RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

Cardozo, Alejandra Johana

Mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación neuronal de células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:
Cardozo, A. J. (2015). Mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación neuronal de células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/156

Puede encontrar éste y otros documentos en: https://ridaa.unq.edu.ar

Universidad
Nacional
de Quilmes
Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Cardozo, Alejandra Johana, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
diciembre de 2013, pp. 114,
http://ridaa.demo.unq.edu.ar/,
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencias Básicas y Aplicadas

Mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación neuronal de células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo

Molecular mechanisms involved in neuronal differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells

TESIS DOCTORAL

Alejandra Johana Cardozo

johana.cardozo@gmail.com

Resumen
Como el sistema nervioso tiene una capacidad limitada de autorreparación, y la neurogénesis en el adulto está restringida a ciertas regiones del cerebro, existe un gran interés en la posibilidad de reparar el sistema nervioso a través de la utilización de técnicas de medicina regenerativa y trasplante celular. Una opción es el trasplante de células madre (*stem cells)* que puedan reemplazar aquellas neuronas perdidas a través del daño o la enfermedad. Numerosos laboratorios, incluido el nuestro, han logrado *transdiferenciar* fenotípicamente células madre mesenquimales en células de estirpe neural. Basándonos en la hipótesis de que existe un paralelismo entre los procesos de neurogénesis y la diferenciación neuronal de células madre mesenquimales, se plantea que las cascadas de señalización involucradas en la neurogénesis del adulto podrían ser equivalentes a las que actúan en el proceso de diferenciación neuronal, en el cual a partir de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo se obtienen células de fenotipo neural. Existen diversos factores de transcripción que intervienen en la proliferación y diferenciación neuronal y que aún no han sido estudiados en la diferenciación neuronal de células madre mesenquimales. Algunos de ellos son factores de transcripción proneurales y neuronales, o de especificación y otros, intervienen en las cascadas de señalización de: Sonic hedgehog (Shh), Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMPs), Notch y Wingless/Int (Wnt). El objetivo de este trabajo es estudiar la expresión diferencial de genes involucrados en las cascadas de señalización intracelular de Shh, BMP, Wnt y Notch, como así también la de genes de especificación u homeóticos, proneurales y neuronales, en relación a su participación en el proceso de diferenciación neuronal a partir de células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo.
Palabras clave: Células madre, diferenciación neuronal, genes proneurales, neurogénesis, factores de transcripción.

Abstract
The nervous system has limited self-renewal ability and adult neurogenesis is restricted to few brain zones. For this reason, there is a great interest into the possibility to repair the nervous system using regenerative medicine techniques and cell transplantation. A promising alternative is the use of stem cells to replace the neurons lost during injury and disease. Previous reports have described the phenotypic *transdifferentiation* of mesenchymal stem cells into neural-like cells. Based on the hypothesis that a parallelism between adult neurogenesis and the neuronal differentiation of mesenchymal stem cells exist, we propose that the signaling pathways involved in adult neurogenesis could be similar to the differentiation process where neural-like cells are obtained from adipose tissue-derived stem cells. Several transcription factors, which take part in proliferation and differentiation, have not been studied in the neuronal differentiation of mesenchymal stem cells yet. Some of them are patterning molecules, proneural and neuronal genes; others are involved in Sonic Hedgehog (Shh), Bone Morphogenic Proteins (BMPs), Notch and Wingless/Int (Wnt) pathways. The aim of this work is to study the differential expression of genes involved in Shh, BMP, Wnt and Notch intracellular signaling pathways, as well as patterning, proneural and neuronal genes during the neuronal differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells.
Keywords: Stem cells, neuronal differentiation, proneural genes, neurogenesis, transcription factors.

LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTE TRABAJO DIERON LUGAR A LAS SIGUIENTES PUBLICACIONES:

- ✓ **"Differential expression of Shh and BMP signaling in the potential conversion of human adipose tissue stem cells into neuron-like cells *in vitro*"**. Alejandra Cardozo, Marcelo Ielpi, Daniel Gómez, Pablo Argibay. *Gene Expression International Journal of Molecular & Cellular Science* ISSN 1052-2166. *Gene Expr. 2010;14(6):307-19.*

- ✓ **"Transcriptional characterization of wnt and notch signaling pathways in neuronal differentiation of human adipose tissue-derived stem cells".** Alejandra Johana Cardozo, Daniel Eduardo Gómez, Pablo Francisco Argibay. *Journal of Molecular Neuroscience* ISSN 0270-6474. *J Mol Neurosci. 2011 Jul; 44(3):186-94.*

- ✓ **"Neurogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: relevance of different signaling molecules, transcription factors, and key marker genes".** Alejandra Johana Cardozo, Daniel Eduardo Gómez, Pablo Francisco Argibay. *Gene* ISSN 0378-1119. *Gene. 2012 Sep 18. pii: S0378-1119(12)01119-5.*

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN

1. Células Madre

    1.1. Células Madre Embrionarias

    1.2. Células Madre Adultas

        1.2.1. Células Madre Mesenquimales

2. Células Madre Mesenquimales de Tejido Adiposo

3. *Stemness*: Patrón de genes comunes a las células madre

    3.1. Factores de Transcripción

        3.1.1. Oct4

        3.1.2. Sox2

        3.1.3. Nanog

    3.2. Morfógenos

        3.2.1. Sonic Hedgehog (Shh)

        3.2.2. Wingless/Int (Wnt)

        3.2.3. Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMPs)

        3.2.4. Notch

4. Neurogénesis Adulta

    4.1. Mecanismos Moleculares

        4.1.1. Pax6

        4.1.2. Factores bHLH

        4.1.3. Neurotransmisores

        4.1.4. Cascadas de Señalización

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

4.1.5. Marcadores Específicos de Neurogénesis

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

1. Objetivos generales

2. Objetivos Específicos

MATERIALES Y MÉTODOS

Donantes

1. Aislamiento de la Fracción Estromal Vascular

2. Cultivo Celular

3. Potencial Multilinaje

   3.1. Diferenciación Adipogénica

   3.2. Diferenciación Osteogénica

   3.3. Diferenciación Condrogénica

4. Diferenciación Neuronal

5. Evaluación de Vesículas Presinápticas: FM1-43

6. Inmunocitoquímica

7. Western Blot

   7.1. Extracción y Cuantificación de Proteínas

   7.2. SDS-PAGE y Transferencia

   7.3. Revelado

8. PCR en Tiempo Real

   8.1. Extracción de ARN y Transcripción Reversa

   8.2. PCR en Tiempo Real Cuantitativa

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

9. Análisis de Datos

RESULTADOS

1. Las hASCs poseen características de células madre mesenquimales

   1.1. Las hASCs se adhieren al plástico, tienen morfología fibroblastoide y se autorrenuevan

   1.2. Las hASCs expresan características inmunofenotípicas de célula madre mesenquimal

   1.3. Las hASCs tienen potencial multilinaje

2. Las hASCs expresan marcadores de células madre embrionarias

3. Las hASCs se diferencian a células de tipo neuronal

   3.1. Las células tipo neuronal tienen una morfología similar a neuronas en cultivo

   3.2. Las células tipo neuronal expresan marcadores neuronales característicos

   3.3. Las células tipo neuronal presentan vesículas presinápticas

4. Los mecanismos moleculares de diferenciación neuronal de hASCs son similares a los de la neurogénesis adulta

   4.1. Shh se encargaría de regulación de la autorrenovación de las hASCs

   4.2. BMP mantendría las hASCs en estado indiferenciado y su antagonista Noggin las comprometería al linaje neuronal

   4.3. La señalización Wnt estaría involucrada en el mantenimiento de la proliferación de las hASCs

   4.4. La vía de Notch mantendría el estado indiferenciado de las hASCs a través de sus genes represores de linaje

   4.5. Factores de especificación y proneurales se expresan luego de la diferenciación neuronal de las hASCs

   4.6. Las células tipo neuronal expresan genes glutamatérgicos y gabaérgicos

DISCUSIÓN

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

1. Obtención de Células Madre Mesenquimales derivadas de Tejido Adiposo
2. Características morfológicas y biológicas del linaje neural en las hASCs sometidas al protocolo de diferenciación neuronal
3. Las vías Shh, BMP, Wnt y Notch se encargan de controlar la proliferación y diferenciación de las hASCs
4. La diferenciación neuronal de las hASCs induce la expresión de genes proneurales, neuronales y de neurotransmisores involucrados en la neurogénesis adulta
5. Modelo de código molecular para la diferenciación neuronal de las hASCs

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

BIBLIOGRAFÍA

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

ABREVIATURAS

Ach: Acetilcolina

ADAs: Células Madre Adultas derivadas de Tejido Adiposo

AdMSCs: Células Madre Mesenquimales de Tejido Adiposo

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ADSCs: Células Madre derivadas de Tejido Adiposo

AMPA: Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

APS: Persulfato de amonio

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ASCs: Células Madre/Estromales de Tejido Adiposo

ATB: Antibiótico

bFGF o FGF2: Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2 o básico

BHA: Hidroxianisola butilada

bHLH: Hélice-bucle-hélice básico

BME: ß-mercaptoetanol

BMPs: Proteínas Morfogenéticas Óseas

BO: Bulbo olfatorio

BSA: Albúmina sérica bovina

Comité de Ética y Protocolos de Investigación

CP: Punto de cruce

DAB: Diaminobencidina

DCX: **Dkk1**: Dickkopf-1

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

dNTPs: Deoxi-nucleótidos trifosfato

DO: Densidad óptica

DTT: Ditiotreitol

Dtx1: Deltex1

Dvl: Disheveled

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGCs: Células Madre Embrionarias Germinales

ESCs: Células Madre Embrionarias

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

FM1-43: N-3-triethylammonmpropyl-4-(4(dibutylamino) styryl) pyridinium dibromide

Fzd: Frizzled

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GABAbR1: Subunidad 1 del receptor $GABA_B$

GABAbR2: Subunidad 2 del receptor $GABA_B$

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

GABAR: Receptores GABA

GABRA1: Subunidad α1del receptor $GABA_A$

GABRD: Subunidad δ del receptor $GABA_A$

GD: Giro dentado

GFAP: Proteína acídica fibrilar glial

GLAST: **GliA**: Proteínas Gli activadoras

GliR.: Proteínas Gli represoras

GluK5: Subtipo 5 del receptor glutamatérgico tipo kainato

GSK-3β: Glicógeno sintasa quinasa

HBSS: Solución salina balanceada de Hank

HBSS-CMF: HBSS libre de calcio y magnesio

Herp: Represor relacionado a Hes

Hes: hairy/enhancer of Split

HGF: Factor de Crecimiento de Hepatocitos

HLH: Hélice-bucle-hélice

HMG: Grupo de Alta Movilidad

HRP: Peroxidasa de rábano

HSCs: Células Madre Hematopoyéticas

IBMX: Isobutilmetilxantina

Ids: Inhibidores de diferenciación

IGF1: Factor de Crecimiento tipo Insulina 1

KCC2: Co-transportador K^+/Cl^-

LRP5/6-Axin: Lipoprotein-receptor-related protein 5/6-Axin

M1: Receptor colinérgico muscarínico 1

mAchR: Receptores de acetilcolina muscarínicos

MAP2: P**Mash1**: Mammalian achaete-scute homolog 1

Math: mammalian atonal homolog

MCI: Macizo celular interno

mGluR5: Receptor de glutamato metabotrópico 5

MSCs: Células Madre Mesenquimales

nAchR: Receptores de acetilcolina nicotínicos

NeuN: **NeuroD**: Factor de diferenciación neurogénico

NF200: Neurofilamento 200 KDa

Ngn: Neurogenina

NICD: Dominio intracelular Notch

NKCC1: Co-transportador de Na^+, K^+, $2Cl^-$

NMDA: N-metil-D-aspartato

NR1: Receptor de NMDA 1

NSCs: Células Madre Neurales

Pax6: Pair box 6

PBS: Buffer fosfato salino

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

PGCs: Células Germinales Primordiales.

PLA: Lipoaspirado Procesado

PSA-NCAM: Molécula de adhesión celular neural poli-sialidada

Ptc: Patched

PVDF: Difluoruro de polivinilideno

RA: Ácido retinoico

RMS: Cadena rostro migratoria

RQ-TRAP: Protocolo de Amplificación de Repeticiones Teloméricas Cuantitativa en Tiempo Real

SDS-PAGE: Electroforesis en gel reductor de SDS/poliacrilamida

SFB: Suero fetal bovino

Shh: Sonic Hedgehog

Smo: Smoothened

SNC: Sistema Nervioso Central

SVF: Fracción Estromal Vascular

Tbr: T-box brain

TCF/LEF/Sox: T cell factor/ lymphoid enhancer factor/Sox

TEMED: Tetrametiletilendiamina

TGF-β1: Factor de crecimiento transformante β1

T_m: Temperatura de fusión

TTBS: Tris Buffer Salino con Tween 20

VEGF: Factor de CrecimientoEndotelial Vascular

Wnt: Wingless/Int

ZSG: Zona subgranular

ZSV: Zona subventricular

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

AGRADECIMIENTOS

- ✓ A mi marido Guillermo, mi compañero de la vida, quien me dio y me da fuerzas para alcanzar mis objetivos.
- ✓ A mi hija Luana, que con su llegada al mundo cambio completamente mi vida.
- ✓ A mis padres, que sin su esfuerzo y apoyo, hoy no habría llegado a donde estoy.
- ✓ A mis hermanas, Andre y Romi, que siempre están a mi lado, en las buenas y en las malas.
- ✓ Al Dr. Pablo Argibay, director de mi tesis, quien me dio la oportunidad de empezar mi carrera como investigadora y me dio el apoyo para poder llevar a cabo este trabajo.
- ✓ A todos y cada una de las personas que formaron y forman del ICBME, quienes pusieron su granito de arena para que me pudiera aprender todo lo que se, quienes me ayudaron a pensar claro cuando todo parecía perdido, quienes se encargaban de pedir los reactivos, quienes limpiaban para que pudiera trabajar al otro día.
- ✓ A mis amigas de la vida y del trabajo, Laly, Flor, Lau Pelle, Gaby, que simplemente están cuando las necesito.
- ✓ Y a todos los que fueron parte de estos duros años de formación profesional, que finalmente dieron su fruto.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

INTRODUCCIÓN

1. CÉLULAS MADRE

Las células madre son células únicas que tienen la capacidad de dividirse (autorreplicarse) durante toda la vida de un individuo y que, bajo las condiciones apropiadas o señales correctas del microambiente, puede dar origen (diferenciarse) en al menos un, y a veces, muchos linajes con características y funciones especializadas como miocitos, neuronas o hepatocitos. Estas células están presentes en muchos tejidos adultos y son importantes en mantener la homeostasis celular y en la reparación de tejidos [1,2]. Cuando una célula madre se divide, cada célula nueva tiene el potencial de permanecer como una célula madre (división simétrica), o convertirse en otro tipo celular con nuevas funciones especializadas (división asimétrica) (**Figura 1**) [3].

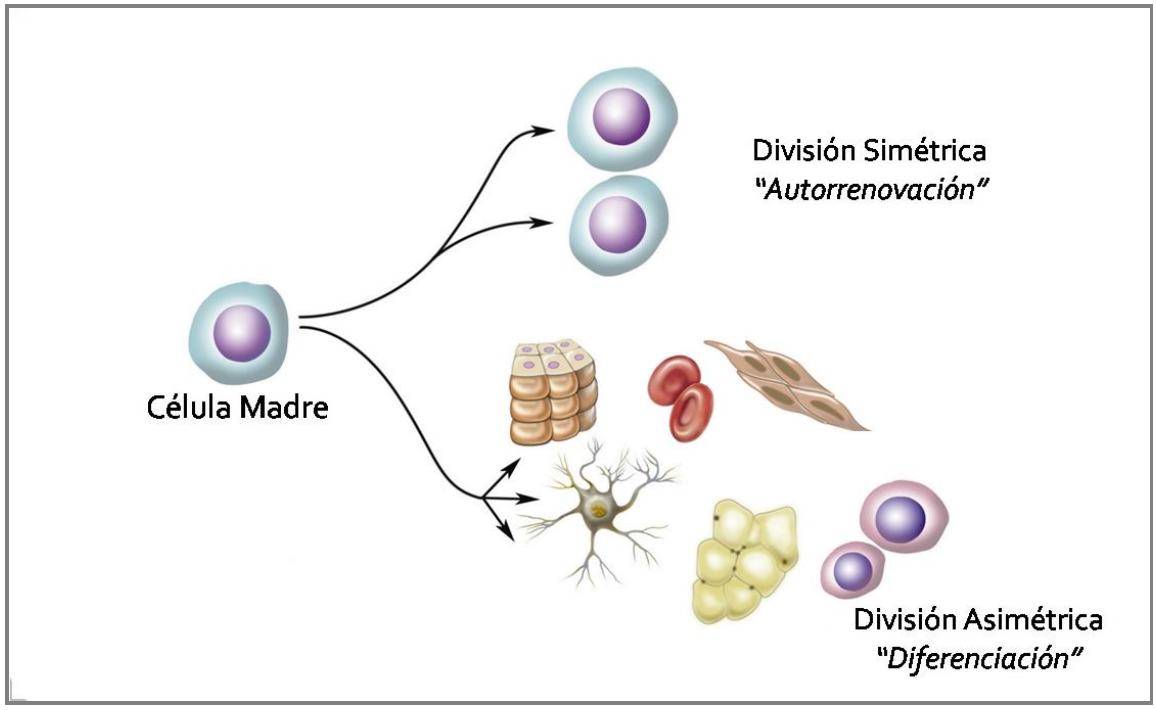


Figura 1. Tipos de división llevadas a cabo por una célula madre. *(Adaptado del folleto "Understanding Stem Cells: An overview of the science and issues from the National Academies" [3])*

Las células madre presentan una serie de características que permiten identificarlas, como ser la expresión de ciertos marcadores en su superficie celular, la expresión de factores transcripcionales, receptores de factores de crecimiento, o la producción de ciertas moléculas. Mientras que hay algunas de ellas que son comunes a distintos tipos de células madre, en

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

general, las células madre de diferentes tejidos poseen características específicas que permiten distinguirlas [4,5].

Muchos de los términos usados para definir una célula madre, obedecen al comportamiento de éstas en diferentes condiciones *in vivo* o *in vitro* [6], de ahí que existan diversas clasificaciones. De acuerdo a la potencialidad, es decir, al tipo de tejido que originan, existen cuatro tipos de células madre: totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes. El término "totipotencial" (del latín *totus*, que significa completo) hace referencia al potencial que tienen estas células de generar un embrión completo (tejido embrionario y extraembrionario), como es el caso del cigoto. "Pluri" (del latín *plures*, que significa muchos o varios) es utilizado para describir las células madre que pueden dar origen a progenitores que forman cualquiera de las tres capas germinales embrionarias: mesodermo, endodermo y ectodermo. Para que una célula madre pueda considerarse como pluripotente tiene que cumplir las siguientes condiciones: en primer lugar, una única célula debe ser capaz de diferenciarse a progenitores especializados procedentes de cualquier capa embrionaria; en segundo lugar, demostrar la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de las células en las que se ha diferenciado, y, finalmente, que se produzca un asentamiento claro y persistente de éstas en el tejido blanco, tanto en presencia como en ausencia de daño en los tejidos en los cuales se injerta. Ejemplos de células madre pluripotenciales son las células madre embrionarias y las células pluripotentes inducidas. La mayoría de los tejidos adultos tienen células madre multipotenciales que son aquellas que pueden dar origen a precursores relacionados solamente con una de las tres capas embrionarias; por ejemplo, células madre que dan origen a tejidos derivados exclusivamente del endodermo como tejido pancreático o pulmonar. Finalmente, la última categoría corresponde a las células madre unipotenciales, que corresponden a las células que sólo pueden generar células hijas que se diferencian a lo largo de una única línea celular, tal como su nombre lo refiere (del latín *unus*: uno) (**Figura 2**). La mayoría de las células madre de un tejido específico que no ha sufrido ningún tipo de agresión o daño son del tipo unipotencial y son las responsables de la fase fisiológica de autorrenovación tisular, donde la cantidad de células perdidas es igual al número de nuevas células. Sin embargo, si el tejido es alterado en su estructura básica a través de un fenómeno lesivo y se requiere de diversos tipos celulares para su reparación, se pueden activar células del tipo multipotencial para reparar el daño [6].

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

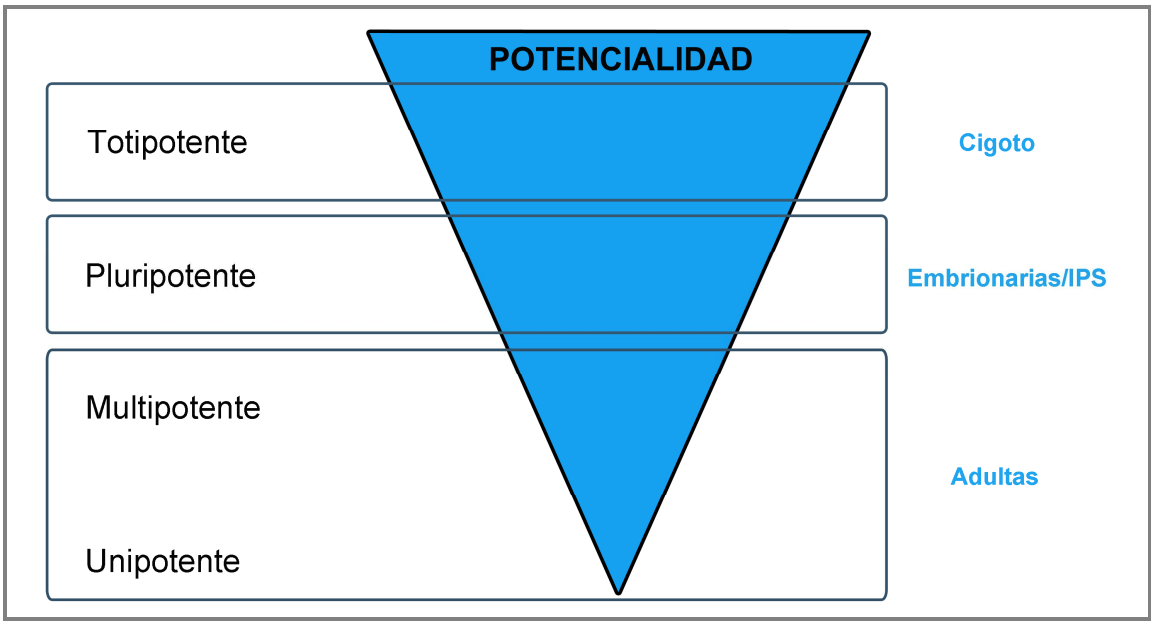


Figura 2. Clasificación de las células madre según su potencialidad.

Si las células madre se clasifican de acuerdo a la fuente a partir de la cual son obtenidas, las mismas pueden proceder básicamente del embrión o de un organismo adulto, de ahí que se hable de células madre embrionarias y de células madre adultas. Pero también existe un tipo intermedio de células que son las células madre de cordón umbilical.

1.1 CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Las células madre embrionarias pueden ser obtenidas a partir de las primeras etapas de formación del embrión, del macizo celular interno (MCI) del blastocisto preimplantatorio (células madre embrionarias, ESCs) [7,8] o de las crestas gonadales del embrión postimplantatorio (células madre embrionarias germinales, EGCs) (**Figura 3**) [9,10]. Ambos tipos de células son capaces de replicarse y dividirse en cultivos por largos períodos de tiempo sin mostrar alteraciones cromosómicas. Además, expresan una serie de marcadores característicos de progenitores pluripotenciales que facilitan su identificación, y se diferencian *in vitro* espontáneamente en estructuras multicelulares conocidas como "cuerpos embrionarios", los cuales contienen elementos de las tres capas germinales a partir de las cuales se pueden forman varios tipos de células como ser cardiomiocitos, neuronas y progenitores hematopoyéticos, entre otros [11,12]. Sin embargo, las células madre embrionarias derivadas del blastocisto y las células germinales difieren del tejido de donde provienen y de su comportamiento *in vivo,* ya que las células madre embrionarias humanas

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

son capaces de generar teratomas cuando son implantadas en ratones inmunocomprometidos mientras que las células germinales humanas no [9,13].

Algunas de las ventajas del uso de células madre embrionarias en investigación es su capacidad de proliferar indefinidamente y de generar una gran variedad de grupos celulares.

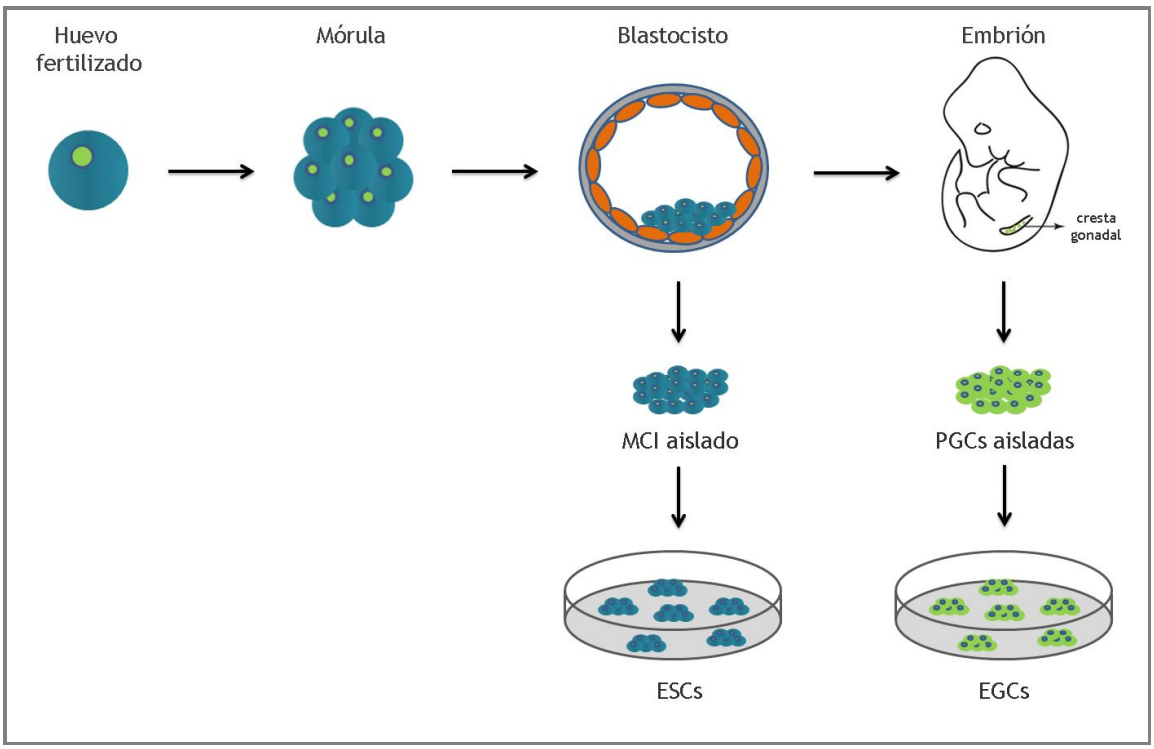


Figura 3. Células madre embrionarias y células embrionarias germinales.

Estas propiedades permiten que, bajo ciertas condiciones, puedan ser manipuladas *in vitro* con el fin de producir precursores de un linaje específico y contribuir así al desarrollo de posibles tratamientos de enfermedades como diabetes y Parkinson en las que existen tejidos claramente comprometidos. Además, pueden ser utilizadas para el estudio de enfermedades producidas durante el desarrollo embrionario y contribuir a identificar sus bases genéticas [6]. Sin embargo, al tratarse de células muy indiferenciadas, éstas pueden inducir la formación de ciertas neoplasias como son los teratomas. Por otra parte, existen consideraciones éticas que llevan a serias discusiones entre quienes consideran al cigoto como “persona”, con sus correspondientes derechos legales, y aquellos que no comparten esta posición. Esto no es un asunto menor, y en muchos países ha retrasado, e incluso detenido, la investigación con estas células [14].

1.2 CÉLULAS MADRE ADULTAS

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Además de las células madre embrionarias, se han identificado células madre adultas que se pueden encontrar en la mayoría de los tejidos de un individuo, como ser la médula ósea, el tejido adiposo, el sistema nervioso, el aparato digestivo, el músculo esquelético, el músculo cardíaco, el hígado, el páncreas y el pulmón, entre otros [15-20]. En un principio, se pensó que las células madre adultas estaban predeterminadas a diferenciarse a tipos celulares procedentes de su mismo tejido de origen o, al menos, de su misma capa embrionaria. Sin embargo, esta idea ha sido reevaluada por varios grupos de investigadores cuyos estudios sugieren que las células madre adultas son capaces de diferenciarse funcionalmente a células especializadas procedentes de capas embrionarias distintas a las de su origen; incluso, algunos de estos grupos han sido capaces de probar la pluripotencialidad de células madre procedentes de la médula ósea o del sistema nervioso central [21,22]. Esta “habilidad biológica”, propia de las células madre adultas, se fundamenta en la capacidad que tienen de alterar drásticamente su fenotipo en respuesta a los cambios del microambiente donde se desarrollan, y se la conoce en la actualidad como “fenómeno de plasticidad” (**Figura 4**) [23-25].

Los mecanismos moleculares que llevan a los cambios de linaje celular están siendo estudiados; sin embargo, los resultados más recientes acerca de la “plasticidad” de las células madre adultas contradicen el dogma sobre la diferenciación de las células madre restringida a su tejido de origen, planteando la idea de que las restricciones en los destinos celulares no son permanentes, sino más bien flexibles, reversibles y dependientes de nicho o microambiente en el cual se encuentren.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

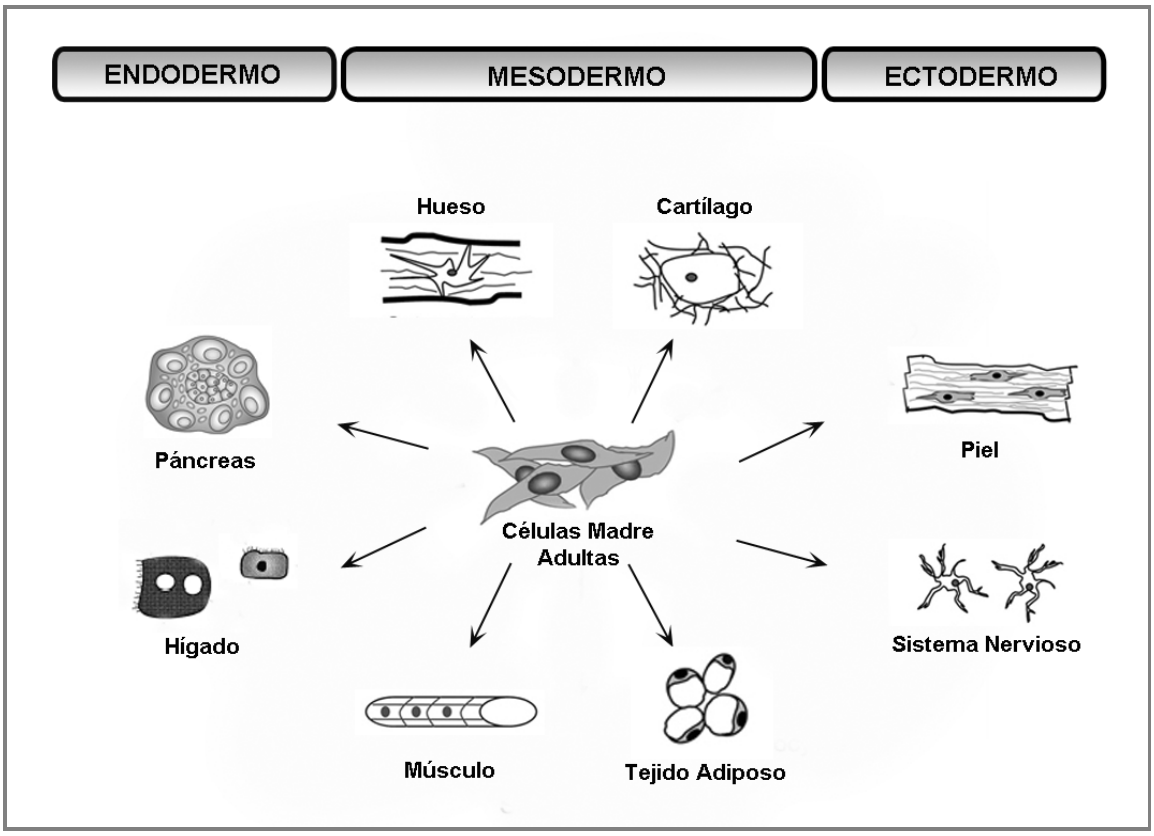


Figura 4. Plasticidad de las células madre adultas.

Existen dos modelos que explicarían los posibles mecanismos que llevan a las células madre adultas a diferenciarse a células de un tejido diferente al original, en respuesta a cambios del microambiente o procesos de reparación tisular: el primer modelo hace referencia a la capacidad que poseen las células maduras de de-diferenciarse y re-diferenciarse a células del mismo tejido que le dio origen o a un tejido diferente [26] (**Figura 5A**). El ejemplo más obvio y extremo de reversión del destino celular viene de los experimentos en los cuales una célula somática terminalmente diferenciada genera otro animal a través de una transferencia nuclear o clonación. Los experimentos de transferencia nuclear demuestran que las células diferenciadas, dadas las condiciones apropiadas, pueden ser regresadas a su estado más primitivo [27-29].

En el segundo modelo, conocido como transdiferenciación, las células madre de un tejido particular, bajo condiciones de un microambiente diferente al original, son capaces de generar células funcionales de un linaje, tejido u órgano distinto de aquel del cual la célula madre es originaria [30,31] (**Figura 5B**).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

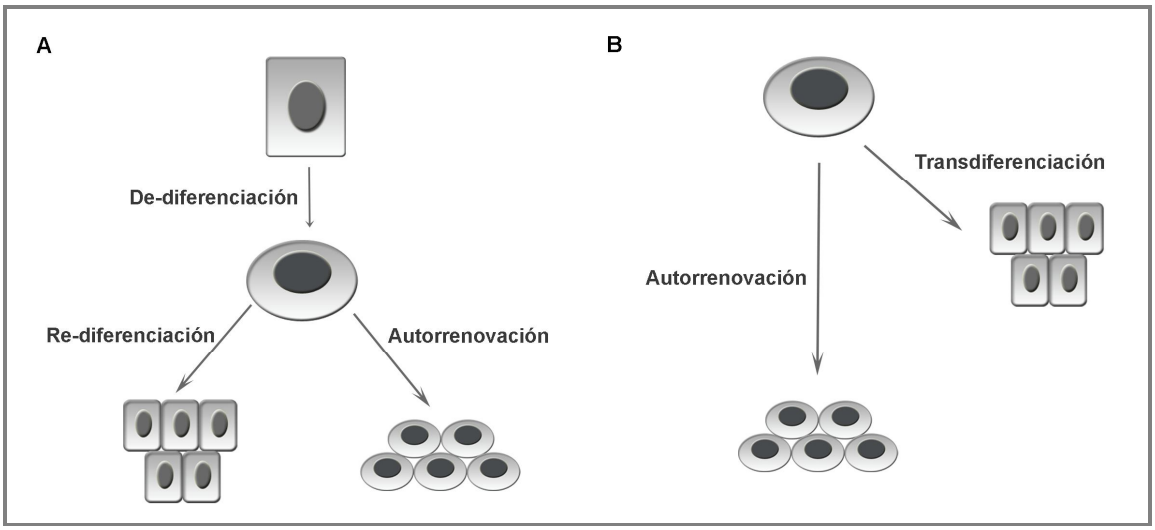


Figura 5. Modelos de los posibles mecanismos de diferenciación de las células madre adultas. **A.** Modelo de de-diferenciación y re-diferenciación. **B.** Modelo de transdiferenciación.

1.2.1 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Una célula madre mesenquimal (MSC) es definida como un tipo de célula madre adulta con un potencial intrínseco para dar origen a varios tipos celulares tales como osteoblastos, condrocitos, adipocitos, miocitos, y otros; es decir que tiene la capacidad de diferenciarse en linajes mesenquimales y no mesenquimales [32,33]. Las MSCs forman parte de una población celular heterogénea, que tiene la capacidad de adherirse al plástico y que contiene progenitores indiferenciados y precursores restringidos al linaje con diferentes capacidades para diferenciarse a distintos tipos celulares.

Células con características de MSC han sido derivadas de diferentes partes del cuerpo como son: médula ósea, tejido adiposo, tendón, piel, hueso, músculo, cerebro, hígado, riñón, pulmón, bazo, páncreas, timo, membrana sinovial, pulpa dental, placenta, líquido amniótico y cordón umbilical. Estas poblaciones celulares heterogéneas, conocidas como MSCs, derivadas de varios órganos exhiben muchas características en común, a pesar de algunas diferencias en cuanto al potencial de diferenciación [34].

