea posible su aplicación clínica.

Las células madre mesenquimales (MSC) obtenidas de tejido adiposo (ADSC) presentan ciertas ventajas frente a otros tipos de MSC, como son la facilidad de obtención y su capacidad de replicación. Estas propiedades hacen del tejido adiposo una fuente preferencial de células madre mesenquimales.

En el presente trabajo se han abordado dos aspectos fundamentales de las ADSC, por un lado, la implicación de estas células en la inmunomodulación y, por otro, la capacidad de transdiferenciarse a neuronas, poniendo de manifiesto que las ADSC tienen el potencial de producir un beneficio histológico en enfermedades neurodegenerativas, que más allá del propio reemplazo neuronal también produciría cambios tisulares que podrían limitar la progresión de la enfermedad.

### **5.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DEL TEJIDO ADIPOSO DE RATA.**

El primer objetivo específico establecido en esta tesis fue el aislamiento y caracterización de las células madre mesenquimales multipotentes derivadas del tejido adiposo de rata adulta (rADSC), siguiendo los criterios establecidos por la ISCT. Con estas células se llevaron a cabo los experimentos posteriores.

Las ADSC provienen de la fracción vascular estromal (FVE), que es obtenida con facilidad siguiendo técnicas poco invasivas y que genera una población celular con una alta tasa de multiplicación. Estas características principales otorgan a la población de células madre derivadas del tejido adiposo ciertas preferencias frente a otras células madre



## 5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

---

mesenquimales como las obtenidas de la médula ósea (BMMSC) que, aunque han sido ampliamente estudiadas, presentan más dificultades a la hora de ser obtenidas (Schaffer and Büchler, 2007; Fernandes et al., 2018).

Cuando se aísla la FVE procedente del tejido adiposo obtenemos una mezcla heterogénea de distintos tipos celulares presentes en el estroma, las cuales presentan tres poblaciones con capacidad para generar las ADSC; una población de células progenitoras sub-endoteliales, una población de células estromales adiposas supra-adventiciales y una población transicional entre ambas poblaciones progenitoras (Tallone et al., 2011). En base a la multitud de células estromales mesenquimales multipotentes que se pueden encontrar en el tejido adiposo, es necesario seguir los criterios establecidos por la ISCT para obtener una población más homogénea de células madre mesenquimales (Bourin et al., 2013; Dominici et al., 2006). Por ello, en este trabajo las células que se emplearon son aquellas con capacidad de adhesión al plástico, multipotentes y con expresión de ciertos marcadores moleculares de superficie, que son los criterios establecidos por la ISCT.

Para la expresión de los marcadores de superficie se tuvo en cuenta los resultados obtenidos previamente en nuestro grupo (Muñoz et al., 2018) utilizando la técnica de separación inmunomagnética con anticuerpos que reconocen CD90.1, y que presentan, tras la citometría de flujo, marcaje positivo para CD90 y CD29 (>98%) y negativo para los marcadores hematopoyéticos CD45/CD34/CD11b (<3%). Éstos marcadores se seleccionaron teniendo en cuenta los criterios de la ISCT y los usados en otros trabajos (Davies et al., 2015; Luo et al., 2018) consiguiendo una población de ADSC más homogénea que con otros métodos empleados por otros investigadores como el *cell sorting* con los marcadores CD90.1 y CD29 (Davies et al., 2015) u otro tipo de marcadores como CD271 (Yamamoto et al., 2007).

En relación a la capacidad multipotente de las rADSC, en este trabajo se muestra la capacidad de diferenciación a adipocitos y a osteoblastos de estas células, que prueba la eficacia multipotencial de las rADSC, sin necesidad de realizar la diferenciación a condroblastos como ha sido mostrado por otros grupos (Berg et al., 2015; Davies et al., 2015; Skubis et al., 2017).

## 5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

---

Además, en experimentos previos de nuestro laboratorio (Muñoz et al., 2018) se demostró que un alto porcentaje de las células de la FVE se pegaban al plástico y que tenían capacidad multipotente, por lo que se usaron estas células procedentes de la FVE.

### 5.2. IMPLICACIÓN DE TLR4 EN LA FUNCIÓN INMUNOMODULADORA DE LAS rADSC.

En la segunda parte de la tesis, se abordó el estudio de la interacción entre el LPS y las rADSC, determinando los cambios en la expresión del TLR4 y su posible implicación en la función inmunomoduladora.

En relación a trabajos previos en nuestro grupo, se obtuvieron resultados interesantes en un modelo inflamatorio de Parkinson tras la inyección de LPS intracerebral en *substantia nigra* de ratas en el que, tras el tratamiento con rADSC, no solo preservó a la *substantia nigra* de la pérdida de neuronas dopaminérgicas, sino que también redujo la activación de la microglia en la zona de la lesión (Muñoz et al., 2019). Esta respuesta inmunomoduladora sobre la microglia observada en este modelo podría estar ligada a la presencia del receptor TLR4 en las ADSC que reconoce específicamente al LPS. Esta interacción directa del LPS inyectado y los TLR4 de las rADSC podría reducir por lo tanto el LPS disponible en la zona de inyección disminuyendo su efecto sobre la activación glial. Aunque la expresión de TLR4 ya se había descrito en células madre mesenquimales (Pevsner-Fischer et al., 2007), no se conocía la proporción de LPS que podría ser ligado por los receptores TLR4 en las ADSC lo que podría determinar la capacidad inmunomoduladora de las estas células.

En el modelo inflamatorio de Parkinson, este factor es relevante ya que, en el sistema nervioso central de la rata el TLR4, a diferencia de los humanos, solo se expresa en las células de la microglia y no en los precursores de astrocitos ni oligodendrocitos. Por lo tanto, la microglia sería la célula del SNC de rata con capacidad para transducir las señales iniciadas por el LPS (Vaure & Liu, 2014).

En el presente trabajo, en primer lugar, se analizó la presencia de TLR4 en las rADSC mediante las técnicas de inmunoblot e inmunofluorescencia, mostrándose la presencia de TLR4 en las rADSC. En este contexto hay que tener en cuenta la posible presencia de células hematopoyéticas u otro tipo de células inmunes que pueden expresar TLR4 en

## 5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

---

la población de rADSC (Mckernan et al., 2020). Por ello, las rADSC empleadas en los experimentos fueron seleccionadas mediante la técnica de separación magnética, con el fin de disminuir al máximo el porcentaje de células de la línea hematopoyética y su posible efecto inmune, y seguir la línea de otros estudios que respaldan los efectos inmunes debidos a la síntesis y expresión de TLR4 en las propias ADSC tanto humanas como murinas (Lombardo et al., 2008; Shirjang et al., 2017).

La gran relevancia de estos receptores reside en la modulación del fenotipo y las propiedades de las MSC hacia un estado pro o anti-inflamatorio (Shirjang et al., 2017). En relación al papel inmunosupresor, no se han reportado resultados significativos, o los efectos son mitigados. No obstante, existen controversias en los resultados de los distintos experimentos realizados con las MSC y su papel inmunomodulador, obteniéndose a veces resultados contradictorios según la preparación y desarrollo de los experimentos, por lo que se requiere mayor investigación sobre el tema (Najar et al., 2017; Shirjang et al., 2017).

Una vez determinada la presencia de TLR4 en las ADSC, se realizaron distintos ensayos de fluorescencia para determinar la interacción entre LPS y las rADSC. Los resultados obtenidos demostraron que el LPS se une a las rADSC, lo que está en concordancia con otros resultados encontrados en la literatura científica (Kurte et al., 2020; Najjar et al., 2017). Asimismo, debido a la evidente ausencia de investigaciones que ensayen la cinética de unión entre el LPS y el TLR4 en las rADSC, en este trabajo se ha valorado, en base a las medidas de fluorescencia total, distintos factores que pueden influir en dicha interacción, optimizándose distintas condiciones de experimentación.

Hay diversos estudios que evalúan la activación de TLR4 en las MSC y sus efectos al ser tratadas con LPS, observándose, por ejemplo, diferencias en base al tiempo de exposición. Tras 1 h de incubación con LPS a 500 ng/ml, se induce un fenotipo MSC1 con propiedades inmunosupresoras limitadas, mientras que 48 h de exposición promueve un fenotipo MSC2 antiinflamatorio, con mayor efecto terapéutico (Kurte et al., 2020). Otro artículo relaciona también a TLR4 en la inmunosupresión, ya que su *knock out*, comprometió las capacidades inmunomoduladoras de las MSC (Lombardo et al., 2008).

## 5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

---

En nuestro caso, los resultados obtenidos en los experimentos nos indican que hay una mayor concentración de TLR4 en las rADSC a las 24h de exposición a LPS a 100 ng/ml, pero no a concentraciones más bajas, sugiriendo el posible papel inmunomodulador no solo frente a elevadas concentraciones de LPS, sino también al tiempo de exposición más prolongado. Una forma alternativa de examinar la interacción entre LPS y TLR4 en las ADSC, sería evaluar la expresión o activación de proteínas que se encuentran en la cascada de activación de TLR4, como las citoquinas. De este modo, un aumento en dichas proteínas podría indicar una mayor actividad de TLR4.

Por otro lado, los ensayos centrados en la captación por parte de las rADSC del LPS con moléculas fluorescentes conjugadas, no nos permite concluir que el LPS se una exclusivamente a TLR4 sin contemplar la posibilidad de que interactúe con la membrana celular o algún otro tipo de componente. Para ello sería necesario llevar a cabo experimentos de co-localización de LPS con TLR4 o el uso de antagonistas de TLR4 que nos permitan discernir la diferencia entre la activación y la inhibición de dicho receptor en presencia de LPS y la expresión de TLR4 en relación con la concentración de LPS en las ADSC.

En el mismo sentido, hay que tener en cuenta otros factores que puedan influir en la interacción del LPS con TLR4 en los experimentos *in vitro*, como, por ejemplo, algunas moléculas presentes en el suero del medio de cultivo con capacidad de unión al LPS, como lo son la proteína de unión al LPS (LBP) y la forma secretada de CD14 (sCD14). Estas proteínas presentes en el suero han sido relacionadas en un estudio como mediadoras en la internalización de TLR4 y la activación de la vía TBK1–IKKε–IRF3 y la expresión del IFN-β (Hiroki Tsukamoto et al., 2018), que es una molécula implicada en las funciones regenerativas e inmunomoduladora de las MSCs (Vigo et al., 2019).

En resumen, la activación de los TLRs presentes en las MSC pueden tener diversos efectos en la capacidad inmunomoduladora de las MSC sobre las células inmunes dependiendo de varios factores, como el tipo de célula inmune presente, el tipo de TLR y el ligando (determina la vía de señalización que se activa), la concentración del ligando, el tiempo de exposición al mismo y las características del medio de cultivo que se emplee en los experimentos *in vitro* (Shirjang et al., 2017). En la literatura en general existen discrepancias en las propiedades inmunomoduladoras de las MSC, dependiendo de la

## 5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

---

fuelle de obtención de las MSC, y los resultados obtenidos son variables en relación al uso de MSC de roedores, como en nuestro caso, o MSC humanas(Najar et al., 2017).