A pesar de los numerosos estudios relacionados con la biología de las MSCs, todavía se definen sobre una base operacional, es decir, selección positiva o negativa de MSCs en base a antígenos de superficie ($CD105^+$, $CD73^+$, $CD90^+$, $Stro1^+$, $CD45^-$, $CD34^-$, $CD14^-$, $CD11b^-$, $CD79alpha^-$, $CD19^-$, $HLA\text{-}DR^-$), su adherencia al plástico, su morfología fibroblastoide, y su capacidad de autorrenovación y diferenciación en al menos tres tipos celulares mesenquimales [35]. Las MSCs han emergido como una modalidad terapéutica prometedora

para regeneración y reparación de tejidos debido a su capacidad de migrar a los sitios de injuria [36]. Se sabe que las MSCs secretan un número de citoquinas y moléculas regulatorias, además de poseer propiedades inmunosupresoras que facilitarían el trasplante [37].

Existen tres escenarios para explicar el origen de las MSCs: la primera hipótesis plantea que las MSCs existen en un solo tejido u órgano, desde donde salen y circulan a otros lugares cuando se las necesita; la segunda se basa en la idea de que prácticamente todos los tejidos poseen sus propias células madre, por lo cual las MSCs pueden ser aisladas de muchos tejidos fetales y adultos; y la última plantea que todas las MSCs de diferentes fuentes se originan a partir de, o al menos, tienen un ancestro común perivascular, los pericitos [38-41].

2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE TEJIDO ADIPOSO

El tejido adiposo es una entidad biológica cuya función se creía que estaba limitada únicamente al almacenamiento del exceso de energía obtenido a través de la ingesta de comida. Sin embargo, a lo largo de los últimos 10 años, el tejido adiposo ha sido reconocido como una fuente rica en células madre multipotentes y un tejido con un rol vital en el metabolismo, además de tener funciones inmunológicas. En hombres y mujeres no obesos, el tejido adiposo pesa alrededor del 37% de la masa corporal total y la distribución anatómica varía entre hombres y mujeres.

El tejido adiposo es una fuente prometedora de células madre para aplicación en terapias celulares, debido a que estas células poseen las siguientes características: a) fáciles de aislar; b) obtenidas del propio paciente; c) el número de células es adecuado para el trasplante, debido a su alta proliferación celular *in vitro*; d) capacidad multipotente de diferenciación celular; e) fácil manipulación *in vitro*; f) baja inmunogenicidad; y g) capacidad de integrarse en el tejido del huésped e interactuar con el tejido que lo rodea [42-45].

El compartimiento estromal vascular del tejido adiposo es el sitio de origen de las células madre de tejido adiposo [46,47]. Luego de una digestión con colagenasa del tejido, una población celular es obtenida, la cual se conoce como células de la fracción estromal vascular (SVF). Cuando la SVF es cultivada, un grupo de células se adhiere a la superficie de la placa de cultivo; son estas células las que exhiben propiedades de células madre. La SVF además de estas células, contiene células derivadas de sangre periférica (leucocitos y eritrocitos), células endoteliales vasculares, macrófagos y linfocitos residentes, y otras células como pericitos y fibroblastos [48]. Aproximadamente el 2% de las células de la SVF son células madre con potencial multilinaje [49,50]. En la literatura, diferentes grupos han dado diferentes nombres para identificar a esta misma población celular, tales como células madre adultas derivadas de tejido adiposo (ADAS), células madre mesenquimales de tejido adiposo

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

(AdMSCs), lipoaspirado procesado (PLA), células madre derivadas de tejido adiposo (ADSCs), células madre/estromales de tejido adiposo (ASCs), entre otros [45]. Es esta última denominación, ASCs, la que adoptaremos en la presente tesis.

El número de ASCs obtenidas puede variar dependiendo del método de procesamiento empleado para la obtención de células madre. De hecho, los datos obtenidos de la literatura acerca del aislamiento de las ASCs indican que de acuerdo al procedimiento quirúrgico empleado, resección quirúrgica o liposucción, un número diferente de células puede ser obtenido a partir de la misma cantidad de tejido adiposo [51,52]. Por otra parte, el número de ASCs obtenidas parece ser el mismo en relación a la región anatómica de la cual es obtenido el tejido. Además, la edad es otro factor que puede interferir en la composición celular, a partir de que se ha observado que individuos más jóvenes tienen un número más alto de ASCs en comparación a individuos más viejos [53-55].

Los depósitos de tejido adiposo subcutáneo son ubicuos y fácilmente accesibles en grandes cantidades con procedimientos mínimamente invasivos. Estos depósitos pueden ser obtenidos utilizando la técnica de liposucción (aspirado) o extirpando una porción de tejido intacto (**Figura 6**).

Se ha encontrado que el tejido adiposo aspirado sólo tiene la mitad del número de ASCs comparado con el tejido adiposo intacto, muchos adipocitos y capilares son rotos y un gran número de células muertas se hallan en el tejido adiposo aspirado [56]. El escaso número de ASCs en el lipoaspirado puede deberse a: (1) una proporción sustancial de ASCs está ubicada alrededor de los vasos y quedan en el tejido del donante; y (2) algunas ASCs son liberadas en la porción fluida de los aspirados. De esta manera, el tejido adiposo aspirado es considerado como una fuente relativamente pobre de progenitores en comparación al tejido adiposo intacto [48,56].

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

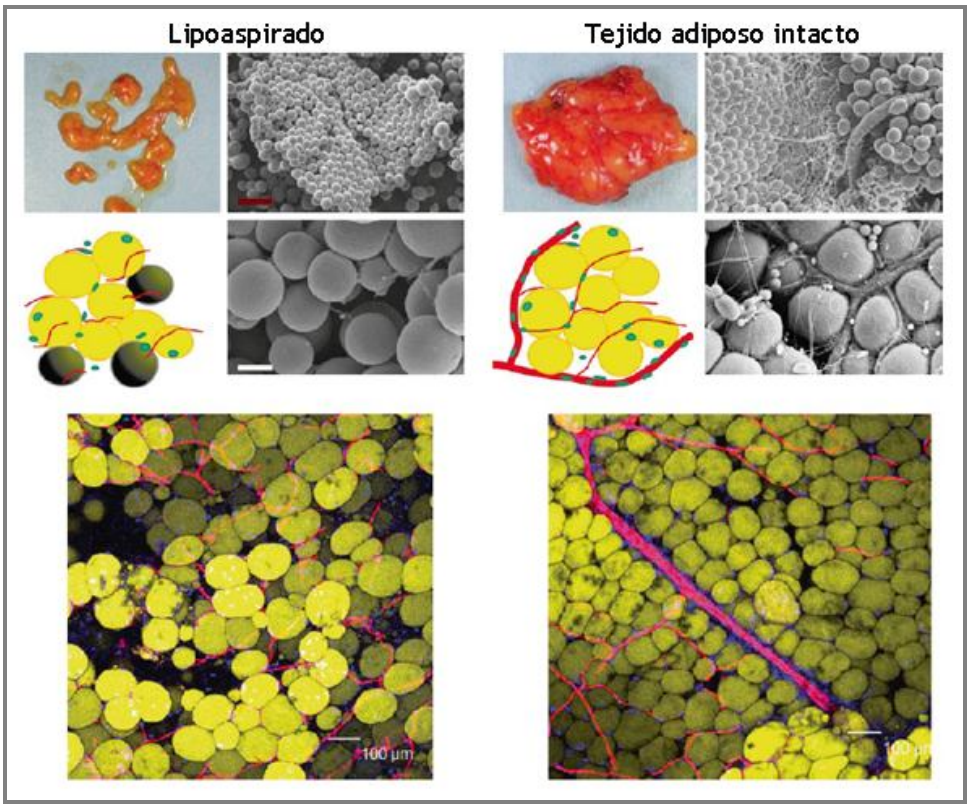


Figura 6. Comparación de tejido adiposo obtenido por lipoaspiración (*izquierda*) o extirpando una porción de tejido intacto (*derecha*) obtenido del mismo sitio de un solo paciente. Vistas macroscópicas (*arriba, izquierda*), vistas esquemáticas (*medio, izquierda*), imágenes de microscopía electrónica (*arriba y medio, derecha;* barra roja = 200 mm, barra blanca = 40 mm), e imágenes de tinción "*whole mount*" (*abajo,* barra = 100 mm). *(Adaptado del capítulo "Adipose Stem Cells: From Liposuction to Adipose Tissue Engineering" K. Yoshimura et al. [57])*

La localización exacta de las ASCs en el tejido adiposo es desconocida, pero se piensa que las ASCs se localizan entre los adipocitos (co-localizan con capilares), en las paredes de los vasos o en el tejido conectivo. La mayoría de ellas muestran una localización perivascular, como soporte de células endoteliales similares a los pericitos (**Figura 7**) [40,58].

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

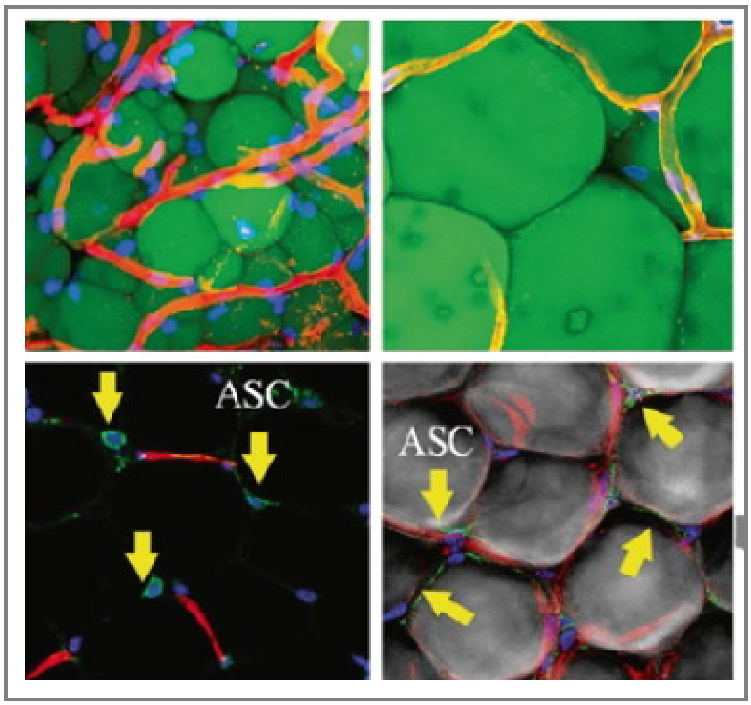


Figura 7. Localización perivascular de las ASCs en el tejido adiposo. Se pueden observar las ASCs (*verde*), los capilares (*rojo*) y los núcleos celulares (*azul*). *(Adaptado del capítulo "Adipose Stem Cells: From Liposuction to Adipose Tissue Engineering" K. Yoshimura et al. [57])*

Basado en análisis de citometría de flujo, las ASCs expresan antígenos típicos tales como CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD46d, CD54, CD71, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166 y Stro-1. Sin embargo, ASCs no expresan antígenos hematopoyéticos tales como c-kit, CD4, CD11b, CD14, CD16, CD34, CD45, CD56, CD79, CD104, CD106 y HLA-DR, ni tampoco marcadores endoteliales como CD31, CD133, CD144 y el factor de von Willebrand [25,43,51,59-66].

Basados en ensayos quimioluminiscentes no-radiactivos, las ASCs han demostrado tener una longitud telomérica de alrededor de 9 kb, la cual es mayor que la que poseen las células somáticas y está asociada a su alto potencial de proliferación. Por otra parte, mediante el protocolo de amplificación de repeticiones teloméricas cuantitativa en tiempo real (RQ-TRAP), se ha observado que la actividad telomerasa de las ASCs es similar a la de otras MSCs, la cual es mayor que la de una célula somática pero menor que la de las líneas celulares de cáncer, indicando el mantenimiento de la capacidad de autorrenovación y proliferación de las mismas [67]. Sin embargo, su capacidad de expansión *in vitro* es limitada, demostrado a través de estudios de características morfológicas, cinética de crecimiento, expresión de marcadores de superficie, de genes asociados a senescencia, entre otros. La manifestación de senescencia en las ASCs ocurre en el pasaje 15 o 20 y todos los resultados demostraron

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

que cultivos más allá del pasaje 10 favorecen las vías de senescencia y limitan su utilidad clínica [68].

Las ASCs son capaces de mantener su autorrenovación *in vitro* debido a que secretan una serie de factores de crecimiento como son el factor de crecimiento de fibroblastos 2 o básico (FGF2 o bFGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento 1, similar al factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF1) [69,70].

El proceso a través del cual las ASCs se diferencian en otras células es denominado diferenciación específica de linaje y comienza con la activación de ciertos factores de transcripción. Recientemente, se ha demostrado *in vitro* la capacidad de las ASCs de diferenciarse en células derivadas del mesodermo (adipocitos, osteocitos y condrocitos), a células derivadas del ectodermo (células epiteliales, gliales y neuronas) y a células derivadas del endodermo (hepatocitos, miocitos, células pancreáticas, de pulmón, epiteliales de intestino, células endoteliales y cardiomiocitos) [66,71-87].

Antes de los eventos de transcripción, el proceso a través del cual las ASCs pueden ser destinadas a un linaje específico todavía no está completamente elucidado. Sin embargo, algunos factores de transcripción específicos de tejido son conocidos. En las células madre, los procesos de proliferación, determinación y diferenciación terminal específica de linaje son regulados por una red compleja de interacción molecular que involucra moduladores de la transcripción génica, factores de transcripción, proteínas quinasas, factores de crecimiento y receptores celulares (**Figura 8**) [44].

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

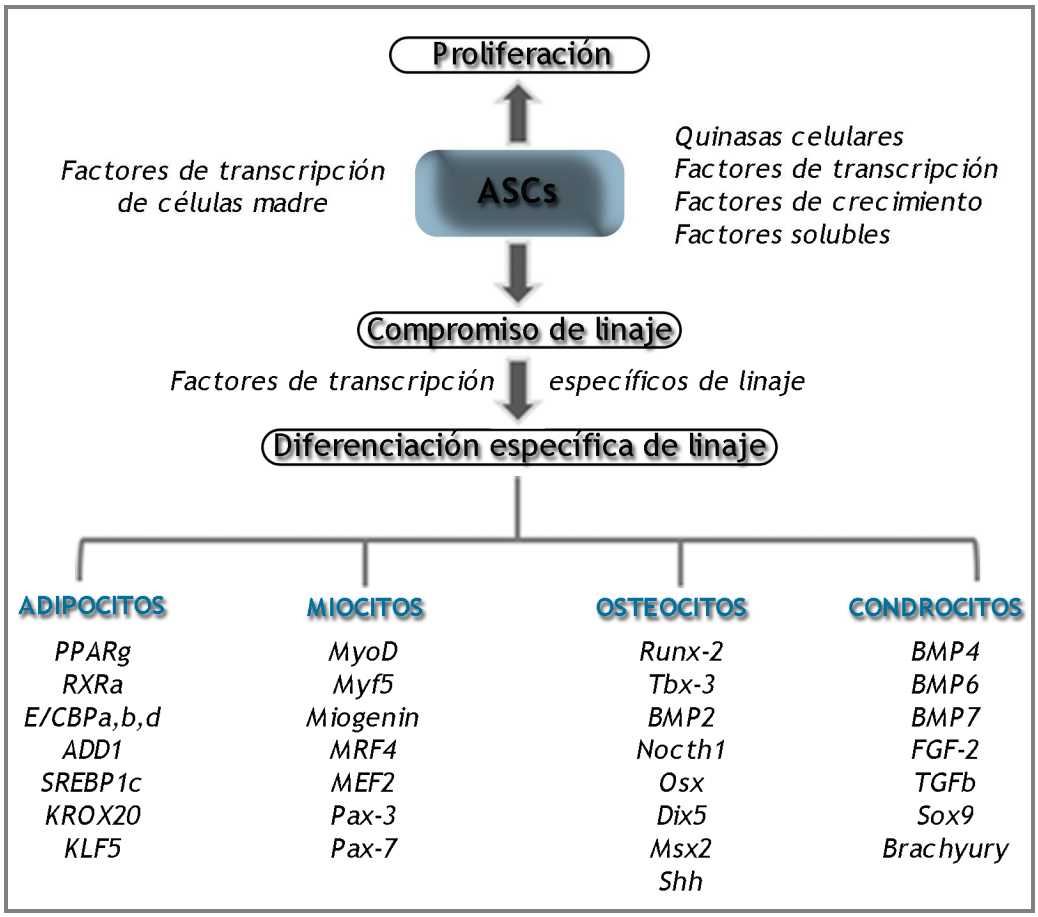


Figura 8. Regulación molecular de la proliferación, del compromiso de linaje y de la diferenciación de las ASCs. *(Adaptado de Schaffler et al 2007 [44].*

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3. *STEMNESS*: PATRÓN DE GENES COMUNES A LAS CÉLULAS MADRE

El término "*stemness*" se refiere a los procesos moleculares subyacentes a las propiedades de células madre como son la autorrenovación y la generación de progenie diferenciada. Aunque las células madre en diferentes microambientes o nichos tendrán, por necesidad, diferentes demandas fisiológicas y, por ende, diferentes programas moleculares, existen probablemente ciertas características genéticas específicas que son compartidas por todas las células madre. Muchos de estos genes presentes en poblaciones de ESCs, células madre hematopoyéticas (HSCs) y células madre neurales (NSCs) han sido identificados [2,88-91]. Extendiendo este enfoque a otras células madre, sería posible desarrollar una huella molecular (*fingerprint*) para las células madre. Esta huella podría ser usada como la base para una definición molecular de célula madre que, combinada con su definición funcional, proveerán un mejor criterio para comprender su naturaleza única.

En los últimos años, se ha puesto mucho esfuerzo en estudiar los mecanismos que regulan la pluripotencialidad de las células madre y su potencial de diferenciación. Como resultado de ello, se encontró que las vías de traducción de señales de Sonic Hedhegog (Shh), Notch, Wnt y BMP, y algunos factores de transcripción, Oct4, Sox2 y Nanog, son los responsables de regular estos intrincados procesos.

3.1 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

La pluripotencialidad es la capacidad de una célula de dar origen a derivados diferenciados que representan cada una de las tres capas germinativas y es una propiedad característica de las ESCs. Estudios funcionales han sido de importancia en identificar un grupo de factores de transcripción que afectan la identidad pluripotente de las ESCs. En este grupo, los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog son cruciales para el mantenimiento eficiente de la identidad de la ESC (**Figura 9**) [92-96].

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

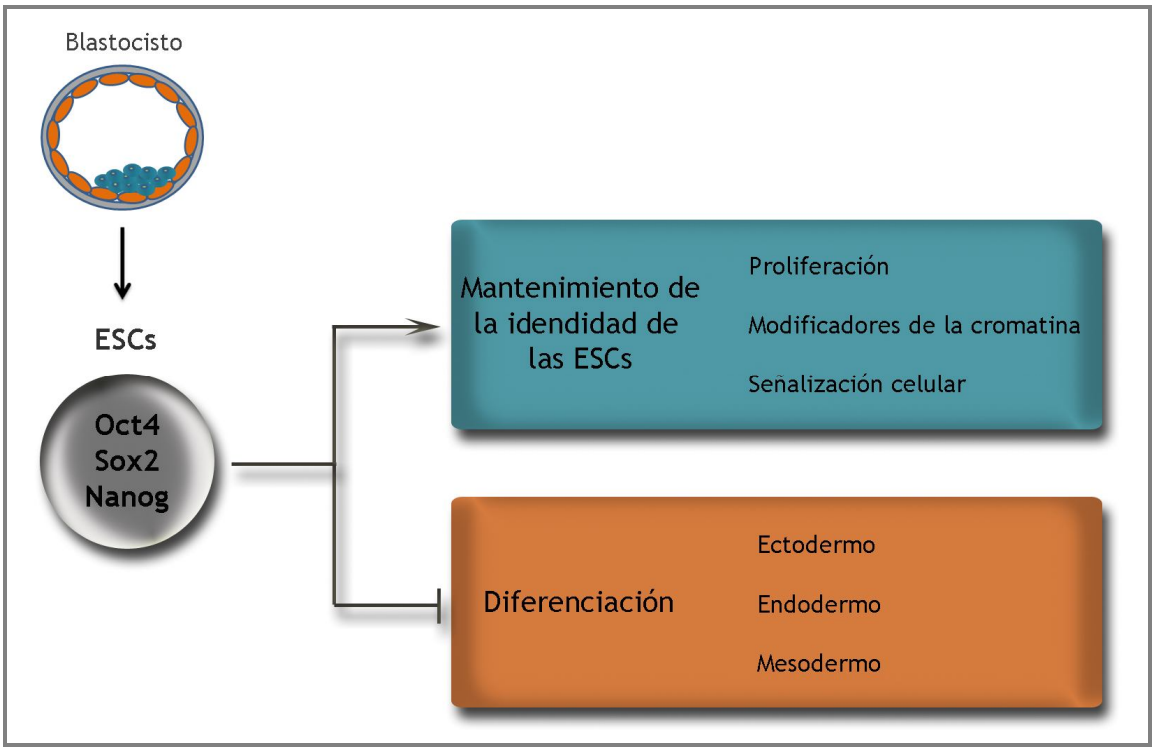


Figura 9. Factores de transcripción que controlan la pluripotencialidad de las ESCs.

3.1.1 OCT4

El gen Oct4 (también conocido como Oct3 o Pou5f1) codifica para un factor de transcripción que juega un rol crucial en el desarrollo del embrión y en el mantenimiento de la capacidad de autorrenovación y la pluripotencialidad de las ESCs.

Oct4 es un transcripto de herencia materna que es regulado durante el desarrollo en ratones. A partir del estadio de 4 células, comienza la expresión de Oct4 y es finamente regulado para permitir la correcta formación de los tejidos embrionarios y extraembrionarios. La disminución de la expresión en algunas zonas de la mórula lleva a la formación de trofoectodermo. Luego, algunas células del macizo celular interno expresan transitoriamente altos niveles de Oct4, lo cual permite el desarrollo del hipoblasto (endodermo primitivo y extraembrionario), mientras que las células con expresión estable de Oct4 son las que van a dar origen al epiblasto. Durante la gastrulación, el promotor del Oct4 se va silenciando progresivamente hasta que su expresión queda limitada a las células germinales primordiales (PGCs). En el adulto, los gonocitos y espermatogonias son las únicas células donde la expresión de Oct4 puede ser detectada [97].

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Oct4 también se expresa en ESCs sin diferenciar y es uno de los factores de transcripción específicos de ESCs cuyos niveles requieren un control riguroso. La pérdida del 50% de su expresión conduce a las ESCs hacia el linaje trofoectodérmico y niveles de expresión mayores al 50% induce a la formación de endodermo primitivo o mesodermo, en concordancia con lo que sucede durante el desarrollo embrionario (**Figura 10**) [94,98].

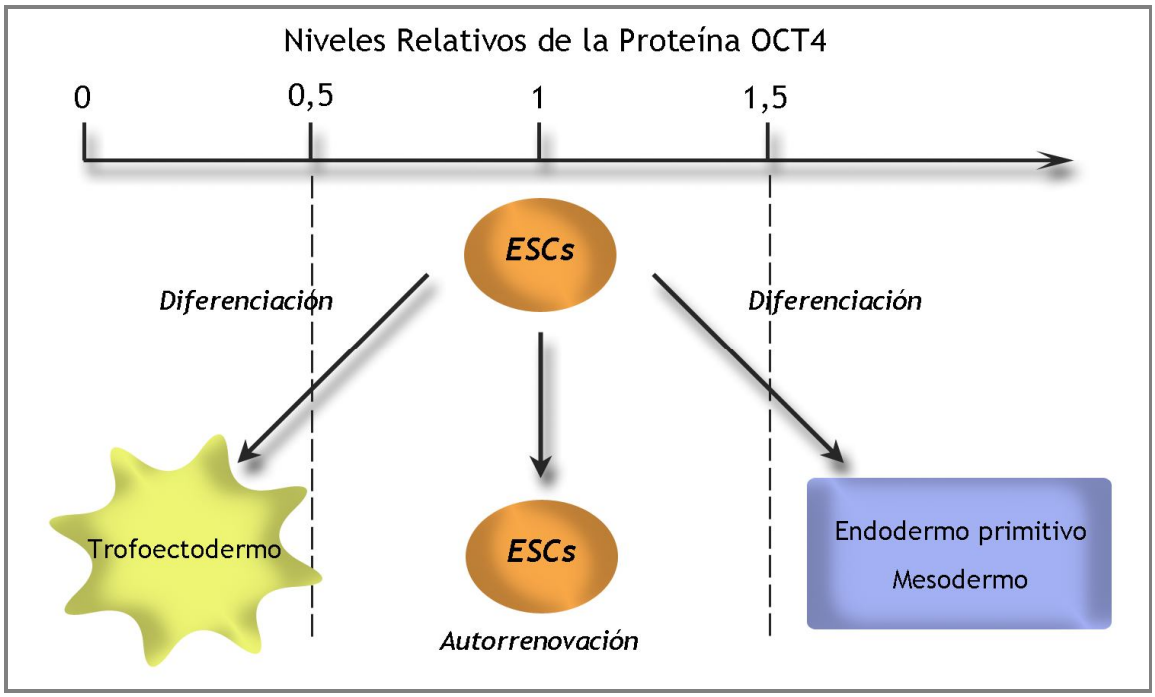


Figura 10. Relación entre el nivel de expresión de Oct4 y el destino de célula madre. *(Adaptado de Niwa et al 2000 [94])*

El gen de Oct4 está localizado en el cromosoma 6 y contiene 5 exones. Por splicing alternativo, el gen puede generar dos isoformas diferentes: OCT4A y OCT4B.

La función de estas dos variantes fue estudiada reprimiendo el Oct4 endógeno en una línea celular de ESCs murinas e intentando rescatarla con las dos isoformas. Se observó que la isoforma OCT4A humana, pero no la OCT4B, fue capaz de rescatar el fenotipo de ESC, es decir, la inhibición de la diferenciación y el mantenimiento de la autorrenovación. Además, se demostró que OCT4A tiene una señal nuclear mientras que OCT4B permanece citoplasmática [99]. Ésto sugiere fuertemente que OCT4A es la responsable del mantenimiento de la condición de *stemness* y del estado indiferenciado de las ESCs. Sin embargo, recientemente se ha descripto una nueva variante de *splicing* OCT4B1 que se expresa en ESCs y que es regulada negativamente luego de su diferenciación (**Figura 11**) [100].

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Un gran número de publicaciones han descripto la expresión de OCT4 en células madre aisladas de diferentes tejidos humanos (médula ósea, sangre periférica, pelo, epidermis, tiroides, hígado, riñón, páncreas, pulmón, cerebro, músculo y endometrio) como también de líquido amniótico y sangre de cordón umbilical [101-107].

A pesar de la abundancia de datos acerca de los blancos y fenotipos del transcripto OCT4, todavía es incierto como actúa el factor de transcripción OCT4 para regular la diferenciación. Experimentos recientes sugieren que puede funcionar tanto como un activador o como un represor de la transcripción génica, ya que se lo ha encontrado asociado con complejos activadores y represores[108-111].

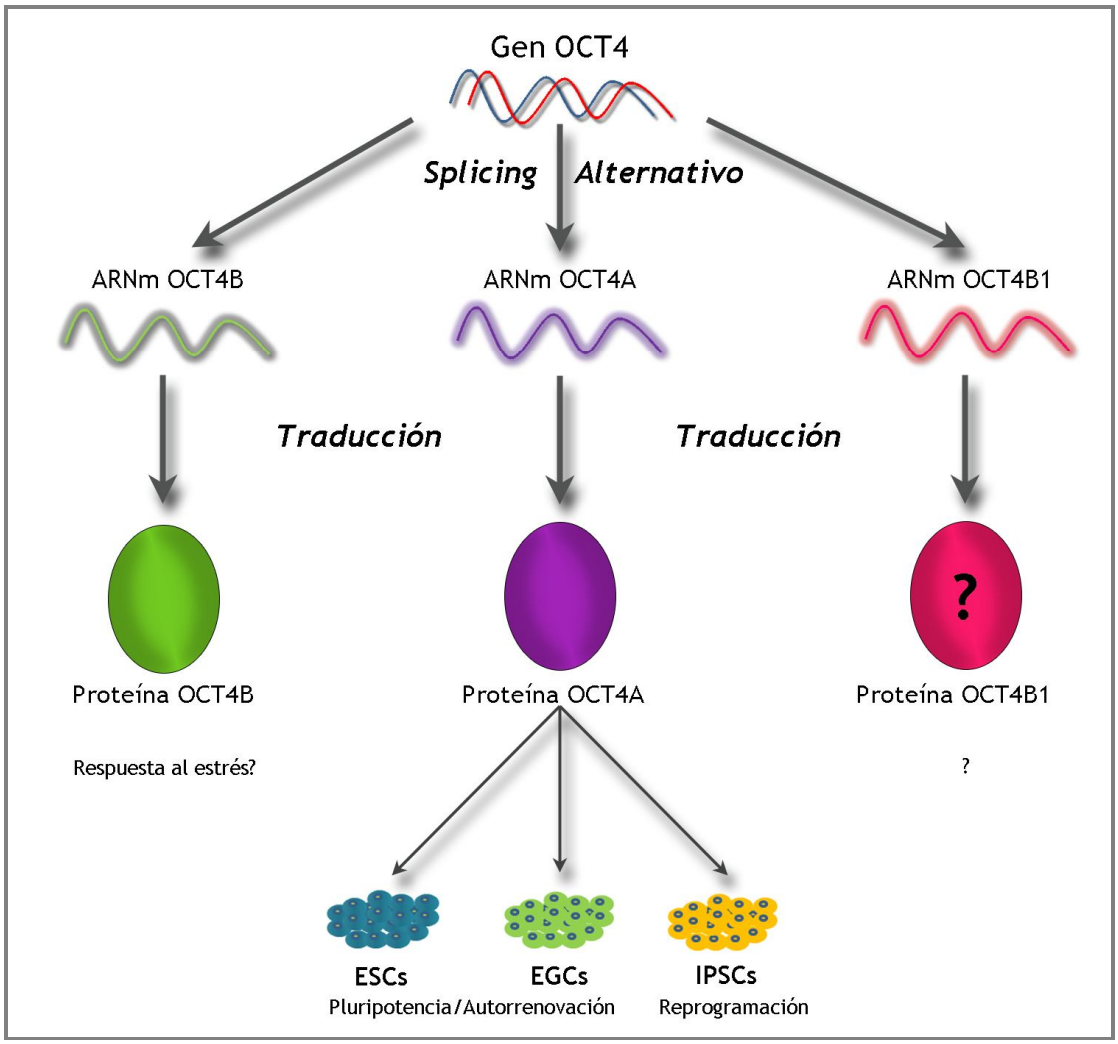


Figura 11. Isoformas de Oct4 y su relación con las células madre *(Adaptado de Wang et al 2010 [112])*

3.1.2 SOX2

Sox2 es miembro de las proteínas de unión al ácido desoxirribonucleico (ADN) del Grupo de Alta Movilidad (HMG). Estas HMG reclutan factores de transcripción para unirse a diferentes regiones potenciadoras del ADN (*enhancers*). Adicionalmente, las proteínas Sox contienen un dominio de activación/represión, a través del cual interactúan con otras proteínas[113]. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario temprano Sox2 activa genes blancos interactuando con Oct4. Durante estadios de desarrollo posteriores, cuando Oct4 ya no está siendo expresado, Sox2 interactúa con Pair box 6 (Pax6) regulando el desarrollo del ojo [114].

La expresión de Sox2 es detectada en el macizo celular interno del blastocisto y se mantiene en el epiblasto [115]. A diferencia de Oct4, Sox2 también tiene un rol importante durante estadios posteriores del desarrollo embrionario y en las células madre adultas. Por ejemplo, Sox2 se expresa en el tubo neural desde los estadios más tempranos del desarrollo y es requerido para mantener las células progenitoras neurales en un estado indiferenciado [116-118]. Además, Sox2 desempeña un rol importante en estadios posteriores del desarrollo, tales como la diferenciación neural, la proliferación y/o el mantenimiento de las NSCs, y su expresión, en las regiones de la neurogenesis adulta, es responsable del mantenimiento y/o proliferación de las NSCs adultas [118,119].

Las proteínas POU son compañeras de interacción comunes de los factores Sox y la heterodimerización entre Sox2 y Oct4 provee el mejor ejemplo de esta interacción. Estudios funcionales han demostrado que Oct4 y Sox2 interactúan directamente, cuando se unen a regiones promotoras, para regular su propia transcripción y activar la expresión de genes asociados a pluripotencialidad (Sox2, Oct4, Nanog, Fgf4, etc.) [120-124]. Es muy interesante que, dependiendo del gen blanco, Oct4 y Sox2 exhiben niveles diferentes de cooperación. Estos niveles parecen resultar en diferente actividad transcripcional para los genes corriente abajo (*downstream*), dependiendo de la cantidad de proteína Sox2 y Oct4 presente en la célula (**Figura 12**).

Mientras que la función de Oct4 en ESCs ha sido extensivamente caracterizada, el rol de Sox2 permanece sin determinarse. Se ha especulado que Sox2 actúa sinergísticamente con Oct4 para regular la expresión de genes pluripotenciales.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

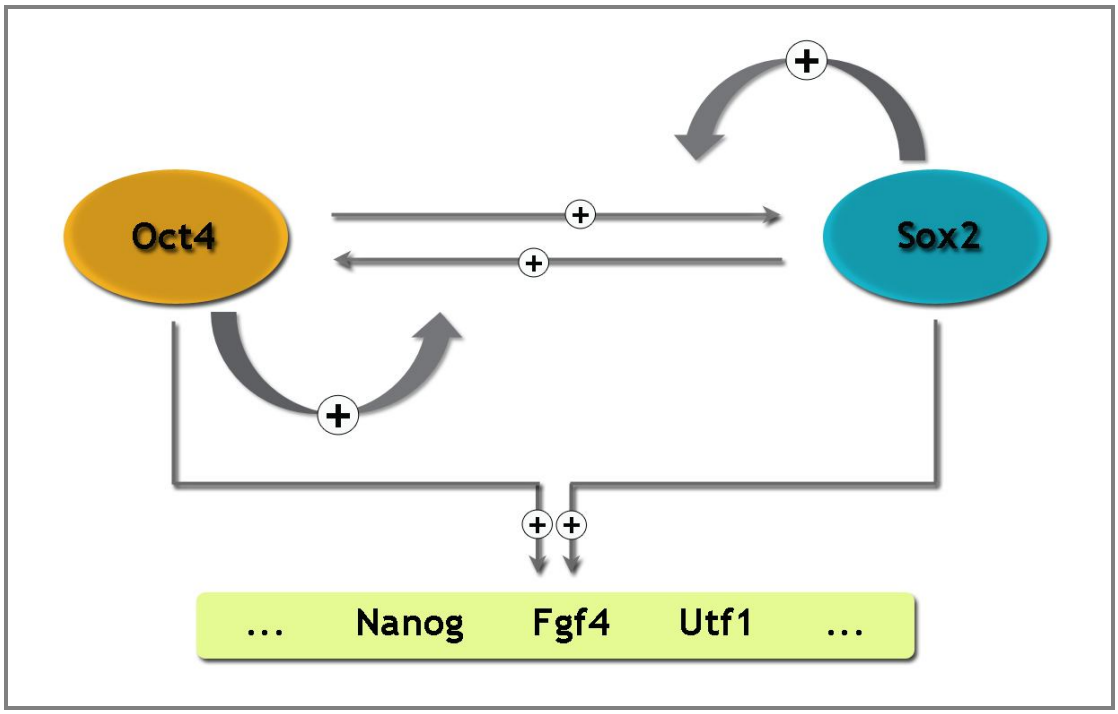


Figura 12. Cooperación entre Sox2 y Oct4 en las células madre. *(Adaptado de Rizzino 2009 [125])*

3.1.3 NANOG

Nanog es una proteína homeodominio y tiene un patrón de expresión bastante restrictivo. *In Vivo*, la expresión de Nanog se detecta en las células interiores de la mórula compacta y en el macizo celular interno del blastocisto [92,126-128]. En el blastocisto pre-implantatorio, la expresión de Nanog se pierde en las células que darán origen al endodermo, mientras que las células destinadas a formar el epiblasto retienen la expresión del mismo [129]. Luego de la implantación, los transcriptos de Nanog pueden ser encontrados en un grupo de células del epiblasto y en las PGCs. *In Vitro*, Nanog marca todas las líneas celulares pluripotentes y en las ESCs, se demostró que es importante para la autorrenovación y mantenimiento del estado indiferenciado de estas células, ya que es regulado negativamente en una etapa temprana de la diferenciación de las ESCs [126]. Ésto demuestra una íntima asociación entre Nanog y la identidad de las células madre pluripotenciales.

Oct4 y Sox2 se unen corriente arriba (*upstream*) del promotor de Nanog, siendo importantes en la regulación de Nanog. Nanog actúa como un activador del promotor de Oct4 y de diversos genes inhibidores de diferenciación (Ids) [122,128,130]. Se ha demostrado que la ablación genética de Nanog en ESCs no suprime la pluripotencia pero reduce la capacidad de autorrenovación, generando un estado transitorio en el cual las células están

reversiblemente preparadas para la autorrenovación o para la diferenciación. Entonces, Nanog actuaría previniendo la progresión de la diferenciación *in vitro*, y podría ser considerado como un salvaguardia de la pluripotencia (**Figura 13**) [128].

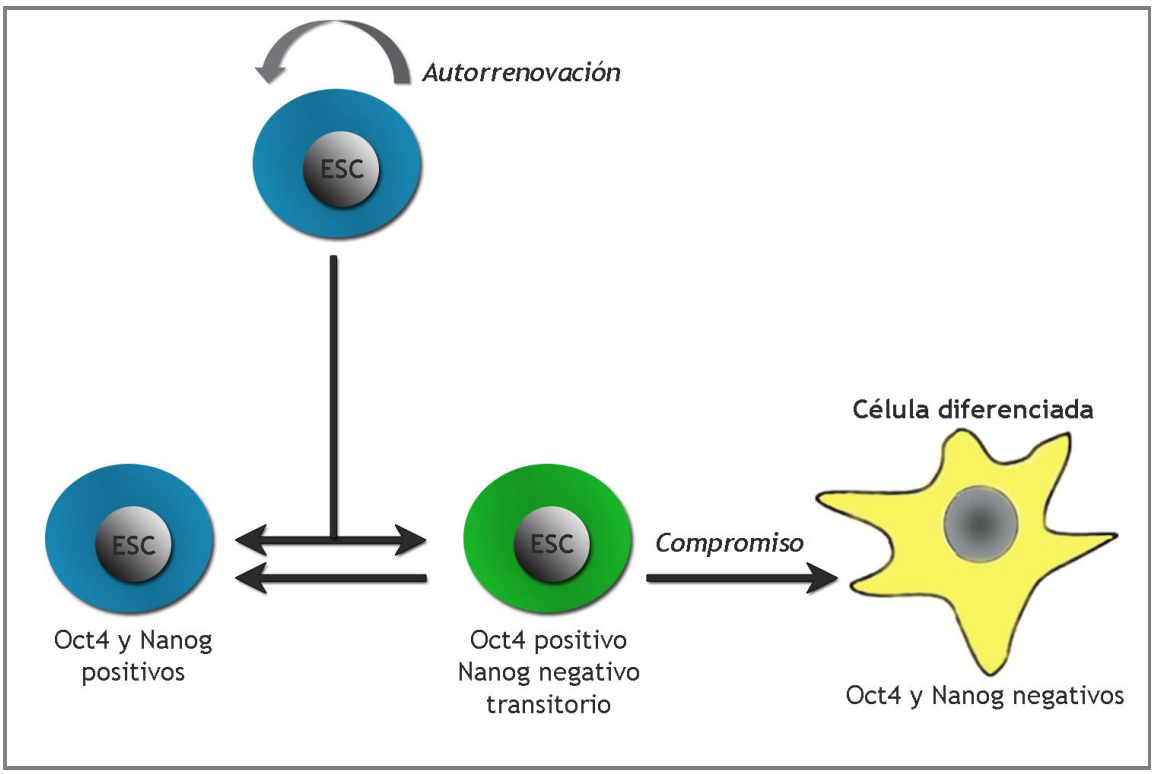


Figura 13. Nanog funciona como un salvaguardia de la pluripotencia de las células madre. *(Adaptado de Chambers et al. 2007[93])*

Por el contrario de Oct4 y Oct4A, Nanog no se expresa en células postnatales; pero como Oct4 y Oct4A, se ha reportado su expresión en células madre somáticas adultas y su ausencia en otras [22,104-106].

3.2 MORFÓGENOS

Los morfógenos son factores extrínsecos que actúan a distancia para instruir la identidad celular y la forma del tejido durante el desarrollo, en una manera dosis-dependiente. Además de las acciones instructivas (determinando el destino), también pueden realizar un control selectivo (proliferación o supervivencia), de manera que es difícil distinguir entre factores que son estrictamente mitogénicos o anti-mitogénicos de aquellos que tienen acciones morfógenas. Numerosos morfógenos involucrados en el modelado neural temprano también están involucrados en controlar la autorrenovación de las células madre adultas y la

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

proliferación de su progenie. Entre ellos se encuentran Sonic Hedgehog (Shh), las proteínas Wnts, Notch y las BMPs [131].

3.2.1 SONIC HEDGEHOG (SHH)

Shh es un morfógeno de señalización intracelular de la familia Hedgehog, el cual juega un rol importante en el desarrollo de muchos órganos y grupos celulares, como también en la regulación de las células madre [132-135].

Durante el desarrollo, Shh actúa como un morfógeno que es secretado desde los centros de señalización ventral para especificar la identidad ventral durante el desarrollo del tubo neural. Shh también tiene acciones mitogénicas sobre las progenitores con especificación neuronal pero no sobre NSCs [136]. En la adultez, diversos estudios demostraron que Shh es importante en la autorrenovación y proliferación de las NSCs en la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales y en la zona subgranular (ZSG) del hipocampo y tiene un rol más específico en la expansión de las células amplificadoras transitorias y neuroblastos [137-139].

Estudios recientes han involucrado a Shh en la proliferación y especificación del destino celular de diversas células madre, donde se ha propuesto un modelo que plantea que Shh convierte la células madre quiescentes, de división lenta, en progenitores amplificadores transitorios más cercanos o comprometidos a la diferenciación (**Figura 14**) [137,140-143].

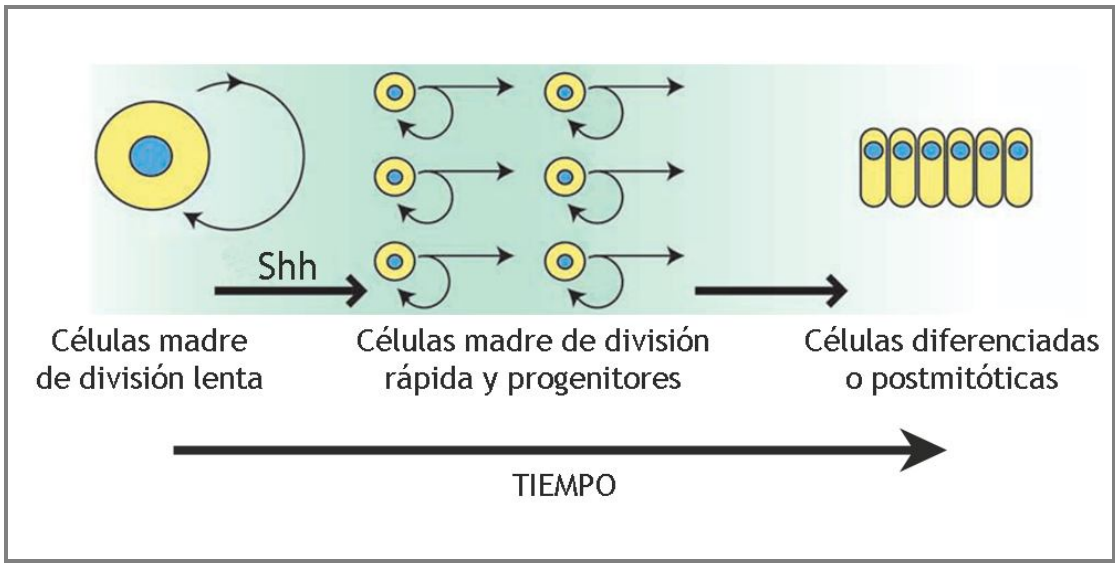


Figura 14. Modelo propuesto para la función de Sonic Hedgehog en las células madre. Las células madre en áreas sin señalización Shh proliferan lentamente y están alejadas de la diferenciación. Un aumento de la señalización Shh las convierte en progenitores de división rápida, los cuales pueden producir progenie postmitótica. *(Adaptado de Agathocleous et al. 2007 [140])*

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Dos proteínas transmembrana median la transmisión intracelular de la señal de Shh, Patched 1 (Ptc1), la cual se une a Shh, y Smoothened (Smo). La unión de Shh a Ptc1 libera la inhibición de Smo, permitiendo la transducción de la señal intracelular [144,145]. En última instancia, la actividad de Smo regula la actividad de efectores transcripcionales, las proteínas Gli (Gli1, Gli2 y Gli3), las cuales son capaces de actuar como activadores (GliA) o represores de la transcripción (GliR) [146-149].

En ausencia de Shh, se piensa que la actividad GliR domina. Esto es el resultado de la degradación de la proteína Gli2 y el procesamiento proteolítico parcial de Gli3 en una isoforma truncada, Gli3R, la cual funciona como un represor transcripcional (**Figura 15A**). En células que responden a Shh, el procesamiento proteolítico de Gli3 es inhibido, resultando en una reducción de los niveles de Gli3R. En células expuestas a altas concentraciones de Shh, la degradación de Gli2 se detiene, resultando en la acumulación de la isoforma activadora transcripcional. Además la transcripción de Gli3 es inhibida y la de Gli1 inducida, el cual parece actuar exclusivamente como un activador. Todos estos eventos resultan en un aumento de la actividad GliA, la cual puede estimular un aumento de la actividad transcripcional de Gli1 y Gli2 (**Figura 15B**) [150-153].

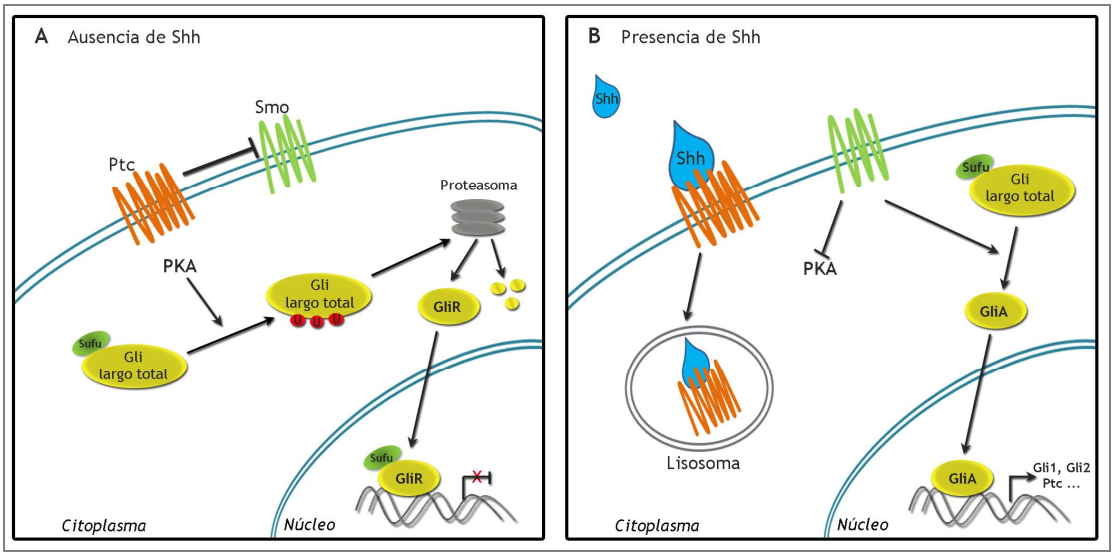


Figura 15. Cascada de señalización intracelular de Sonic Hedgehog. **A.** En ausencia de Shh, PKA marca a las proteínas Gli para su procesamiento proteolítico y la generación de las isoformas represoras, que inhiben la transcripción. **B.** En presencia de Shh, Smo inhibe a la PKA permitiendo la generación de las isoformas activadoras de Gli y, en consecuencia, la transcripción de los genes blancos.

3.2.2 WINGLESS/INT (WNT)

Las proteínas Wnt pueden tener acciones morfogénicas, proliferativas o antiproliferativas, dependiendo del contexto. Wnts se unen a receptores de la familia Frizzled (Fzd) en la membrana plasmática para iniciar la vía canónica [154]. La señal Wnt canónica induce el ensamblaje de los complejos Frizzled-Disheveled (Dvl) y Lipoprotein-receptor-related protein 5/6-Axin (LRP5/6-Axin) para liberar a β-catenina del complejo de degradación glicógeno sintasa quinasa (GSK-3β). La fosforilación de β-catenina por la GSK-3β es inhibida por Dvl, provocando la estabilización y acumulación de β-catenina citoplasmática, la cual se trasloca al núcleo, donde interactúa con los factores de transcripción T cell factor/ lymphoid enhancer factor/Sox (TCF/LEF/Sox), para promover la expresión génica. Myc, ciclinaD1, Axin2, FGF20, Wisp1, Jag1 y Dickkopf-1 (Dkk1) son genes blanco de esta cascada canónica (**Figura 16**) [155-159].

La señalización Wnt desempeña un rol importante en la regulación de la proliferación y diferenciación de células progenitoras neurales, hematopoyéticas y MSCs [160,161]. Diversos estudios han sugerido que la vía canónica de señalización Wnt mantiene a las células madre en un estado indiferenciado y de autorrenovación [162,163].

En el hipocampo adulto, Wnt3 es expresado en astrocitos mientras que los receptores de los componentes de señalización intracelular de Wnt son expresados en progenitores. Debido a que en algunos trabajos se vio que la sobreexpresión de Wnt3 promueve la neurogénesis activando el factor de diferenciación neurogénico 1 (NeuroD1), y en otros que promueve la autorrenovación de las NSCs; se sugiere que la señalización Wnt podría activar las NSCs quiescentes para que se autorrenueven, pero específicamente a través de divisiones asimétricas en servicio de la neurogénesis antes que por divisiones simétricas para la expansión de las NSCs. De manera que la señalización Wnt parece regular la proliferación y diferenciación de los linajes neuronales en una manera estadio-específica y dependiente del contexto celular [164-167].

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

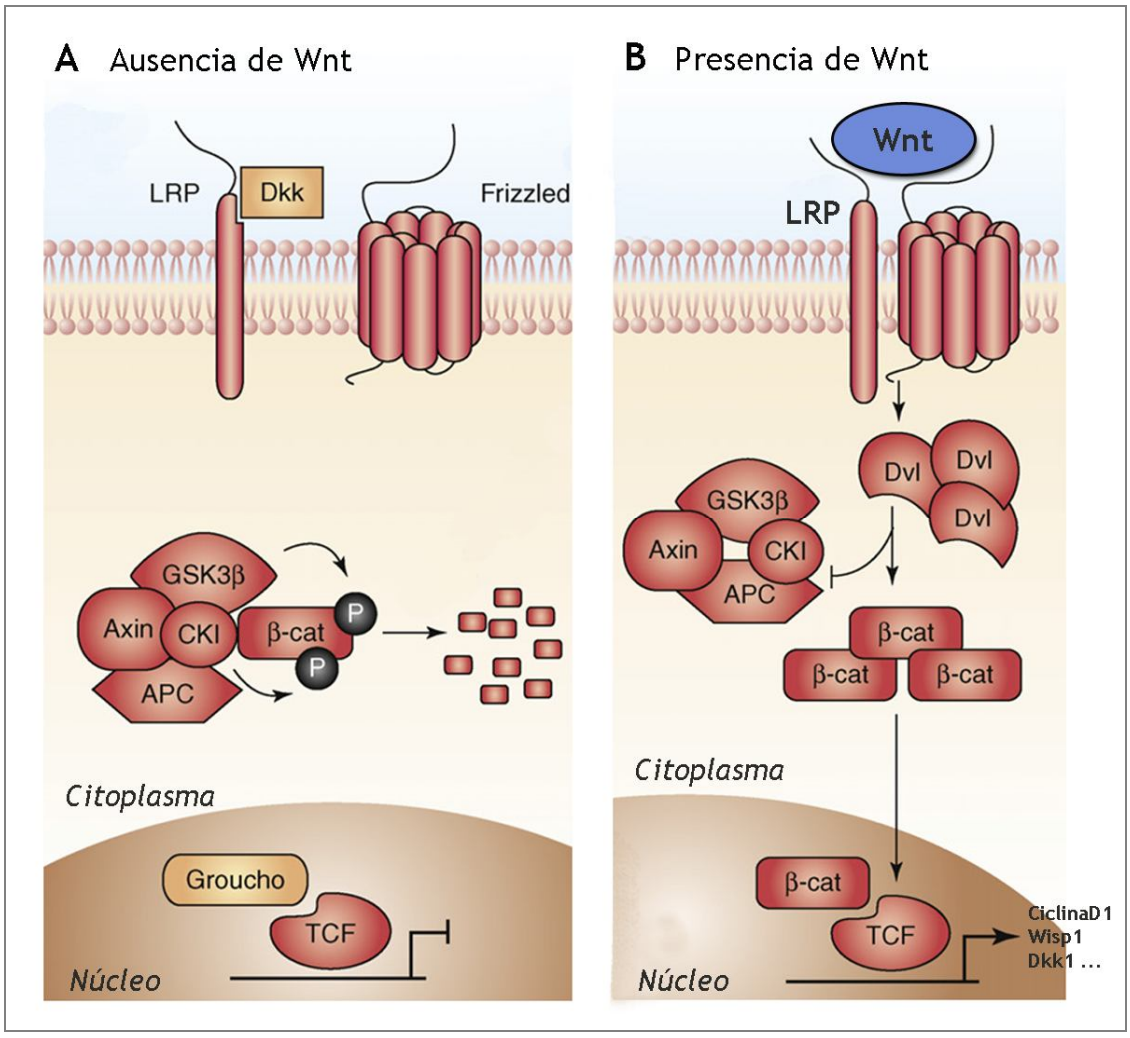


Figura 16. Vía de señalización intracelular Wnt. **A.** En ausencia de Wnt, la β-catenina citoplasmática es reclutada por el complejo de degradación GSK3β, que facilita la fosforilación y degradación proteolítica de β-catenina. **B.** En presencia de Wnt, Dvl inhibe la fosforilación de β-catenina, la cual se acumula en el citoplasma y se trasloca al núcleo, donde se une a los factores de transcripción TCF/LEF para activar la transcripción de los genes blanco. *(Adaptado de Christodoulides et al. 2008 [168]).*

3.2.3 PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS (BMPs)

Durante el desarrollo del sistema nervioso, las BMPs actúan como morfógenos pleiotrópicos, secretados por los centros de señalización dorsal para especificar las identidades dorsales en el desarrollo del tubo neural. Además, pueden promover indirectamente la proliferación vía la señalización Wnt, o la diferenciación a través del bloqueo directo del ciclo celular. Los ligandos se unen al complejo receptor (BMPR) que activa un complejo de transducción canónico (Smad), el cual se trasloca al núcleo para regular la transcripción génica (**Figura 17**). Los principales genes blancos de la señalización BMP son

los genes Ids, los cuales son miembros de la familia hélice-bucle-hélice (*helix-loop-helix*, HLH) pero carecen del dominio de unión al ADN [169,170]. La heterodimerización de los Ids con otros factores de transcripción HLH resulta en el transporte activo de tales complejos al núcleo y la inhibición de su unión al ADN [171]. Simultáneamente, los Ids pueden actuar como reguladores dominantes negativos que interfieren con las actividades transcripcionales de las proteínas proneurales en los progenitores neuronales [172]. Entre los cuatro miembros de la familia Id, Id1 parece ser específicamente requerido para la proliferación de células neuroepiteliales y para la activación precisa de la diferenciación neuronal en el estadio embrionario [170,173-175]. En ratones, Id1 es expresado en precursores neurales en proliferación en la ZSV, pero no se lo encuentra en células diferenciadas en estadios tempranos de la embriogénesis [176,177]. Id2 se expresa en neuronas tempranas durante el desarrollo del sistema nervioso y se sigue expresando en neuronas específicas en el cerebro adulto, sugiriendo que Id2 puede estar involucrado en otros procesos celulares, además de proliferación [178,179]. La expresión de Id3 está más distribuida a lo largo de la embriogénesis; está presente en varias regiones del embrión, incluyendo áreas del cerebro en desarrollo. Por último, los transcriptos de Id4 son detectados principalmente en tejidos neuronales [180,181].

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

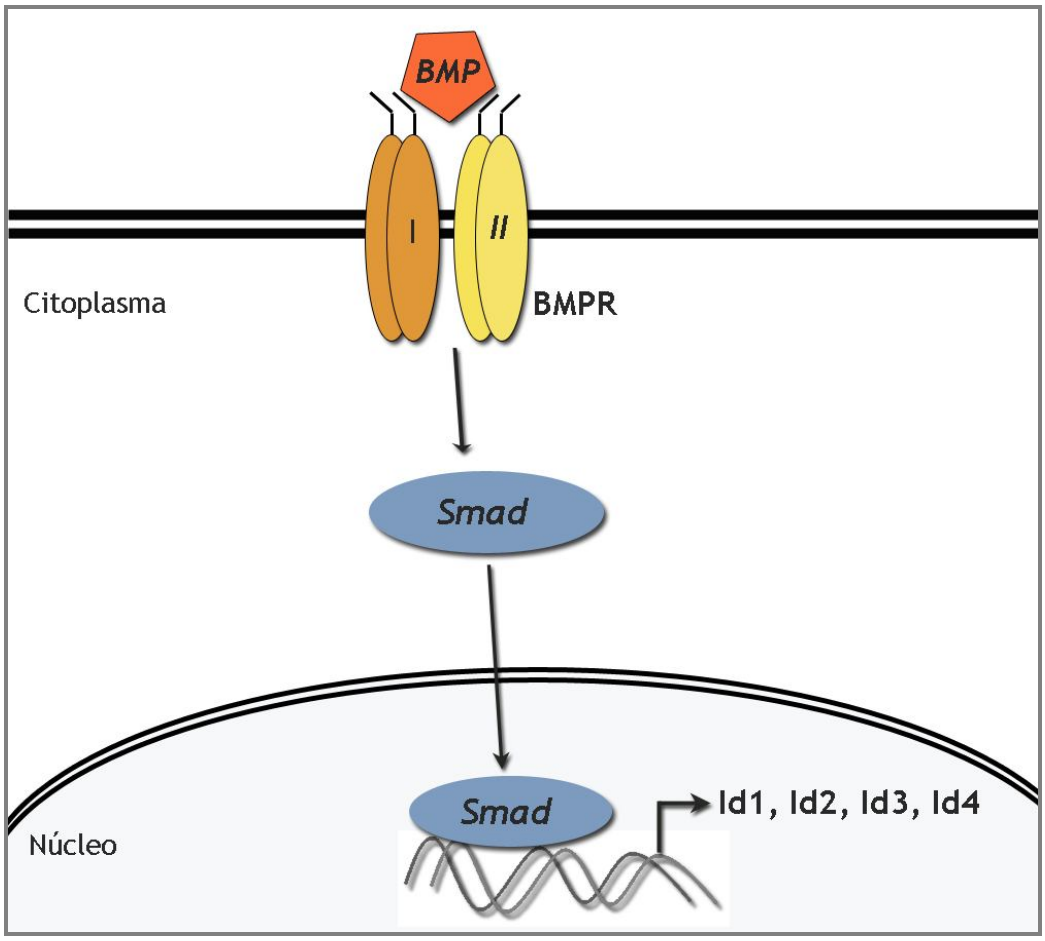


Figura 17. Señalización BMP. La unión del ligando (BMP) al complejo receptor (BMPR), formado por la heterodimerización de los receptores tipo I y II, activa a los mensajeros intracelulares (Smad), los cuales se traslocan al núcleo, donde se unen directamente a las secuencias específicas en los promotores de los genes blancos de BMP (Id1, Id2, Id3 e Id4) para regular su transcripción.

Basados en toda esta evidencia, es claro que la familia de genes Id tienen un rol importante en la proliferación y diferenciación de las células progenitoras neurales. En general, en el sistema nervioso de mamíferos, la expresión de Id1 e Id3 está localizada en los neuroblastos menos diferenciados, mientras que Id2 e Id4 se expresan en neuronas motoras e interneuronas. Ésto indica que la expresión de dos subclases (Id1 e Id3 por un lado, e Id2 e Id4 por otro) puede tener diferentes consecuencias fisiológicas, es decir, la especificación de diferentes estadios de diferenciación de células neuronales durante el desarrollo.

Noggin pertenece a una clase de polipéptidos que se unen a las BMPs y, consecuentemente, previene la activación de los receptores de BMP. En el cerebro adulto, las BMPs provocan acciones antiproliferativas y gliogénicas [182]. Las células ependimales del ventrículo expresan el factor Noggin, un antagonista competitivo de la unión del ligando BMP a

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

su receptor, lo cual promueve un aumento de la neurogénesis [183]. De esta manera, el balance de la señalización BMP regula la autorrenovación de las NSCs en las zonas neurogénicas del cerebro (**Figura 18**).

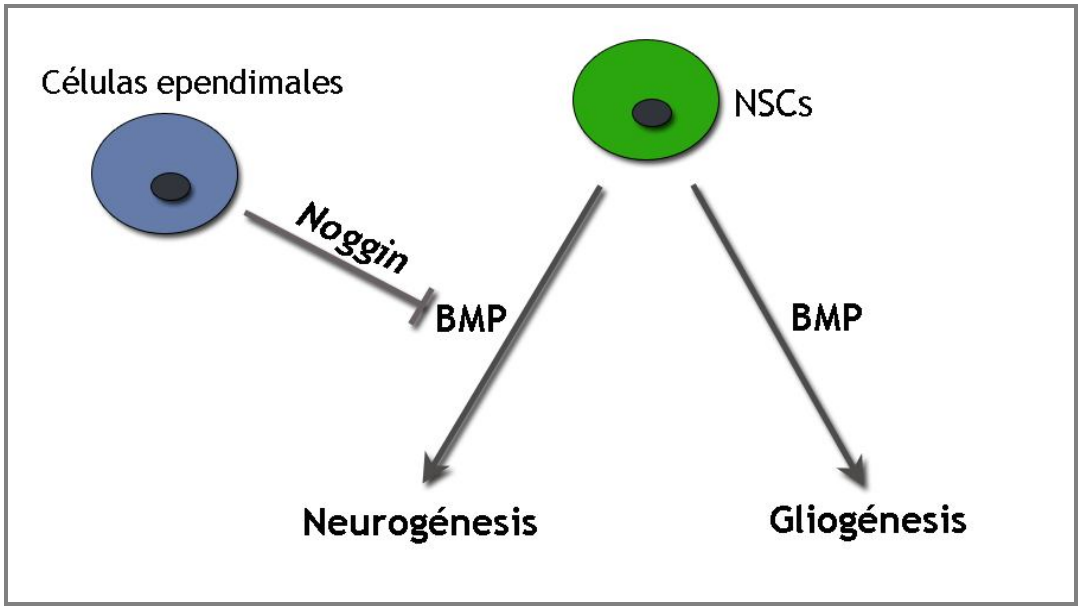


Figura 18. Rol propuesto de Noggin en promover el linaje neuronal de las NSCs en el cerebro adulto. *(Adaptado de Lim et al. 2000 [183])*

3.2.4 NOCTH

Notch es parte de un mecanismo de señalización que controla decisiones de destino celular, proliferación y apoptosis, durante el desarrollo y en la vida adulta [184,185]. La unión del receptor Notch al ligando Jagged y Delta, activa el clivaje enzimático del receptor Notch para producir un dominio intracelular Notch (NICD) activado que se trasloca al núcleo e interactúa con un complejo Mam/CBF1. El complejo activado promueve la transcripción de genes represores de linaje, de los cuales los mejor caracterizados pertenecen a las proteínas hairy/enhancer of Split (Hes) y represor relacionado a Hes (Herp). Estos genes represores son factores de transcripción hélice-bucle-hélice básico (bHLH) que regulan negativamente la expresión de factores de transcripción específicos de tejido, de esta manera regulando la diferenciación específica de linaje (**Figura 19**) [186,187].

En el sistema nervioso, los genes represores de linaje de la señalización Notch inhiben la transcripción de genes neurogénicos como lo es Mammalian achaete-scute homolog 1 (Mash1). Sin embargo, Mash1 promueve la expresión de ligandos Notch, de manera que

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

células expresando altos niveles de genes neurogénicos también secretan altos niveles de ligandos Notch, los cuales reprimen los programas neurogénicos en las células vecinas. Se piensa que este circuito de retroalimentación amplifica las pequeñas diferencias transcripcionales iniciales para producir una célula con un fuerte programa de especificación del linaje, y una célula adyacente con un fuerte programa de autorrenovación de células madre (**Figura 19**) [188].

Mientras que Notch está involucrado en el mantenimiento de la población de NSCs, también participa en la adquisición progresiva de características más gliales durante la transición de glia radial a célula madre adulta. Ésto podría explicar por qué la exposición a factores de diferenciación como BMP promueve la neurogénesis a partir de precursores de estadio temprano, pero induce gliogénesis a partir de progenitores de estadios posteriores. Ésto sugiere que la vía Notch podría ser usada para tomar decisiones binarias en diferentes tipos de progenitores, en estadios posteriores de maduración celular y plasticidad [182,188].

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

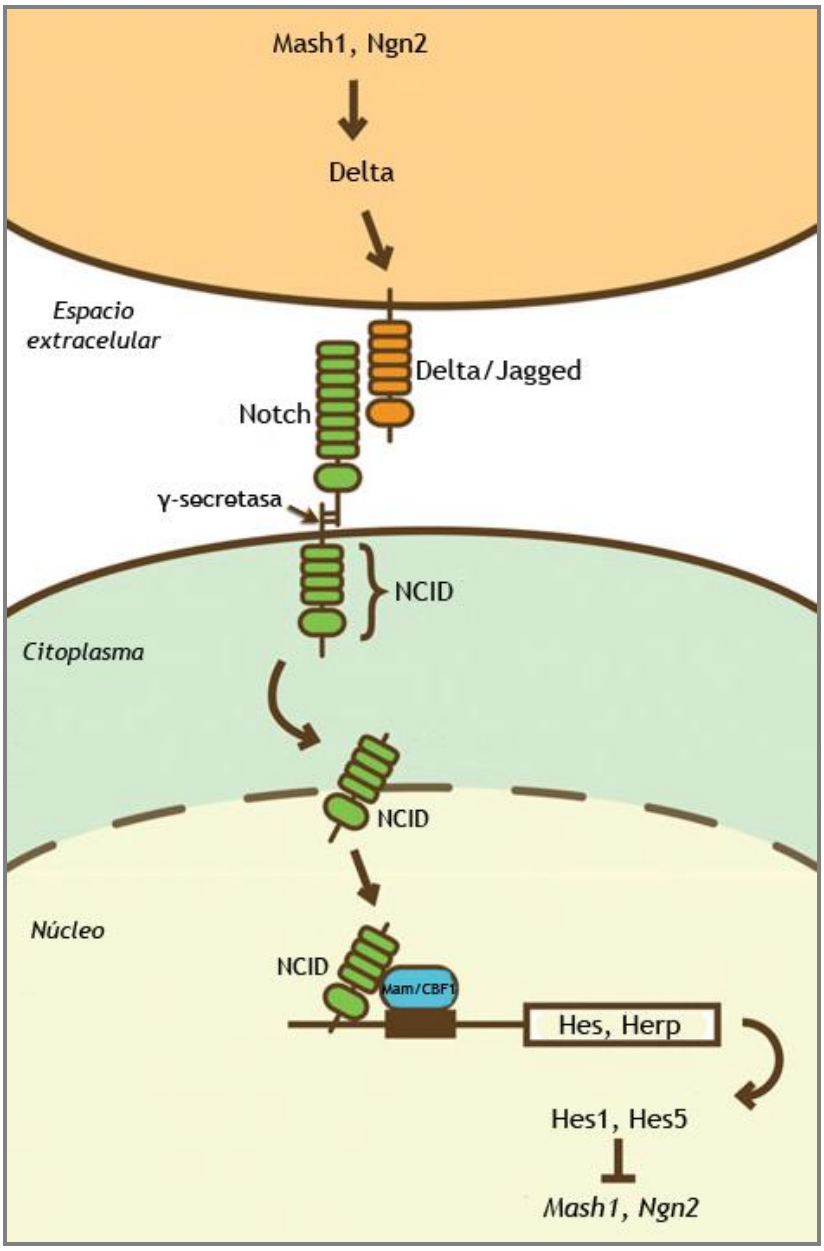


Figura 19. Señalización Notch en sistema nervioso. Los genes proneurales (Mash1 y Ngn2) activan el programa de diferenciación neuronal e inducen la expresión de Delta, el cual activa la señalización Notch en células vecinas. La activación de Notch libera el dominio intracelular (NCID), por acción de la γ-secretasa, el cual se trasloca al núcleo y forma un complejo con Mam/CBF1. Este complejo induce la expresión de los genes represores transcripcionales (Hes, Herp), los cuales reprimen la expresión de genes proneurales, llevando al mantenimiento de las NSCs. *(Adaptado de Kageyama et al. 2009 [189])*

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

4. NEUROGÉNESIS ADULTA

Las NSCs son definidas como células que poseen la capacidad de autorrenovarse y de generar los tres principales tipos celulares en el sistema nervioso central (SNC): neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (**Figura 20A**) [190-192]. En un principio, se creía que la generación de nuevas neuronas (neurogénesis) en los mamíferos estaba limitada a la fase prenatal; sin embargo, a lo largo de los años se descubrió que la neurogénesis también se llevaba a cabo en discretas áreas del cerebro adulto, y que las nuevas células neuronales generadas se originaban a partir de células madre del cerebro adulto [193-195].

La neurogénesis ocurre principalmente en dos regiones del cerebro adulto en varias especies: la ZSV de los ventrículos laterales y la ZSG del giro dentado (GD) del hipocampo (**Figura 20B**) [195]. De estas regiones, la ZSV posee el pool más grande de células progenitoras neurales en división. Las nuevas células neuronales generadas en la ZSV migran al bulbo olfatorio (BO) a lo largo de la cadena rostro migratoria (RMS), donde se diferencian en neuronas granulares y periglomerulares del BO (**Figura 20B,C**) [196-200]. En el giro dentado del hipocampo, las nuevas neuronas generadas en la ZSG migran a la capa granular, donde se diferencian en células neuronales y extienden proyecciones axonales al área CA3 (**Figura 20D**) [201-204].

En estas dos regiones, las NSCs tipo-gliales generan progenitores amplificadores transitorios altamente proliferativos que luego dan origen a precursores neuronales comprometidos con el destino [205-208]. Estos precursores (neuroblastos) migran a su destino final y se diferencian en neuronas postmitóticas, desarrollando una morfología dendrítica apropiada e integrándose sinápticamente al circuito preexistente [209].

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

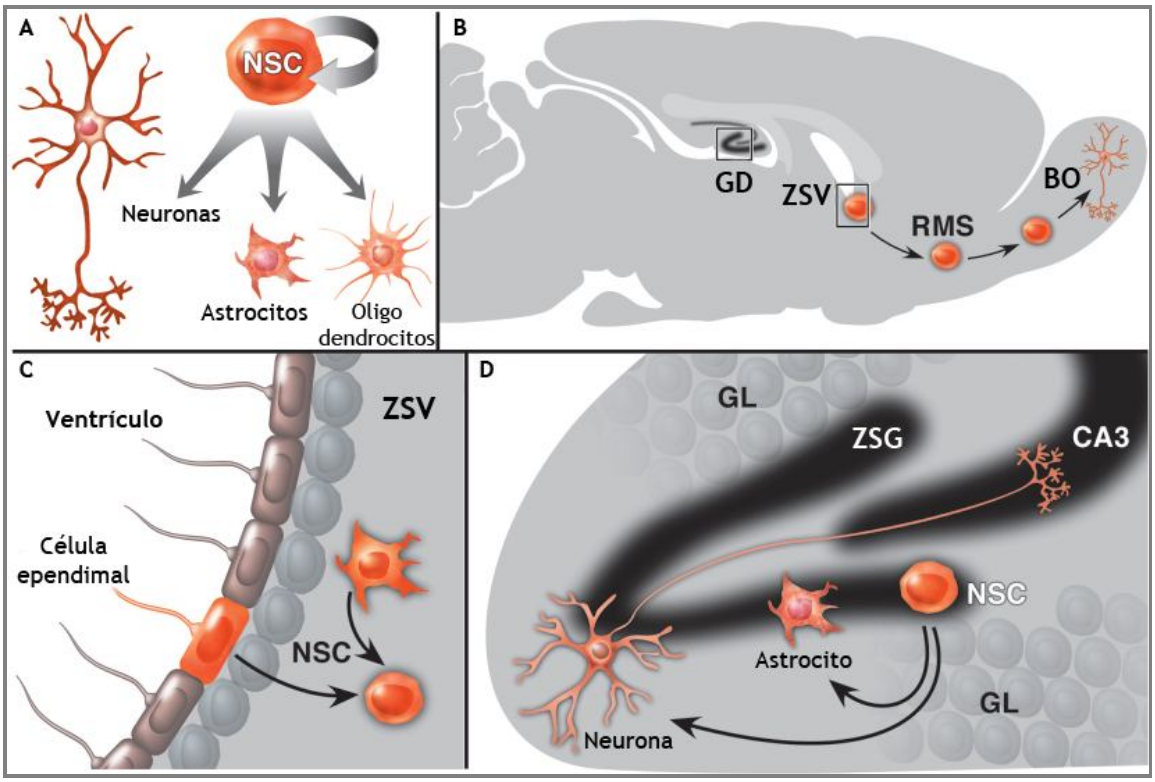


Figura 20. Neurogénesis y NSCs en el sistema nervioso central adulto. **A.** Las NSCs son células autorrenovables y multipotentes que generan neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. **B.** Áreas neurogénicas del SNC: el GD del hipocampo y la ZSV del ventrículo lateral. Las NSCs de la ZSV migran hasta el BO a través de la RMS, donde se diferencian en interneuronas. **C.** Teorías del origen celular de las NSCs de la ZSV: como células ependimales diferenciadas o como células tipo astrocitos. **D.** En el GD las nuevas neuronas son generadas a partir de las NSCs de la ZSG del hipocampo y se diferencian en células neurales y gliales en la capa granular del GD. *(Adaptado de Taupin et al. 2002 [195])*

La neurogénesis también puede ocurrir en otras áreas del cerebro adulto, aunque en menor proporción, como son el bulbo olfatorio, el área CA1, la neocorteza, el estriado, la amígdala, la sustancia nigra, el tercer ventrículo, el núcleo caudado, entre otros [210-212].