En conjunto, los resultados obtenidos apoyan de cierta manera el efecto observado en el modelo inflamatorio de Parkinson con LPS del trabajo de Muñoz et al. (2019), en el que el trasplante de rADSCs en la *substantia nigra* disminuyó la activación de la microglia probablemente mitigando el efecto del LPS debido a la unión entre éste y el TLR4 presente en las células, reduciendo así la cantidad de LPS disponible para activarla.

### 5.3. DIFERENCIACIÓN DE LAS rADSC A CELULAS MADRE NEURALES Y CÉLULAS SIMILARES A NEURONAS.

En los resultados obtenidos en los experimentos de diferenciación a neuronas, se ha mostrado la capacidad de la población de rADSC de diferenciarse a NSC y neuronas. Este hecho tiene gran importancia en el conocimiento de las propiedades biológicas de las MSC en el ámbito de las terapias celulares, ya que se han realizado numerosos ensayos preclínicos pero no están muy establecidas las terapias celulares basadas en MSC para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y neurológicas como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, Esclerosis Lateral Amiotrófica o daños de médula espinal entre otras(Soares et al., 2022; Staff et al., 2019), siendo necesario por lo tanto, seguir la investigación acerca de las ventajas e inconvenientes de esta población de células tanto *in vitro* como *in vivo*.

En cuanto a las células madre derivadas del tejido adiposo, se han empleado tanto las células de la FVE (Al-Kharboosh et al., 2022) como las ADSC (S.-Z. Lin et al., 2014), con resultados prometedores en algunas terapias llevadas a cabo en humanos, situando a las células madre del tejido adiposo como candidatas para las terapias celulares en enfermedades del sistema nervioso en base a sus propiedades regenerativas, inmunomoduladoras y la posible diferenciación a células madre neurales. Por ello, como objetivo se estableció estudiar la diferenciación de las rADSC a células madre neurales y neuronas *in vitro*.

Los resultados obtenidos por inmunofluorescencia demuestran que se da *in vitro* la transdiferenciación de las rADSC a NSC y que a partir de éstas se formaron las células

## 5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

---

con fenotipo similar a neuronas. Las neuroesferas se formaron siguiendo un protocolo de inducción con factores de crecimiento como EGF y FGF, bien establecido por otros autores tanto en ADSC de rata como humanas (Peng et al., 2019; Xu et al., 2008) y con el que se obtienen un número considerable de NSC en comparación con otros métodos menos efectivos como el uso de factores de transcripción o lentivirus (Luo et al., 2018). Las neuroesferas se detectaron por inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo de Nestina, que es una proteína del filamento intermedio y un reconocido marcador de las NSC, imprescindible para la autorrenovación (D. Park et al., 2010). A partir de las neuroesferas, se siguió un protocolo de inducción a neuronas basado en trabajos anteriores (Ji et al., 2015), que sigue la línea de usar factores de crecimiento como el BDNF para inducir la diferenciación y obtener una mayor eficacia y duración de las células en cultivo.

En los resultados podemos observar los cambios morfológicos de las células hacia un fenotipo neuronal conforme avanzan los días de incubación, apreciándose en los primeros días células similares a neuroblastos que aún se marcan con nestina. Después de 14 días aparecen células con prolongaciones características de neuronas como estructuras similares a axones o dendritas. Para confirmar que se trataba de neuronas maduras, se utilizó el anticuerpo de la proteína asociada a microtúbulos MAP2, específica de neuronas maduras, distinguiéndose el mayor marcaje a los 18 días de cultivo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros trabajos que observan una mayor estabilidad del marcaje de MAP2 en neuronas maduras después de dos semanas de inducción en cultivo (Anghileri et al., 2008; Darvishi et al., 2017). En este trabajo no se especificó el tipo de neurona madura que se obtuvo en cultivo, pero en otros trabajos si se ha mostrado la obtención *in vitro* de neuronas maduras con marcajes específicos, como neuronas colinérgicas y dopaminérgicas (H. T. Zhang et al., 2012), GABAérgicas (Anghileri et al., 2008) o motoneuronas (Darvishi et al., 2017) a partir de las MSC, pero no se ha conseguido evidenciar sus características electrofisiológicas.

Este proceso de diferenciación a neuronas maduras *in vitro* es similar a la neurogénesis adulta a partir de las NSC localizadas en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo. En la primera etapa de la neurogénesis adulta, las NSC expresan nestina y GFAP, y tienen una gran capacidad proliferativa. El comienzo de la segunda etapa viene

## 5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

---

determinado por la disminución de la proliferación y el inicio de la diferenciación temprana, donde las células presentan nestina durante los tres primeros días. Tras procesos de migración y tras estímulos neurogénicos y el establecimiento de nuevas conexiones, las neuronas maduran y presentan marcadores postmitóticos neuronales como NeuN o calbindina en el Bulbo Olfatorio o MAP2 en zonas corticales (Jurkowski et al., 2020).

Un artículo de especial relevancia publicado en 2013 describió una población de células pluripotenciales denominadas como células imperecederas por estrés con capacidad de diferenciación multilinaje (*Multilineage Differentiating Stress-Enduring, Muse*), aisladas tras someter a las células derivadas del tejido adiposo a diferentes condiciones estresantes, como la larga exposición a colagenasa, medio sin suero, baja temperatura o hipoxia. Estas células pueden diferenciarse al linaje ectodérmico empleando medios de diferenciación neuronal y obtener NSCs con una eficacia del 78 % (Heneidi et al., 2013). Este método abre la posibilidad de que el tejido adiposo podría presentar células madre con capacidad pluripotencial inducida por estrés, y obtener células que no han seguido un proceso de transdiferenciación a partir de células madre mesenquimales con capacidad multipotente y corrobora la versatilidad de las células madre presentes en el tejido adiposo como candidatas para la obtención de células.

Una vez establecidas las diferencias morfológicas y la presencia de marcadores de las células neurales derivadas de las rADSC, es esencial el estudio de las propiedades electrofisiológicas para determinar la funcionalidad de las células similares a neuronas obtenidas. Para ello, se realizaron experimentos de *patch-clamp* con las neuronas obtenidas a partir de las rADSC. En la literatura científica hay muy pocos trabajos que registren las propiedades electrofisiológicas de las neuronas derivadas de las ADSC utilizando esta técnica.

Los artículos de algunos grupos de investigación han mostrado la presencia de canales de Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup> dependientes de voltaje en las neuronas derivadas de las MSC humanas (Ullah et al., 2016), pero no muestran cambios en las propiedades pasivas, como el potencial de membrana en reposo o la resistencia de membrana, según el estado de madurez de las neuronas. Otro artículo con neuronas derivadas de ADSC humanas registraron diferencias en el potencial de membrana como respuesta a pulsos de

## 5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

---

corriente, obteniendo cambios en las conductancias de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> respecto a la electrofisiología de las ADSC en condiciones basales, pero no se registraron potenciales de acción (Anghileri et al., 2008). En MSC de ratas, se han registrado neuronas derivadas de las BMMSC, pero no tenían características funcionales; ni presentaban canales de Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup> ni disparaban potenciales de acción (Barnabé et al., 2009). Sin embargo, los artículos referenciados sobre electrofisiología en las neuronas derivadas de las MSC datan de hace más de 10 años, y no hay trabajos más actuales que empleen ADSC de ratas para evaluar los efectos.

Los resultados que se obtuvieron en este trabajo muestran cambios significativos en propiedades electrofisiológicas pasivas características de neuronas como el potencial y la resistencia de membrana, y propiedades activas como la actividad de corrientes rectificadoras. Así, las células similares a neuronas registradas presentan propiedades electrofisiológicas características de neuronas como el cambio de potencial de membrana en reposo, donde disminuye desde los  $-28.86 \pm 13.16$  mV de las rADSC en condiciones basales a  $-60.94 \pm 6.75$  mV en las células similares a neuronas incubadas durante 10 días, y a  $-74.74 \pm 1.58$  mV en neuronas incubadas durante 20 días. Estos datos se diferencian del trabajo realizado por Barnabé et al. (Barnabé et al., 2009) en neuronas derivadas de la BMMSC. Estos cambios podrían deberse a los distintos protocolos utilizados, ya que inducen la diferenciación neuronal mediante el uso de reactivos químicos directamente sobre las MSC mientras que el protocolo seguido por nuestro grupo emplea factores de crecimiento para la transdiferenciación a neuroesferas y posteriormente neuronas, que se ha mostrado más efectivo en la eficacia para la obtención de neuronas (Luo et al., 2018). En las NLC derivadas de ADSC humanas se obtuvieron resultados similares, registrándose un potencial de  $-59.75 \pm 5.41$  mV tras 30 días en cultivo (Anghileri et al., 2008)

Otra de las propiedades de interés observada es el cambio en la resistencia de membrana, que resulta significativo a los 20 días de incubación de las neuronas derivadas de las rADSC, alcanzando las rADSC en condiciones basales 500 M $\Omega$  respecto a las NLC que reducen la resistencia a 250 M $\Omega$ . Estos datos nos indicarían la posible presencia de corrientes de fuga o canales de potasio acordes a un mayor grado de madurez neuronal (Carrascal et al., 2020).



## 5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

---

En relación a las propiedades en respuesta a estímulos eléctricos en las ADSC humanas, los resultados corroboran un cambio en el potencial de membrana respecto a la intensidad de corriente inyectada debido a la actividad de canales de entrada de  $\text{Na}^+$  y canales de corrientes rectificadoras retardadas de  $\text{K}^+$  voltaje-dependientes, como demuestran tras la inhibición específica de dichos canales con tetrodotoxina (TTX) para corrientes de  $\text{Na}^+$  o Tetraetilamonio (TEA) para las corrientes de  $\text{K}^+$  rectificadoras (Anghileri et al., 2008). Nuestros resultados indican una respuesta rectificadora o Sag a pulsos de corrientes hiperpolarizantes en NLC de 22 días de incubación, pero no se emplearon inhibidores específicos de canales voltaje-dependientes, por lo que no se puede afirmar la actividad de un canal en específico, pero sí se puede deducir la presencia de actividad rectificadora voltaje-dependiente en estas células. Lo que sí es común a los demás trabajos es la ausencia de disparo de potencial de acción de las NLC, manteniéndose como uno de los retos por conseguir en la actualidad (Anghileri et al., 2008; Barnabé et al., 2009; Ullah et al., 2016).

En resumen y en base a los resultados obtenidos en este apartado y la literatura científica, es evidente el potencial uso de las MSCs y la transdiferenciación a NSC con capacidad para la diferenciación a neuronas como estrategia en terapias celulares para enfermedades neurológicas o neurodegenerativas, pero la mayoría de los estudios se han basado en identificar a la NSC derivadas de las MSC con marcadores mediante técnicas de inmunofluorescencia o citometría, pocos se han realizado sobre la funcionalidad con técnicas como la electrofisiología. En el presente trabajo se muestra que las células similares a neuronas obtenidas a partir de las rADSC presentan características electrofisiológicas de neuronas, incluso hemos podido registrar un potencial de acción de poca amplitud y mucha duración, lo que indica que son funcionales activamente. Probablemente será necesario hacer nuevos registros en estados más avanzados de la maduración neuronal.