4.1 MECANISMOS MOLECULARES

Los mecanismos moleculares que controlan la especificación del destino celular neural en progenitores adultos son de gran interés debido a que nos enseñan cómo podríamos controlar el comportamiento de progenitores endógenos o trasplantados, para el tratamiento de enfermedades neurológicas.

Aunque los mecanismos moleculares de determinación del destino de las NSCs no son completamente entendidos, se ha vuelto gradualmente aparente que tanto las claves

extracelulares como los programas intracelulares están profundamente involucrados en la especificación del destino neuronal.

4.1.1 PAX6

Pax6 es un miembro de la familia Pax y es crucial para el desarrollo del SNC, ojo y páncreas [213-215]. Pax6 es expresado en patrones espacio-temporales específicos durante el desarrollo del cerebro y, es por eso, que se cree que está corriente arriba (*upstream*) de las redes de genes involucrados en el modelado del cerebro, la migración neuronal y la formación de circuitos neurales [216,217].

Pax6 juega un rol importante promoviendo la neurogénesis. Por tal motivo, la pérdida de Pax6 resulta en progenitores neurales con reducido potencial neurogénico [218,219], mientras que su sobreexpresión *in vitro* dirige a las células hacia un destino neuronal [219]. Los mecanismos por los cuales Pax6 promueve la neurogénesis son todavía desconocidos.

Durante el desarrollo del SNC, la expresión de Pax6 comienza temprano en las células neuroepiteliales en proliferación, y luego se expresa en las células progenitoras neurales de la zona ventricular [220]. Postnatalmente, la expresión de Pax6 es detectada en la ZSV de los ventrículos laterales y la ZSG del hipocampo, lugares en los cuales la neurogénesis tiene lugar. En la ZSG, Pax6 se expresa en células madre neurales y progenitores neurales que tienen morfología de glía radial y son positivas para el marcador de la proteína acídica fibrilar glial (GFAP) y nestina, como también en una pequeña población de progenitores tardíos que son positivos para la molécula de adhesión celular neural poli-sialidada (PSA-NCAM) [221-223].

4.1.2 FACTORES bHLH

Experimentos recientes han demostrado que la proliferación, especificación y diferenciación de las NSCs están controladas por un grupo de factores de transcripción con motivo hélice-bucle-hélice básico (bHLH) [223]. En una NSC que está destinada a convertirse en una neurona, la transición de proliferación a neurogénesis está acompañada por un incremento en la expresión de factores bHLH proneurales. Se sabe que la expresión de las proteínas bHLH es necesaria y suficiente para promover la generación de neuronas diferenciadas a partir de células progenitoras indiferenciadas [224-228]. Este compromiso de destino neuronal, dirigido por bHLH, se desarrolla de una manera temporalmente sucesiva, desde proteínas bHLH ampliamente proneurales a proteínas especificadoras neuronales [229].

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

La neurogénesis es mediada por dos amplias categorías de factores bHLH. Los factores bHLH proneurales, entre los cuales se encuentran Mash1, mammalian atonal homolog 1 (Math1), y neurogenina 1 y 2 (Ngn1 y Ngn2), los cuales están involucrados en la iniciación de la neurogénesis; y los factores bHLH de diferenciación, como son NeuroD1, NeuroD2, Math2 y T-box brain 1 y 2 (Tbr1 y Tbr2), los cuales facilitan la diferenciación terminal [227,230,231].

Estas proteínas bHLH se unen al ADN formando heterodímeros con las proteínas E, e interactuando con coactivadores para reclutar un gran complejo, incluida la maquinaria transcripcional, para promover la expresión de los genes neuronales blanco. Por el contrario, las proteínas bHLH son reguladas negativamente por otro grupo de factores bHLH, como son los factores Id y Hes, los cuales se unen de manera competitiva a las proteínas E, impidiendo la formación de heterodímeros. Se sabe que la expresión de Hes1, Hes5, Id1 e Id3 es inducida por la señalización Notch y BMP, ambas vías involucradas en la autorrenovación de las NSCs y gliogénesis, a través de la inhibición de las señales neurogénicas (**Figura 21**) [232-235].

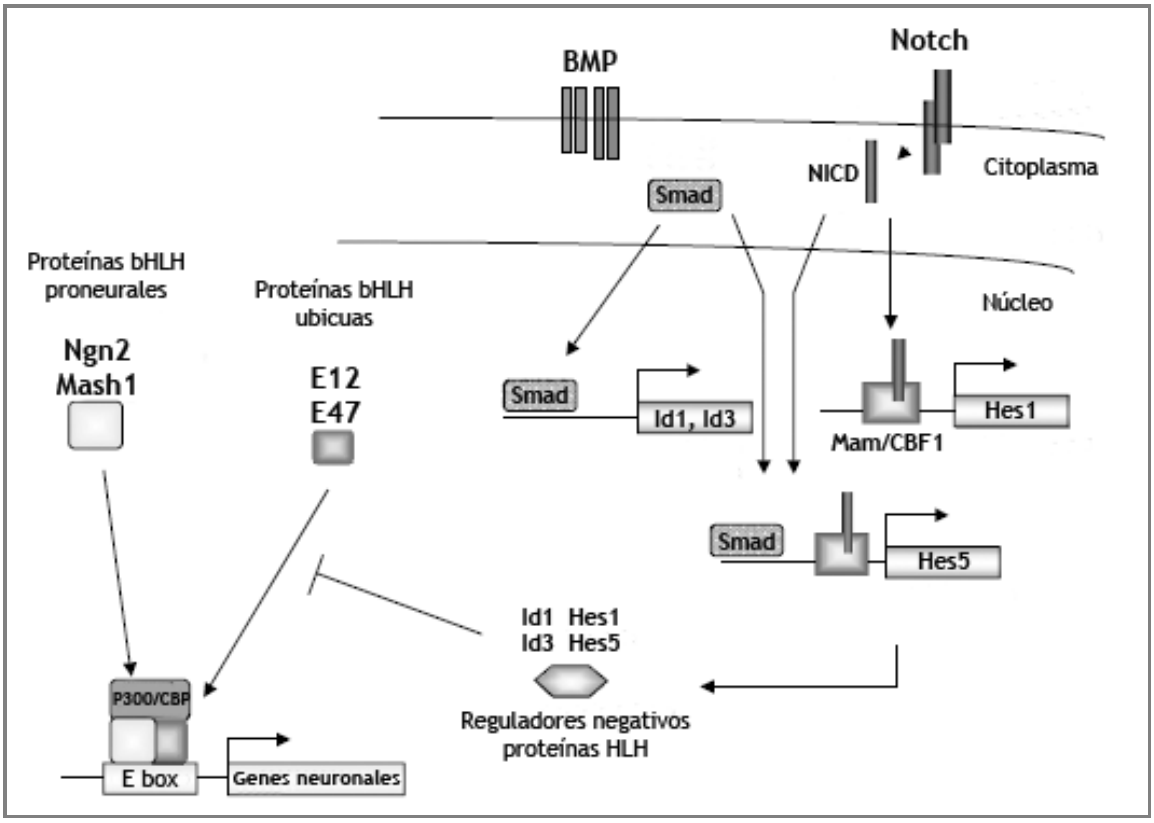


Figura 21. Regulación de la especificación y diferenciación neuronal por los factores bHLH mediante un balance de factores bHLH antagónicos.

4.1.3 NEUROTRANSMISORES

GABA (ácido gamma-aminobutírico), el principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC maduro, tiene un rol bien establecido en la regulación de la integración funcional de nuevas neuronas en redes inmaduras y maduras, tanto en el embrión como en el adulto [236,237]. Recientemente, GABA ha surgido como un regulador clave que controla múltiples fases de la neurogénesis adulta [236,238]. En los mecanismos de transducción de señales mediados por GABA, las señales extracelulares son transformadas en intracelulares a través de subtipos de receptores GABA (GABAR), ionotrópicos ($GABA_AR$ y $GABA_CR$) y metabotrópicos ($GABA_BR$).

Los receptores $GABA_A$ son predominantemente canales iónicos permeables a cloruro (Cl^-) y la polaridad de la acción de GABA depende del gradiente de Cl^- a través de la membrana, el cual está determinado por la expresión regulada de los transportadores de Cl^-, el co-transportador de Na^+, K^+, $2Cl^-$ (NKCC1) y el co-transportador K^+/Cl^- (KCC2) [237,239,240]. En la neurogénesis adulta, debido a la abundancia inicial del importador de Cl^- NKCC1 y la baja expresión del exportador de Cl^- KCC2, las concentraciones internas de Cl^- son mayores en neuronas inmaduras que en neuronas maduras. El alto potencial de equilibrio resultante para Cl^- en neuroblastos provoca que GABA, a través de sus receptores $GABA_A$, despolaricen a las células inmaduras luego de la determinación del destino celular. Finalmente, se sabe que este efecto despolarizante de GABA en neuronas juveniles y progenitores regula etapas claves de la neurogénesis tales como proliferación, migración y morfogénesis, en las zonas neurogénicas [241,242].

GABA también está involucrado en estadios tardíos de la neurogénesis adulta, orquestando la formación de sinapsis y el crecimiento dendrítico de neuronas inmaduras. La regulación de estos procesos tiene lugar cuando se produce la reversión del gradiente de Cl^- a través del aumento de los niveles de KCC2 en las neuronas inmaduras, momento en el cual GABA pasa a tener un efecto hiperpolarizante [240,243].

Otro neurotransmisor, glutamato, es el más prominente en el SNC de mamíferos y lleva a cabo su acción a través de receptores ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y kainato, y metabotrópicos mGluR. En los primeros estadios de la neurogénesis adulta en la ZSV, se ha detectado la expresión de receptores metabotrópicos, regulando de manera positiva la proliferación de progenitores; e ionotrópicos, los cuales actúan junto con GABA para disminuir la migración de los neuroblastos [244-246]. En estadios posteriores de la neurogénesis, la señalización glutamatérgica juega un rol importante en la regulación de la supervivencia de neuroblastos, dependiente de receptores ionotrópicos NMDA 1 (NR1), y en la plasticidad sináptica de neuronas inmaduras a través de los receptores NMDA ionotrópicos 2B (NR2B) [247-251].

Por último, la acetilcolina (ACh) produce sus efectos en el SNC a través de dos subtipos de receptores: muscarínicos (mAChRs) y nicotínicos (nAChRs). Las subunidades de los

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

nAChRs están entre las primeras proteínas de membrana en aparecer durante el desarrollo del SNC y se han sugerido roles importantes en la comunicación celular para estos receptores durante la migración y diferenciación de células precursoras neurales *in vitro* e *in vivo* [252-254].

4.1.4 CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN

Se ha demostrado que factores difusibles afectan el establecimiento inicial del nicho neurogénico, influenciando la autorrenovación y las decisiones de destino celular. Shh, Wnt, BMP y Notch son factores extracelulares que posiblemente actúan de manera local. La señalización Shh es requerida para el establecimiento y el mantenimiento de grupos quiescentes de células madre en el cerebro postnatal [255]. En el cerebro adulto, la vía de Notch está activa en células madre neurales y células proliferativas para mantener la autorrenovación y prevenir la diferenciación terminal. De manera que la sobreexpresión de Notch aumenta el número de progenitores quiescentes en la ZSV a costa de los neuroblastos migratorios; y su ablación conduce a la pérdida de características de NSCs y a la diferenciación en neuronas granulares y periglomerulares [256,257]. Se ha demostrado que las BMPs instruyen a las NSCs hacia el linaje glial, y Noggin bloquea la diferenciación glial de las NSCs a favor de la neurogénesis [183]. Finalmente, se sabe que la señalización Wnt controla la diferenciación neuronal de las NSCs y la proliferación de los progenitores neuronales [164].

4.1.5 MARCADORES ESPECÍFICOS DE NEUROGÉNESIS

En la neurogénesis adulta, tanto en la ZSG como en la ZSV, se pueden distinguir varias etapas, a través de las cuales los progenitores primarios se desarrollan lentamente en neuronas [258]. En una primera etapa, tenemos a las NSCs, llamadas células tipo 1 o células B, las cuales se dividen lentamente, expresan Sox2, tienen características astrocíticas y expresan marcadores gliales como son nestina, GFAP y el transportador de glutamato y aspartato (GLAST) [207,259]. Los progenitores intermedios, llamados neuroblastos, células tipo 3 o células A, proliferan activamente y expresan algunos marcadores neuronales como son PSA-NCAM, doblecortina (DCX) y Tbr2 [260,261]. Sin embargo, estudios recientes han sugerido que existiría una subpoblación de células $GFAP^+$ que también expresarían el marcador neuronal Mash1, nestina y Sox2, la cual representaría un estado intermedio o células amplificadoras transitorias, células tipo 2 o C, que ya están comprometidas hacia el linaje neuronal [262]. Después de la mitosis final de las células progenitoras intermedias, las

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

nuevas células generadas comienzan a madurar como neuronas, pasando por neuronas inmaduras, con expresión de marcadores característicos como son βIII-tubulina, NeuroD1, Calretinina, entre otros; para finalmente diferenciarse de manera terminal a neuronas postmitóticas maduras, con expresión de la proteína de núcleo neuronal (NeuN), enolasa específica de neurona (NSE), la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2), sinaptofisina, calbindina, Tbr1, NeuroD2, entre otros (**Figura 22**) [263,264].

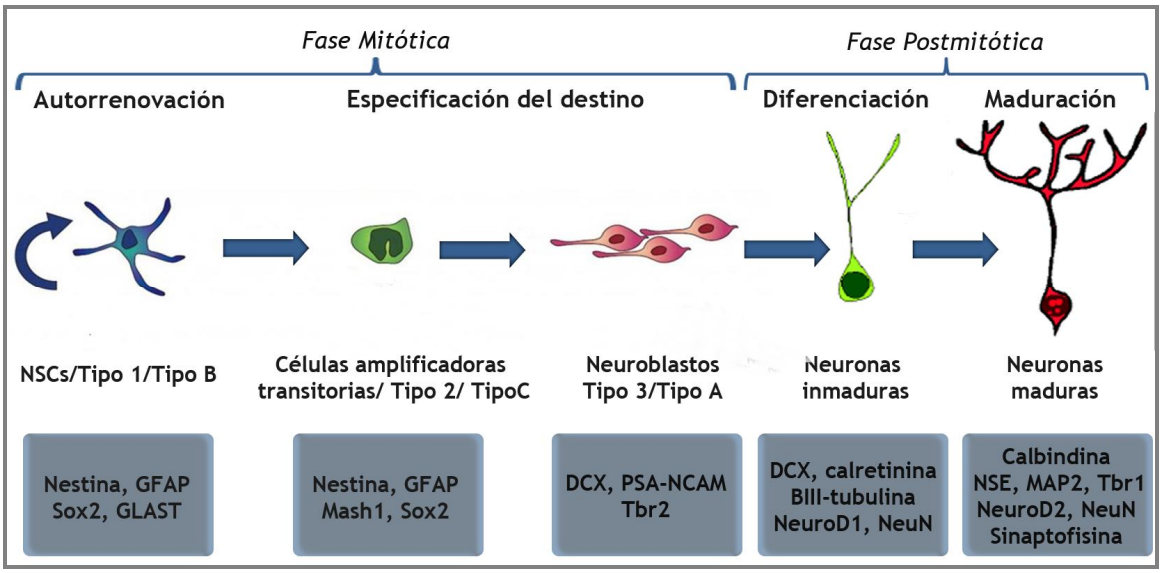


Figura 22. Marcadores específicos de las distintas etapas de la neurogénesis adulta.

HIPÓTESIS

Basados en algunas similitudes encontradas entre la neurogénesis adulta y la diferenciación neural a partir de hASCs, se plantea como hipótesis de trabajo que los factores morfogenéticos y de transcripción involucrados en la regulación de la neurogénesis adulta y en procesos del desarrollo neural, podrían intervenir en los procesos de diferenciación en los cuáles a partir de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo se obtienen células de fenotipo neural.

OBJETIVOS

1. OBJETIVOS GENERALES

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Determinar si los mecanismos moleculares que regulan la diferenciación neural a partir de células madre mesenquimales de tejido adiposo son los mismos que aquellos que regulan la neurogénesis adulta.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

De ese objetivo general, se derivan los siguientes objetivos específicos:

- Corroborar que las células madre derivadas de tejido adiposo tienen propiedades de células madre.
- Evaluar, inmunocitoquímicamente, el grado de diferenciación neuronal alcanzado por las hASCs después del protocolo de diferenciación.
- Estudiar la expresión diferencial de genes involucrados en las cascadas de señalización intracelular de ciertos factores morfogenéticos como Shh, BMP, Wnt, Notch, como también la de genes proneurales y de neurotransmisores, en relación a su participación en los procesos de diferenciación neural de hASCs.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. DONANTES

Las muestras de tejido adiposo subcutáneo humano fueron obtenidas como material de descarte luego de cirugías estéticas de abdomen (abdominoplastía) y de mamas (mamoplastía). Las mismas fueron donadas, bajo consentimiento informado de los pacientes y la aprobación del Comité de Ética y Protocolos de Investigación (CEPI) del Hospital Italiano de Buenos Aires, por 23 pacientes sanos, de los cuales 17 correspondían a mujeres y 6 a hombres, en un rango de edad entre 23 y 60 años (**Figura 23**).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

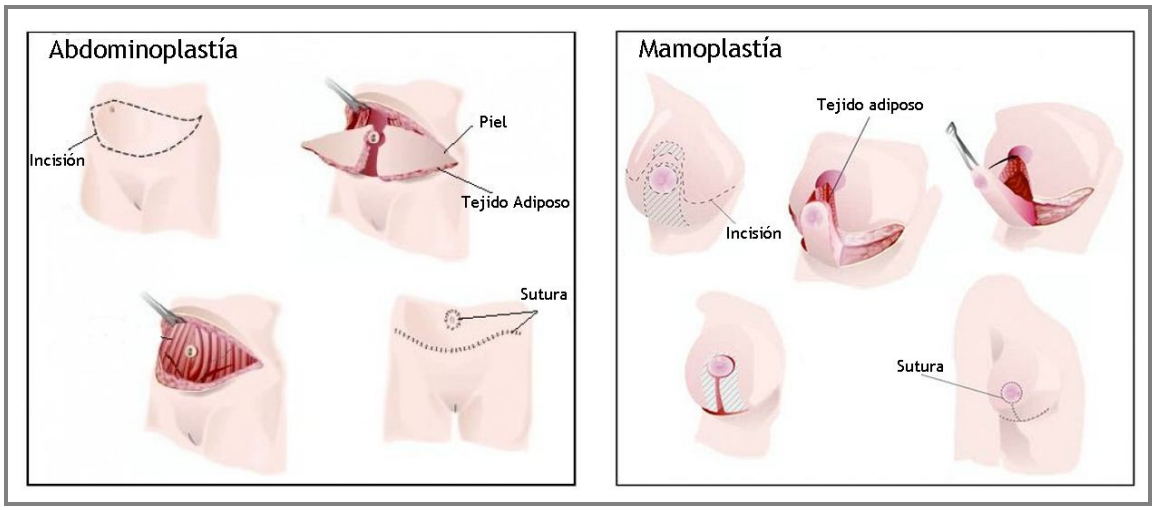


Figura 23. Cirugías a partir de las cuales se obtuvieron las muestras de tejido adiposo.

2. AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN ESTROMAL VASCULAR

Los métodos para aislar células a partir de tejido adiposo fueron establecidas en los años 60, y luego han sido adaptadas para aislar células de tejido adiposo humano [265-269]. El tejido adiposo se transporta en un tubo estéril conteniendo medio de transporte, y luego se realizan sucesivos lavados con solución salina balanceada de Hank (HBSS, Sigma, Buenos Aires, Argentina) con antibióticos (ATB, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 0.25 µg/ml anfotericina, Gibco, California, USA), para remover todo el exceso de sangre que contenga la muestra. Todo el material fibroso y restos de vasos sanguíneos fueron cuidadosamente diseccionados y descartados. El tejido remanente fue cortado minuciosamente y digerido enzimáticamente con 0,1% de Colagenasa Tipo I (Gibco) a 37ºC con agitación de 250 rpm durante 45 minutos. La actividad enzimática fue neutralizada con dos veces el volumen de medio estándar conteniendo medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco) con 20% de suero fetal bovino (SFB, Gibco) y 1% de ATB, y luego centrifugado a 400 g durante 12 minutos. El sobrenadante conteniendo los adipocitos maduros fue descartado. La SVF depositada en el fondo del tubo fue resuspendida con medio estándar (**Figura 24**). Se realizó el recuento celular y se evaluó la viabilidad celular utilizando el ensayo de exclusión con Azul Tripán o el test Bromuro de Etidio/Naranja de Acridina, utilizando la captación diferencial de estos fluorocromos de unión al ADN.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

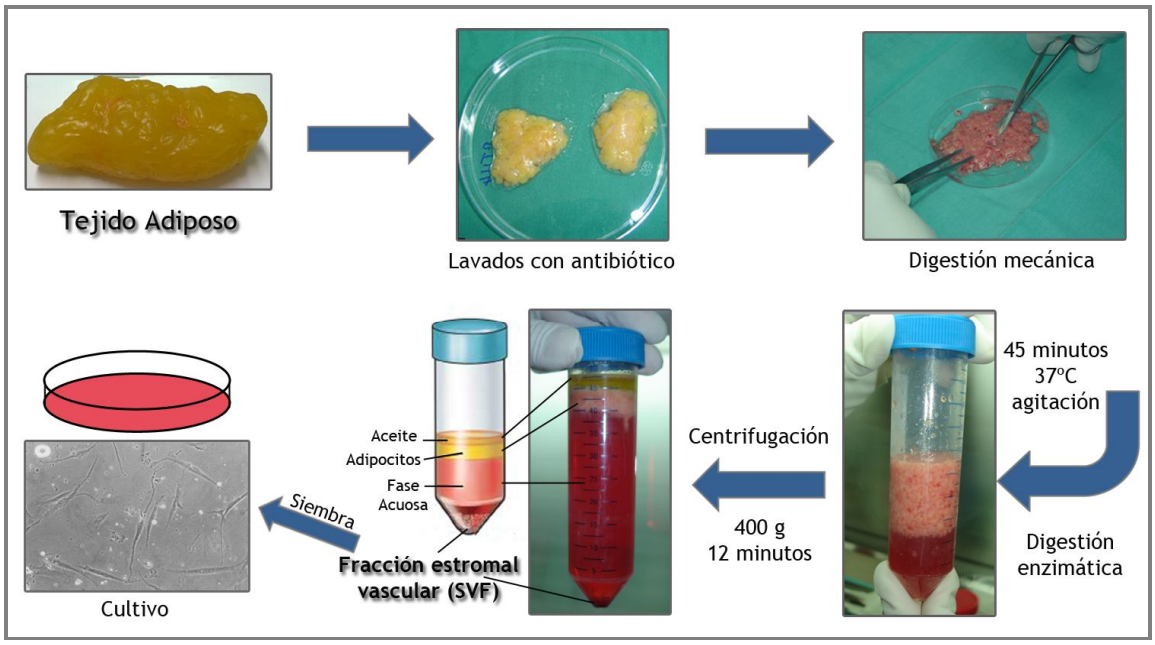


Figura 24. Procedimiento para el aislamiento de la SVF de tejido adiposo humano.

3. CULTIVO CELULAR

Las células de la SVF fueron sembradas en placas de cultivo (Nunc International, Roskilde, Dinamarca) en una proporción de 8000 a 10000 células/cm2. Los cultivos de la SVF fueron incubados en una estufa gaseada a 37ºC, en una atmósfera húmeda con 5% CO_2. Luego de 48 hs, las células no adherentes fueron removidas a través de un cambio de medio. Una vez que las células primarias (Pasaje 0) alcanzaron el 80-100% de confluencia, las mismas fueron repicadas a través de una digestión enzimática con tripsina-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (0.25%, Sigma) a 37°C durante 5 min. Luego las células fueron centrifugadas y lavadas con medio estándar para remover la tripsina, para finalmente ser expandidas en placas de cultivos más grandes. El medio de cultivo fue cambiado dos veces por semana.

Una población celular homogénea de hASCs fue obtenida luego de 2 a 3 semanas de cultivo. Las células en cultivo en pasajes tempranos (3 a 5) fueron utilizadas para realizar los diferentes experimentos.

4. POTENCIAL MULTILINAJE

Para corroborar el potencial multilinaje de hASCs, se llevaron a cabo los experimentos de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica [42,73,270].

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

4.1 Diferenciación Adipogénica

Para la diferenciación adipogénica, las hASCs (pasaje 3-5) fueron sembradas y cultivadas en monocapa hasta que alcanzaron 60% de confluencia. Los cultivos subconfluentes fueron incubados en medio de inducción adipogénico [25,86,267,271] conteniendo DMEM alta glucosa (Gibco), 10% SFB, 1% ATB, 1 µM dexametasona (Sigma), 0.5 mM de isobutilmetilxantina (IBMX, Sigma), 10 µM de insulina (Gibco) y 200 µM indometacina (Sigma), durante 2 días, y luego en medio de mantenimiento adipogénico conteniendo DMEM Alta Glucosa, 10% SFB, 1 µM dexametasona y 10 µM de insulina durante otros 2 días. La inducción fue llevada a cabo cultivando las células 2 días en medio de inducción, luego 2 días en medio de mantenimiento, y así sucesivamente hasta completarse los 21 días de protocolo. Los cultivos control fueron mantenidos en medio estándar durante los 21 días de diferenciación.

La adipogénesis fue evaluada utilizando la coloración de Oil Red O, para lo cual las células fijadas en 4% de paraformaldehído fueron incubadas en solución de Oil Red O 0,5% (Biopack, Buenos Aires, Argentina) durante 20 a 50 minutos.

4.2 Diferenciación Osteogénica

Para la diferenciación osteogénica, las células del pasaje 3-5 fueron sembradas a una densidad de 3000 células/cm^2 e incubadas en medio estándar hasta alcanzar 60% de confluencia. El medio fue reemplazado con medio de inducción osteogénico [272,273], el cual consiste en medio estándar suplementado con 10 mM β-glicerofosfato (Sigma), 50 µM ascorbato-2-fosfato (Sigma), 100 nM dexametasona. El medio osteogénico fue cambiado dos veces por semana hasta completarse los 21 días de diferenciación.

Los cultivos control fueron mantenidos en medio estándar. Al día 21, las células fueron fijadas en etanol 70% frío durante 60 minutos y luego la diferenciación osteogénica fue evaluada incubando las células fijadas durante 30 minutos en la solución acuosa de Rojo Alizarina al 2% (Biopack).

4.3 Diferenciación Condrogénica

Para la diferenciación condrogénica, se utilizaron dos sistemas de cultivo para obtener el entorno tridimensional necesario para esta diferenciación: en micromasa y en pellet [25,274,275]. En el primero de ellos, se sembraron en una placa de cultivo 4 gotas de 10 µl conteniendo 100.000 células cada una, se incubó la placa con las microgotas durante 2 horas

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

en la estufa gaseada a 37ºC, y a continuación se agregó el medio de inducción condrogénico (**Figura 25A**). En el segundo sistema, las hASCs fueron ligeramente centrifugadas en un tubo cónico de polipropileno de 15 ml (Nunc) para formar pequeños pellets y cultivarlos 21 días en el medio condrogénico (**Figura 25B**). Este medio consiste en medio estándar suplementado con 20 µg/ml factor de crecimiento transformante β1 (TGF-β1, R&D System), 40 µg/ml L-prolina (Sigma), 50 µg/ml ácido ascórbico (Sigma), 100nM dexametasona, 100 µg/ml piruvato de sodio (Sigma), 6.25 mg/ml insulina, 6.25 mg/ml transferrina (Sigma) y 6.25 ng/ml selenito de sodio (Sigma). El medio de inducción fue renovado cada 3 días durante los 21 días de protocolo.

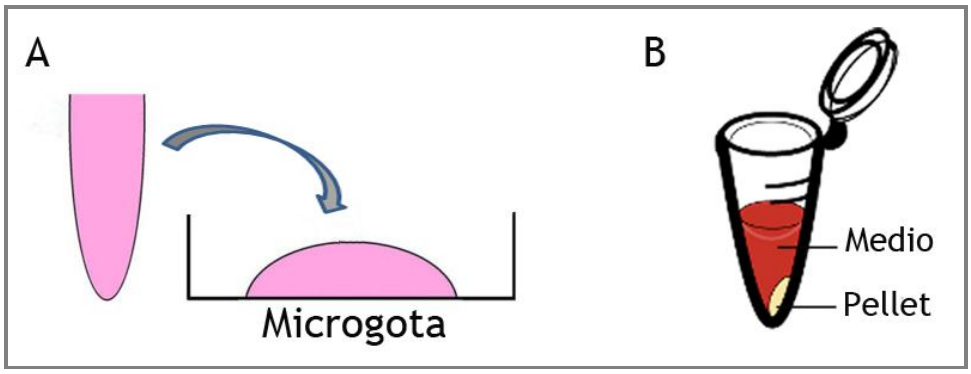


Figura 25. Sistemas de cultivo utilizados para la diferenciación condrogénica. **A.** Cultivo en micromasa. **B.** Cultivo en pellet.

Los acúmulos o pellets condrogénicos fueron fijados en 4% de paraformaldehído durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron incluidas en parafina, cortadas con micrótomo y las secciones teñidas con la solución de Azul de Toluidina al 1% (Biopack).

5. DIFERENCIACIÓN NEURONAL

La diferenciación neuronal de 12 muestras de hASCs se inició en los pasajes 3-5, usando una modificación de protocolos de inducción neuronal previamente descriptos [25,276-279]. Las células fueron sembradas en placas hasta que estuvieran subconfluentes y luego sometidas al protocolo de diferenciación neuronal, el cual consiste en dos pasos: preinducción e inducción.

La preinducción fue llevada a cabo durante 48 horas luego de descartar el medio estándar, lavar las células y agregar el medio de preinducción conteniendo medio estándar suplementado con 1 mM ß-mercaptoetanol (BME, Riedel, De Haën, Alemania). Luego, este medio de preinducción es reemplazado por el medio de inducción neuronal. La composición

del medio neuronal consta de DMEM suplementado con los siguientes agentes diferenciadores y factores tróficos: 10^{-6}M de ácido retinoico (RA, Sigma), 100 µM de hidroxianisola butilada (BHA, Sigma), 10 ng/ml factor de crecimiento epidérmico (EGF, Gibco) y 10 ng/ml factor bFGF (Gibco). Las células fueron incubadas en este medio durante 14 días, con reemplazo total del medio cada 3 días, y monitoreadas continuamente durante el protocolo de inducción neuronal (**Figura 26**). Al día 14, las células fueron lisadas para realizar la extracción de ácido ribonucleico (ARN) o proteínas o fijadas para análisis inmunocitoquímico. Una placa de cultivo de hASCs sin inducir fue analizada también en cada experimento como control del mismo.

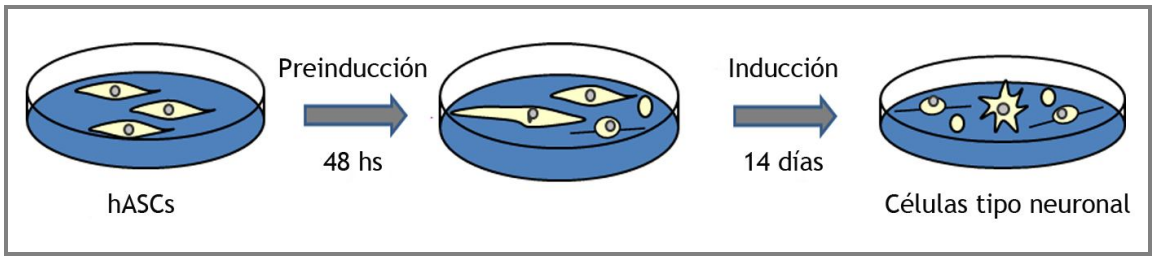


Figura 26. Protocolo de diferenciación neuronal.

6. EVALUACIÓN DE VESÍCULAS PRESINÁPTICAS: FM 1-43

Para visualizar si existía formación y acumulación de vesículas sinápticas, las hASCs diferenciadas y sin diferenciar, como también un cultivo de fibroblastos humanos (control negativo) y la línea celular PC12 diferenciada ampliamente utilizada como modelo de diferenciación neuronal (control positivo), fueron teñidos con el colorante fluorescente FM1-43 ((N-3-triethylammonmpropyl)-4-(4(dibutylamino) styryl) pyridinium dibromide, Molecular Probes, Oregon, USA). Para ello, se retiró todo el medio de cultivo de la placa y se lavó las células con el medio libre de calcio y magnesio (HBSS-CMF, Gibco), para evitar que estos cationes aceleren la endocitosis del colorante, resultando en una escasa selectividad. Luego, las hASCs son cargadas con 15 µM de FM1-43 en una solución extracelular despolarizante (70mM K^+) durante 90 segundos, protegiéndolas de la luz. Este colorante es capturado por las vesículas durante la endocitosis, haciéndolas fluorescentes. Después, las células fueron lavadas en una solución con baja concentración de Ca^{+2} por 5-10 minutos, para eliminar el excedente de colorante. Las placas de cultivo fueron visualizadas bajo el microscopio de fluorescencia (NIKON ECLIPSE E400). Este método es ampliamente utilizado para estudiar el reciclado de vesículas sinápticas.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

7. INMUNOCITOQUÍMICA

Las hASCs diferenciadas y sin diferenciar fueron fijadas con 4% de paraformaldehído a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS) durante 15 minutos para luego realizar el bloqueo con suero (Power Block, Biogenex) durante 10 minutos, con el objetivo de prevenir la unión inespecífica del anticuerpo. Posteriormente, las placas fueron incubadas con los anticuerpos primarios, en cámara húmeda, a 4ºC durante la noche. Luego de un lavado con PBS para retirar todo exceso de anticuerpo, las placas fueron incubadas con el kit avidina/biotina conjugados con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) o Texas Red (1:50, 1:200, Vector Laboratories, Burlingame, USA) en cámara húmeda y a temperatura ambiente durante 1 hora, con el objetivo de marcar los anticuerpos. En algunas muestras, los núcleos fueron contracoloreados con el fluorocromo Hoechst 33258 (Sigma) durante 20 minutos.

Para el control de especificidad de la señal obtenida, se mantuvieron las mismas condiciones excepto que los anticuerpos primarios fueron omitidos, reemplazándolos por PBS.

Previo a la diferenciación neuronal, se caracterizaron las hASCs con marcadores típicos de MSCs, utilizando los anticuerpos CD29 (1:50, integrina β1, Chemicon International, Inc., California, USA), CD34 (1:20, Abcam, Cambridge, UK), CD45 (1:20, Abcam), CD90 (1:10, Thy-1, Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA) y Stro-1 (1:100, R&D System, Minneapolis, USA).

Antes y luego del protocolo de inducción neuronal, las células fueron marcadas con los siguientes anticuerpos primarios, correspondientes a marcadores neuronales y gliales, anti-nestina (1:200, Chemicon), anti-GFAP (1:100, Chemicon), anti-A2B5 (1:200, Chemicon), anti-NeuN (1:200, Chemicon), anti-NF200 (neurofilamento 200 KDa, 1:100, Chemicon), anti-sinaptofisina (1:25, Dako, Glostrap, Denmark) y anti-ßIII-tubulina (1:100, Chemicon).

Se utilizaron como controles negativos líneas celulares o tejidos que no expresan los distintos marcadores y como control positivo cortes de cerebro de ratas neonatas y adultas para los distintos marcadores neuronales y gliales.

Las placas fueron examinadas bajo el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400) y las imágenes fueron captadas por una cámara digital acoplada al mismo (Nikon Coolpix E4500). Para cada marcador, se fotografiaron 5 campos aleatorios no superpuestos (± 60 células por campo) por cada placa analizada. Los datos son presentados como un porcentaje de células expresando el marcador positivo entre las células totales marcadas. Todos los ensayos fueron repetidos 3 a 6 veces en experimentos independientes.

El programa ImageJ (National Institute of Health, USA) fue utilizado para pseudo-colorear las imágenes, ajustar el contraste y agregar las barras de escala.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

8. WESTERN BLOT

8.1 Extracción y Cuantificación de Proteínas

Las proteínas totales fueron obtenidas a partir de las hASCs diferenciadas y sin diferenciar usando buffer de lisis RIPA (20 mM de Tris HCl pH=7,4, 2 mM de EDTA, 137 mM de NaCl, 10% de glicerol, 0,1% de SDS, 0,5% de deoxicolato de sodio y 1% de tritón X100) suplementado con inhibidores de proteasas (1:100, Protease Inhibitor Cocktail, Sigma). Para ello, las células fueron levantadas de la placa de cultivo y transferidas a un tubo, donde se adicionó el buffer de lisis. Los tubos fueron mantenidos en hielo por al menos 45 minutos y, posteriormente, centrifugados a 13.200 r.p.m. durante 15 minutos a 4ºC. Los sobrenadantes fueron transferidos a un nuevo tubo y guardados a -70ºC para su posterior uso. La concentración de proteínas fue determinada mediante el método de Bradford, utilizando el Ensayo de Proteína (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, California, USA). La curva de calibración se realizó con concentraciones crecientes (1-10 µg/µl) de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) [280].

8.2 SDS-PAGE y Transferencia

25 a 50 µg de proteínas fueron llevadas a un mismo volumen con agua destilada, se les agregó buffer de siembra (50 mM de Tris-HCl pH 6,8; 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,006% de azul de bromofenol y 2% de β-mercaptoetanol) y ditiotreitol (DTT, Sigma), para finalmente calentarlas durante 5 minutos a 100ºC para completar el proceso de desnaturalización. Posteriormente, las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en gel reductor de SDS/poliacrilamida (SDS-PAGE) de porcentaje variable (8-15%), según el peso molecular de las proteínas de interés. La composición de los geles concentradores utilizada fue acrilamida/bisacrilamida (29:1, Bio-Rad), 0,125 M de Tris-HCl pH=6,8, 0,1% de SDS, 0,05% de persulfato de amonio (APS) y 0,1% de tetrametiletilendiamina (TEMED), y la de los geles separadores fue acrilamida/bisacrilamida (29:1, Bio-Rad) entre 8% y 15%, 0,375 M de Tris-HCl pH=8,8, 0,1% de SDS, 0,03% de APS y 0,07% de TEMED. Las muestras fueron corridas a voltaje constante de 100 V durante 3 horas en el buffer correspondiente (25 mM de Tris-Cl PH=8,8, 250 mM Glicina, 0,1% SDS) y luego electro-transferidas en frío a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) o PVDF (difluoruro de polivinilideno, Millipore, Billerica, USA) a una corriente constante de 250 mA durante 2 horas en buffer de transferencia (25 mM de Tris-Cl PH= 8,8, 192 mM Glicina y 20% de metanol (nitrocelulosa) o 10% (PVDF)). Finalizada la

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

transferencia, se realizó la tinción de las proteínas en la membrana con una solución de Rojo Ponceau al 0,1% en ácido acético durante 5 minutos, para verificar la eficiencia de la transferencia.

8.3 Revelado

Para el revelado de la membrana, las mismas fueron lavadas y bloqueadas durante 30 minutos con una solución de 5% de leche descremada en Tris Buffer Salino con Tween 20 (TTBS, 1M Tris, 1,5M ClNa y 0,1% Tween 20) a temperatura ambiente, con agitación constante. Posteriormente, la membrana se incubó durante toda la noche a 4ºC con los anticuerpos primarios específicos diluidos en TTBS sólo o con 5% de leche descremada. Al día siguiente, se realizaron 5 lavados de 5 minutos en TTBS, para retirar todo exceso de anticuerpo; y luego, la membrana fueron incubadas con los respectivos anticuerpos secundarios, diluidos en TTBS con 2% leche descremada, durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación constante. Se repitió el proceso de lavado con TTBS y finalmente la membrana fue revelada utilizando el kit de quimioluminiscencia (Pierce, Rockford, USA), según las indicaciones del fabricante. La señal de quimioluminiscencia fue capturada utilizando diaminobencidina (DAB, Dako) o el método de revelado manual (Kodak). El peso molecular de las bandas detectadas se comparó con un marcador de peso molecular (PageRuler Plus, Thermo Scientific, USA) sembrado en el mismo gel. La intensidad de las bandas presentes en las imágenes fue cuantificada por densitometría utilizando el programa ImageJ. Los valores de intensidad obtenidos para cada banda fueron normalizados con los valores de la señal de actina correspondiente.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-TAU (1:200, Dako), anti-sinaptofisina (1:250, Dako), anti-βIII tubulina (1:500, Chemicon), anti-NSE (1:500, Dako), anti-Oct4 (1:500, Chemicon) y anti-actina (1:1000, Sigma); y los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (HRP) fueron: anti-cabra HRP (1:1000, Dako), anti-conejo HRP (1:1000, Dako) y anti-ratón HRP (1:1000, Dako).

9. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

9.1 Extracción de ARN y Transcripción Reversa

El ARN de las hASCs, antes y después de 14 días de inducción neuronal, fue extraído utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Éstas incluyen una extracción con cloroformo (Merck, Darmstadt, Alemania), la precipitación del

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

ARN con isopropanol (Merck), el lavado del pellet de ARN con etanol 75% (Merck) y finalmente su resuspensión en agua libre de ribonucleasas. En todos los casos, las muestras de ARN fueron cuantificadas en un espectrofotómetro (Genesys 10uv scanning, Thermo Scientific) a partir de la medición de la absorbancia a 260 nm. La pureza e integridad del ARN extraído fue evaluada por medidas de densidad óptica (relación 260:280 nm > 1,8) y a través de la visualización bajo luz ultravioleta de las bandas correspondientes al ARN ribosomal, por electroforesis en geles de agarosa al 1% (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina) teñidos con Bromuro de Etidio (Sigma) en buffer TAE 1X (40mM Tris, 40mM de ácido acético, 1mM de EDTA). Las muestras así obtenidas fueron conservadas a -70ºC.

Dos microgramos de cada ARN total fueron tratados con DNasa libre de RNasas RQ1 (Promega, Madison, WI, USA) para eliminar cualquier posible contaminación con ADN genómico. No se detectó amplificación alguna en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el ARN tratado como molde.

Para realizar la transcripción reversa, se utilizó 1 µg de ARN total libre de ADN como molde en un volumen final de reacción de 20 µl, conteniendo 1 µg de Oligo-dT (Biodynamics), 0,5 mM de deoxi-nucleótidos trifosfato (dNTPs, Fermentas), 20 U de inhibidor de ribonucleasas (Fermentas) y 200 U de la enzima transcriptasa reversa ImpromII™ (Promega) en 1X del buffer de transcripción correspondiente, siguiendo las instrucciones del fabricante de la enzima.

9.2 PCR en Tiempo Real Cuantitativa

Para determinar los niveles de expresión génica relativa de los genes involucrados en el compromiso neural y la diferenciación neuronal terminal, se utilizó PCR en tiempo real.

Todas las reacciones de PCR en tiempo Real descriptas en este trabajo fueron optimizadas, de manera que se llevaran a cabo sin la formación de dímeros de oligonucleótidos ni bandas ectópicas que pudieran interferir en la cuantificación.

Se realizaron en un volumen final de 20 µl conteniendo entre 3 y 4 mM de $MgCl_2$ (Invitrogen), 0,5 mM de dNTPs (Fermentas), 1,25 U de la Enzima Taq Polimerasa Platinum (Invitrogen), 10 ng/µl de cada oligonucleótido específico para la secuencia del gen a amplificar (**Tabla 1**) y 1:10000 del fluorocromo Syber Green (Invitrogen), en el correspondiente buffer de polimerización 1X (Invitrogen), utilizando el ciclador LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania).

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados usando el Programa LightCycler Probe Design Software 2.0 (Roche Applied Science) usando las secuencias génicas obtenidas a

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

partir de la base de datos de GeneBank (National Center for Biotechnology Information, National Institute of Health, USA).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Gen	Genebank	Secuencia oligonucleótido foward (5´--3´)	Secuencia oligonucleótido reverse (5´--3´)	T° Hibridación (°C)	Tamaño (pb)
Genes "Stemness"					
Sox2	NM_003106	TCCCATCACCCACAgCAAAT	CCCCCAAAAAgAAgTCCAgg	59	122
Oct4	DQ486513	CCCCAgTCTCCgTCATCAC	CCCCTgTTCCCCATTCCT	59	79
Oct4A	NM_002701	CCgCCgTATgAgTTCTg	gTTgCTCTCCACCCCgA	57	126
Oct4B	NM_203289	CAgATgCACTTCTACAgACTATT	ACTTgTAAgAACATAAACACACCA	57	102
Nanog	NM_024865.1	gCAgAAggCCTCAgCACCTA	AggTTCCCAgTCgggTTCA	59	81
Genes Cascada Shh					
Gli1	NM_005269	ggAAggAgTTCgTgTgCC	CACTTgTgTggCTTCTCgC	60	112
Gli2	NM_030381	CAACTgCCACTgggAAgAC	gTggATgTgCTCgTTgTTg	59	82
Gli3	NM_000168	AgCAggACCTCAgCAACAC	TTggCTTCTCTgCCTTgAC	59	75
Ptc	NM_000264	TggAgCAgATTTCCAAg	TTTgAATgTAACAACCCAgT	58	102
Smo	NM_005631	gTCCTCACTgTggCAATCC	CgCACggTATCggTAgTTC	59	96
Genes Cascada BMP					
Noggin	NM_005450	TgTAAATATAgAgAACAAATggAATgACT	ACgggATATTATAAAgAATAAATAgCAgAT	57	79
Id1	NM_002165	CTgCTCTACgACATgAACg	CTCACCTTgCggTTCTg	57	77
Id2	NM_002166.4	AACATgAACgACTgCTACT	AggATTTCCATCTTgCTCAC	58	83
Id3	NM_002167.3	CgACATgAACCACTgCTAC	ggATTTCCACCTggCTAAg	58	83
Id4	NM_001546.2	TgCTACCAAAggACAAACTC	TTCTCCCACTgTTgCCTA	58	81
Genes Cascada Wnt					
Wnt1	NM_005430.3	ACgAgTTTggATgTTgTA	AgAAAggAgAgAAgAgTg	57	109
Wnt5a	NM_003392.3	ATCCCATTCACAggTTCTC	CTCAAATAggTTgTCTgCTCT	58	83
Dkk1	NM_012242.2	ACCAAAggACAAgAAggTT	TggACCAgAAgTgTCTAgCA	57	82
Wisp1	NM_080838.1	CTgTgAgTgCTgTAAgATgT	TCCTATTgCgTACCTCgg	56	124
CiclinaD1	NM_053056.2	ggTgTCCTACTTCAAATg	CTCCTCgCACTTCTgTTC	58	104
Genes Cascada Notch					
Notch1	NM_017617.3	TCTTTgTTTCAggTTCAgT	CCTACATTTCAAgAACgg	58	101
CBF1	NM_005349.2	ACCAgTgTCACATCATCTA	ACACTCAAgTCAgTTTAAg	58	120
Dtx1	NM_004416.2	ACTCCAATggCAACAAggA	CggATggTCTgggTATCAg	57	78
Hes1	NM_005524.2	AgAggCggCTAAggTgTTT	CTggTgTAgACggggATgA	58	148
Herp1	AF232238.1	gCAATAgTAACTgAATgTCCT	ggCATCTgTATggCTACC	58	76
Hey1	NM_012258.3	CTATCggAgTTTgggATTTCg	gggTCAgAggCATCTAgTC	58	84
Genes Proneurales					
Pax6	NM_000280.3	TTACgAgACTggCTCCATCA	CCgCTTATACTgggCTATTT	55	97
Mash1	NM_004316.3	CCAgTTgTACTTCAgCACC	TgCCACTTTgAgTTTggAC	55	125
Ngn2	NM_024019.2	CCTggAAACCATCTCACTTCA	TACCCAAAgCCAAgAAATgC	55	81
NeuroD1	NM_002500.2	CCACggATCAATCTTCTCAg	CATgATgTgAATggCTATCg	55	89
NeuroD2	NM_006160.3	CAgTAAggACTTTTAgAA	TgATTATTggTAgTAgTg	45	86
Math1	NM_005172.1	gAgAgAgCATCCCgTCTA	ggAATgTAgCAAATACTg	53	124
Math2	NM_022728.2	TgAATCCTTCTATgAAAgTA	gAAAATATCCCATTATAgTTA	45	96
Tbr1	NM_006593.2	gAATCAgTCAgATACAgA	AAgACAggAgAgAgTTTA	50	86
Tbr2	NM_005442.2	CAAggTTCTgTATTTATTT	TTTAACTCATCTgATAgC	48	92
Genes Neuronales					
Nestina	NM_006617.1	AgAgCgTAgAggCAgTAA	CACAgTggTgCTTgAgTT	55	112
GFAP	NM_002055.3	gCCTCAAggACgAgATgg	TCgCCCTCTAgCAgCTTC	57	109
βIIItubulina	NM_006086.2	gCCAAgTTCTggAAgTCA	gCCTCgTTgTAgTAgACgC	56	110
NSE	NM_001975.2	TAACTTCCgTAATCCCAgTgT	AAgAggTCAggTAAgCCAA	54	189
TAU	NM_016835.3	TACAgACCTgCggCTTCATAA	CCAgAAATAgTCCTgCTCAACA	56	136
Sinaptofisina	NM_003179.2	AggAggACAgggAgggAA	gggAgAgAgAggAgAgAgT	64	76
DCX	NM_000555.2	gAAggCATTAgCgTTTCTCAT	gATACACAAgAggTAgAgCgg	55	80
MAP2	NM_002374.3	AACCCTTTgAgAACACgACA	TCTTTCCgTTCATCTgCCA	54	104
Genes Neurotransmisores					
GABRA1	NM_000806.5	TgATTCTCTCACAAgTCTCCT	gAgCACAgTTgTTACTCCAAA	53	80
GABRbR1	NM_001470.2	CCCTggTCATCAAgACATTC	gTTAAAggACAgACAgACAACA	55	107
GABRbR2	NM_005458.7	TgACACggAgTgCgACAA	TggATgTgACggATggAC	55	110
GABRD	NM_000815.4	CCgACTACAggAAgAAgCA	AgAgggAgAAgAggACAAT	55	93
GAT1	NM_003042.3	gATCggTCTCTCTAACATCAC	TCAAAgAACACgAggAACAg	53	102
NKCC1	NM_001046.2	AgTAAAggAgTCgTgAAgTT	TTgACCCACAATCCATgACA	53	108
KCC2	NM_020708.4	CCTTCATCAACAgCACCgA	gTCCATCTCCTCCTCAAAC	53	80
M1	NM_000738.2	gCTACTTCTCCgTgACTCg	gCCCAgAgCACAAAggAAA	56	106
GluK5	NM_002088.3	ggAATgACCTCAgCgTTT	TCCACAATACCgTCCAgAT	52	77
mGluR5	NM_000842.3	CCCTgTTTgTTACTgTAgTCTT	ggATAATgTAgCAgAgTTCCC	56	89
NR1	NM_000832.6	gTCCACCAgACTgAAgATT	CgTTgACTgTgAACTCCTC	53	101
KCNH1	NM_172362.1	TTggAgATgTgTTCTggAAggAA	AgggCATCCCgCTTgATC	59	100
KCNH5	NM_139318.3	gACgAAATTTgCCCgATTgA	TgAATgTTTATggACCACCTCTgT	57	100
Gen Housekeeping					
β-actina	NM_001101	CCCTTgCCATCCTAAAAgCC	TgCTATCACCTCCCCTgTgT	58	86

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para PCR en tiempo real

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

De acuerdo al nivel de expresión de cada gen a estudiar, se utilizó desde 0,1 µl a 1 µl de ADN complementario (ADNc) de cada muestra, las cuales fueron determinadas por cuadruplicado.

El programa utilizado en todos los casos consistió en: 10 minutos a 94ºC, 45 ciclos de 5 segundos a 94ºC, 10 segundos a la temperatura de hibridación correspondiente y 10 segundos a 72ºC, efectuándose la lectura de la fluorescencia producida al finalizar cada paso a 72ºC. Luego de 45 ciclos de amplificación, una curva de hibridación de los productos de PCR fue obtenida. Una curva sigmoidea suave fue una indicación de que el ADN doble cadena presente en el producto de PCR fue únicamente el producto dimerizado y ningún dímero de oligonucleótidos o bandas ectópicas estaban contaminando la reacción. Para verificar la identidad del producto de amplificación correspondiente se observó la temperatura de fusión ("melting", T_m) en la curva correspondiente, además de corroborar el tamaño del producto en un gel de agarosa al 3%.

Para calcular la eficiencia promedio de la reacción y poder estimar la masa de molde inicial relativa en cada muestra, se realizó una curva de calibración estándar para cada par de oligonucleótidos, utilizando diluciones seriadas de una mezcla del ADNc de todas las muestras a analizar. El número de ciclos a partir del cual la fluorescencia de la reacción supera la línea de base se designó como punto de cruce (crossing point, CP). A medida que más ADNc fue incluido en una reacción, el CP disminuyó, y una curva de calibración del volumen de ADNc versus CP fue graficada. El CP de cada muestra de ADNc fue graficado sobre esta curva de calibración, permitiendo así la cuantificación relativa del ADNc en todas las reacciones de PCR. Una vez calculada la masa inicial relativa en cada réplica, se promediaron las 4 repeticiones, y se normalizaron los niveles de expresión génica a los valores obtenidos para el gen β-actina (housekeeping). Finalmente, los valores obtenidos (hASCs diferenciadas) fueron relativizados al tratamiento control (hASCs sin diferenciar). De esta manera, todos los datos de cambio de expresión son representados como *n* veces de cambio respecto al control. Cualquier valor por encima de 1 es considerado un aumento (*upregulación)* de la expresión génica en las células diferenciadas, y cualquier valor menor a 1 indica una disminución (*downregulación)* de la expresión génica en las células diferenciadas comparadas con las células sin diferenciar.

Experimentos control sin molde de ADNc revelaron que no existía amplificación inespecífica. Cuando los resultados de la PCR en tiempo real fueron negativos, ADNc de líneas celulares o tejidos humanos fueron usados como controles positivos para eliminar la posibilidad de resultados falsos negativos.

10. ANÁLISIS DE DATOS

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

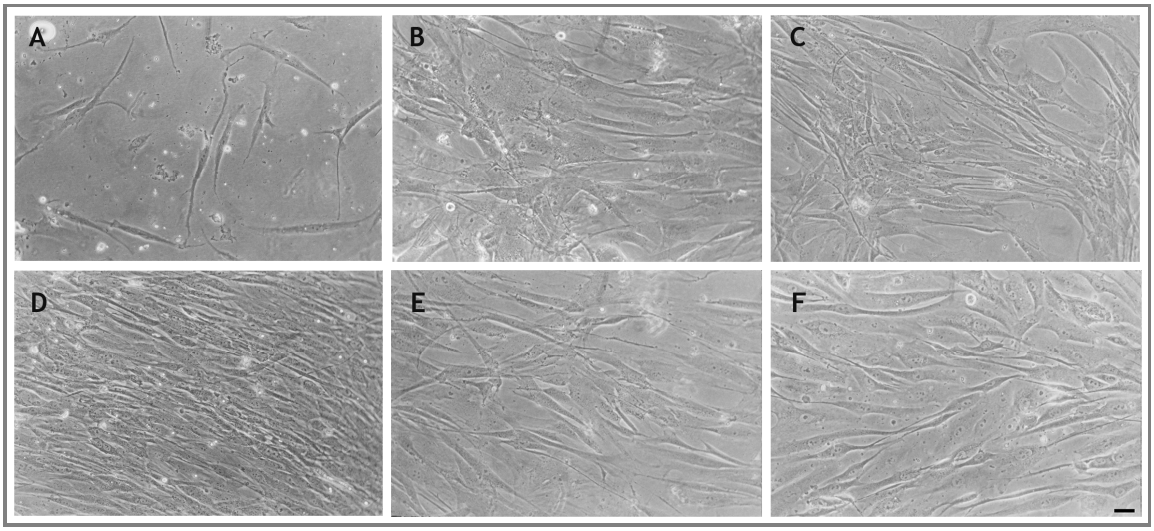
Todos los datos fueron presentados como media ± error estándar. La comparación estadística de los resultados obtenidos con hASCs diferenciadas y sin diferenciar fue llevada a cabo de acuerdo a la Prueba de t de Student (para comparar dos grupos de tratamiento). Antes de realizar el análisis estadístico, se corroboró que los datos cumplieran con los supuestos de normalidad y homocedacia usando las pruebas de Lilliefors y Bartlett, respectivamente. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con un valor de $p < 0,05$. El análisis estadístico se realizó usando el programa Primer of Byostatistics Version 5.0 (McGraw-Hill 2002).

RESULTADOS

1. Las hASCs poseen características de Células Madre Mesenquimales

1.1 Las hASCs se adhieren al plástico, tienen morfología fibroblastoide y se autorrenuevan

Una vez sembrada en la placa de cultivo, las células de la SVF se adhirieron al plástico formando una población celular heterogénea con diferentes morfologías, incluyendo células redondeadas y pequeñas, como también células grandes, planas y con forma ahusada. Las células ahusadas, con morfología fibroblastoide, se volvieron gradualmente predominantes en los sucesivos pasajes, con un crecimiento y división celular continuos a lo largo del cultivo (**Figura 27**).



Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Figura 27. Morfología de las hASCs. Fotografías microscópicas de las hASCs en los pasajes 0 (**A**), 1 (**B**), 2 (**C**), 3 (**D**), 4 (**E**) y 5 (**F**), donde se observa la morfología celular ahusada, tipo fibroblastoide, característica de las células madre mesenquimales. Barra = 100 μm.

1.2 Las hASCs expresan características inmunofenotípicas de célula madre mesenquimal

El análisis por inmunocitoquímica de las hASCs en los pasajes 3 a 5 reveló que las células fueron negativas para CD29, CD34 y CD45, los cuales son marcadores asociados con células hematopoyéticas (**Figura 28**).

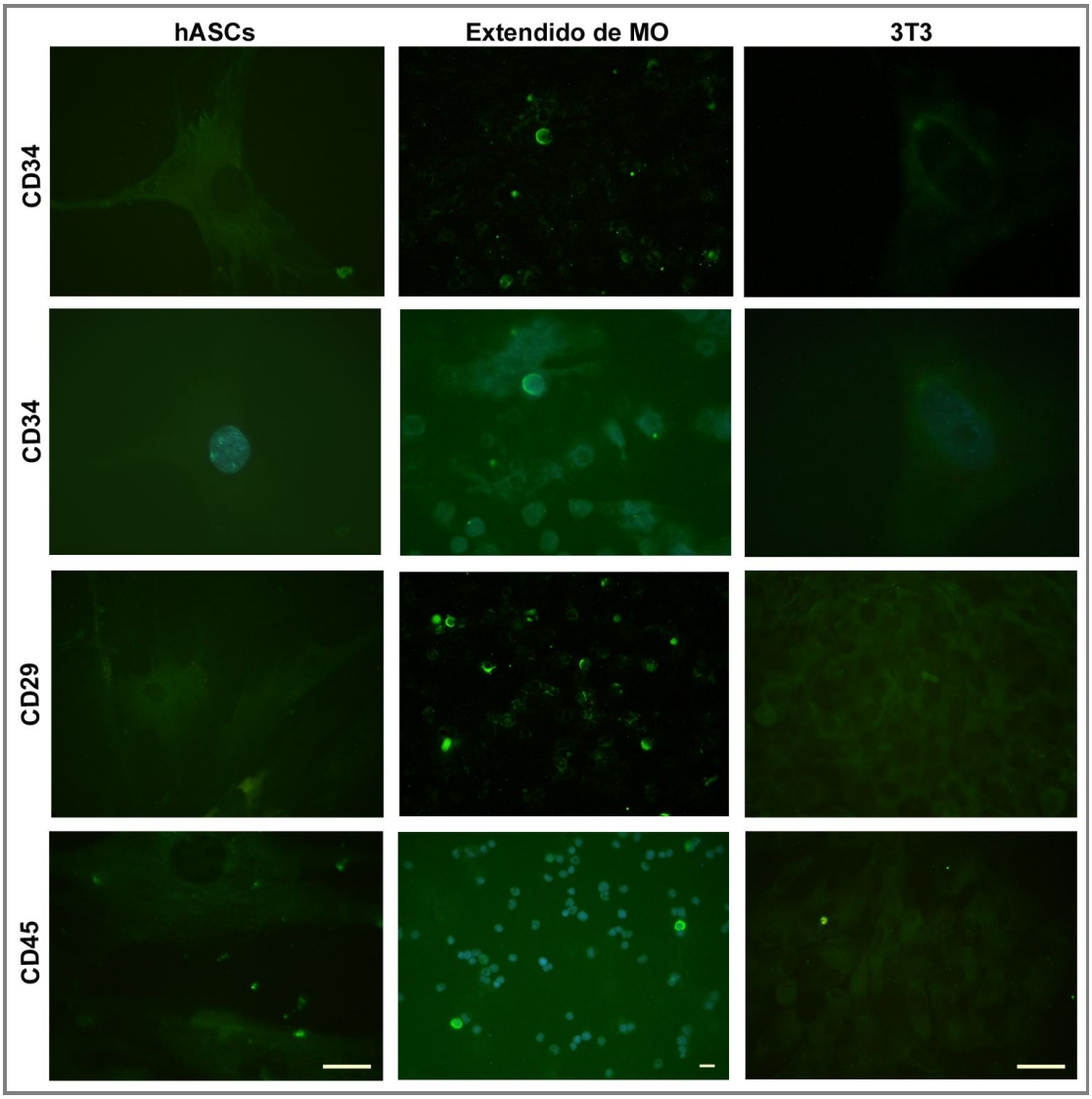


Figura 28. Caracterización de las hASCs. Se observó ausencia de expresión de los marcadores hematopoyéticos CD34 (1° y 2° fila), CD29 (3° fila) y CD45 (fila inferior) en las hASCs (columna izquierda) y en la línea celular 3T3 (columna derecha), pero si en el extendido de médula ósea (columna del medio). Barra = 100 μm.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

En contraste, 49.3 ± 0.2% de las hASCs expresaron CD90 y 40.8 ± 1.2% de las células expresaron Stro-1, los cuales son marcadores típicos de células madre mesenquimales. También pudimos observar que algunas células co-expresaban ambos marcadores, siendo Stro-1 una marca puntillada perinuclear mientras que CD90 se expresa en forma de parches a lo largo de la célula (**Figura 29**).

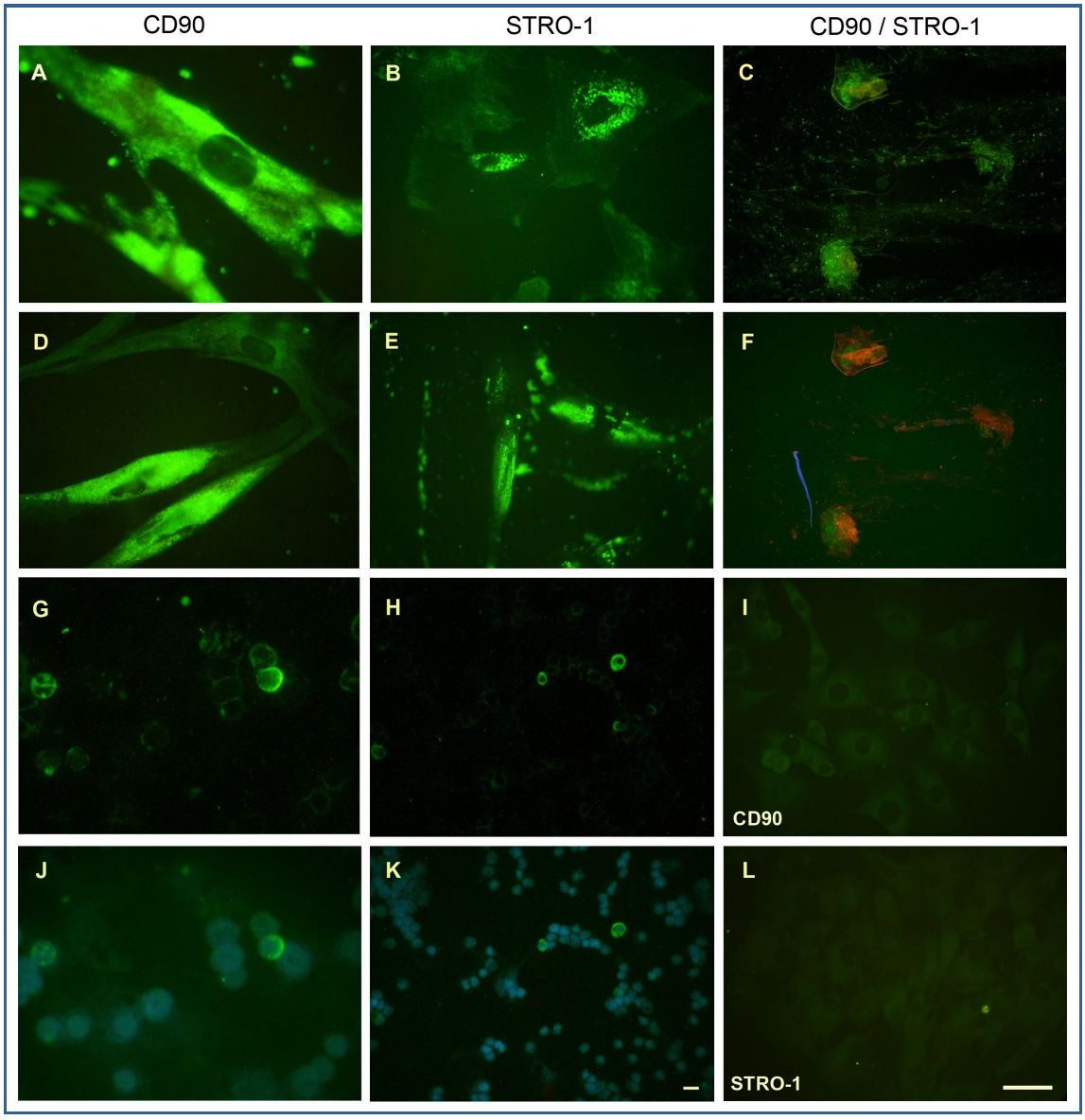


Figura 29. Caracterización de las hASCs de pasaje 5. Expresión de C90 en las hASCs, con localización citoplasmática (**A,D**) y en un extendido de médula ósea (**G,J,** control positivo), y ausencia del mismo en la línea celular 3T3 (**I**, control negativo). Expresión de Stro-1 en hASCs, con localización perinuclear (**B,E**), en el extendido de médula ósea (**H,K**, control positivo), y ausencia de expresión en las 3T3 (**L**, control negativo). Se observó coexpresión de CD90 (marcado con Texas Red, **rojo**) y STRO1 (marcado con FITC, **verde**) en las hASCs (**C,F**). Barra = 100 μm.

1.3 Las hASCs tienen potencial multilinaje

Con el experimento de multipotencialidad, se corroboró que las hASCs pudieron diferenciarse al linaje adipogénico, osteogénico y condrogénico, cuando eran cultivadas en medios de diferenciación específicos para cada linaje.

Se observó que las hASCs aumentaron el almacenamiento intracelular de lípidos, una semana a 10 días luego de la diferenciación adipogénica. Al finalizar el protocolo, se detectó que alrededor del 31% de las hASCs se diferenciaron al linaje adipogénico, corroborado por la presencia de gotas lipídicas intracelulares coloreadas con Oil Red O. Como se esperaba, no se observó tinción con el colorante en las hASCs sin diferenciar (**Figura 30**).

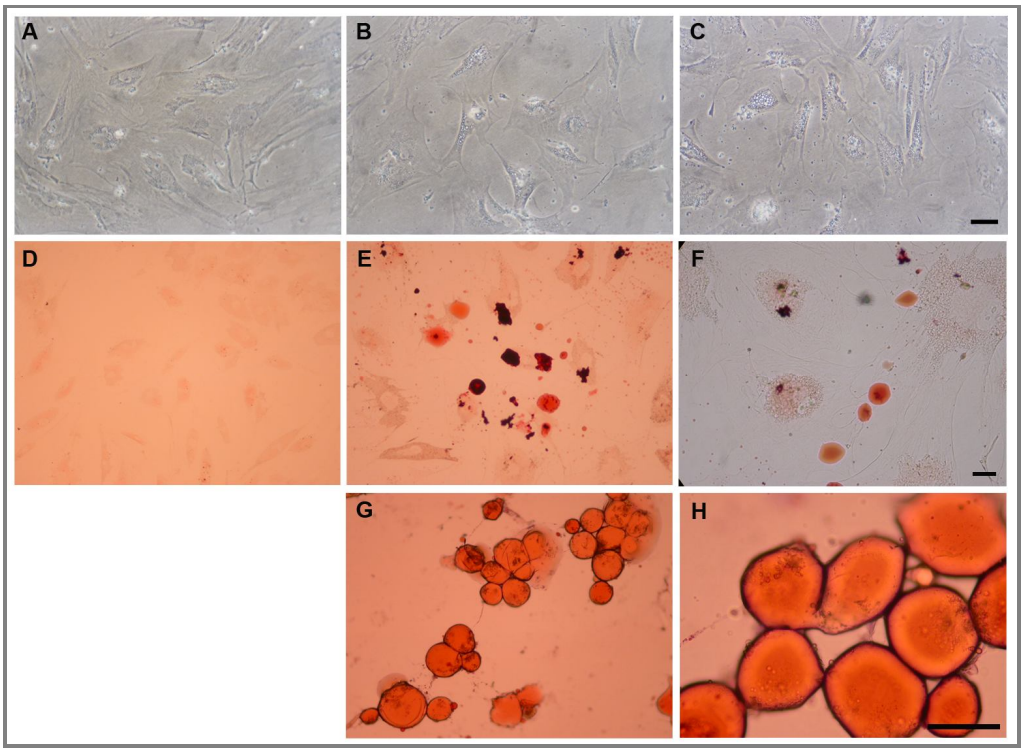


Figura 30. Diferenciación Adipogénica. (**A-C**) Morfología de las células a lo largo del protocolo de diferenciación: Día 0 (**A**), Día 10 (**B**) y Día 21 (**C**). (**D-H**) Tinción con el colorante Oil Red O en hASCs sin diferenciar (**D**) y luego del protocolo de diferenciación (**E-F**). Un corte de tejido adiposo humano fue utilizado como control positivo de la coloración (**G-H**). Barra = 100 μm.

Cuando las hASCs fueron tratadas con el medio osteogénico, se observó la formación de acúmulos de células. El 10% de las células se tiñeron con el colorante Rojo Alizarina que detecta la formación de cristales de calcio, característicos del linaje osteogénico. Este comportamiento no se observó en las hASCs sin diferenciar (**Figura 31).**

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

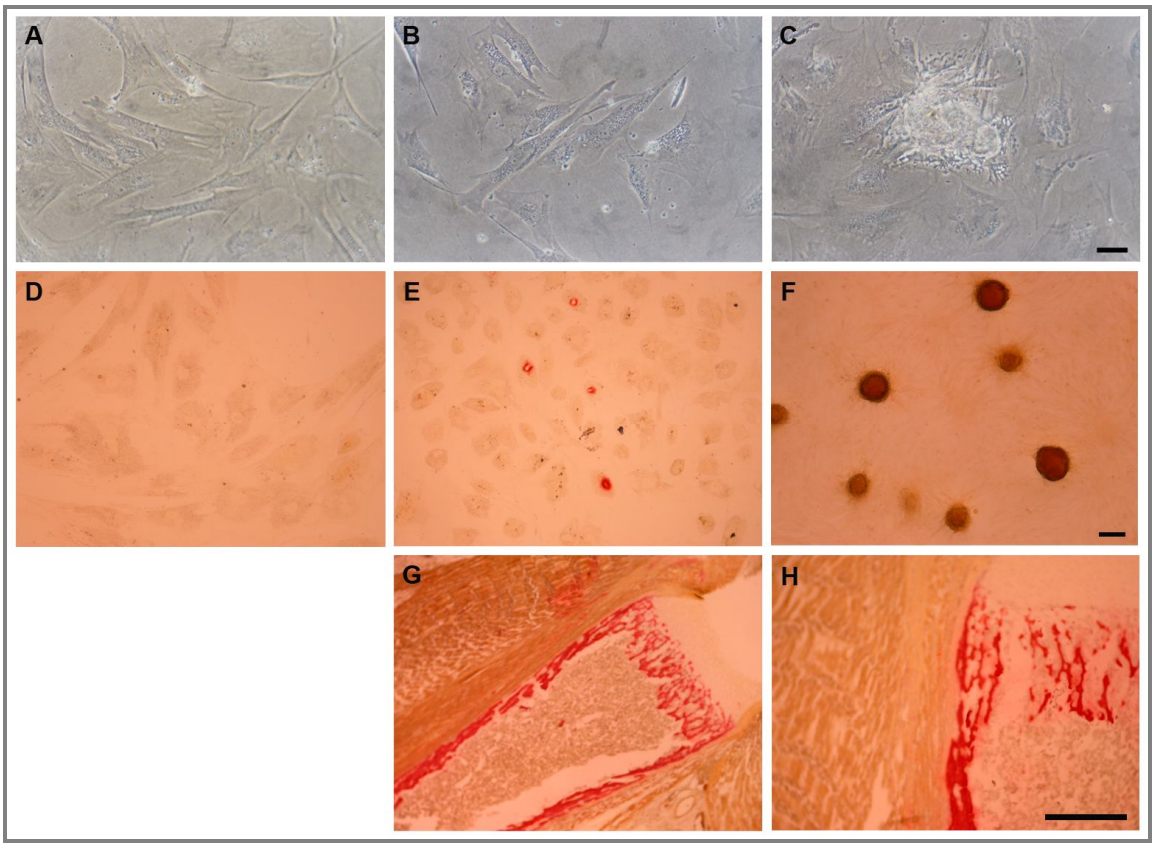


Figura 31. Diferenciación Osteogénica. (**A-C**) Morfología de las células a lo largo del protocolo de diferenciación: Día 0 (**A**), Día 10 (**B**) y Día 21 (**C**). (**D-H**) Tinción con el colorante Rojo Alizarina en hASCs sin diferenciar (**D**) y luego del protocolo de diferenciación (**E-F**). Un corte de músculo con hueso murino fue utilizado como control positivo de la coloración (**G-H**). Barra = 100 μm.