Otro punto a tener en cuenta es que, según algunos trabajos, la población de ADSC pueden contener NSC sin necesidad de la inducción neuronal (Petersen et al., 2018) o poblaciones celulares con cierta capacidad pluripotencial (Heneidi et al., 2013), por lo que sería necesario solventar el criterio sobre la selección de las ADSC con capacidad de transdiferenciación a NSC o las células con capacidad pluripotencial en base a

## 5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

---

marcadores más específicos de estos tipos celulares. También se desconoce el efecto de la edad de las ADSC y su capacidad de transdiferenciación, dependiendo de factores como la edad del donante o la región de origen de las ADSC, siendo del mismo modo características que podrían influir en la heterogenicidad de las ADSC.

### 5.4. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA EDAD SOBRE MOLÉCULAS IMPLICADAS EN RUTAS BIOQUÍMICAS ASOCIADAS A LA INMUNOMODULACIÓN, SUPERVIVENCIA Y TRANSDIFERENCIACIÓN DE LAS rADSC

El éxito de las terapias celulares con las MSC reside en la capacidad de adaptación a ambientes adversos y poder regenerar o reemplazar células en los tejidos dañados. El estrés oxidativo es uno de los daños endógenos reconocidos en el proceso de envejecimiento y está asociado con la senescencia celular, la inflamación persistente y la desregulación de metabolitos intracelulares que promueven apoptosis, el acortamiento de los telómeros, la inhibición de la autofagia o disfunciones mitocondriales (López-Otín et al., 2013), y es la base de muchas enfermedades crónicas asociadas a la edad como el Parkinson o el Alzheimer.

Tras estudiar la implicación en la función inmunomoduladora de las rADSC y su capacidad de transdiferenciarse a NSC y posteriormente a células similares a neuronas, se indagó en factores que pueden influir en estas funciones como la edad o el estrés oxidativo ya que aún no se conocen como pueden afectar estos factores a estas capacidades de las ADSC.

Debido a la pérdida de la capacidad regenerativa de las células madre con el envejecimiento, sumada al incremento de la senescencia y apoptosis, en esta sección se discute cómo la edad y el estrés oxidativo inducido por HC puede afectar a la transdiferenciación a NSC y la supervivencia de las rADSC enfocándonos en distintas moléculas que directa o indirectamente intervienen en vías asociadas. Para ello, nos centramos en analizar la expresión de moléculas que están relacionadas con varias funciones biológicas de las células madre y que están implicadas en funciones de inmunomodulación como TLR4, la autorrenovación y mantenimiento del estado multipotencial como SOX2, vías de la longevidad como eEF2 que actúa en el proceso de

## 5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

---

síntesis de proteínas y Sirt1 que está implicada con el control de la autofagia, el metabolismo y la supervivencia celular.

Para conocer el efecto de la edad se han utilizado ADSC de ratas jóvenes (3 meses) y mediana edad (10 meses). Los experimentos en las ratas de 10 meses nos permitieron estudiar cambios moleculares que pueden aparecer en las rADSC de una edad no demasiado avanzada y que por tanto pueden ser susceptibles de modular o evitar en edades más avanzadas con intervenciones que puedan prevenir su agravamiento. Por otro lado, el HC como agente oxidativo, que genera un ambiente de estrés oxidativo cuando se añade a los cultivos celulares como se ha mostrado en trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Muñoz et al., 2020).

### **TLR4**

El TLR4, es un receptor implicado en la respuesta proinflamatoria de las MSC ante un estímulo asociado a patógenos, y es relevante en mecanismos de importancia terapéutica como es la capacidad inmunomoduladora, entre otros (De Filippis & Peri, 2021; Shirjang et al., 2017).

En nuestro caso, cuando las rADSC se sometieron a estrés oxidativo, disminuyó considerablemente los niveles de TLR4. Este descenso sugiere que la capacidad inmunomoduladora de las rADSC se podría afectar cuando se encuentran en ambiente con daño oxidativo. Por el contrario, en otros trabajos lo que se ha puesto de manifiesto es la relación entre la activación de TLR4 y la protección frente al estrés oxidativo en las MSC, disminuyendo la apoptosis inducida por estrés oxidativo e incrementando la supervivencia a través del factor  $\text{NF}\kappa\beta$  que interviene en la vía de señalización de TLR4 (Wang et al., 2009). Igualmente, Chen et al. proponen un modelo de protección frente al estrés oxidativo por hipoxia, donde la activación del TLR4 liberación de citoquinas y ROS, por la translocación de  $\text{NF}\kappa\beta$  al núcleo, y este mecanismo estimula el factor Nrf2 lo que promueve una respuesta antioxidante (Xiaosong Chen et al., 2016b). Por ello, sería necesario investigar más sobre los efectos del estrés oxidativo sobre el TLR4.

En la transdiferenciación no se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de TLR4. Este resultado implica que las NSC mantienen la expresión de TLR4 y por lo tanto capacidad de respuesta ante ligandos del receptor. Algunos trabajos asocian la

## 5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

---

activación del TLR4 en NSC adultas y una respuesta proinflamatoria mediante la producción de citoquinas (Covacu et al., 2009), o incluso en un modelo de Alzheimer en ratones se correlacionó el descenso de la actividad de TLR4 de NSC implantadas con un descenso en la neuroinflamación y mejoras cognitivas, sugiriendo de cierta forma, la capacidad inmunomoduladora de las NSC sobre la microglia y astrocitos (Q. Zhang et al., 2016).

El estrés oxidativo inducido por HC también mostró una reducción significativa de los niveles de TLR4 en las NSC, lo cual es coherente con el resultado anterior ya que las NSC se formaron a partir de rADSC sometidas a HC en las que ya estaba disminuida la expresión de TLR4. Esto cobra importancia en situaciones patológicas en el sistema nervioso central en las que el estrés oxidativo se encuentra exacerbado, y podría afectar en la expresión de TLR4, que se ha visto que, aparte de llevar a cabo una respuesta proinflamatoria, intervendría en la autorrenovación de las NSC y la homeostasis del SNC (De Filippis & Peri, 2021; Rolls et al., 2007) y que por tanto podría limitar los beneficios terapéuticos de las ADSC y neuroesferas formadas a partir de ellas.

### SOX2

Aunque hay varios estudios sobre la diferenciación de las ADSC a neuronas se conoce poco sobre cómo se afecta este proceso en situaciones adversas. Diferentes moléculas juegan un papel activo a la hora de diferenciarse las células madre, pero SOX2 forma parte del sistema regulatorio que promueve la autorrenovación, el estado multipotente potente y ralentiza la diferenciación de las MSC adultas (Novak et al., 2020). Así, uno de los objetivos del trabajo fue estudiar como el efecto del estrés oxidativo y la edad podrían afectar a la multipotencialidad de las rADSC por lo que se midió la expresión de SOX2 en esas condiciones. Los resultados mostraron que los niveles de SOX2 disminuyen significativamente en las rADSC tanto cuando están expuestas a estrés oxidativo como por la edad, lo que nos sugieren que en estas situaciones las células madre pierden en gran medida la capacidad pluripotente. Esto podría ser responsable, en parte, de los cambios en la capacidad de diferenciación observada con la edad, lo cual conduciría a una disminución en la funcionalidad de las células madre importante para las propuestas de terapias regenerativas.

## 5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

---

Por otro lado, en algunos estudios se ha relacionado SOX2 con moléculas implicadas con las vías de longevidad. En células madre procedentes de médula ósea se ha visto que el descenso de SOX2 puede ser estimulado por el silenciamiento de Sirt1 (Kretsovali, 2017; Suk Yoon et al., 2014). Pero en el presente estudio el descenso de SOX2 no ha sido acompañado por un descenso de Sirt1. En relación con este aspecto se necesitarían más estudios para ver la relación de ambas moléculas.

En relación a las NSC, SOX2 se presenta como un factor que interviene en la proliferación y estado multipotencial de las NSC, interviniendo en estadios tempranos de la diferenciación neuronal y disminuyendo considerablemente su expresión en el estadio post-mitótico de la diferenciación neuronal (Cavallaro et al., 2008; S. Zhang & Cui, 2014). En nuestro caso, cuando determinamos la expresión de SOX2 en el proceso de diferenciación de las rADSCs a neuronas, los resultados obtenidos nos muestran que los niveles de SOX2 bajan significativamente en las neuroesferas respecto a las rADSC. Estos resultados nos sugieren que en el proceso de diferenciación se pierde capacidad pluripotente, perdiéndose en parte el fenotipo indiferenciado y probablemente permitiendo la activación de genes específicos para completar la diferenciación neuronal. En otros estudios también se ha observado este mismo comportamiento encontrándose los niveles más altos de SOX2 en las células madre indiferenciadas (Fong et al., 2008; Kretsovali, 2017). Al contrario que en nuestros resultados, otros investigadores han comprobado por PCR que los niveles de SOX2 se incrementan al inducir las SVF a neuroesferas (Peng et al., 2019; Qin et al., 2015), pero estas diferencias en resultados podrían deberse a los métodos de medida, ya que en nuestro caso se cuantificó la cantidad de proteínas, las cuales pueden sufrir cambios posttranscripcionales que promoverían la degradación de SOX2.

Lo que si parece quedar patente es que las neuroesferas formadas a partir de rADSC tratadas con HC o las obtenidas a partir de rADSC envejecidas presentan una menor expresión de SOX2, lo que nos indica que las neuroesferas en estas condiciones tendrán una menor capacidad para proliferar y formar nuevas neuronas.

Estos hechos pondrían de manifiesto el potencial de las rADSC y su capacidad de autorrenovación y mantenimiento del estado multipotente. Y que cuando se diferencian

## 5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

---

a neuroesferas esta capacidad disminuye, pero siguen manteniendo cierta potencialidad y capacidad de autorenovación importante para su posible uso terapéutico. Asimismo, ambos tipos celulares y estas capacidades se afectan tanto por estrés oxidativo como por la edad. En cualquier caso, no se puede ignorar el hecho de que las ADSC y las neuroesferas son células multipotentes diferentes y que existen otros factores de transcripción implicados en este proceso como Nanog u Oct4 (Han et al., 2014) que podrían ser cruciales para comprender mejor el efecto de la edad y el estrés oxidativo.

### **eEF2**

El eEF2 es un factor determinante en la homeostasis proteica, ya que está implicado en la etapa de elongación de la síntesis de proteínas. Este proceso está regulado por diversos factores metabólicos, fisiológicos y fisiopatológicos (Argüelles et al., 2013, 2014). La síntesis de proteínas es un proceso que requiere una gran cantidad de energía, por lo que en condiciones de estrés oxidativo o una mayor edad, el proceso se puede reducir para dirigir la energía hacia otros procesos. Varios estudios en diferentes tejidos han mostrado que eEF2 disminuye sus niveles durante el envejecimiento o sometido a agentes oxidantes (Parrado et al., 2003; Argüelles et al., 2011).