Por último, los cortes histológicos de las microesferas o acúmulos formados luego de la diferenciación condrogénica, revelaron la secreción de una matriz de glicosaminoglicanos teñida de azul con el colorante Azul de Toluidina, característico del linaje condrogénico. En contraste, las hASCs sin diferenciar no fueron capaces de formar acúmulos compactos y no se tiñeron con Azul de Toluidina (**Figura 32**).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

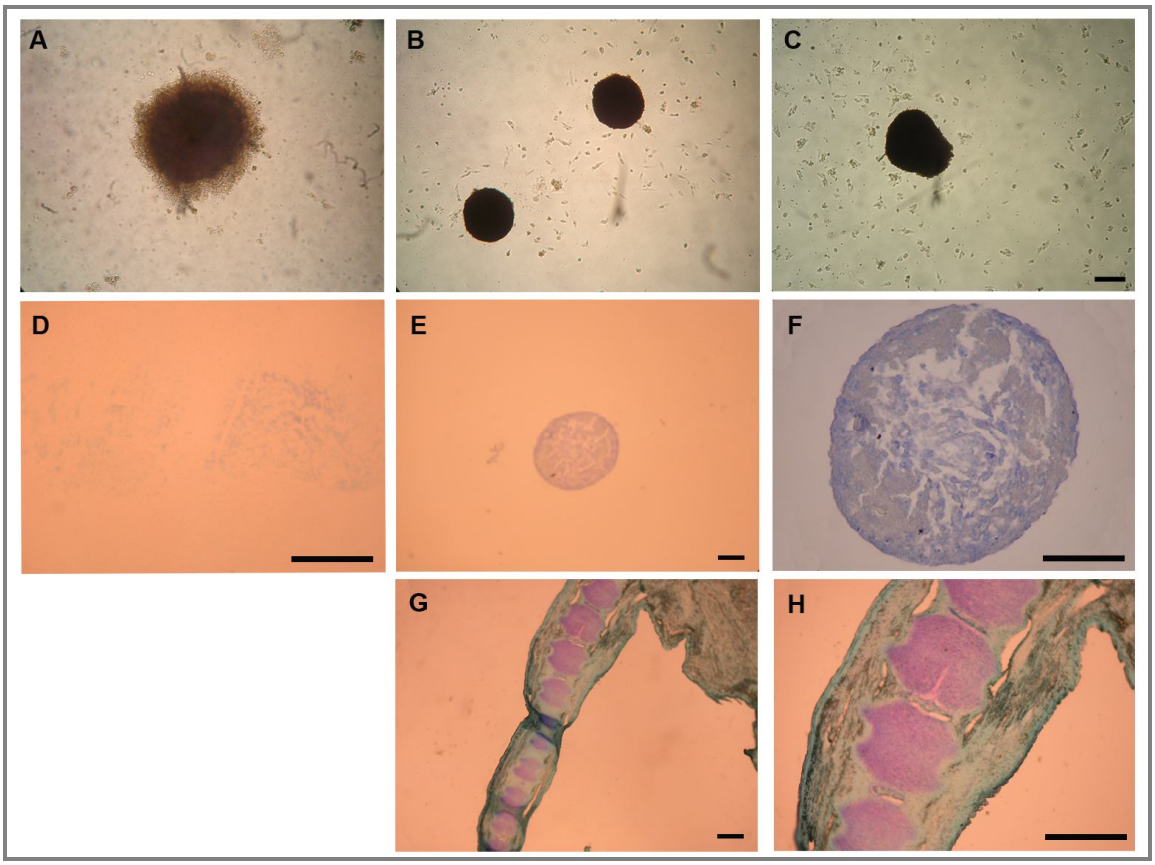


Figura 32. Diferenciación Condrogénica. (**A-C**) Morfología de las microesferas o acúmulos de células a lo largo del protocolo de diferenciación: Día 21 sin diferenciar (**A**), Día 10 diferenciadas (**B**) y Día 21 diferenciadas (**C**). (**D-H**) Tinción con el colorante Azul de Toluidina en hASCs sin diferenciar (**D**) y luego del protocolo de diferenciación (**E-F**). Un corte de embrión murino fue utilizado como control positivo de la coloración (**G-H**). Barra = 100 μm.

2. Las hASCs expresan marcadores de Células Madre Embrionarias

Las hASCs sin diferenciar fueron estudiadas, por PCR en tiempo real, para ver si expresaban los marcadores típicos de células madre embrionarias, Oct4 y sus dos isoformas, Oct4A y Oct4B, Nanog y Sox2. Además, se evaluó si la expresión de los mismos se veía modificada luego de la diferenciación neuronal de las células.

Se detectó expresión de Oct4 y de sus isoformas, Oct4A y Oct4B, en las hASCs sin diferenciar, y dicha expresión disminuyó significativamente luego de que las células fueron diferenciadas al linaje neuronal, en concordancia con trabajos previos donde una disminución de la expresión de Oct4 está asociado al linaje ectodérmico (**Figura 33A-C**) [94,98]. Este mismo comportamiento se observó a nivel proteico utilizando la técnica de Western Blot (**Figura 33E-F**).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Por otra parte, también se detectó la expresión de Sox2 en las hASCs sin diferenciar que, a diferencia de Oct4, tuvo un aumento significativo de la expresión luego del protocolo de inducción neuronal (**Figura 33D**). Este resultado se corresponde con el hecho de que las células diferenciadas están comprometidas al linaje neuronal, donde se ha demostrado que Sox2 se encarga de regular el mantenimiento y la proliferación de los progenitores neurales, como también su diferenciación neuronal [117-119].

Finalmente, no pudimos detectar la expresión del gen embrionario Nanog en ninguna de las condiciones estudiadas.

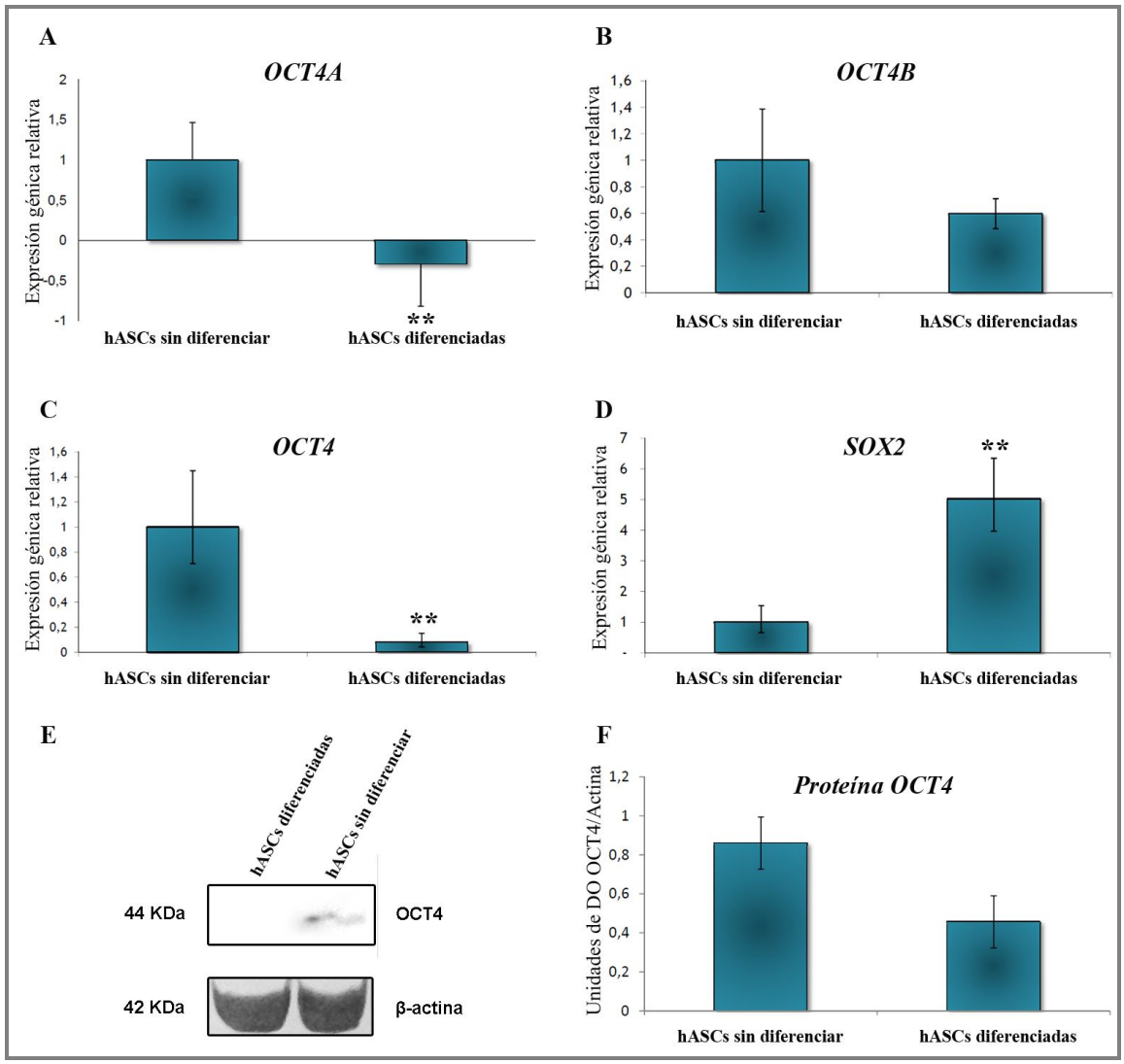


Figura 33. Expresión de marcadores embrionarios en las hASCs. (**A-D**) Cambios en la expresión génica relativa, de las isoformas A (**A**) y B del gen OCT4 (**B**), como también de las isoformas juntas (**C**); y para el gen Sox2 (**D**). La expresión génica relativa de cada gen (promedio ± error estándar), normalizado a la expresión del gen housekeeping β-actina, para las hASCs diferenciadas y sin diferenciar es graficada. (**E-F**) Western Blot para la proteína OCT4 (**E**), donde se midieron las unidades de densidad óptica (DO) de la proteína OCT4 normalizadas a la expresión de β-actina (**F**). * $p<0.05$, **$p<0.01$ es significativamente diferente al control.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3. Las hASCs se diferencian a células de tipo neuronal

3.1 Las células tipo neuronal tienen una morfología similar a neuronas en cultivo

Durante la preinducción de las hASCs con BME, las células experimentaron pocos cambios; la morfología fibroblastoide se mantuvo pero las células se volvieron un poco más elongadas (**Figura 34B-C**). Luego de la inducción neuronal, la morfología de las células comenzó a cambiar en unas pocas horas. Las células pasaron de una morfología ahusada, elongada y aplastada a una con cuerpos celulares redondeados con una o más extensiones citoplasmáticas características, similares a aquellas observadas en células neuronales en cultivo. Luego de 12 horas de inducción, alrededor del 13% de las hASCs exhibieron retracción del citoplasma hacia el núcleo, formando cuerpos celulares más compactos con extensiones del citoplasma. Los cuerpos celulares se volvieron cada vez más esféricos y refringentes con múltiples procesos citoplasmáticos. Durante los 14 días del protocolo de inducción neuronal, el número de células que exhibieron un fenotipo neuronal se incrementó hasta alcanzar un 59.7 ± 2.5% (**Figura 34D-F**). También se observó que algunas de las células de tipo neuronal parecían establecer contacto entre ellas y/o con otras sin diferenciar (**Figura 34G-I**).

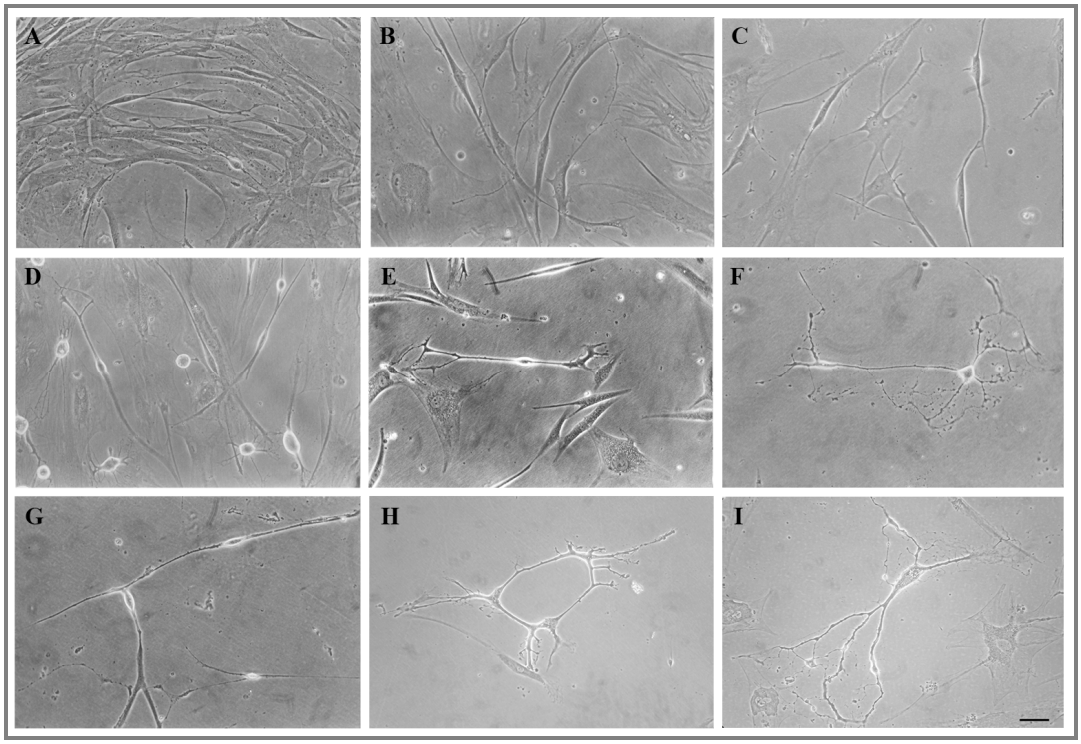


Figura 34. Cambios morfológicos durante la diferenciación neuronal de las hASCs. hASCs en medio de cultivo estándar (**A**). Cambios morfológicos experimentados por las hASCs durante las 48 hs con medio de preinducción (**B-C**). Durante los 14 días de diferenciación neuronal, se observaron

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

cambios morfológicos tales como retracción del citoplasma hacia el núcleo y las células exhibieron apariencia neuronal (**D-F)**. Algunas de las células diferenciadas parecían establecer contacto entre ellas y/o con otras sin diferenciar (**G-I**). Barra = 100 μm.

3.2 Las células tipo neuronal expresan marcadores neuronales característicos

Al analizar la expresión de los diferentes genes neuronales en las hASCs, antes y después de 14 días de diferenciación neuronal, se detectó en las células sin diferenciar un alto nivel de expresión de GFAP y Nestina, dos marcadores de NSCs y progenitores neurales, el cual se vio significativamente disminuido luego de la diferenciación neuronal (P=0.009; P=0.006, respectivamente). Los marcadores de neuronas inmaduras y maduras fueron detectados en las hASCs en niveles basales y hubo un aumento significativo de la expresión de βIII-tubulina (P=0.057), NSE (P=0.046), TAU (P=0.001), MAP2 (P=0.007) y sinaptofisina (P=0.036) luego del protocolo de inducción neuronal. No pudimos detectar expresión de DCX antes ni después del protocolo de diferenciación (**Figura 35**).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

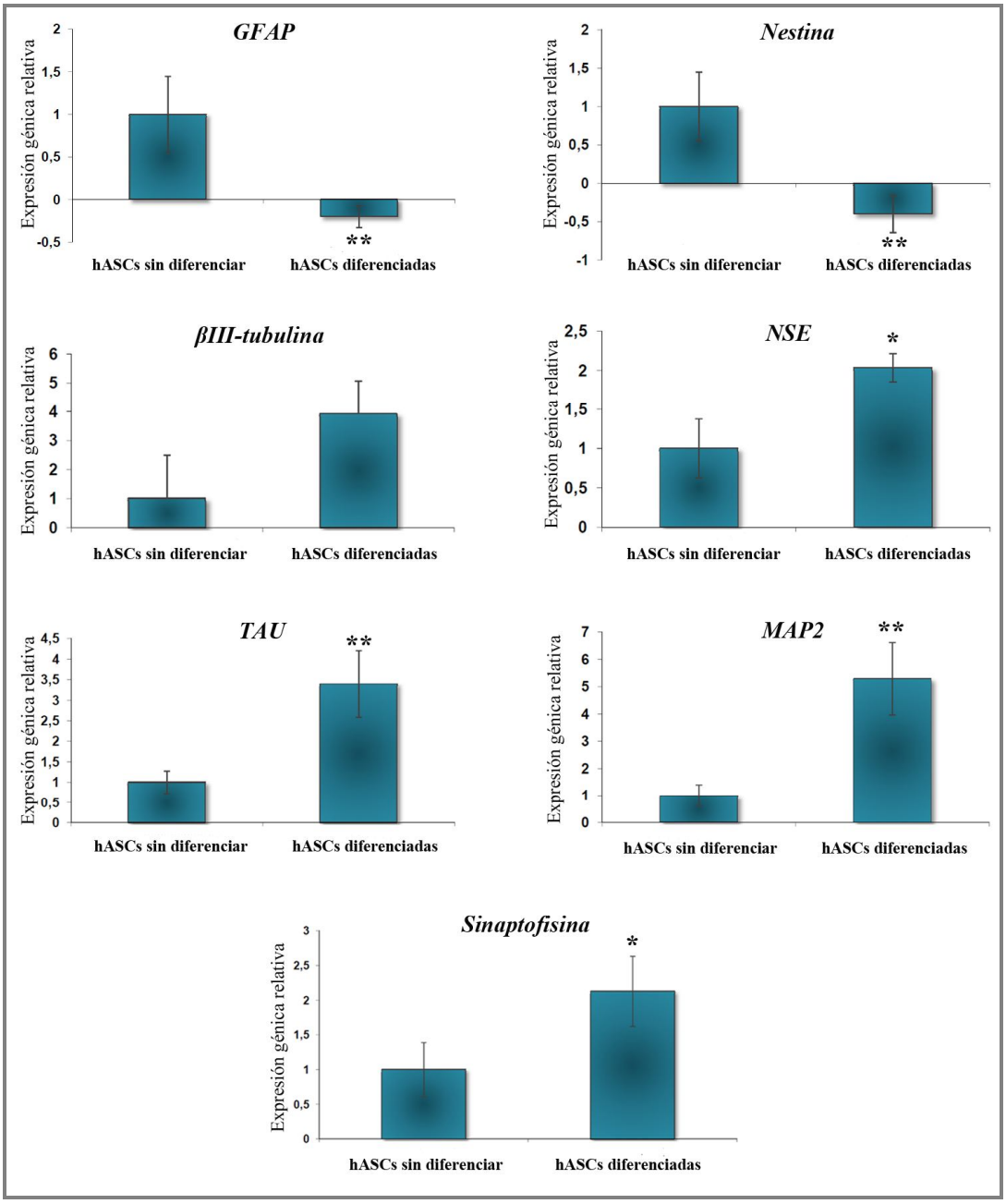


Figura 35. Las hASCs expresaron altos niveles de los genes marcadores de NSCs, GFAP y nestina, los cuales disminuyeron luego de la diferenciación neuronal. Luego del protocolo de inducción, hubo un incremento en la expresión de marcadores de neuronas inmaduras y maduras, tales como βIII-tubulina, MAP2, NSE, sinaptofisina y TAU. * p<0.05, **p<0.01 es significativamente diferente al control.

Luego, confirmamos la diferenciación neuronal de las hASCs a través de la expresión de proteínas neuronales utilizando inmunocitoquímica y la técnica de Western Blot. Ambos métodos revelaron la expresión de los marcadores representativos de las distintas etapas del

compromiso del linaje neural, incluyendo los marcadores de células progenitoras neurales, nestina y GFAP, antes de la inducción de las hASCs. Células inmunoreactivas para βIII-tubulina, NF200, TAU, NSE, A2B5 y Sinaptofisina, marcadores de células neurales comprometidas, fueron observadas dos semanas después de la diferenciación neuronal. No pudimos detectar la expresión del marcador de neuronas maduras NeuN.

La técnica inmunocitoquímica reveló que 29.4 ± 7.2% de las células diferenciadas expresaban βIII-tubulina, 32.9 ± 5.1% fueron positivas para NF200, 24.6 ± 2.5 % fueron inmunoreactivas para GFAP y 42.1 ± 8.4% de las células tipo neuronal expresaban Sinaptofisina; a diferencia de las hASCs sin diferenciar, en las cuales no se pudo detectar la expresión de ninguno de estos marcadores. También se observó la co-expresión de los marcadores nestina y βIII-tubulina en algunas de las células diferenciadas (**Figura 36**).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

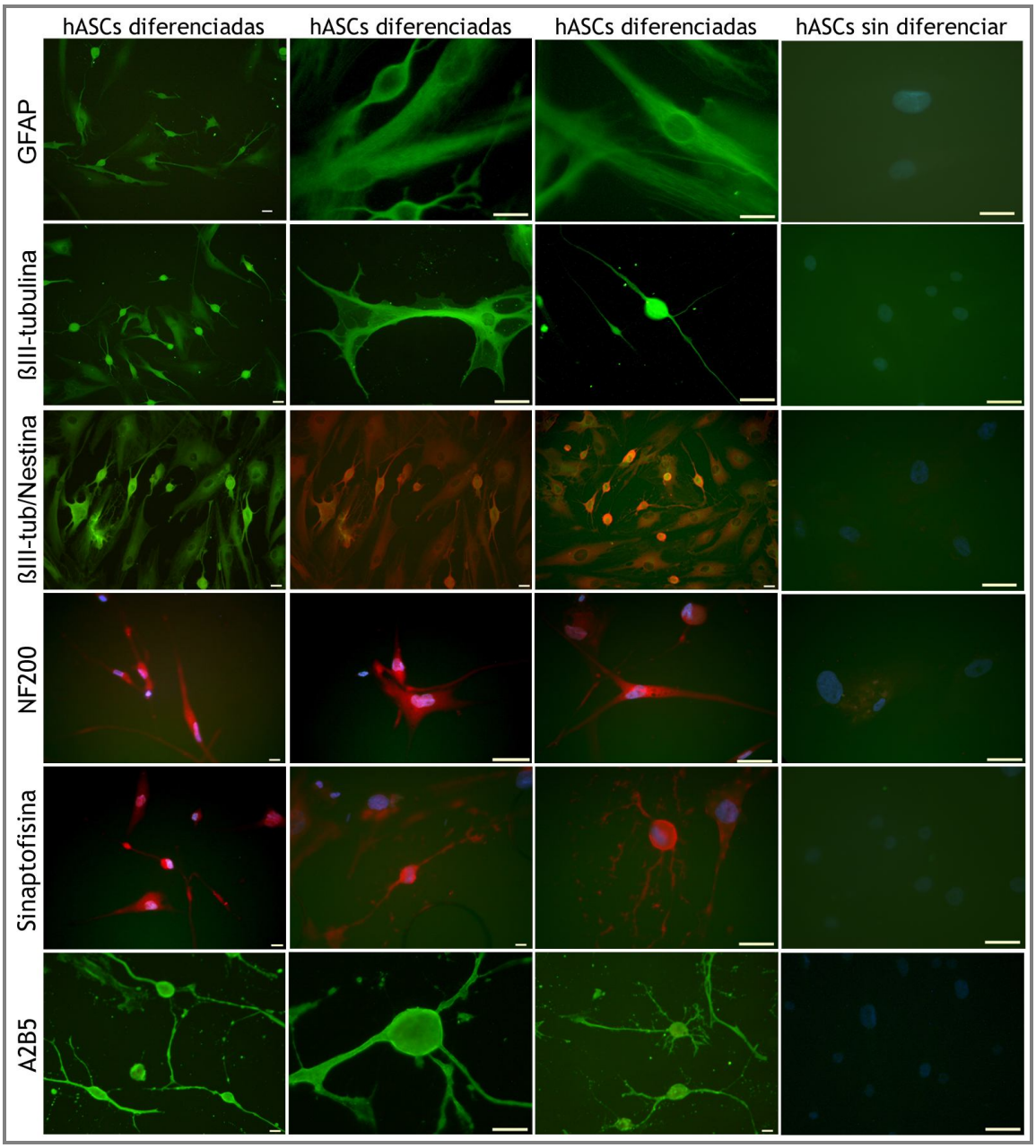


Figura 36. Análisis inmunocitoquímico de las hASCs diferenciadas (columnas de la izquierda) y sin diferenciar (columna de la derecha), usando anticuerpos específicos para marcadores neurales tempranos como son GFAP y nestina, y para marcadores de neuronas inmaduras y maduras, como son βIII-tubulina, NF200, Sinaptofisina y A2B5. Barra=100 µm.

La expresión de βIII-tubulina, TAU, NSE y Sinaptofisina aumentó significativamente luego de la inducción neural comparada con la de las hASCs sin diferenciar, cuando fueron analizadas por Western Blot (**Figura 37**).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

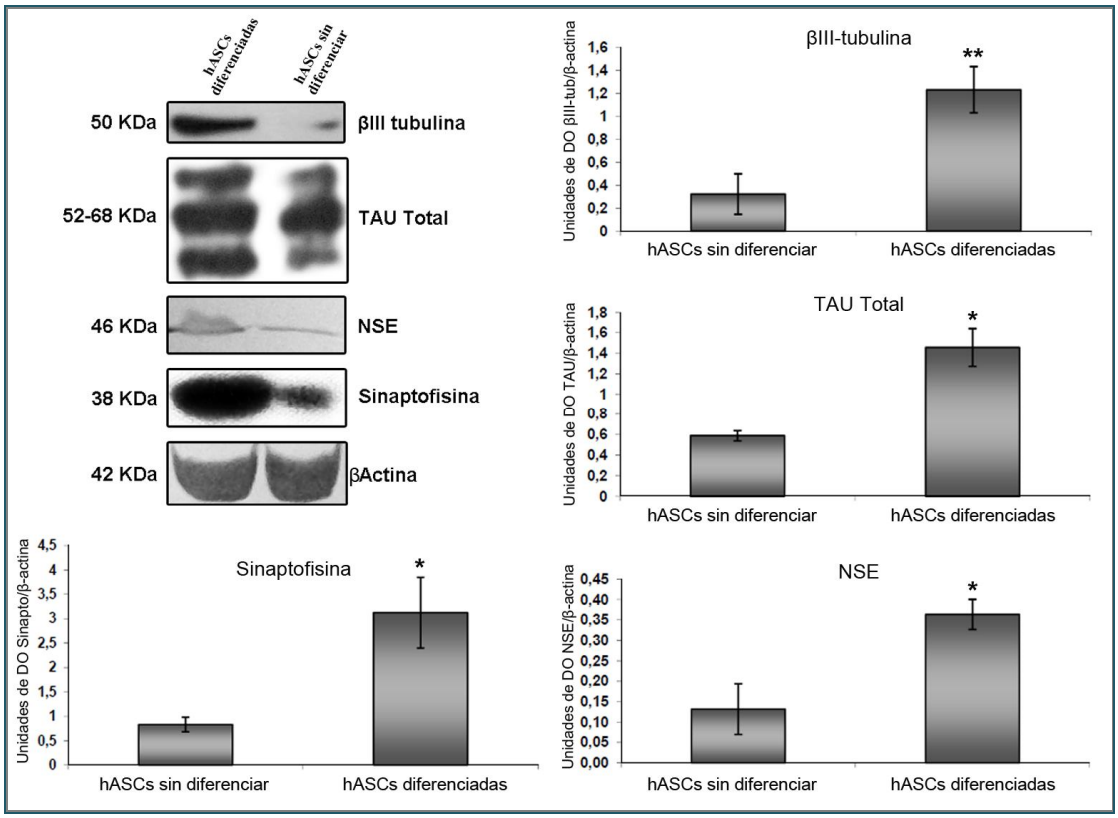


Figura 37. Análisis por Western Blot de las hASCs diferenciadas y sin diferenciar para las proteínas βIII-tubulina, TAU, NSE y sinaptofisina. La expresión de todas las proteínas analizadas aumentó luego del protocolo de diferenciación neuronal. Las Unidades de Densidad Óptica (DO) para cada proteína (promedio ± error estándar), normalizado a la expresión de β-actina, para las hASCs sin diferenciar y diferenciadas son graficadas. *p<0.05, **p<0.01 es significativamente diferente al control.

3.3 Las células tipo neuronal presentan vesículas presinápticas

Para probar si las células tipo neuronal desarrollan cierta actividad sináptica, las hASCs diferenciadas durante 14 días fueron cargadas con el colorante FM1-43, el cual tiene la capacidad de teñir las vesículas sinápticas recicladas [281,282]. La tinción saturada fue llevada a cabo en una solución despolarizante para estimular el ciclado de las vesículas sinápticas en presencia de FM1-43. Durante la endocitosis, el colorante es incorporado y al ser un compuesto lipofílico, se inserta en la membrana donde comienza a fluorescer. Se observó una marca puntuada en las hASCs diferenciadas, similar a la que presentan las células PC12 diferenciadas utilizadas como control positivo, lo cual probablemente nos indica la presencia de terminales presinápticos funcionales. Por el contrario, no se observó ninguna marca en las hASCs sin diferenciar, al igual que en fibroblastos humanos utilizados como control negativo, ya que no tienen capacidad de formar vesículas sinápticas (**Figura 38**).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

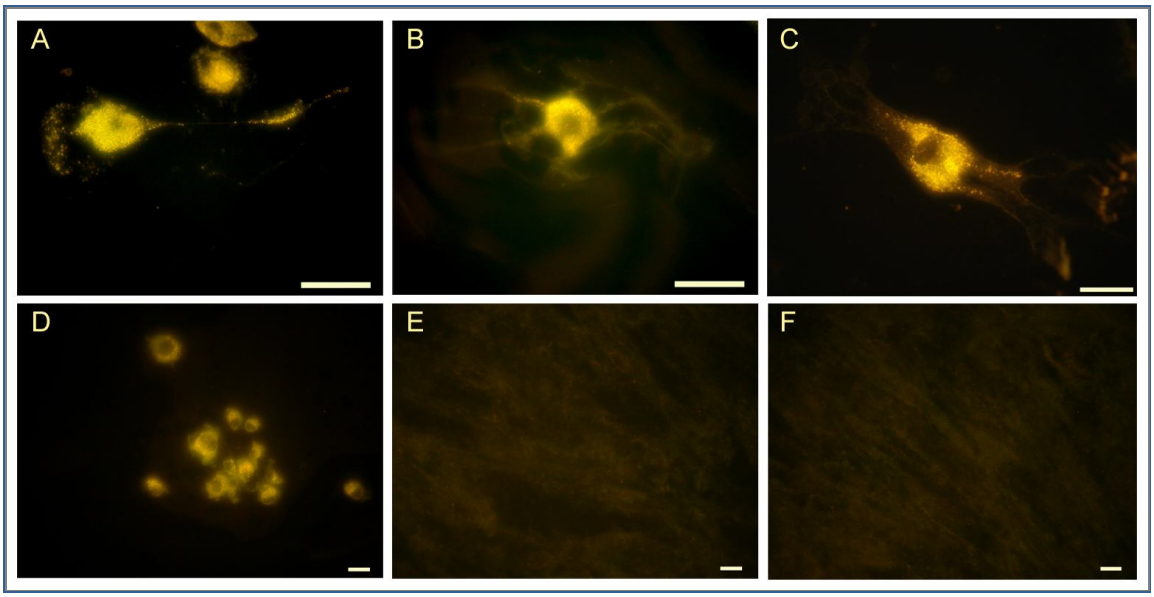


Figura 38. Tinción con el colorante FM1-43. Imágenes de fluorescencia de las hASCs diferenciadas en células tipo neuronal (**A-C**), como de las células PC12 diferenciadas (control positivo, **D**). Se puede notar la apariencia puntuada del colorante cargado. Las hASCs sin diferenciar no se cargaron con el colorante (**E**), como tampoco lo hicieron los fibroblastos humanos (control negativo, **F**). Barra = 100 μm.

4. Los mecanismos moleculares de proliferación y diferenciación neuronal son similares a los de la neurogénesis adulta

Para comprender cuáles son los mecanismos moleculares involucrados en la proliferación y diferenciación neuronal de las hASCs, se evaluó la expresión génica de diferentes genes en hASCs sin diferenciar y luego de 14 días de inducción neuronal. Los genes estudiados correspondían a morfógenos, genes proneurales, neurales y neurotransmisores, todos ellos involucrados en el mantenimiento de la proliferación de células madre neurales y en diferentes etapas de la generación de nuevas neuronas en el cerebro adulto.

4.1 Shh se encargaría de la regulación de la autorrenovación de las hASCs

Usando PCR en tiempo real, los perfiles de expresión génica de las hASCs sin diferenciar y diferenciadas de los siguientes genes fue comparada: factores de transcripción de la cascada de Shh (Gli1, Gli2 y Gli3), como también la de sus receptores (Ptc y Smo).

Se encontró que los 5 genes pertenecientes a la vía de señalización de Shh estaban expresados en las hASCs, sugiriendo que estas células serían capaces de responder a la señal Shh proveniente del microambiente. Luego de la diferenciación neuronal, la expresión

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

de Gli1, Gli2, Gli3 y Smo disminuyó significativamente ($p<0.01$); mientras que sólo la expresión de Patch fue la que no demostró cambios estadísticamente significativos. Estos resultados son consistentes con el hecho de que la vía Shh está involucrada en el mantenimiento de grupos de células con propiedades de células madre en otros tejidos, y que su expresión disminuye luego de la diferenciación [137,140-143] (**Figura 39**).

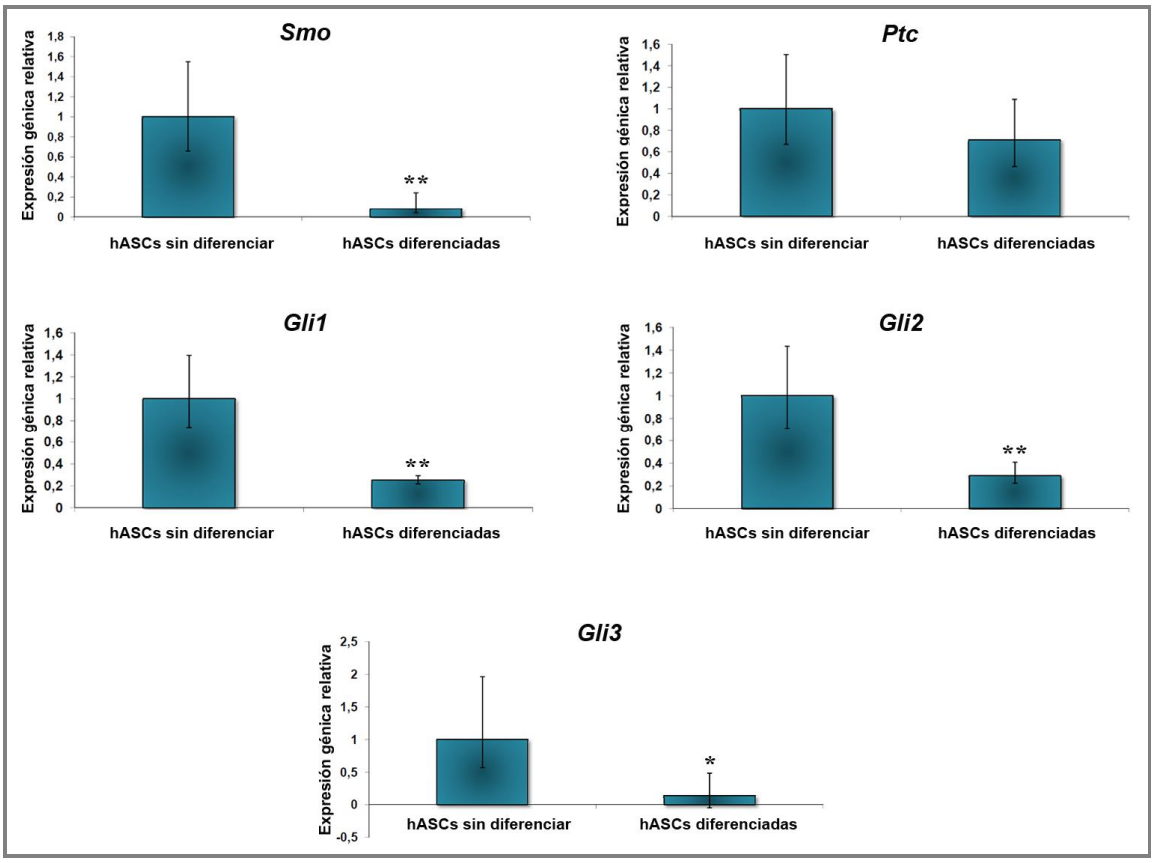


Figura 39. Expresión génica relativa de la vía de señalización de Sonic Hedgehog en las hASCs tratadas con medio de inducción neuronal comparada con la misma en las hASCs sin diferenciar. La cascada de Shh es regulada de manera negativa luego de la diferenciación neuronal. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

4.2 BMP mantendría las hASCs en estado indiferenciado y su antagonista, Noggin, las comprometería al linaje neuronal

Una de las vías de señalización intracelular involucrada en el compromiso y diferenciación celular es la vía BMP. Por ello, se decidió estudiar la expresión de sus genes blanco Id1, Id2, Id3 e Id4, y la de su antagonista Noggin.

En nuestros experimentos, se encontró expresión de Noggin, un antagonista de BMP, luego de la diferenciación neuronal y su expresión no se detectó en las hASCs sin diferenciar.

Estos resultados concuerdan con trabajos previos donde reportaron que Noggin inhibe la señalización BMP promoviendo la diferenciación neuronal [183].

Además, se analizó la expresión de los genes Id, antes y después de la inducción neuronal, encontrándose que las hASCs sin diferenciar expresan Id1, Id2, Id3 e Id4. Sin embargo, después de la exposición de los cultivos a los neuromorfógenos, cuando las células detuvieron su proliferación y comenzaron a diferenciarse morfológicamente, se detectó una disminución significativa de la expresión de Id1. Estos resultados son similares a trabajos previos donde hubo una reducción abrupta de la proteína Id1 *in vitro* cuando las células eran diferenciadas bajo el tratamiento con suero y/o morfógenos [232], y se observaba una expansión génica proneural y una diferenciación neuronal prematura cuando la expresión de Id1 era inhibida [283], y una significativa inhibición de la diferenciación neuronal cuando Id1 es sobreexpresada [284]. Por otra parte, se detectó un aumento de la expresión de Id4 luego de la diferenciación neuronal, lo cual concuerda con el hecho de que este gen es expresado en fenotipos maduros de células neurales [179,181]. No se observaron cambios significativos en la expresión de Id2 e Id3 luego del tratamiento, si bien se comportaban de manera similar a Id4 e Id1, respectivamente (**Figura 40**).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

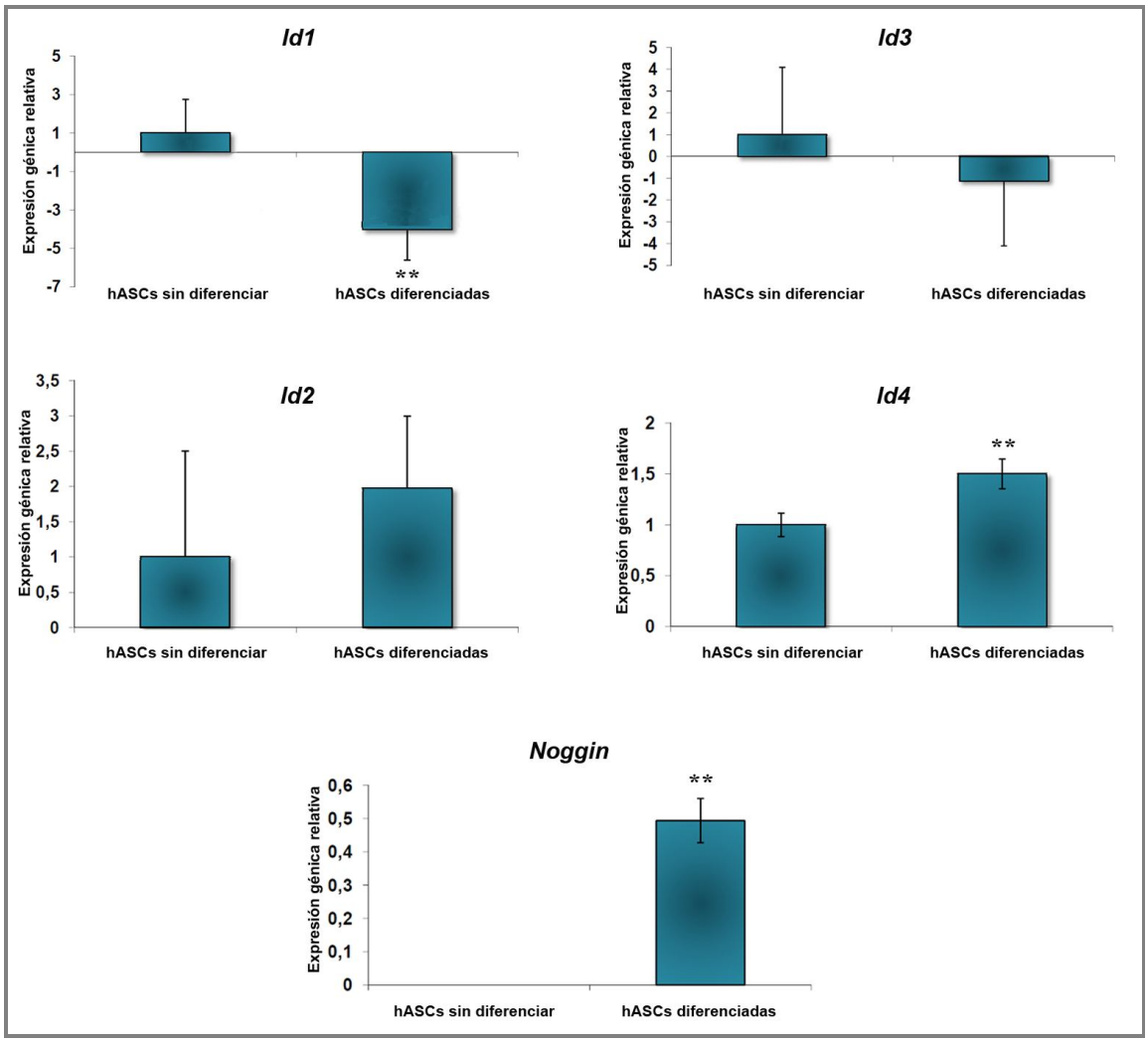


Figura 40. Expresión génica relativa de Noggin y los genes Id, pertenecientes a la cascada BMP, en las hASCs diferenciadas comparada con la misma en las hASCs sin diferenciar. Id1 es regulado de manera negativa luego de la diferenciación neuronal, mientras que Id4 y Noggin fueron regulados de manera positiva luego del tratamiento con morfógenos. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

4.3 La señalización Wnt estaría involucrada en el mantenimiento de la proliferación de las hASCs

Como se sabe que la vía de señalización Wnt tiene roles importantes en la proliferación y diferenciación de células madre [160-163], usando PCR en tiempo real, se evaluó la expresión de los ligandos Wnt (Wnt1 y Wnt5), un inhibidor de la cascada (Dkk1) y dos de los genes blancos de la vía Wnt (CiclinaD1 y Wisp1). En el presente trabajo, se observó la presencia de la señalización canónica de Wnt en las hASCs, la cual probablemente esté involucrada en la proliferación de estas células. Se detectó la expresión de Wnt5, CiclinaD1, Wisp y Dkk1 en hASCs pero no se observó expresión de Wnt1 en estas células, utilizando esta técnica. Luego

de la inducción neuronal, hubo una disminución en todos los transcriptos de la cascada estudiados, en concordancia con trabajos previos donde la señalización de Wnt fue asociada al control del mantenimiento de las MSCs [161]. No pudimos detectar un aumento en la expresión de su inhibidor Dkk1, el cual está involucrado en el control de la determinación de los diferentes linajes (**Figura 41**).

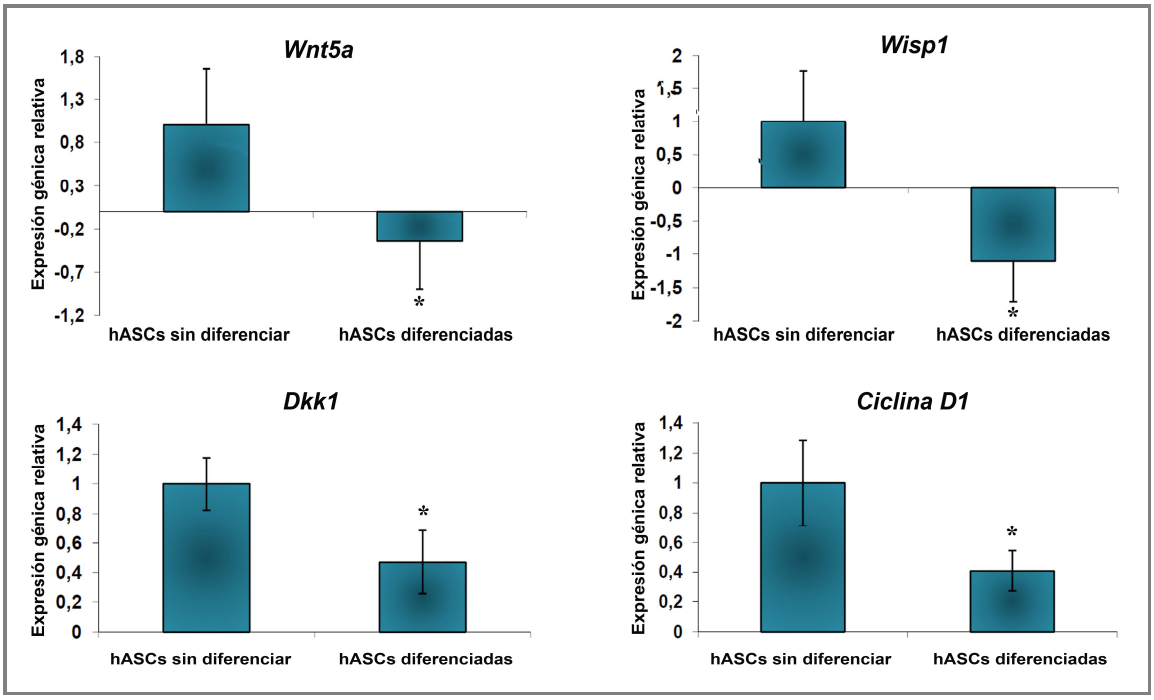


Figura 41. Los niveles de ARN mensajero (ARNm) de los genes que participan en la señalización Wnt exhibieron una disminución en las células diferenciadas en relación a los niveles en las hASCs sin diferenciar. *p<0.05.

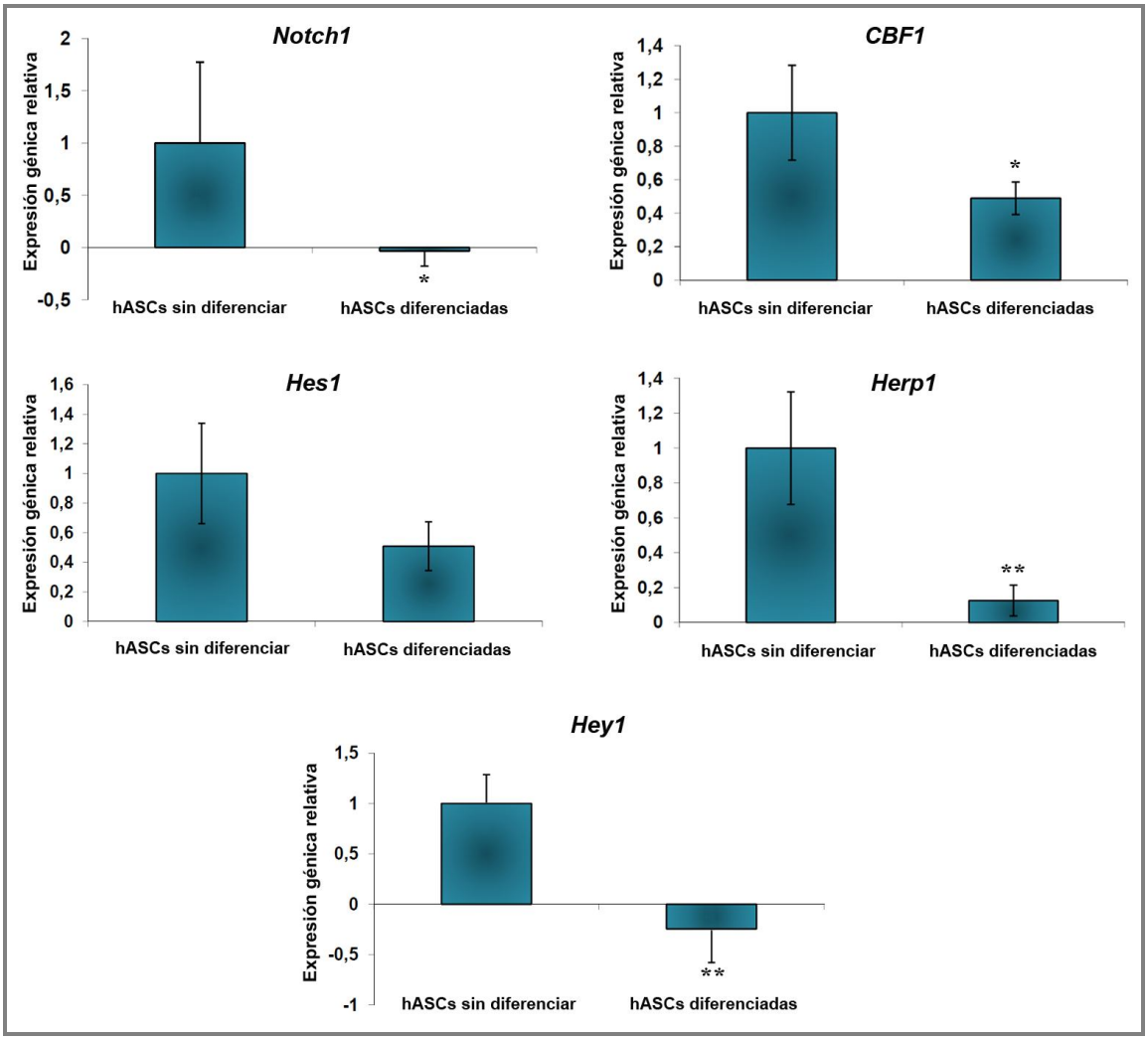
4.4 La vía de Notch mantendría el estado indiferenciado de las hASCs a través de sus genes represores de linaje.

Dado el rol tan bien documentado de la señalización Notch en la regulación de la capacidad proliferativa, la adquisición del destino celular y la diferenciación de poblaciones de NSCs y HSCs [285-287], se investigó, utilizando la técnica de PCR en tiempo real, la presencia de los transcriptos de la vía de Notch en las hASCs antes y después de 14 días de inducción neuronal. Los transcriptos estudiados correspondían al ligando Notch1, al inhibidor Deltex1 (Dtx1), al factor CBF1del complejo de activación nuclear y a los genes blanco Hes1, Herp1 y Hey1, estos últimos conocidos como represores de linaje.

Se encontró expresión de transcriptos de elementos funcionales correspondientes a distintos niveles de la cascada de señalización en las hASCs sin diferenciar. Notch1, CBF1,

Hes1, Herp1 y Hey1 se expresaron en las hASCs, mientras que no se detectó expresión del represor Dtx1. Luego de la diferenciación neuronal, hubo una disminución estadísticamente significativa ($P<0.05$) en la expresión de todos los transcriptos de Notch analizados (**Figura 42**).

Estos resultados indicaron que la expresión del ARNm de los componentes de la vía de Notch fueron regulados diferencialmente durante la diferenciación neuronal de las hASCs. Se determinó que hay una vía Notch activa en las hASCs, en concordancia con la función descripta para esta cascada en mantener la autorrenovación de las células madre, reprimiendo factores de transcripción específicos de linaje; y una regulación negativa de la misma luego del protocolo de inducción neuronal, necesaria para el compromiso de estas células hacia el linaje neural.



Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Figura 42. Expresión génica relativa de genes que participan en la señalización Notch. Los niveles de los ARNm se vieron disminuidos luego de los 14 días de diferenciación neuronal. *p<0.05; **p<0.01.

4.5 Factores de especificación (*patterning*) y proneurales se expresan luego de la diferenciación neuronal de las hASCs

En este trabajo, se detectó la expresión de factores de especificación y proneurales antes y luego del protocolo de diferenciación neuronal de las hASCs. Pax6, Mash1 y Ngn2 fueron expresados en niveles bajos en las hASCs pero luego de la diferenciación neuronal hubo un aumento significativo del nivel de expresión de Pax6 (P=0.039) y una tendencia fue observada para el gen Mash1 (0.17) y Ngn2 (P=0.21). La expresión de Math1 no fue detectada usando PCR en tiempo real (**Figura 43**). Estos resultados son similares a los reportados en la neurogénesis adulta, donde había sido demostrado que los primeros pasos de este proceso involucra la expresión de genes de especificación y genes proneurales bHLH de determinación tales como Pax6, Sox2, Mash1, Math1 y Ngn2 [227].

Basado en trabajos previos [229,260], también se examinó el patrón de expresión de los factores de diferenciación NeuroD1, NeuroD2, Math2, Tbr1 y Tbr2, los cuales son expresados en estadios intermedios y tardíos de la neurogénesis. Se encontró que antes de la diferenciación neuronal, hubo una baja expresión de NeuroD1 y Tbr2, la cual aumentó significativamente luego del protocolo de diferenciación (P=0.03; P=0.18, respectivamente). Las células sin diferenciar no expresaron Tbr1 pero si se lo detectó luego del protocolo de inducción. Sin embargo, no pudimos detectar expresión de Math2 y NeuroD2 ni antes ni después de la diferenciación, ambos genes expresados en estadios tardíos de la neurogénesis, es decir, en neuronas maduras (**Figura 43**).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

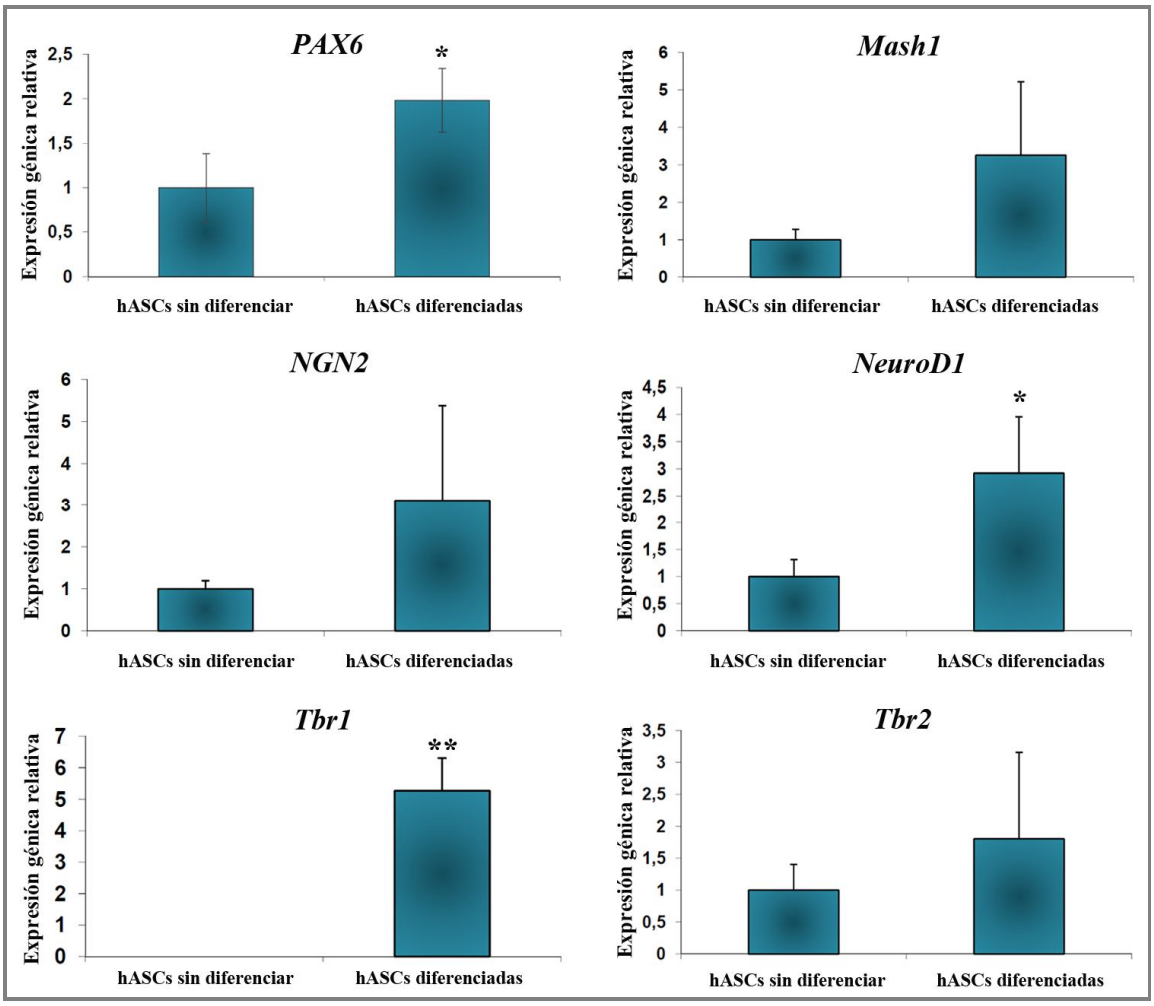


Figura 43. Expresión génica relativa de genes de determinación y diferenciación proneurales. Se detectaron niveles bajos de los ARNm en las hASCs, los cuales aumentaron significativamente luego de los 14 días de diferenciación neuronal, demostrando que han adquirido un destino neuronal. *p<0.05; **p<0.01.

4.6 Las células tipo neuronal expresan genes glutamatérgicos y gabaérgicos

Diversas moléculas, como los neurotransmisores, han sido implicadas en la regulación extrínseca de la proliferación celular y la diferenciación neuronal en el SNC. Por esta razón, decidimos estudiar los receptores de neurotransmisores específicos que son expresados en los diferentes estadios de diferenciación de la neurogénesis adulta, tales como el receptor colinérgico muscarínico 1 (M1), la subunidad α1del receptor $GABA_A$ (GABRA1), la subunidad 1 y 2 del receptor $GABA_B$ (GABAbR1, GABAbR2), la subunidad δ del receptor $GABA_A$ (GABRD), el co-transportador NKCC1 y el co-transportador KCC2, el subtipo 5 del receptor

glutamatérgico tipo kainato (GluK5), el receptor de glutamato metabotrópico 5 (mGluR5) y el receptor de NMDA 1 (NR1) en hASCs, antes y luego del protocolo de inducción neuronal.

En este trabajo, se detectó la expresión del receptor colinérgico M1 en hASCs y un incremento significativo luego de la diferenciación neuronal (P=0,024) (**Figura 44**), comportamiento característico de células progenitoras neurales y de neuronas inmaduras [252].

También se encontró la presencia de la señalización glutamatérgica en nuestras células de tipo neuronal. Se observó baja expresión de los receptores ionotrópicos NR1 y GluK5, y del receptor metabotrópico mGluR5 en las hASCs sin diferenciar y un incremento en la expresión de los mismos luego del protocolo de inducción neuronal (NR1, P=0,049; GluK5, P=0,026; mGluR5, P=0,064) (**Figura 44**), característico de las células de los estadios tempranos de la neurogénesis, como son los progenitores neurales y las neuronas inmaduras. Esto confirmó que las hASCs habían predeterminado su destino hacia la especificación neuronal como había sido reportado previamente [288].

Finalmente se estudiaron los receptores de GABA y se detectó expresión basal de ambos co-transportadores NKCC1 y KCC2 en las hASCs sin diferenciar. Su expresión se vio aumentada significativamente luego de la diferenciación neuronal (P=0,036; P=0,049, respectivamente) (**Figura 44**), lo cual concuerda con resultados previos en cerebro adulto donde la expresión de NKCC1 había sido asociada con proliferación neuronal en neuronas juveniles y algunas neuronas maduras [289,290]. Sin embargo, la mera expresión de estos co-transportadores en nuestras células de tipo neuronal no implica necesariamente que estas células sean funcionalmente activas. También se detectó la expresión de GABAbR1 y GABAbR2 en las hASCs, y un aumento significativo de GABAbR2 (P=0,039) luego de la inducción neuronal, lo cual fue previamente asociado con la actividad proliferativa en células progenitoras neurales antes del compromiso de estas células; y una disminución significativa de GABAbR1 (P=0,022), ligado a la subsecuente diferenciación de los progenitores neurales hacia el linaje neuronal (**Figura 44**) [291].

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

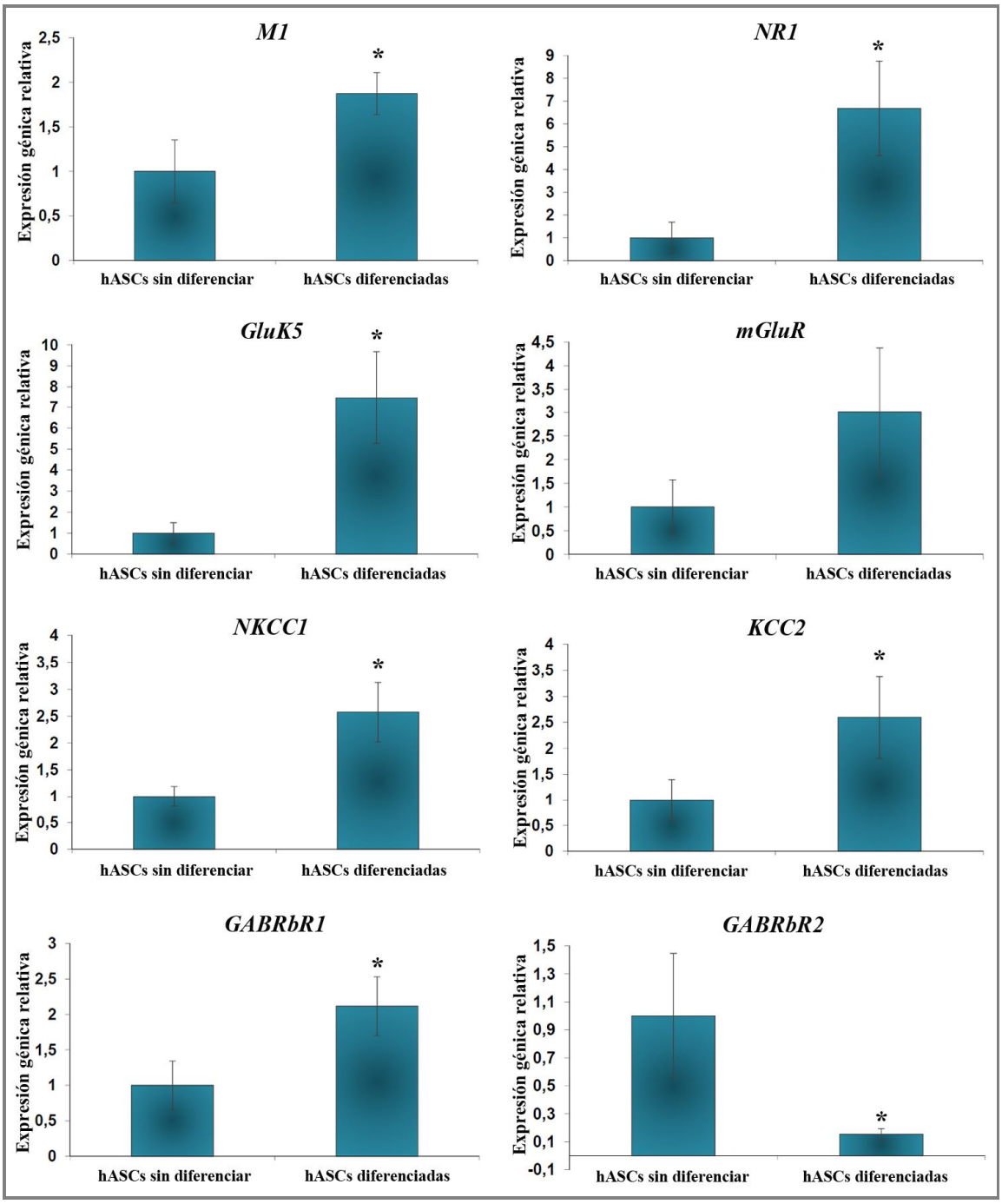


Figure 44. Expresión génica relativa de genes correspondientes a receptores de neurotransmisores colinérgicos, GABAérgicos y glutamatérgicos. Se detectaron niveles basales de ARNm de estos genes en las hASCs, pero la mayoría de ellos aumentaron significativamente luego de los 14 días de diferenciación neuronal. *p<0.05.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

DISCUSIÓN

Las terapias celulares constituyen una opción terapéutica interesante para el tratamiento de diversas enfermedades neurológicas como son la enfermedad de Parkinson, el Alzheimer, Huntington y daños en la médula espinal, entre otras .Uno de los problemas principales de estas terapias es el origen y la naturaleza de las células que van a ser utilizadas para estos procedimientos. La célula ideal debería exhibir diversas propiedades importantes, incluyendo: (1) un alto nivel de proliferación *in vitro*, permitiendo la producción de un gran número de células a partir de una mínima cantidad de material donado; (2) un buen control de esta actividad proliferativa *in vivo*; y (3) una plasticidad fenotípica permitiendo la diferenciación en el fenotipo neuronal o glial apropiado.

1. Obtención de Células Madre Mesenquimales derivadas de Tejido Adiposo

Diversos trabajos recientes sugieren que las células madre adultas de tejido adiposo podrían ser una alternativa adecuada para las estrategias de reemplazo celular en el tratamiento de los desórdenes del SNC [83,292-295]. En esta tesis nos ha parecido interesante evaluar los procesos moleculares a través de los cuales se produce la diferenciación desde una hASC a una célula de características fenotípicamente similares a una neurona. Las hASCs fueron aisladas a partir de tejido adiposo humano usando un procedimiento de adhesión, y fueron seleccionadas por su capacidad y rapidez de proliferación. Se demostró que estas células estromales presentaban una morfología de tipo fibroblastoide y fueron capaces de expresar marcadores de células madre mesenquimales, CD90 y Stro1. También se observó que estas células tenían la habilidad de diferenciarse a múltiples linajes, incluyendo el adipogénico, osteogénico, condrogénico y neurogénico, en concordancia con estudios previos [71,272,274,275,296].

Los factores de pluripotencialidad proveen mecanismos fundamentales subyacentes a las propiedades de las células madre. Diversas vías moleculares mediadas por dichos factores interaccionan con diferentes cascadas de señalización para mantener u obtener la pluripotencia de una potencial célula madre. Se ha demostrado que Oct4, Sox2 y Nanog co-regulan ciertos genes que codifican componentes de las vías de señalización que controlan los comportamientos de célula madre como son la proliferación y diferenciación celular. Los mecanismos involucrados en la regulación de Oct4 en las ESCs han sido ampliamente investigados pero su función en el estadio adulto no ha sido identificada. Sin embargo, recientemente Oct4 ha sido asociado con el estado indiferenciado de poblaciones de células madre derivadas de tejidos humanos adultos [101-107]. En este trabajo se encontró que una

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

alta expresión del gen Oct4 y sus dos isoformas, Oct4A y Oct4B, en las hASCs y una disminución luego de la diferenciación neuronal, en concordancia con trabajos previos donde el *knockdown* de Oct4 disminuye la identidad de célula madre e incrementa la diferenciación de las células hacia un determinado linaje [297,298]. Por otra parte corroboramos la expresión de la isoforma Oct4A en las hASCs, la cual ha sido demostrada como la única isoforma responsable de mantener la pluripotencia. Estos resultados y los de trabajos previos demuestran que Oct4 participa en la autorrenovación y supervivencia de las hASCs.

Nanog parece ser crucial para la pluripotencia y la autorrenovación de las ESCs pero no es expresado por células madre neurales y hematopoyéticas, tejidos adultos, fibroblastos o ESCs diferenciadas [88,92,93]. En el presente trabajo no pudimos detectar el marcador de células madre embrionarias Nanog, lo cual concuerda con resultados previos en distintos tipos de células madre [86], probablemente porque las hASCs se encuentre en un estado transitorio reversible preparadas para la autorrenovación o la diferenciación.

De esta manera, se pudo corroborar que las células madre derivadas de tejido adiposo humano corresponden a una población de células madre mesenquimales que poseen morfología, plasticidad y expresión de marcadores característicos de este tipo de células. Y que además expresan el factor de pluripotencia Oct4, el cual se comporta de la misma manera que como lo hace en las ESCs.

2. Características morfológicas y biológicas del linaje neural en hASCs sometidas al protocolo de diferenciación neuronal.

Luego de la inducción de la diferenciación neuronal, las hASCs revelaron características morfológicas y biológicas de los linajes neurales, como también un aumento en la expresión de proteínas neuronales específicas, como son βIII-tubulina, NF200, NSE, MAP2, A2B5 y sinaptofisina; y de marcadores de progenitores neurales, como son GFAP y nestina.

Este patrón de expresión es similar al observado para las células madre neurales, neuronas inmaduras y maduras durante el proceso de la neurogénesis adulta [258]. Las células madre en el cerebro adulto exhiben características de glia radial, expresando las proteínas de filamento intermedio nestina y GFAP [208,258,299]. Estas células madre sufren una división simétrica dando lugar a dos células madre idénticas. Pero ellas también pueden dividirse asimétricamente y dar origen a una nueva célula madre y a un progenitor neuronal. Este último expresa nestina, PSA-NCAM y DCX [300,301]. Una vez que estos progenitores están comprometidos, ellos se vuelven neuronas inmaduras expresando los marcadores βIII-tubulina y calretinina. Y finalmente, cuando estas células reciben la estimulación neurogénica correcta, se diferencian terminalmente y adquieren el fenotipo maduro expresando NeuN,

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

MAP2, NSE, TAU y sinaptofisina [302-304]. Esta similitud en el patrón de expresión génica probablemente se deba a la utilización de bFGF y RA, dos moléculas epigenéticas críticas en nuestro medio definido químicamente, las cuales son rutinariamente empleados en la expansión de las células madre de la cresta neural [305,306].

El bFGF es ampliamente conocido por sus efectos pleiotrópicos sobre los progenitores neurales, produciendo efectos neurogénicos, proliferativos y especificadores en las células madre del SNC adulto [307-309]. Se ha sugerido que un cambio en la concentración de bFGF puede tener un rol en la regulación del destino de las células madre neurales, donde una baja concentración de bFGF, similar a la hemos utilizado, llevan a la célula hacia un programa neuronal, mientras que altas concentraciones estimulan la proliferación de estas células [310]. Por otra parte, se ha demostrado que el bFGF tiene la capacidad de activar un programa neurogénico latente en progenitores multipotentes del SNC [311].

El ácido retinoico (RA) es una de las señales inductivas más importantes en la ontogenia de los vertebrados y es comúnmente utilizado *in vitro* para inducir la diferenciación neural, el cual se ha demostrado que promueve la expresión génica neural y reprime la expresión de genes mesodérmicos [312-315]. El RA es conocido como la forma activa de la vitamina A y se ha demostrado que tiene un rol importante durante la embriogénesis, influenciando en el desarrollo neural en los primeros estadios del desarrollo del SNC [316].

Es evidente que la caracterización de una célula derivada de una célula madre pluripotente para ser denominada “neurona”, debe incluir criterios funcionales. En nuestro protocolo no hemos podido determinar la presencia de actividad eléctrica en las células diferenciadas debido a problemas logísticos. Sin embargo, una característica semifuncional pudo ser observada utilizando la tinción con el colorante FM1-43 en las hASCs luego de la diferenciación neuronal. Esta marca, dependiendo de la despolarización inducida, es evidencia indirecta de la presencia de terminales presinápticos funcionales, condición necesaria para la neurotransmisión eficiente [317]. En el presente trabajo, las células diferenciadas mostraron una marca positiva y clara con la despolarización, mientras que las hASCs sin diferenciar no fueron capaces de incorporar el colorante. La visualización en tiempo real de las vesículas sinápticas en células vivas ha sido una evidencia fuerte en nuestro trabajo acerca de la eficiencia de la diferenciación neuronal.

3. Las vías Shh, BMP, Wnt y Nocth se encargarían de controlar la proliferación y diferenciación de las hASCs.

Comprender la regulación molecular de la transición “mesenquimal-neural” es un paso importante para una futura diferenciación guiada, no sólo para el uso terapéutico de las células

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

madre, sino para la utilización de otro tipo de estrategia terapéutica en medicina regenerativa, como ser el uso de factores diferenciadores de acción molecular específica a emplear en neurología regenerativa. Por otra parte, conocer los genes reguladores, podría ayudarnos al diseño de terapias génicas específicas de diferenciación neural. Sin ir más lejos, una de las modernas estrategias de diferenciación celular de tejido adulto es la pluripotencialidad inducida, en la cual células de tejido adulto son moduladas químicamente para lograr la expresión de genes típicos de estadios anteriores [318-320]. Por otra parte, no debe soslayarse el valor de la investigación básica en este terreno de la biología celular y molecular, aún no plenamente investigado.