A pesar de que existen muchos estudios en este sentido, son pocos los que han estudiado como se afecta el eEF2 en las células madre y sus procesos de diferenciación bajo estas condiciones. Por ello, es importante investigar este aspecto y más concretamente cómo se afecta el proceso de transdiferenciación de las ADSC a neuronas.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que en las rADSC el estrés oxidativo inducido por HC y la edad produjo una disminución significativa en los niveles de eEF2, lo que nos sugiere que en estas condiciones la síntesis de proteínas esté disminuida ya que la energía celular sea requerida para otros procesos celulares enfocados a la supervivencia. Aunque resultados similares se han descrito en otros tipos celulares en los que disminuye el eEF2 por estrés oxidativo (Argüelles et al., 2012), otros estudios en rADSC de distintas edades mostraron un aumento de la expresión de eEF2 con el envejecimiento pero una disminución en las rADSC de ratas tratadas con HC *in vivo* (Muñoz et al., 2020).

## 5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

---

Aunque se ha descrito en ratones que el eEF2 es importante en la neurogénesis adulta (Taha et al., 2020), en el proceso de transdiferenciación de las rADSC a NSC, nuestros resultados mostraron que los niveles eEF2 sufrieron un descenso significativo, que se vio agravado en ratas envejecidas. Esto sugiere que mientras las rADSC están en estado indiferenciado haya una mayor activación de la síntesis de proteínas, probablemente enfocada a mantener el “pull” de células en los tejidos mientras que cuando les llega un estímulo para diferenciarse la energía se desvía a procesos necesarios para la diferenciación.

Estos cambios en la expresión de eEF2 durante la transdiferenciación de células madre mesenquimales a neuronas necesitan en un futuro ser estudiados en profundidad y en el proceso completo de diferenciación hasta neuronas para dilucidar la implicación del eEF2 en este proceso.

### **Sirt1**

Sirt1 es una molécula implicada en numerosas rutas bioquímicas importantes en el metabolismo y la supervivencia celular, como son la autofagia, reparación del ADN, capacidad antioxidante o función mitocondrial.

En nuestros resultados, los niveles proteicos se elevan significativamente cuando las rADSCs son sometidas a un ambiente oxidante, lo cual está de acuerdo con otros estudios en los que se ha mostrado que estas células pueden incrementar la expresión de Sirt1 en respuesta al estrés oxidativo (Li et al., 2018; Muñoz et al., 2020) y nos sugiere que forma parte de la activación de mecanismos antioxidantes para aumentar la resistencia celular al estrés oxidativo.

Sin embargo, cuando se estudió el efecto de la edad sobre la expresión de Sirt1 no pudimos apreciar diferencias significativas. En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación se reportó un descenso de Sirt1 en ADSC de ratas de 24 meses de edad (Muñoz et al., 2020), probablemente, en nuestro caso, no se ha podido llegar a observar un ese descenso porque las rADSC procedían de ratas de 10 meses y por tanto no tan envejecidas. Estas diferencias entre la edad y estrés oxidativo podrían ser debido a que los efectos del estrés oxidativo agudo asociado al modelo de inducción con HC son diferentes al estrés oxidativo crónico asociado a la edad y a los mecanismos de

## 5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

---

senescencia que favorecerían la degradación de Sirt1 (Liguori et al., 2018). De hecho, otros trabajos han reportado la disminución de Sirt1 en células de organismos más envejecidos, donde muchas de ellas se encuentran en estado senescente (Vono et al., 2018).

En la transdiferenciación de las rADSC a NSC, no hubo diferencias significativas en los niveles de Sirt1, por lo que parece que no está implicada en el proceso de diferenciación a neuroesferas, aunque hay estudios que han descrito la implicación de Sirt1 en la modulación de la diferenciación neuronal a partir de las NSC (Hisahara et al., 2008).

Por otro lado, las NSC derivadas de rADSC sometidas a estrés oxidativo si mostraron una disminución en la expresión de Sirt1, lo cual nos podría indicar que las NSC obtenidas a partir de rADSC sometidas a estrés oxidativo tendrían una menor “defensa antioxidante”, aunque serían necesarios más estudios para dilucidar el papel de esta molécula y su implicación en estas funciones.

Tomando estos resultados en conjunto, se sugiere que con la edad y el estrés oxidativo en las rADSC se reducen los niveles SOX2 y eEF2, implicadas en mecanismos de autorrenovación, proliferación, mantenimiento del estado multipotencial y la diferenciación, y se incrementa los niveles de Sirt1, que actúa en mecanismos de supervivencia y protección frente al estrés oxidativo en condiciones *in vitro*. Quizás más enfocado a mantener el tejido que a repararlo en condiciones en las que la biología celular está desafiada.

El proceso de transdiferenciación de rADSC a NSC también produjo cambios en SOX2 y eEF2, manifestando posibles diferencias moleculares entre ambos tipos de células madre multipotentes y los mecanismos bioquímicos subyacentes.

En general, es necesario investigar más los distintos parámetros moleculares que influyen en las distintas capacidades biológicas de las MSC y las NSC en condiciones adversas para conocer el potencial terapéutico de estas células, y poder trasladarlo a la clínica, especialmente a pacientes mayores, donde el envejecimiento conlleva estrés oxidativo y procesos inflamatorios.



## 5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

---

### 5.5. ESTUDIOS *IN VIVO* CON rADSC EN MODELO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON EN RATA

La enfermedad de Parkinson es una de las enfermedades neurodegenerativas ligadas al envejecimiento de mayor repercusión en la actualidad, y es necesario la investigación sobre las distintas alternativas para su tratamiento. En la actualidad, los pacientes con Parkinson presentan una alta heterogeneidad en el cuadro clínico, siendo la diagnosis de especial relevancia para comprender el estado del paciente (Lang & Espay, 2018). Los tratamientos más recientes están enfocados en el uso de fármacos, como ,por ejemplo, la inosina que está dirigida hacia el estrés oxidativo presente en los pacientes, y otros compuestos que implican cambios en la vía de síntesis de dopamina, y poder restaurar los niveles de esta molécula (Balestrino & Schapira, 2019; Lang & Espay, 2018).

En nuestro trabajo, empleando un modelo de Hemiparkinsonismo basado en el estrés oxidativo, valoramos el posible efecto protector de las rADSC inyectándolas en el núcleo estriado, con el fin de investigar los posibles efectos terapéuticos. Se obtuvieron resultados alentadores, ya que tras la implantación de rADSC, hubo una recuperación en el número de neuronas dopaminérgicas que se observó desde los 10 días y hasta los 4 meses después del trasplante.

En el modelo de Parkinson usado, la 6- hidroxidopamina (6-OHDA), un potente inhibidor de la actividad de las mitocondrias, se destruyen selectivamente las neuronas dopaminérgicas de un lado de la *substantia nigra* de ratas cuando se inyecta intracranealmente por estereotaxia (Deumens et al., 2002). Así, en nuestro modelo, la lesión se induce directamente en la *substantia nigra*, produciendo una pérdida de neuronas del 95.5 %, distinguible 10 días después de la lesión. Sin embargo, en las ratas lesionadas que tuvieron el implante de las rADSC en el cuerpo estriado la pérdida de neuronas fue bastante menor, 74 %, es decir hubo una recuperación a corto plazo (10 días) del 21.52 %, por lo que ya desde el principio del tratamiento con rADSC se pudo observar cierto efecto neuroprotector. Sorprendentemente, cuando se midió el número de neuronas a los 4 meses después de la lesión con la inyección de 6-OHDA y el tratamiento con las rADSC se observó que el grupo no tratado con rADSC seguía mostrando una pérdida neuronal alta, del 80%, mientras que el grupo tratado con rADSC tan solo presentaba una disminución de neuronas del 35 % respecto a la situación

## 5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

---

control, lo cual supone una recuperación del número de neuronas dopaminérgicas de un 45% en 4 meses en comparación con las ratas que no tuvieron tratamiento, lo que nos sugiere que las rADSC aumentan su efecto neuroprotector a largo plazo. Además, estos resultados histológicos fueron acompañados de la recuperación de disfunciones motoras que se midieron mediante el test de rotación, lo que nos confirma este efecto beneficioso de las rADSC en la restauración de la función motora.

Los efectos de las MSC como posible terapia para el Parkinson se han estudiado en otros trabajos con modelos animales, investigándose distintos aspectos como la capacidad inmunomoduladora, angiogénica, efectos quimiotácticos y la estimulación de la diferenciación de las células residentes (Gugliandolo et al., 2017). En este sentido, algunos trabajos han mostrado resultados beneficiosos con el mismo modelo de Parkinson después de 6 meses del trasplante de ADSC, basándose en el incremento de TH y el BDNF, y viendo recuperación en síntomas motores (Berg et al., 2015) y cognitivos (Schwerk et al., 2015). Sin embargo, en estos artículos no se produjo una mejoría en el número de neuronas TH en la *substantia nigra*, según los datos mostrados de la estereología. Estas diferencias podrían deberse a distintos factores como el origen y las distintas regiones de implantación de las ADSC, ya que en los trabajos de Berg y Schwerk, se implantan ADSC humanas en la *substantia nigra* una semana después de la lesión con la 6 OHDA, y podrían verse afectadas por el estrés oxidativo presente en la zona, modificando la capacidad terapéutica de las ADSC. Esto lo diferencia de nuestro caso ya que las rADSC se inyectaron en núcleo estriado para que no se vieran afectadas por el estrés oxidativo que provoca el 6OHDA, estrategia que parece ser más efectiva para mantener la viabilidad de las rADSC inyectadas.

Otro modelo similar al nuestro se llevó a cabo con BMSC, que se inyectaron en ambos cuerpos estriados, tras la lesión unilateral con 6 OHDA en la *substantia nigra*, y observaron después de 45 días que las MSC sobrevivieron mejor en el cuerpo estriado asociado a la *substantia nigra* neurodegenerada que en el cuerpo estriado del otro hemisferio. Además, también mostraron la migración de estas células a través del cuerpo calloso para poblar, entre otras regiones, a la *substantia nigra* lesionada (Hellmann et al., 2006). Aunque en este artículo no se describe la posible recuperación del número de neuronas TH en la *substantia nigra*, sí que explicaría un posible

## 5. DISCUSIÓN Y FUTURAS PERSPECTIVAS

---

mecanismo migratorio que permite el efecto neuroprotector de las ADSC en el lugar del daño desde el cuerpo estriado hasta SN.

Aunque el modelo de PD con 6-OHDA es un modelo centrado en la neurodegeneración causada por el daño del estrés oxidativo y no por inflamación, nos interesó estudiar si había activación de la microglía y si el implante con rADSC tenía algún efecto sobre ellas. Nuestros resultados mostraron con este modelo de PD se produce una pequeña activación de la microglía y que cuando se trata la lesión con rADSC se produce un leve descenso significativo del 13.58 % de la microglía activa 10 días después del implante de las ADSC en el estriado, indicando cierta capacidad inmunomoduladora sobre la activación de la microglía de la *substantia nigra* por parte de las rADSC. En otros estudios sobre el posible efecto inmunomodulador de las ADSC en modelos de Parkinson con 6-OHDA los resultados indicaron la inducción de citoquinas antiinflamatorias periféricas, recogidas del suero del animal, pero no describe el posible papel inmunomodulador sobre la microglia (Schwerk et al., 2015). Sin embargo, este modelo no resulta el más adecuado para la investigación acerca del efecto inmunomodulador de las rADSC, ya que existen otros modelos que se centran más en la neuroinflamación y la fagocitosis por la microglía, como el que emplea LPS inyectado en la SN, que provoca la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas (Herrera et al., 2000; Flores-Martinez et al., 2018; M. Liu & Bing, 2011). Por otro lado, este modelo presenta inconvenientes como la hiperactividad motora en un modelo bilateral de LPS, que dificultaría el estudio sobre la mejora de esta función (M. Liu & Bing, 2011), o la menor degeneración de neuronas dopaminérgicas (Castaño et al., 2002).

En resumen, las evidencias de los distintos resultados obtenidos con las MSC en modelos *in vivo* de Parkinson muestran un claro efecto neuroprotector a largo plazo y cierta capacidad inmunomoduladora de las ADSC sobre la microglía, mejorando las capacidades motoras y cognitivas asociadas al Parkinson después de 120 días, pero son necesarios más estudios acerca de los posibles mecanismos y estrategias terapéuticas que podrían desarrollarse con las ADSC para conocer su potencial clínico real.

## 6. CONCLUSIONES

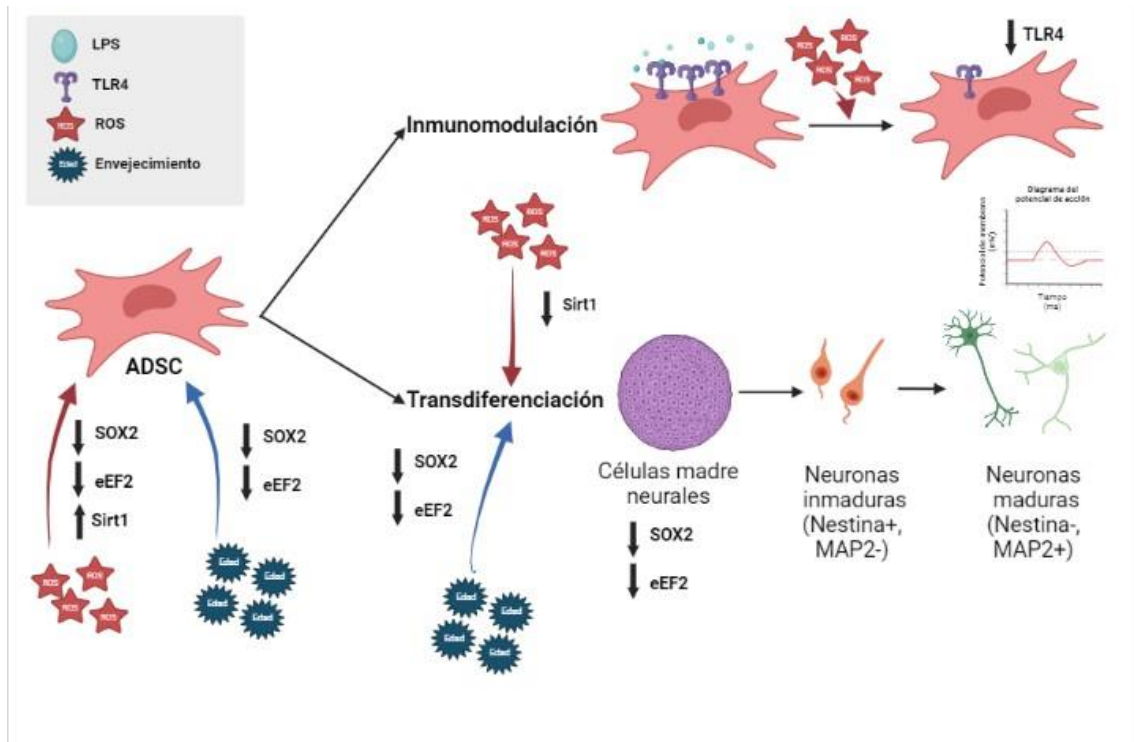
---



En base a los resultados obtenidos en esta tesis, las conclusiones obtenidas del estudio sobre la función inmunomoduladora, la capacidad de diferenciación de las rADSC a neuronas, el efecto que tiene el estrés oxidativo y la edad sobre estos procesos, y los efectos terapéuticos en un modelo *in vivo* son:

1. Las células utilizadas cumplen las propiedades típicas de las MSC:
  - a) Con capacidad de adherencia al plástico
  - b) Capacidad multipotente de diferenciación a adipocitos y osteoblastos.
2. La interacción de LPS con las rADSC depende del número de rADSC presentes, el tiempo y la concentración de LPS al que están expuestas, siendo mayor esta interacción a más tiempo y concentraciones más altas. El receptor implicado en la respuesta inmunomoduladora TLR4, está presente en la población de ADSC y sus niveles de expresión aumentan según el tiempo de exposición y la concentración de LPS, así como del número de ADSC presentes.
3. Las ADSC pueden diferenciarse *in vitro* a células madre neurales a través de un proceso denominado transdiferenciación, y de éstas a células similares a neuronas que presentan propiedades electrofisiológicas características de neuronas como el potencial de membrana y la resistencia de membrana, así como corrientes rectificadoras ante estímulos hiperpolarizantes, como indica la presencia de Sag. Lo que sugiere que pueden funcionar como neuronas.
4. El efecto del estrés oxidativo, la transdiferenciación y la edad produjo cambios en moléculas implicadas en varias rutas bioquímicas de interés de las ADSC y las NSC, como se reúne a continuación:
  - a) El estrés oxidativo disminuye la expresión de TLR4, receptor implicado en procesos de inmunomodulación en las ADSC y en las NSC, así como los niveles de SOX2 y eEF2, que intervienen en vías relacionadas con la proliferación, síntesis de proteínas y mantenimiento del estado multipotencial de las células madre. Sirt1 en cambio aumenta con el estrés oxidativo en las ADSC, que es una molécula que participa en vías de supervivencia y defensa antioxidante, mientras que en las NSC disminuye la expresión de Sirt1.

- b) En la transdiferenciación *in vitro* de ADSC a NSC disminuyen los niveles de SOX2 y eEF2, mientras que TLR4 y Sirt1 no muestran cambios significativos.
  - c) Con la edad se reduce significativamente SOX2 en las ADSC y las NSC de 10 meses respecto a las de 3 meses, al igual que hay un descenso en la transdiferenciación de las ADSC a NSC de 10 meses. Respecto a eEF2 disminuye significativamente tanto en las ADSC como en las NSC de 10 meses respecto a las de 3 meses. En la transdiferenciación no se produjo cambios en NSC de 3 meses respecto a las ADSC, pero si en las NSC de 10 meses, mostrándose el efecto de la edad en este proceso. La expresión de Sirt1 no mostró ningún cambio significativo con edad en las ADSC ni en las NSC, así como tampoco en la transdiferenciación.
5. En el modelo de Parkinsonismo inducido en ratas, se observó el efecto neuroprotector del implante de ADSC en el cuerpo estriado tanto a un corto plazo de 10 días como a largo plazo (4 meses) aumentando el número de células TH+ en la *substantia nigra* y la mejora de funciones motoras de los animales a los 4 meses.



**Figura 35. Resumen de los cambios en los niveles de proteínas de interés en los procesos de inmunomodulación y transdiferenciación de las ADSCs, y el efecto del estrés oxidativo y la edad.** Las ADSC tiene función inmunomoduladoras en base a la respuesta provocada por la interacción del LPS con el TLR4 y capacidad de transdiferenciación, por su capacidad de generar una población de células madre neurales que pueden generar células similares a neuronas. Las ADSC se ven afectadas tanto por el efecto del estrés oxidativo como la edad, como muestran los cambios en proteínas que participan en procesos de importancia biológica como la autorrenovación y mantenimiento del estado multipotente a través del factor SOX2, la elongación de las proteínas con el eEF2, la protección antioxidante e incremento de la longevidad mediante la regulación de Sirt1, y la capacidad de detectar estímulos nocivos extracelulares a través del TLR4 para llevar a cabo una respuesta inmunomoduladora. Figura realizada en *Biorender.com*



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---



- Al-Kharboosh, R., Perera, J. J., Bechtle, A., Bu, G., Quinones-Hinojosa, A., & Jude, J. (2022). Emerging point-of-care autologous cellular therapy using adipose-derived stromal vascular fraction for neurodegenerative diseases. *Clinical and Translational Medicine*, *12*, 1093. <https://doi.org/10.1002/ctm2.1093>
- Anghileri, E., Marconi, S., Pignatelli, A., Cifelli, P., Galié, M., Sbarbati, A., Krampera, M., Belluzzi, O., & Bonetti, B. (2008). Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, *17*(5), 909–916. <https://doi.org/10.1089/scd.2007.0197>
- Argüelles, S., Camandola, S., Cutler, R. G., Ayala, A., & Mattson, M. P. (2014). Elongation factor 2 diphthamide is critical for translation of two IRES-dependent protein targets, XIAP and FGF2, under oxidative stress conditions. *Free Radical Biology and Medicine*, *67*, 131–138. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2013.10.015>
- Argüelles, S., Camandola, S., Hutchison, E. R., Cutler, R. G., Ayala, A., & Mattson, M. P. (2013). Molecular control of the amount, subcellular location, and activity state of translation elongation factor 2 in neurons experiencing stress. *Free Radical Biology and Medicine*, *61*, 61–71. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2013.03.016>
- Arguelles, S., Cano, M., Machado, A., & Ayala, A. (2011). Effect of aging and oxidative stress on elongation factor-2 in hypothalamus and hypophysis. *Mechanisms of Ageing and Development*, *132*(1–2), 55–64. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2010.12.002>
- Argüelles, S., Muñoz, M. F., Cano, M., MacHado, A., & Ayala, A. (2012). In vitro and in vivo protection by melatonin against the decline of elongation factor-2 caused by lipid peroxidation: Preservation of protein synthesis. *Journal of Pineal Research*, *53*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.2011.00961.X>
- Ayala, A., Parrado, J., Bougria, M., & Machado, A. (1996). Effect of Oxidative Stress, Produced by Cumene Hydroperoxide, on the Various Steps of Protein Synthesis. Modifications of Elongation Factor 2. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(38), 23105–23110. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.38.23105>

- Bacakova, L., Zarubova, J., Travnickova, M., Musilkova, J., Pajorova, J., Slepicka, P., Kasalkova, N. S., Svorcik, V., Kolska, Z., Motarjemi, H., & Molitor, M. (2018). Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. In *Biotechnology Advances*. 36(4), 1111–1126. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.011>
- Baksh, D., & Tuan, R. S. (2007). Canonical and non-canonical Wnts differentially affect the development potential of primary isolate of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 212(3), 817–826. <https://doi.org/10.1002/JCP.21080>
- Balestrino, R., & Schapira, A. H. V. (2019). Parkinson disease. *European Journal of Neurology*, 2020, 27–42. <https://doi.org/10.1111/ene.14108>
- Barnabé, G. F., Schwindt, T. T., Calcagnotto, M. E., Motta, F. L., Martinez Jr, G., de Oliveira, A. C., ... & 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(4), e5222.
- Baser, A., Skabkin, M., & Martin-Villalba, A. (2017). Neural Stem Cell Activation and the Role of Protein Synthesis. *Brain Plasticity*, 3, 27–41. <https://doi.org/10.3233/BPL-160038>
- Berg, J., Roch, M., Altschüler, J., Winter, C., Schwerk, A., Kurtz, A., & Steiner, B. (2015). Human adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Improve Motor Functions and are Neuroprotective in the 6-Hydroxydopamine-Rat Model for Parkinson's Disease when Cultured in Monolayer Cultures but Suppress Hippocampal Neurogenesis and Hippocampal Memory Functi. *Stem Cell Reviews and Reports*, 11(1), 133–149. <https://doi.org/10.1007/s12015-014-9551-y>
- Bernardo, M. E., & Fibbe, W. E. (2013). Cell Stem Cell Review Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell*, 13(4), 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.006>
- Bilic, J., & Belmonte, J. C. I. (2012). Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cells Versus Embryonic Stem Cells: Close Enough or Yet Too Far Apart? *STEM CELLS*,

30(1), 33–41. <https://doi.org/10.1002/stem.700>

Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Redl, H., Rubin, J. P., Yoshimura, K., & Gimble, J. M. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, *15*(6), 641–648.

<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>

Carrascal, L., Gorton, E., Pardillo-Díaz, R., Perez-García, P., Gómez-Oliva, R., Castro, C., & Nunez-Abades, P. (2020). Age-Dependent Vulnerability to Oxidative Stress of Postnatal Rat Pyramidal Motor Cortex Neurons. *Antioxidants*, *9*(12), 1307.

<https://doi.org/10.3390/antiox9121307>

Castaño, A., Herrera, A. J., Cano, J., & Machado, A. (2002). The degenerative effect of a single intranigral injection of LPS on the dopaminergic system is prevented by dexamethasone, and not mimicked by rh-TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$  IFN- $\gamma$ . *Journal of Neurochemistry*, *81*(1), 150–157. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2002.00799.X>

Cavallaro, M., Mariani, J., Lancini, C., Latorre, E., Caccia, R., Gullo, F., Valotta, M., DeBiasi, S., Spinardi, L., Ronchi, A., Wanke, E., Brunelli, S., Favaro, R., Ottolenghi, S., & Nicolis, S. K. (2008). Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic Sox2 mutants. *Development*, *135*(3), 541–557.

<https://doi.org/10.1242/DEV.010801>

Ceccarelli, S., Pontecorvi, P., Anastasiadou, E., Napoli, C., & Marchese, C. (2020). Immunomodulatory Effect of Adipose-Derived Stem Cells: The Cutting Edge of Clinical Application. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 236.

<https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.00236>

Chen, H., Liu, X., Chen, H., Cao, J., Zhang, L., Hu, X., & Wang, J. (2014). Role of SIRT1 and AMPK in mesenchymal stem cells differentiation. *Ageing research reviews*, *13*, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.12.002>

- Chen, Xiaodong, Wang, S., & Cao, W. (2018). Mesenchymal stem cell-mediated immunomodulation in cell therapy of neurodegenerative diseases. *Cellular Immunology*, 326, 8–14. <https://doi.org/10.1016/J.CELLIMM.2017.06.006>
- Chen, Xiaosong, Yan, L., Guo, Z., Chen, Z., Chen, Y., Li, M., Huang, C., Zhang, X., & Chen, L. (2016). Adipose-derived mesenchymal stem cells promote the survival of fat grafts via crosstalk between the Nrf2 and TLR4 pathways. Official journal of the Cell Death Differentiation Association. *Citation: Cell Death and Disease*, 7. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.261>
- Cheng, Y., Lin, K.-H., Young, T.-H., & Cheng, N.-C. (2020). The influence of fibroblast growth factor 2 on the senescence of human adipose-derived mesenchymal stem cells during long-term culture. *STEM CELLS Translational Medicine*, 9(4), 518–530. <https://doi.org/10.1002/SCTM.19-0234>
- Clevers, H. (2015). What is an adult stem cell? *Science*, 350(6266), 1319–1320. <https://doi.org/10.1126/science.aad7016>
- Covacu, R., Arvidsson, L., Andersson, A., Khademi, M., Erlandsson-Harris, H., Harris, R. A., Svensson, M. A., Olsson, T., & Brundin, L. (2009). TLR Activation Induces TNF- $\alpha$  Production from Adult Neural Stem/Progenitor Cells. *The Journal of Immunology*, 182(11), 6889–6895. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0802907>
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C. W., Corselli, M., Park, T. S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P. N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B. M., Badyrak, S., Buhring, H. J., Giacobino, J. P., Lazzari, L., ... Péault, B. (2008). A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell*, 3(3), 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.003>
- 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(11), 2204–2213. <https://doi.org/10.1242/jcs.02932>
- Darvishi, M., Tiraihi, T., Mesbah-Namin, S. A., Delshad, A. R., & Taheri, T. (2017). Motor Neuron Transdifferentiation of Neural Stem Cell from Adipose-Derived Stem Cell Characterized by Differential Gene Expression. *Cellular and Molecular*

- Neurobiology*, 37(2), 275–289. <https://doi.org/10.1007/S10571-016-0368-X/FIGURES/7>
- Davies, O. G., Cooper, P. R., Shelton, R. M., Smith, A. J., & Scheven, B. A. (2015). Isolation of adipose and bone marrow mesenchymal stem cells using CD29 and CD90 modifies their capacity for osteogenic and adipogenic differentiation. *Journal of Tissue Engineering*, 6. <https://doi.org/10.1177/2041731415592356>
- De Filippis, L., & Peri, F. (2021). The Role of TLR4 in Neural Stem Cells–Mediated Neurogenesis and Neuroinflammation. *Progress in Inflammation Research*, 87, 129–141. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-56319-6\\_9/FIGURES/1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-56319-6_9/FIGURES/1)
- De Pablos, R. M., Espinosa-Oliva, A. M., & Herrera, A. J. (2013). Immunohistochemical detection of microglia. *Methods in Molecular Biology*, 1041, 281–289. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-520-0\\_24/FIGURES/00244](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-520-0_24/FIGURES/00244)
- Denu, R. A., & Hematti, P. (2016). Effects of Oxidative Stress on Mesenchymal Stem Cell Biology. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2016/2989076>
- Deumens, R., Blokland, A., & Prickaerts, J. (2002). Modeling Parkinson’s disease in rats: An evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Experimental Neurology*, 175(2), 303–317. <https://doi.org/10.1006/EXNR.2002.7891>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Dulak, J., Szade, K., Szade, A., Nowak, W., & Józkwicz, A. (2015). Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochimica Polonica*, 62(3), 329–337. [https://doi.org/10.18388/abp.2015\\_1023](https://doi.org/10.18388/abp.2015_1023)
- Faustini, M., Bucco, M., Chlapanidas, T., Lucconi, G., Marazzi, M., Tosca, M. C., Gaetani, P., Klinger, M., Villani, S., Ferretti, V. V., Vigo, D., & Torre, M. L. (2010). Nonexpanded mesenchymal stem cells for regenerative medicine: Yield in stromal

- vascular fraction from adipose tissues. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 16(6), 1515–1521. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2010.0214>
- Fernandes, M., Valente, S. G., Sabongi, R. G., Dos Santos, J. B. G., Leite, V. M., Ulrich, H., Nery, A. A., & Da Silva Fernandes, M. J. (2018). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *Neural Regeneration Research*, 13(1), 100–104. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.224378>
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. In *Nature*. 408(6809), 239–247. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/35041687>
- Flores-Martinez, Y. M., Fernandez-Parrilla, M. A., Ayala-Davila, J., Reyes-Corona, D., Blanco-Alvarez, V. M., Soto-Rojas, L. O., ... & Martinez-Fong, D. (2018). Acute neuroinflammatory response in the substantia nigra pars compacta of rats after a local injection of lipopolysaccharide. *Journal of Immunology Research*, 2018.
- Fong, H., Hohenstein, K. A., & Donovan, P. J. (2008). Regulation of Self-Renewal and Pluripotency by Sox2 in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 26(8), 1931–1938. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1002>
- Frijhoff, J., Winyard, P. G., Zarkovic, N., Davies, S. S., Stocker, R., Cheng, D., Knight, A. R., Taylor, E. L., Oettrich, J., Ruskovska, T., Gasparovic, A. C., Cuadrado, A., Weber, D., Poulsen, H. E., Grune, T., Schmidt, H. H. H. W., & Ghezzi, P. (2015). Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. In *Antioxidants and Redox Signaling* 23(14), 1144–1170. Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6317>
- Galderisi, U., & Giordano, A. (2014). The Gap Between the Physiological and Therapeutic Roles of Mesenchymal Stem Cells. *Medicinal Research Reviews*, 34(5), 1100–1126. <https://doi.org/10.1002/med.21322>
- Garcia-Contreras, M., & Thakor, A. S. (2021). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and their extracellular vesicles modulate lipopolysaccharide activated human microglia. *Cell Death Discovery*, 7, 98. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00471-7>



- Gugliandolo, A., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2017). Mesenchymal stem cell therapy in Parkinson's disease animal models. *Current Research in Translational Medicine*, 65(2), 51–60. <https://doi.org/10.1016/J.RETRAM.2016.10.007>
- Han, S.-M., Han, S.-H., Coh, Y.-R., Jang, G., Ra, J. C., Kang, S.-K., Lee, H.-W., & Youn, H.-Y. (2014). Enhanced proliferation and differentiation of Oct4- and Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 46, 101. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.28>
- Havens, A. M., Sun, H., Shiozawa, Y., Jung, Y., Wang, J., Mishra, A., Jiang, Y., O'Neill, D. W., Krebsbach, P. H., Rodgers, D. O., & Taichman, R. S. (2014). Human and murine very small embryonic-like cells represent multipotent tissue progenitors, in vitro and in vivo. *Stem Cells and Development*, 23(7), 689–701. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0362>
- Hellmann, M. A., Panet, H., Barhum, Y., Melamed, E., & Offen, D. (2006). Increased survival and migration of engrafted mesenchymal bone marrow stem cells in 6-hydroxydopamine-lesioned rodents. *Neuroscience Letters*, 395(2), 124–128. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2005.10.097>
- Heneidi, S., Simerman, A. A., Keller, E., Singh, P., Li, X., Dumesic, D. A., & Chazenbalk, G. (2013). Awakened by Cellular Stress: Isolation and Characterization of a Novel Population of Pluripotent Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue. *PLOS ONE*, 8(6), e64752. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0064752>
- Heo, J. S., Choi, S. M., Kim, H. O., Kim, E. H., You, J., Park, T., Kim, E., & Kim, H. S. (2013). Neural transdifferentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on hydrophobic polymer-modified surface and therapeutic effects in an animal model of ischemic stroke. *Neuroscience*, 238, 305–318. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.011>
- Herrera, A. J., Castaño, A., Venero, J. L., Cano, J., & Machado, A. (2000). The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiology of Disease*, 7(4), 429–447. <https://doi.org/10.1006/NBDI.2000.0289>

- Hiroki Tsukamoto, X., Takeuchi, S., Kubota, K., Kobayashi, Y., Kozakai, S., Ukai, I., Shichiku, A., Okubo, M., Numasaki, M., Kanemitsu, Y., Matsumoto, Y., Nochi, T., Watanabe, K., Aso, H., & Tomioka, Y. (2018). Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein stimulates CD14-dependent Toll-like receptor 4 internalization and LPS-induced TBK1-IKK-IRF3 axis activation. *Journal of Biological Chemistry*, *293*, 10186–10201. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.796631>
- Hisahara, S., Chiba, S., Matsumoto, H., Tanno, M., Yagi, H., Shimohama, S., Sato, M., & Horio, Y. (2008). Histone deacetylase SIRT1 modulates neuronal differentiation by its nuclear translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(40), 15599–15604. [www.pnas.org/cgi/content/full/1054015599](http://www.pnas.org/cgi/content/full/1054015599)
- Jaenisch, R., & Young, R. (2008). Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. In *Cell*. *132*(4), 567–582. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.015>
- Ji, W., Zhang, X., Ji, L., Wang, K., & Qiu, Y. (2015). Effects of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on the neuronal differentiation of rat adipose-derived stem cells. *Molecular Medicine Reports*, *12*(4), 4981. <https://doi.org/10.3892/MMR.2015.4099>
- Jo, C. H., Chai, J. W., Jeong, E. C., Oh, S., Shin, J. S., Shim, H., & Yoon, K. S. (2017). Intra-articular Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A 2-Year Follow-up Study. *American Journal of Sports Medicine*, *45*(12), 2774–2783. <https://doi.org/10.1177/0363546517716641>
- Jurkowski, M. P., Bettio, L., K. Woo, E., Patten, A., Yau, S. Y., & Gil-Mohapel, J. (2020). Beyond the Hippocampus and the SVZ: Adult Neurogenesis Throughout the Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*, 576444. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2020.576444/BIBTEX>
- Kolf, C. M., Cho, E., & Tuan, R. S. (2007). Mesenchymal stromal cells: Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy* *2007* *9*:1, *9*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/AR2116>

- Kretsovali, A. (2017). Dissecting the Role of Sox2 in Stemness Regulation and Regenerative Medicine. *Journal of Stem Cell Research and Transplantation*, 4(1). <https://doi.org/10.26420/JSTEMCELLRESTRANSPLANT.2017.1026>
- Kuo, T. K., Hung, S. P., Chuang, C. H., Chen, C. T., Shih, Y. R. V., Fang, S. C. Y., Yang, V. W., & Lee, O. K. (2008). Stem Cell Therapy for Liver Disease: Parameters Governing the Success of Using Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Gastroenterology*, 134(7), 2111-2121.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.015>
- Kurte, M., Vega-Letter, A. M., Luz-Crawford, P., Djouad, F., Noël, D., Khoury, M., & Carrión, F. (2020). Time-dependent LPS exposure commands MSC immunoplasticity through TLR4 activation leading to opposite therapeutic outcome in EAE. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/S13287-020-01840-2>
- Lang, A. E., & Espay, A. J. (2018). Disease Modification in Parkinson's Disease: Current Approaches, Challenges, and Future Considerations. *Movement Disorders*, 33(5), 660–677. <https://doi.org/10.1002/MDS.27360>
- Leppik, L., Sielatycka, K., Henrich, D., Han, Z., Wang, H., Eischen-Loges, M. J., Oliveira, K. M. C., Bhavsar, M. B., Ratajczak, M. Z., & Barker, J. H. (2020). Role of Adult Tissue-Derived Pluripotent Stem Cells in Bone Regeneration. *Stem Cell Reviews and Reports*, 16(1), 198–211. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09943-x>
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. In *Clinical Interventions in Aging*. 13, 757–772. Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
- Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. In *Nature* 443(7113), 787–795. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature05292>
- Lin, S.-Z., Chan, T.-M., Yi-Ru Chen, J., Ho, L.-I., Lin, H.-P., Hsueh, K.-W., David Liu, D., Chen, Y.-H., Hsieh, A.-C., Tsai, N.-M., Hueng, D.-Y., Tsai, S.-T., Chou, P.-W., & Harn,

- H.-J. (2014). ADSC Therapy in Neurodegenerative Disorders. *Cell Transplantation*, 23, 549–557. <https://doi.org/10.3727/096368914X678445>
- Liu, J., Song, L., Jiang, C., Liu, Y., George, J., Ye, H., & Cui, Z. (2012). Electrophysiological properties and synaptic function of mesenchymal stem cells during neurogenic differentiation - a mini-review. *International Journal of Artificial Organs*, 35(5), 323–337. <https://doi.org/10.5301/IJAO.5000085>
- Liu, M., & Bing, G. (2011). *Lipopolysaccharide Animal Models for Parkinson's Disease*. 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/327089>
- Lombardo, E., DelaRosa, O., Mancheno-Corvo, P., Menta, R., Ramirez, C., & Büscher, D. (2009). Toll-like receptor–mediated signaling in human adipose-derived stem cells: implications for immunogenicity and immunosuppressive potential. *Tissue Engineering Part A*, 15(7), 1579–1589. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEA.2008.0340>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.05.039>
- Lou, S., Duan, Y., Nie, H., Cui, X., Du, J., & Yao, Y. (2021). Mesenchymal stem cells: Biological characteristics and application in disease therapy. *Biochimie*, 185, 9–21. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2021.03.003>
- Luo, L., Hu, D. H., Yin, J. Q., & Xu, R. X. (2018). Molecular mechanisms of transdifferentiation of adipose-derived stem cells into neural cells: Current status and perspectives. In *Stem Cells International 2018*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/5630802>
- Ma, C. Y., Yao, M. J., Zhai, Q. W., Jiao, J. W., Yuan, X. B., & Poo, M. M. (2014). SIRT1 suppresses self-renewal of adult hippocampal neural stem cells. *Development*, 141(24), 4697–4709.
- Marei, H. E. S., El-Gamal, A., Althani, A., Afifi, N., Abd-Elmaksoud, A., Farag, A., Cenciarelli, C., Thomas, C., & Anwarul, H. (2018). Cholinergic and dopaminergic neuronal differentiation of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 233(2), 936–945. <https://doi.org/10.1002/JCP.25937>

- McCoy, M. K., Martinez, T. N., Ruhn, K. A., Wrage, P. C., Keefer, E. W., Botterman, B. R., Tansey, K. E., & Tansey, M. G. (2008). Autologous transplants of Adipose-Derived Adult Stromal (ADAS) cells afford dopaminergic neuroprotection in a model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, *210*(1), 14–29.  
<https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2007.10.011>
- Mckernan, K., Varghese, M., Patel, R., & Singer, K. (2020). Role of TLR4 in the induction of inflammatory changes in adipocytes and macrophages. *Adipocyte*, *9*.  
<https://doi.org/10.1080/21623945.2020.1760674>
- Meredith, G. E., & Rademacher, D. J. (2011). MPTP Mouse Models of Parkinson's Disease: An Update. *Journal of Parkinson's Disease*, *1*, 19–33.  
<https://doi.org/10.3233/JPD-2011-11023>
- Mollinari, C., Zhao, J., Lupacchini, L., Garaci, E., Merlo, D., & Pei, G. (2018). Transdifferentiation: a new promise for neurodegenerative diseases. In *Cell Death and Disease* *9*(8), 1–9. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0891-4>
- Morris, R. J., Liu, Y., Marles, L., Yang, Z., Trempus, C., Li, S., Lin, J. S., Sawicki, J. A., & Cotsarelis, G. (2004). Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nature Biotechnology*, *22*(4), 411–417. <https://doi.org/10.1038/nbt950>
- Mundra, V., Gerling, I. C., & Mahato, R. I. (2013). Mesenchymal stem cell-based therapy. *Molecular pharmaceuticals*, *10*(1), 77-89.
- Muñoz, M. F., Argüelles, S., Guzman-Chozas, M., Guillén-Sanz, R., Franco, J. M., Pintor-Toro, J. A., Cano, M., & Ayala, A. (2018). Cell tracking, survival, and differentiation capacity of adipose-derived stem cells after engraftment in rat tissue. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(10), 6317–6328. <https://doi.org/10.1002/jcp.26439>
- Muñoz, M. F., Argüelles, S., Marotta, F., Barbagallo, M., Cano, M., & Ayala, A. (2020). Effect of age and lipoperoxidation in rat and human adipose tissue-derived stem cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2020*, 1-20.
- Muñoz, M. F., Argüelles, S., Medina, R., Cano, M., & Ayala, A. (2019). Adipose-derived stem cells decreased microglia activation and protected dopaminergic loss in rat

- lipopolysaccharide model. *Journal of Cellular Physiology*, 234(8), 13762–13772.  
<https://doi.org/10.1002/jcp.28055>
- Najar, M., Krayem, M., Meuleman, N., Bron, D., & Lagneaux, L. (2017). Mesenchymal Stromal Cells and Toll-Like Receptor Priming: A Critical Review. *Immune Network*, 17(2), 89. <https://doi.org/10.4110/IN.2017.17.2.89>
- Novak, D., Hüser, L., Elton, J. J., Umansky, V., Altevogt, P., & Utikal, J. (2020). SOX2 in development and cancer biology. *Seminars in Cancer Biology*, 67, 74–82.  
<https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2019.08.007>
- Omole, A. E., & Fakoya, A. O. J. (2018). Ten years of progress and promise of induced pluripotent stem cells: historical origins, characteristics, mechanisms, limitations, and potential applications. *PeerJ*, 6(MAY), e4370.  
<https://doi.org/10.7717/PEERJ.4370>
- Orozco, L., Munar, A., Soler, R., Alberca, M., Soler, F., Huguet, M., Sentís, J., Sánchez, A., & García-Sancho, J. (2014). Treatment of Knee Osteoarthritis With Autologous Mesenchymal Stem Cells. *Transplantation*, 97(11), e66–e68.  
<https://doi.org/10.1097/TP.000000000000167>
- Park, D., Xiang, A. P., Mao, F. F., Zhang, L., Di, C. G., Liu, X. M., Shao, Y., Ma, B. F., Lee, J. H., Ha, K. S., Walton, N., & Lahn, B. T. (2010). Nestin Is Required for the Proper Self-Renewal of Neural Stem Cells. *Stem Cells*, 28(12), 2162–2171.  
<https://doi.org/10.1002/STEM.541>
- Park, S., Seo, K., So, A., Seo, M., Yu, K., Kang, S., & Kang, K. (2012). SOX2 has a crucial role in the lineage determination and proliferation of mesenchymal stem cells through Dickkopf-1 and c-MYC. *Cell Death and Differentiation*, 19, 534–545.  
<https://doi.org/10.1038/cdd.2011.137>
- Peng, C., Lu, L., Li, Y., & Hu, J. (2019). Neurospheres Induced from Human Adipose-Derived Stem Cells as a New Source of Neural Progenitor Cells. *Cell Transplantation*, 28(1\_suppl), 66S-75S.  
[https://doi.org/10.1177/0963689719888619/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\\_0963689719888619-FIG2.JPEG](https://doi.org/10.1177/0963689719888619/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0963689719888619-FIG2.JPEG)

- Petersen, E. D., Zenchak, J. R., Lossia, O. V., & Hochgeschwender, U. (2018). Neural stem cells derived directly from adipose tissue. *Stem Cells and Development*, 27(9), 637–647. <https://doi.org/10.1089/scd.2017.0195>
- Pevsner-Fischer, M., Morad, V., Cohen-Sfady, M., Rousso-Noori, L., Zanin-Zhorov, A., Cohen, S., Cohen, I. R., & Zipori, D. (2007). Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*, 109(4), 1422–1432. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2006-06-028704>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2017*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Pourova, J., Kottova, M., Voprsalova, M., & Pour, M. (2010). Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. In *Acta Physiologica* 198(1), 15–35. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.02039.x>
- Qin, Y., Zhou, C., Wang, N., Yang, H., & Gao, W.-Q. (2015). Conversion of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells to Neural Stem Cell-Like Cells by a Single Transcription Factor, Sox2. *Cellular Reprogramming*, 17(3), 221–226. <https://doi.org/10.1089/cell.2015.0001>
- Robinton, D. A., & Daley, G. Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. In *Nature* 481(7381), 295–305. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1038/nature10761>
- Rolls, A., Shechter, R., London, A., Ziv, Y., Ronen, A., Levy, R., & Schwartz, M. (2007). Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nature Cell Biology*, 9(9), 1081–1088. <https://doi.org/10.1038/NCB1629>
- Schwerk, A., Altschüler, J., Roch, M., Gossen, M., Winter, C., Berg, J., Kurtz, A., Akyüz, L., & Steiner, B. (2015). Adipose-derived human mesenchymal stem cells induce long-term neurogenic and anti-inflammatory effects and improve cognitive but not motor performance in a rat model of Parkinson's disease. *Regenerative Medicine*, 10(4), 431–446. <https://doi.org/10.2217/RME.15.17>

- Shirjang, S., Mansoori, B., Solali, S., Hagh, M. F., & Shamsasenjan, K. (2017). Toll-like receptors as a key regulator of mesenchymal stem cell function: An up-to-date review. *Cellular Immunology*, *315*, 1–10.  
<https://doi.org/10.1016/J.CELLIMM.2016.12.005>
- Skubis, A., Gola, J., Sikora, B., Hybiak, J., Paul-Samojedny, M., Mazurek, U., & Łos, M. J. (2017). Impact of antibiotics on the proliferation and differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(12), 2522. <https://doi.org/10.3390/IJMS18122522>
- Soares, M. B. P., Gonçalves, R. G. J., Vasques, J. F., da Silva-Junior, A. J., Gubert, F., Santos, G. C., de Santana, T. A., Almeida Sampaio, G. L., Silva, D. N., Dominici, M., & Mendez-Otero, R. (2022). Current Status of Mesenchymal Stem/Stromal Cells for Treatment of Neurological Diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *15*, 277. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2022.883378/BIBTEX>
- Sobhani, A., Sobhani, A., Khanlarkhani, N., Baazm, M., Mohammadzadeh, F., Najafi, A., Mehdinejadani, S., & Aval, F. S. (2017). Multipotent Stem Cell and Current Application. In *Acta Med Iran* *55*(1).  
<https://acta.tums.ac.ir/index.php/acta/article/view/4962>
- Squillaro, T., Peluso, G., & Galderisi, U. (2016). Clinical trials with mesenchymal stem cells: An update. In *Cell Transplantation* *25*(5), 829–848. Cognizant Communication Corporation. <https://doi.org/10.3727/096368915X689622>
- Staff, N. P., Jones, D. T., & Singer, W. (2019). Mesenchymal Stromal Cell Therapies for Neurodegenerative Diseases. *Mayo Clinic Proceedings*, *94*(5), 892–905.  
<https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.001>
- Suk Yoon, D., Choi, Y., Jang, Y., Lee, M., Jin Choi, W., Kim, S., & Woo Lee, J. (2014). SIRT1 Directly Regulates SOX2 to Maintain Self-Renewal and Multipotency in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS*, *32*, 3219–3231.  
<https://doi.org/10.1002/stem.1811>
- Suszynska, M., Zuba-Surma, E. K., Maj, M., Mierzejewska, K., Ratajczak, J., Kucia, M., & Ratajczak, M. Z. (2014). The proper criteria for identification and sorting of very



- small embryonic-like stem cells, and some nomenclature issues. *Stem Cells and Development*, 23(7), 702–713. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0472>
- Suzuki, S., Namiki, J., Shibata, S., Mastuzaki, Y., & Okano, H. (2010). The Neural Stem/Progenitor Cell Marker Nestin Is Expressed in Proliferative Endothelial Cells, but Not in Mature Vasculature. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 58(8), 721–730. <https://doi.org/10.1369/jhc.2010.955609>
- Taha, E., Patil, S., Barrera, I., Panov, J., Khamaisy, M., Proud, C. G., Bramham, C. R., & Rosenblum, K. (2020). eEF2/eEF2K Pathway in the Mature Dentate Gyrus Determines Neurogenesis Level and Cognition. *Current Biology*, 30(18), 3507–3521.e7. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2020.06.061>
- Trounson, A., & McDonald, C. (2015). Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. In *Cell Stem Cell* 17(1), 11–22. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.06.007>
- Ullah, I., Subbarao, R. B., Kim, E. J., Bharti, D., Jang, S. J., Park, J. S., Shivakumar, S. B., Lee, S. L., Kang, D., Byun, J. H., Park, B. W., & Rho, G. J. (2016). In vitro comparative analysis of human dental stem cells from a single donor and its neuronal differentiation potential evaluated by electrophysiology. *Life Sciences*, 154, 39–51. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2016.04.026>
- Vaure, C., & Liu, Y. (2014). A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Frontiers in Immunology*, 5(JUL). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00316>
- Vigo, T., Rocca, C. La, Faicchia, D., Procaccini, C., Ruggieri, M., Salvetti, M., Centonze, D., Matarese, G., & Uccelli, A. (2019). IFN $\beta$  enhances mesenchymal stromal (Stem) cells immunomodulatory function through STAT1-3 activation and mTOR-associated promotion of glucose metabolism. *Cell Death and Disease*, 10, 85. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1336-4>
- Viña, J., Borras, C., Abdelaziz, K. M., Garcia-Valles, R., & Gomez-Cabrera, M. C. (2013). The Free Radical Theory of Aging Revisited: The Cell Signaling Disruption Theory of Aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(8), 779–787.

<https://doi.org/10.1089/ars.2012.5111>

Visvader, J. E., & Clevers, H. (2016). Tissue-specific designs of stem cell hierarchies. In *Nature Cell Biology* 18(4), 349–355. Nature Publishing Group.

<https://doi.org/10.1038/ncb3332>

Vono, R., Garcia, E. J., Spinetti, G., & Madeddu, P. (2018). Oxidative Stress in Mesenchymal Stem Cell Senescence: Regulation by Coding and Noncoding RNAs. *Antioxidants & Redox Signaling*, 29(9), 864–879.

<https://doi.org/10.1089/ars.2017.7294>

Wang, Z. jun, Zhang, F. min, Wang, L. sheng, Yao, Y. wei, Zhao, Q., & Gao, X. (2009). Lipopolysaccharides can protect mesenchymal stem cells (MSCs) from oxidative stress-induced apoptosis and enhance proliferation of MSCs via Toll-like receptor(TLR)-4 and PI3K/Akt. *Cell Biology International*, 33(6), 665–674.

<https://doi.org/10.1016/J.CELLBI.2009.03.006>

Waterman, R. S., Tomchuck, S. L., Henkle, S. L., & Betancourt, A. M. (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS ONE*, 5(4).

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0010088>

Wislet-Gendebien, S., Wautier, F., Leprince, P., & Rogister, B. (2005). Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin. *Brain Research Bulletin*, 68(1–2), 95–102. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2005.08.016>

Xu, Y., Liu, Z., Liu, L., Zhao, C., Xiong, F., Zhou, C., Li, Y., Shan, Y., Peng, F., & Zhang, C. (2008). Neurospheres from rat adipose-derived stem cells could be induced into functional Schwann cell-like cells in vitro. *BMC Neuroscience*, 9(1), 1–10.

<https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-21/FIGURES/6>

Yamamoto, N., Akamatsu, H., Hasegawa, S., Yamada, T., Nakata, S., Ohkuma, M., Miyachi, E. I., Marunouchi, T., & Matsunaga, K. (2007). Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. *Journal of Dermatological Science*, 48(1), 43–52. <https://doi.org/10.1016/J.JDERMSCI.2007.05.015>

Yao, H., & Rahman, I. (2012). Perspectives on translational and therapeutic aspects of

- SIRT1 in inflammaging and senescence. *Biochemical Pharmacology*, 84(10), 1332–1339. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2012.06.031>
- Yoshimura, H., Muneta, T., Nimura, A., Yokoyama, A., Koga, H., & Sekiya, I. (2007). Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell and Tissue Research*, 327(3), 449–462. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0308-z>
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), 1917–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1151526>
- Zaragosi, L.-E., Ailhaud, G., & Dani, C. (2006). Autocrine Fibroblast Growth Factor 2 Signaling Is Critical for Self-Renewal of Human Multipotent Adipose-Derived Stem Cells. *STEM CELLS*, 24(11), 2412–2419. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2006-0006>
- Zhang, H. T., Liu, Z. L., Yao, X. Q., Yang, Z. J., & Xu, R. X. (2012). Neural differentiation ability of mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue: A comparative study. *Cytotherapy*, 14(10), 1203–1214. <https://doi.org/10.3109/14653249.2012.711470>
- Zhang, Q., Wu, H. H., Wang, Y., Gu, G. J., Zhang, W., & Xia, R. (2016). Neural stem cell transplantation decreases neuroinflammation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 136(4), 815–825. <https://doi.org/10.1111/JNC.13413>
- Zhang, S., & Cui, W. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World Journal of Stem Cells*, 6(3), 305. <https://doi.org/10.4252/WJSC.V6.I3.305>
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., & Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279–4295. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-02-0105>