Para estudiar algunas de las vías involucradas en esta transición, en el presente trabajo se analizó la expresión génica de diferentes factores involucrados en la proliferación de las células madre neurales, como también en la diferenciación de neuronas en el cerebro adulto.

Shh, un importante morfógeno, está involucrado en una variedad de procesos celulares durante el desarrollo y la enfermedad, tales como proliferación, determinación del destino, diferenciación y supervivencia celular. Ha sido ampliamente estudiado en el contexto de las células madre, con la expectativa de que la modulación específica de su señal pueda proveer una herramienta *in vitro* para la expansión de las células madre y la manipulación de la diferenciación específica de linaje en el futuro. El principal hallazgo de este trabajo fue que la señalización Shh representa un mecanismo endógeno que regula la proliferación de las células con propiedades de células madre en el tejido adiposo, es decir, de las hASCs. Se demostró que las hASCs están dotadas con una señalización Hedgehog activa, con expresión de los receptores de Shh, Ptc y Smo, y de los factores de transcripción *downstream*, Gli1, Gli2 y Gli3, durante la proliferación de estas células. Sin embargo, esta expresión se vio disminuida luego de la inducción neuronal, en concordancia con el hecho de que la proliferación disminuye durante el proceso de diferenciación. La disminución de la señalización Shh podría estar asociada con una disminución de la expresión de Gli1. De hecho, Gli1 es el activador principal de la señalización Hedgehog y una disminución de su expresión *in vivo* e *in vitro* lleva a una señalización disminuida [148]. Estos hallazgos demuestran que Shh es un factor que regula el número de células madre y contribuyen a comprender los mecanismos que modulan la proliferación de las mismas. La modulación controlada de la señalización Shh *in vitro* e *in vivo* es probable que lleve al desarrollo de protocolos para incrementar el número de células con propiedades de células madre, en un esfuerzo para mejorar los efectos sobre las enfermedades degenerativas. Reclutar un número adecuado de progenitores neurales, puede ser una estrategia de interés tanto o más importante que el trasplante de células madre en enfermedades con déficit de las mismas en la zona lesionada, como por ejemplo en lesiones isquémicas.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Los inhibidores Ids son conocidos por ser los principales blancos de la señalización de la diferenciación celular [321,322]. Han surgido como intermediarios regulatorios claves para coordinar la expresión génica asociada a la diferenciación con el control del ciclo celular en respuesta a las señales extracelulares. Existe una paradoja entre las propiedades funcionales de las diferentes proteínas Ids en promover el crecimiento celular y detener la diferenciación y sus aparentemente disparatados mecanismos de acción. Durante la embriogénesis, una abundancia de los transcriptos Id1, Id2 e Id3 se observaron en la VZ del cerebro de roedores. La expresión de los diferentes genes Ids encaja bien con la cronología del desarrollo neuronal: la expresión de Id1 e Id3 es encontrada en neuroblastos mitóticamente activos y menos diferenciados, y su expresión disminuye en estadios posteriores cuando los neuroblastos ya no están presentes. Por otra parte, Id2 e Id4 son expresados primero en los presuntos neuroblastos y más tarde en neuronas postmitóticas específicas. De esta manera, Id2 e Id4 marcan grupos de neuronas desde estadios tempranos, mientras que la expresión de Id1 e Id3 está presente en neuroblastos mitóticamente activos [179]. Nuestros datos confirmaron que la principal función de Id1 está estrictamente conectada con la regulación de la diferenciación celular, lo cual no difiere de los datos obtenidos para células madre de tejidos neuroectodérmicos y de cordón umbilical sometidas a diferenciación neuronal [284,322]. En estudios previos se demostró que la proteína Id1 podía actuar como un regulador dominante negativo para interferir la actividad transcripcional de las proteínas proneurales e inhibir la diferenciación prematura de los progenitores neuronales [172]. En este estudio, se encontró expresión de Id1 en las hASCs, probablemente asociado al mantenimiento de su capacidad de autorrenovación y a la prevención de la diferenciación neuronal. Luego de la inducción neuronal, la expresión de Id1 disminuyó significativamente, lo cual concuerda con reportes previos [232,283]. Además, se demostró que hubo un aumento significativo en la expresión de Id4 luego de la diferenciación neuronal, previamente asociado con fenotipos neuronales más maduros [180]. Así, distintos miembros de la familia de los genes Id pueden tener diferentes roles funcionales que pueden ser dependientes de sus niveles de expresión y de la co-expresión de ciertos factores de transcripción bHLH asociados a las Ids [179,232]. Por otra parte, el antagonista endógeno de BMP, Noggin, es una molécula potencial que controla el compromiso neural. Parece promover la neurogénesis uniéndose al BMP endógeno y de esta manera previniendo la activación de los receptores de BMP [183]. Los resultados de este estudio demostraron que únicamente se detectó expresión de Noggin luego de la diferenciación neuronal, confirmando la adquisición del compromiso neuronal por parte de las hASCs.

Además, este trabajo demostró la expresión de diversos componentes de la vía de señalización de Wnt en las hASCs, sugiriendo que esta vía puede ser de fundamental

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

importancia en estas células. La expresión de los transcriptos de esta vía se vio significativamente disminuida luego del protocolo de inducción neuronal, lo cual avala datos previos donde se sugirió que la señalización Wnt puede regular las vías de diferenciación en varios tipos celulares mesenquimales. La señalización Wnt canónica endógena en preadipocitos y MSCs inhibe la diferenciación y si se inhibe la vía ocurre una diferenciación espontánea. Los niveles de expresión son elevados en preadipocitos y MSCs pero disminuyen cuando se estimula la diferenciación [161,323,324]. La estimulación de una vía por una Wnt particular parece depender del sistema experimental empleado, un ligando específico puede señalizar a través de mecanismos canónicos o no canónicos [325]. En el presente trabajo, se empleó bFGF y ácido retinoico como agentes neuritizantes y es importante destacar las interacciones de estos agentes con la señalización Wnt. El tratamiento con bFGF de células progenitoras neurales provee soporte trófico y mitogénico, además de influenciar la elección del destino de la célula progenitora [326]. Miembros de la familia Wnt son usualmente encontrados en la proximidad de los dominios de síntesis de FGF durante el desarrollo neural y actúan en cooperación con FGF para controlar el destino celular [327]. Por otra parte, la regulación negativa de la vía de Wnt ha sido demostrada como uno de los mecanismos involucrados en la diferenciación neuronal inducida por RA [328]. Interesantemente, se ha demostrado que β-catenina, una molécula clave en la señalización Wnt, interactúa directamente con el receptor del RA, disminuyendo la transactivación mediada por β-catenina-Lef/CBF1 en células en cultivo de manera dosis dependiente [329]. A pesar de que la β-catenina tiene efectos mitogénicos, se sabe que no es suficiente para mantener las células en estado proliferativo y requiere de otros factores como el suero para lograrlo [330]. Estos hallazgos incrementan la posibilidad de que uno de los efectos del RA en las hASCs, sumado a la limitación del suero en el medio, sea inhibir la vía anti-neural Wnt incrementando sus inhibidores o secuestrando β-catenina en una manera dependiente de concentración, resultando en la promoción de la diferenciación neural.

Notch ha sido ampliamente estudiado en el contexto de las células madre. En este trabajo se demostró que componentes claves de la señalización Notch están presentes en las hASCs. Notch1, CBF1 y los genes blanco Hes1, Herp1 y Hey1 fueron detectados, lo que nos permitió concluir que las hASCs poseen los elementos necesarios requeridos para una señal Notch funcional; y que la expresión de estos transcriptos se ve disminuida luego de 14 días de diferenciación neuronal. Hes1, Herp1 y Hey1 actúan como represores de los factores de transcripción bHLH que regulan el compromiso del linaje, inhibiendo la expresión de genes específicos del destino celular, manteniendo de ese modo a las células madre o progenitoras. Estos resultados son similares a aquellos obtenidos en un trabajo previo en HSCs, donde se demostró que la señalización Notch es usada por las HSCs y es regulada de manera negativa

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

a medida que las células se diferencian [286]. En las NSCs, blancos de la señalización Notch trabajan juntos para prevenir la diferenciación terminal y preservar el pool de células madre, a través de la regulación negativa de genes proneurales como Mash1 [184,285,331]. Basados en estos datos, podríamos sugerir que Notch y sus genes blanco, guardianes de poblaciones de progenitores y reguladores de los destinos de las NSCs, probablemente regulan la proliferación y la expresión inducida por diferenciación de marcadores neurales en las hASCs, avalando la idea de que la diferenciación de las hASCs en células tipo neuronal representa un proceso regulado análogo al que ocurre durante la diferenciación de las NSCs.

4. La diferenciación neuronal de las hASCs induce la expresión de genes proneurales, neuronales y neurotransmisores involucrados en la neurogénesis adulta.

En este trabajo, se demostró que las células tipo neuronal obtenidas a partir de la inducción neuronal de las hASCs tienen un patrón de expresión génica similar al del proceso de la neurogénesis adulta.

Nuestros datos de estudios *in vitro* demostraron que los factores bHLH de determinación y diferenciación, Mash1, Ngn2, Tbr1, Tbr2 y NeuroD1 son expresados en la hASCs y dicha expresión se ve significativamente aumentada luego del protocolo de diferenciación neuronal. Por otra parte, también demostramos que la expresión de los factores inhibidores Id1 y Hes1 se vio disminuida significativamente después de la diferenciación, los cuales son conocidos por inhibir la neurogénesis a través de la regulación negativa de los genes proneurales. De esta manera vemos como el comportamiento de estos factores en la diferenciación neuronal de las hASCs es similar a lo que ocurre en la neurogénesis adulta, mucha expresión de inhibidores está asociada a poca expresión de genes proneurales y viceversa.

Estudios *in vivo* demostraron que los factores bHLH logran la diferenciación neuronal en colaboración con Pax6, cuya función principal parece ser especificar la identidad posicional de los progenitores, y este factor también fue detectado en las hASCs y se vio aumentado luego del protocolo de diferenciación. Estos factores de especificación y bHLH participan en conjunto en controlar la coordinación de la diferenciación y el destino celular de los progenitores multipotentes [332].

Sox2 es expresado en células multipotentes, es esencial para la inducción neural del ectodermo y retiene la identidad de progenitor neural interactuando con los factores proneurales bHLH [117,333,334]. En este trabajo se pudo corroborar la expresión de este factor en las hASCs y que, luego de la diferenciación neuronal, la expresión de Sox2 se vio significativamente aumentada, sustentando la idea de que se ha logrado determinar a las células hacia el linaje neural.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Los resultados obtenidos acerca del aumento de los niveles de expresión de Pax6, Sox2, Mash1 y Ngn2 luego del protocolo de diferenciación neuronal concuerdan con trabajos previos en neurogénesis adulta, donde había sido demostrado que los primeros pasos de este proceso involucran la expresión de estos factores de especificación y bHLH proneurales [227]. Pax6 regula la diferenciación neuronal y su sobreexpresión promueve la neurogénesis en el cerebro, mientras que la pérdida de Pax6 resulta en una neurogénesis reducida y la formación precoz de precursores de oligodendrocitos y astrocitos [219]. Los factores de determinación proneural Mash1 y Ngn2 están presentes transitoriamente en las células progenitoras neurales y, si son expresados ectópicamente en células progenitoras neurales, las mismas salen del ciclo celular y comienzan a expresar marcadores de diferenciación neuronal [227,335-337].

En base a trabajos previos, se examinó el patrón de expresión de los factores bHLH de diferenciación NeuroD1, NeuroD2, Math2, Tbr1 y Tbr2, los cuales son expresados en estadios intermedios y tardíos de la neurogénesis [229,260]. Se encontró que antes de la diferenciación neuronal había expresión basal de NeuroD1 y Tbr2, la cual se vio incrementada luego de la diferenciación. Las hASCs sin diferenciar no expresaron Tbr1 pero si se lo pudo detectar luego de la inducción. Sin embargo, no se detectó la expresión de los factores Math2 y NeuroD2 en ninguna de las etapas del protocolo, ambos expresados en neuronas maduras, en los últimos estadios de la neurogénesis. Los progenitores neurales se caracterizan por la expresión de Tbr2, mientras que las neuronas inmaduras expresan Tbr1 y NeuroD1. Mientras que la expresión de Tbr1 desaparece en la maduración neuronal, NeuroD1 es mantenido débilmente cuando comienza la expresión de NeuN. Finalmente, NeuroD2 es altamente expresado en neuronas maduras [229,338].

Estos factores de transcripción son expresados tanto en la neurogénesis embrionaria y adulta. Entre ellos, Ngn2 es expresada en células progenitoras neurales e induce fuertemente la producción de neuronas. La expresión de Pax6 se solapa con la de Ngn2 en un pequeño número células progenitoras neuronales, y Pax6 puede regular la transcripción de Ngn2. Existe un cierto solapamiento de la expresión de Pax6 con Tbr2, pero Tbr2 es expresado principalmente en progenitores intermedios [260]. NeuroD es otro factor de transcripción expresado en la neocorteza y el giro dentado del hipocampo donde es necesario para la proliferación y diferenciación neuronal. Tbr1 se expresa en todas las neuronas piramidales y se encarga de regular la diferenciación y migración celular, como también la formación axonal. Aunque la expresión secuencial de factores de transcripción es difícil de demostrar directamente, podría existir una transición de expresión de factores de transcripción desde Pax6⁻Ngn2⁻Tbr2⁻NeuroD⁻Tbr1 [229,339,340].

A partir de que los genes proneurales son necesarios y suficientes para iniciar el desarrollo de los linajes neurales y promover la generación de progenitores que están comprometidos a

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

la diferenciación neuronal [226,227], y en base a que hemos observado que en hASCs los niveles de genes proneurales están ausentes o en niveles muy bajos y que la diferenciación neuronal lleva al aumento significativo de la expresión de casi todos los genes proneurales investigados, pudimos confirmar que las células tipo neuronal obtenidas a partir de hASCs están comprometidas al linaje neural.

Diversas moléculas extracelulares, como son los neurotransmisores, han sido implicadas en la regulación de la proliferación celular y la diferenciación neuronal en el SNC. La acetilcolina produce su efecto sobre el SNC a través de receptores muscarínicos y nicotínicos, y se han sugerido roles importantes en la comunicación celular para estos receptores durante la migración y diferenciación de células precursoras neurales *in vivo* e *in vitro*. En el presente trabajo se analizó y detectó la expresión del receptor muscarínico M1 en las hASCs y un aumento de su expresión luego de la diferenciación neuronal, lo cual es típico de células progenitoras y neuronas inmaduras. Se ha evidenciado que el receptor M1 se expresa en células progenitoras positivas para nestina y en neuronas recientemente diferenciadas positivas para βIII-tubulina. Estos datos avalan la idea de que la expresión temprana de M1 participa en la diferenciación neuronal previa a la sinaptogénesis [252].

Glutamato es el neurotransmisor más prominente del SNC y su acción es llevada a cabo a través de los receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA y kainato) y metabotrópicos. En este estudio, se observó baja expresión de los recetores ionotrópicos NR1 y GluK5 y del receptor metabotrópico mGluR5 en las hASCs y un incremento de la expresión luego del protocolo de inducción neuronal. La expresión de los receptores de glutamato ionotrópicos se detectó en neuronas inmaduras, y se sabe que las subunidades NR1 y NR2 son expresadas en estadios tempranos de la neurogénesis adulta [248,249,341]. Por otro lado, el receptor ionotrópico tipo kainate GluK5 se expresa en neuroblastos migratorios en la ZSV [245]. El receptor de glutamato metabotrópico mGluR5 se expresa principalmente en células progenitoras neurales, incluyendo neuroblastos, y su activación endógena controla la proliferación y/o supervivencia de estas células *in vivo* e *in vitro* [246]. De esta manera, nuestros resultados y los datos previamente mencionados confirman que las hASCs diferenciadas predisponen su destino hacia la especificación neuronal.

Por otra parte, GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro adulto y actúa principalmente uniéndose a sus receptores $GABA_A$ o $GABA_B$. Sin embargo, en el desarrollo temprano, las acciones de GABA pueden ser excitatorias y pueden funcionar como una señal trófica [237,342]. Cambios en la función gabaérgica durante el desarrollo surgen, en parte, debido a alteraciones en el potencial de reversión de los iones cloruro, mediados por cambios en la expresión de las proteínas transportadoras de cloruro [343,344]. El receptor $GABA_A$ dispara un canal de Cl^-, y en el cerebro maduro, la activación de GABA provoca la

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

entrada de Cl^- y la hiperpolarización de la membrana debido a la baja concentración intracelular de Cl^- establecida por el co-transportador KCC2 [344]. Sin embargo, durante el desarrollo, GABA produce un efecto diferente despolarizando los progenitores y neuronas inmaduras. Esto se debe al gradiente de Cl^- establecido por el co-transportador de $Na^+ K^+ 2Cl^-$ NKCC1, expresado desde los estadios intermedios de desarrollo hasta las primeras semanas de vida. NKCC1 importa Cl^- dentro de las células inmaduras, causando de esta manera la salida de Cl^- y la despolarización de la membrana luego de la activación del receptor $GABA_A$ [289]. Durante el desarrollo neuronal temprano, existe una expresión retrasada del co-transportador KCC2 y su expresión es aumentada durante la maduración neuronal, lo cual se correlaciona con el cambio de la excitación a inhibición GABAérgica [345]. En nuestro trabajo, se detectó la expresión basal de ambos transportadores en las hASCs y ambos fueron regulados de manera positiva luego de la diferenciación neuronal. Sin embargo, la mera expresión de estos co-transportadores en las células de tipo neuronal no implica necesariamente que estas células sean funcionalmente activas. Por otra parte, los receptores $GABA_B$ son funcionalmente expresados por las células progenitoras neurales para promover preferentemente el compromiso hacia el linaje neuronal, luego de la activación de la proliferación celular en el cerebro [291]. Nuestros resultados son concordantes con estos trabajos previos, ya que se detectó la expresión de GABAbR1en las hASCs sin diferenciar y un aumento de la misma luego de la diferenciación neuronal; y lo contrario se observó para GABAbR2, con una disminución de su expresión luego de la inducción. La expresión de estos receptores es importante, ya que influencian en la actividad neuronal modulando numerosas vías de señalización intracelular.

Por otra parte, dada la importancia de la expresión aumentada o disminuida de diferentes vías de neurotransmisión en diversas enfermedades neuropsiquiátricas, el conocimiento de su regulación molecular, abre una línea de investigación interesante para la elucidación de potenciales mecanismos fisiopatológicos e incluso terapéuticos para las mismas.

5. Modelo de código molecular para la diferenciación neuronal de hASCs

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, luego del protocolo de diferenciación neuronal, las hASCs diferenciadas adquieren un patrón de expresión específico de genes neurales tempranos e intermedios, tales como factores de especificación, proneurales, neuronales y de neurotransmisores (**Tabla 2**).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Expresión significativamente diferente			Expresión significativamente diferente			Expresión no estadísticamente diferente		
Gen	EGR	Valor p	Gen	EGR	Valor p	Gen	EGR	Valor p
OCT4	0,08	3,29E-03	CICLINAD1	0,40800131	4,93E-02	OCT4B	0,59	3,17E-01
OCT4A	-0,29	3,24E-02	DKK1	0,46978806	4,37E-02	BIII-TUBULINA	3,92	7,53E-02
SOX2	5,02	1,16E-04	WISP1	-1,10492478	4,90E-02	PTC	0,71	2,47E-01
GFAP	-0,20	1,58E-02	NOTCH1	-0,03	1,10E-02	ID2	1,97	4,34E-01
NESTINA	-0,40	1,11E-02	CBF1	0,49	4,61E-02	ID3	-1,13	6,44E-02
NSE	2,03	4,66E-02	HERP1	0,13	7,89E-03	HES1	0,51	1,20E-01
TAU	3,40	1,09E-02	HEY1	-0,25	9,09E-03	MASH1	3,26	1,70E-01
MAP2	5,29	1,68E-02	PAX6	1,98	4,95E-02	NGN2	3,12	2,15E-01
SYNAP	2,13	4,31E-02	NEUROD1	2,92	4,66E-02	TBR2	1,80	2,91E-01
SMO	0,08	3,77E-02	TBR1	5,27		mGLUR	3,01	4,01E-01
GLI1	0,14	3,17E-03	M1	1,87	2,05E-02			
GLI2	0,29	6,44E-03	NR1	6,68	4,88E-02			
GLI3	0,14	4,28E-02	GLUK5	7,48	2,61E-02			
ID1	-4,03	1,98E-04	NKCC1	2,57	3,57E-02			
ID4	1,50	7,37E-03	KCC2	2,59	2,51E-02			
NOGGIN	0,49		GABRbR1	2,12	4,94E-02			
WNT5A	-0,35	4,94E-02	GABRbR2	0,15	2,23E-02			

EGR: *Expresión Génica Relativa*

Tabla 2. Expresión génica relativa en hASCs diferenciadas en relación a las hASCs sin diferenciar.

En presencia de los factores de crecimiento/citoquinas conocidas por inducir diferenciación neuronal, como son el RA y el bFGF, las hASCs se diferencian *in vitro* en células tipo neuronal que expresan marcadores como MAP2, TAU, NSE, NF200, βIII-tubulina y sinaptofisina. El tratamiento con estos inductores está regulando de manera positiva la expresión de una gran variedad de genes neurales. Es improbable que estos inductores estén actuando directamente sobre cada uno de estos genes; sin embargo, probablemente sirvan como un disparador de una vía de expresión génica neural coordinada y preexistente.

Una posible explicación de nuestros hallazgos es que la diferenciación neuronal de las hASCs resulta en un estadio intermedio de diferenciación neuronal, una transición entre progenitores neurales y neuronas inmaduras, con el establecimiento de la determinación del destino neural y la expresión de marcadores característicos de estas etapas.

En este trabajo, se demostró que la expresión de Hes1 e Id1, genes blanco de la señalización Notch y BMP, respectivamente, fueron regulados de manera negativa luego de la diferenciación neuronal [346,347], y que los genes bHLH proneurales, Mash1 y Ngn2, se regularon de manera positiva luego del protocolo de inducción. Por trabajos previos, se sabe que Hes1 y Id1 regulan negativamente la diferenciación neuronal, antagonizando los genes bHLH proneurales [348]. Por lo tanto, con los resultados de este trabajo se demostró que existiría un balance entre reguladores positivos y negativos, tales como Mash1/Ngn2 y Hes1/Id1, que serían críticos para la diferenciación neuronal de las hASCs.

Basados en las similitudes moleculares encontradas entre el patrón de expresión génica detectado en la diferenciación neuronal de las hASCs y la neurogénesis adulta, se propone un modelo de código molecular para la diferenciación neuronal de las hASCs. Este modelo

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

sugiere que células co-expresando factores de especificación y factores bHLH inhibitorios son mantenidos como progenitores indiferenciados (hASCs) y que estas células generan de manera secuencial progenitores neurales intermedios inmaduras con la concomitante expresión de factores proneurales y genes neuronales tempranos. Finalmente, estos progenitores intermedios se diferencian para dar lugar a neuronas inmaduras con expresión de genes neuronales más tardíos (**Figura 45**).

De acuerdo a nuestro modelo molecular de la diferenciación neuronal de las hASCs, las hASCs expresando GFAP, Sox2, Pax6, Id1, Hes1 y Nestina se diferencian en células que están en una transición activa ente células progenitoras neurales expresando Mash1, Ngn2, Noggin y Tbr2, y neuronas diferenciadas inmaduras expresando βIII-tubulina, NeuroD1, MAP2, Sinaptofisina, Tbr1, NSE y TAU. Además, expresan diferentes receptores para neurotransmisores. Este modelo es concordante con el modelo actual de neurogénesis adulta, avalando nuestra hipótesis de que existe cierto paralelismo entre estos dos procesos diferentes [338,349].

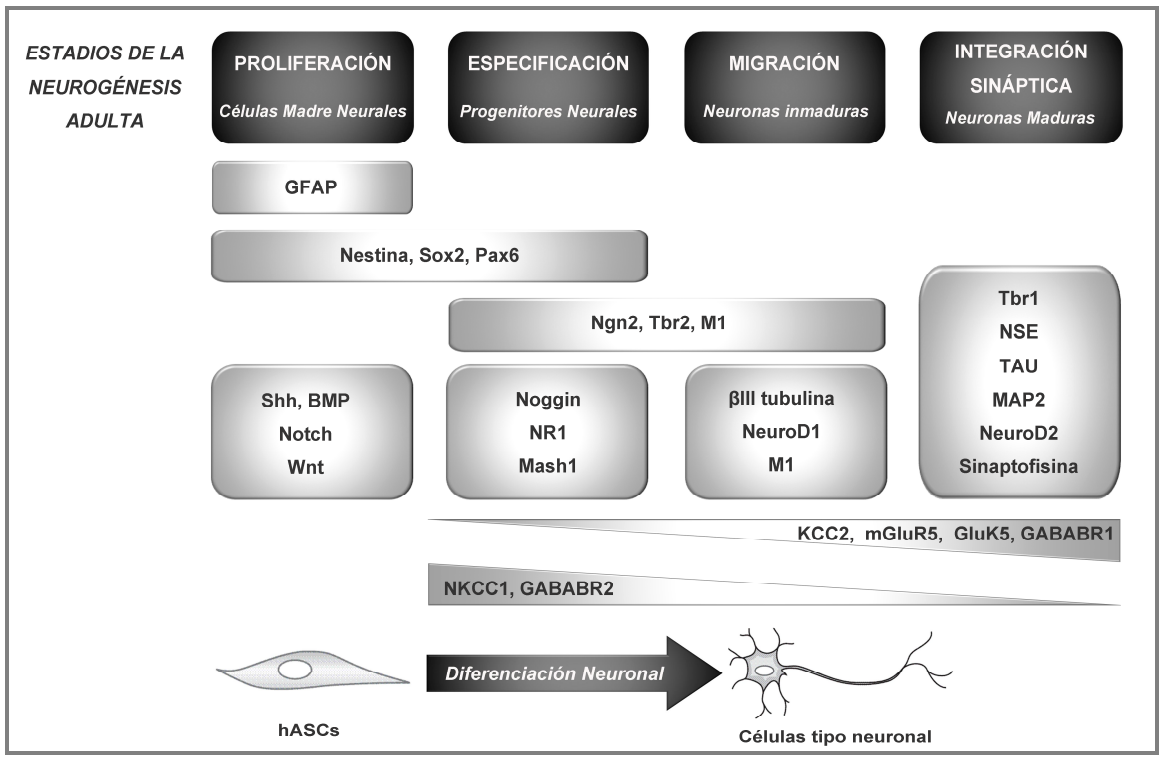


Figura 45. Modelo de código molecular de la diferenciación neuronal de las hASCs, basado en las similitudes en el patrón de expresión génica entre esta diferenciación neuronal y la neurogénesis adulta.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las células madre derivadas de tejido adiposo exhiben propiedades que las hacen una población interesante a la hora de pensar en la "célula ideal" a utilizar en medicina regenerativa:

- ✓ Fácil obtención.
- ✓ Expansión *in vitro.*
- ✓ Multipotencia.
- ✓ Hipoinmunogenicidad.

Sin embargo, creímos necesario y fue el objetivo de la presente tesis, que antes de pensar en aplicaciones clínicas, era indispensable conocer en cierto detalle los mecanismos moleculares que regulan su autorrenovación y diferenciación, en este caso hacia células de fenotipo neural. Dirigir a estas células a un linaje específico, logrando la diferenciación terminal completa y el mantenimiento del estado diferenciado son requisitos esenciales para la ingeniería de tejidos. De manera que descifrar las cascadas moleculares que regulan el mantenimiento de las hASCs, la autorrenovación y la diferenciación, facilitarían el desarrollo de nuevas terapias celulares para enfermedades neurológicas.

Hasta el momento, la diferenciación de las hASCs en células de tipo neuronal ha sido llevada a cabo a través del agregado de varios factores, citoquinas y/o antioxidantes. Sin embargo, la eficiencia de estas estrategias no ha sido suficiente para aplicaciones terapéuticas. Por lo tanto, si se pueden elucidar los mecanismos moleculares subyacentes a la diferenciación neuronal de las hASCs, sería posible determinar si estas células tienen la capacidad de diferenciarse al linaje neuronal como también incrementar la eficiencia de la misma.

Los resultados de este trabajo demuestran que las hASCs tienen la capacidad de diferenciarse al linaje neural activando los mismos mecanismos moleculares que se activan en la neurogénesis adulta, convirtiéndolas en una posible fuente de células autólogas para terapias de reemplazo celular en diferentes enfermedades neurológicas.

En síntesis, si bien es poco probable que las hASCs sean capaces de reemplazar directamente a las neuronas pérdidas durante la enfermedad, y de restaurar la función de los circuitos neuronales a través de mecanismos que involucren la diferenciación y el mantenimiento de fenotipos neuronales robustos, las hASCs serían capaces de contribuir a la reparación neural a través de otros mecanismos. Por lo tanto, estudios adicionales son necesarios para determinar si las hASCs autólogas, trasplantadas en el sitio lesionado,

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

sobreviven, se implantan e interactúan con poblaciones progenitoras endógenas para incrementar la reparación neural.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

BIBLIOGRAFÍA

1. P.J. Donovan, J. Gearhart, The end of the beginning for pluripotent stem cells, Nature 414 (2001) 92-7.
2. N.B. Ivanova, J.T. Dimos, C. Schaniel, J.A. Hackney, K.A. Moore, I.R. Lemischka, A stem cell molecular signature, Science 298 (2002) 601-4.
3. N. Academies Understanding Stem Cells. An overview of the sciences and issues of the National Academies. The National Academies.
4. A.M. Elliott, K.A. Elliott, A. Kammesheidt, Array-comparative genomic hybridization characterization of human pluripotent stem cells, Methods Mol Biol 873 (2012) 261-7.
5. P. Mafi, H. Hindocha, R. Mafi, M. Griffin, W. Khan, Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization - a systematic review of the literature, Open Orthop J 5 (2011) 253-60.
6. I.L. Weissman, D.J. Anderson, F. Gage, Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations, Annu Rev Cell Dev Biol 17 (2001) 387-403.
7. M.J. Evans, M.H. Kaufman, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, Nature 292 (1981) 154-6.
8. G.R. Martin, Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, Proc Natl Acad Sci U S A 78 (1981) 7634-8.
9. M.J. Shamblott, J. Axelman, S. Wang, E.M. Bugg, J.W. Littlefield, P.J. Donovan, P.D. Blumenthal, G.R. Huggins, J.D. Gearhart, Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells, Proc Natl Acad Sci U S A 95 (1998) 13726-31.
10. J.L. Resnick, L.S. Bixler, L. Cheng, P.J. Donovan, Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture, Nature 359 (1992) 550-1.
11. J.A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro, M.A. Waknitz, J.J. Swiergiel, V.S. Marshall, J.M. Jones, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, Science 282 (1998) 1145-7.
12. J.A. Thomson, J. Kalishman, T.G. Golos, M. Durning, C.P. Harris, R.A. Becker, J.P. Hearn, Isolation of a primate embryonic stem cell line, Proc Natl Acad Sci U S A 92 (1995) 7844-8.
13. J.S. Odorico, D.S. Kaufman, J.A. Thomson, Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines, Stem Cells 19 (2001) 193-204.
14. M.F. Pera, B. Reubinoff, A. Trounson, Human embryonic stem cells, J Cell Sci 113 (Pt 1) (2000) 5-10.
15. J.E. Till, E.A. McCulloch, L. Siminovitch, A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells, Proc Natl Acad Sci U S A 51 (1964) 29-36.
16. R.B. Taylor, Pluripotential stem cells in mouse embryo liver, Br J Exp Pathol 46 (1965) 376-83.
17. S. Deslex, R. Negrel, C. Vannier, J. Etienne, G. Ailhaud, Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium, Int J Obes 11 (1987) 19-27.
18. A.P. Beltrami, L. Barlucchi, D. Torella, M. Baker, F. Limana, S. Chimenti, H. Kasahara, M. Rota, E. Musso, K. Urbanek, A. Leri, J. Kajstura, B. Nadal-Ginard, P. Anversa, Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration, Cell 114 (2003) 763-76.
19. B.A. Reynolds, S. Weiss, Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system, Science 255 (1992) 1707-10.
20. R.M. Seaberg, S.R. Smukler, T.J. Kieffer, G. Enikolopov, Z. Asghar, M.B. Wheeler, G. Korbutt, D. van der Kooy, Clonal identification of multipotent precursors from adult

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages, Nat Biotechnol 22 (2004) 1115-24.
21. E.L. Herzog, L. Chai, D.S. Krause, Plasticity of marrow-derived stem cells, Blood 102 (2003) 3483-93.
22. Y. Jiang, B.N. Jahagirdar, R.L. Reinhardt, R.E. Schwartz, C.D. Keene, X.R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W.C. Low, D.A. Largaespada, C.M. Verfaillie, Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow, Nature 418 (2002) 41-9.
23. J. Sanchez-Ramos, S. Song, F. Cardozo-Pelaez, C. Hazzi, T. Stedeford, A. Willing, T.B. Freeman, S. Saporta, W. Janssen, N. Patel, D.R. Cooper, P.R. Sanberg, Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro, Exp Neurol 164 (2000) 247-56.
24. A.J. Wagers, I.L. Weissman, Plasticity of adult stem cells, Cell 116 (2004) 639-48.
25. P.A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian, D.A. De Ugarte, J.I. Huang, H. Mizuno, Z.C. Alfonso, J.K. Fraser, P. Benhaim, M.H. Hedrick, Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells, Mol Biol Cell 13 (2002) 4279-95.
26. M. Korbling, Z. Estrov, Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept?, N Engl J Med 349 (2003) 570-82.
27. D. Solter, Mammalian cloning: advances and limitations, Nat Rev Genet 1 (2000) 199-207.
28. K.H. Campbell, J. McWhir, W.A. Ritchie, I. Wilmut, Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line, Nature 380 (1996) 64-6.
29. W.M. Rideout, 3rd, K. Eggan, R. Jaenisch, Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome, Science 293 (2001) 1093-8.
30. Y. Liu, M.S. Rao, Transdifferentiation--fact or artifact, J Cell Biochem 88 (2003) 29-40.
31. H.M. Blau, T.R. Brazelton, J.M. Weimann, The evolving concept of a stem cell: entity or function?, Cell 105 (2001) 829-41.
32. A.I. Caplan, Mesenchymal stem cells, J Orthop Res 9 (1991) 641-50.
33. D.G. Phinney, D.J. Prockop, Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views, Stem Cells 25 (2007) 2896-902.
34. H.K. Salem, C. Thiemermann, Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status, Stem Cells 28 (2010) 585-96.
35. M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, E. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, Cytotherapy 8 (2006) 315-7.
36. S. Aggarwal, M.F. Pittenger, Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses, Blood 105 (2005) 1815-22.
37. W.E. Fibbe, A.J. Nauta, H. Roelofs, Modulation of immune responses by mesenchymal stem cells, Ann N Y Acad Sci 1106 (2007) 272-8.
38. L. da Silva Meirelles, A.I. Caplan, N.B. Nardi, In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells, Stem Cells 26 (2008) 2287-99.
39. L. da Silva Meirelles, P.C. Chagastelles, N.B. Nardi, Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues, J Cell Sci 119 (2006) 2204-13.
40. M. Crisan, S. Yap, L. Casteilla, C.W. Chen, M. Corselli, T.S. Park, G. Andriolo, B. Sun, B. Zheng, L. Zhang, C. Norotte, P.N. Teng, J. Traas, R. Schugar, B.M. Deasy, S. Badylak, H.J. Buhring, J.P. Giacobino, L. Lazzari, J. Huard, B. Peault, A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs, Cell Stem Cell 3 (2008) 301-13.
41. L. Zimmerlin, V.S. Donnenberg, M.E. Pfeifer, E.M. Meyer, B. Peault, J.P. Rubin, A.D. Donnenberg, Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue, Cytometry A 77 (2010) 22-30.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

42. J. Gimble, F. Guilak, Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential, Cytotherapy 5 (2003) 362-9.
43. A.J. Katz, A. Tholpady, S.S. Tholpady, H. Shang, R.C. Ogle, Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells, Stem Cells 23 (2005) 412-23.
44. A. Schaffler, C. Buchler, Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies, Stem Cells 25 (2007) 818-27.
45. B.A. Bunnell, M. Flaat, C. Gagliardi, B. Patel, C. Ripoll, Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation, Methods 45 (2008) 115-20.
46. M.S. Rodeheffer, K. Birsoy, J.M. Friedman, Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo, Cell 135 (2008) 240-9.
47. W. Tang, D. Zeve, J.M. Suh, D. Bosnakovski, M. Kyba, R.E. Hammer, M.D. Tallquist, J.M. Graff, White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature, Science 322 (2008) 583-6.
48. K. Yoshimura, T. Shigeura, D. Matsumoto, T. Sato, Y. Takaki, E. Aiba-Kojima, K. Sato, K. Inoue, T. Nagase, I. Koshima, K. Gonda, Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates, J Cell Physiol 208 (2006) 64-76.
49. C.T. Gomillion, K.J. Burg, Stem cells and adipose tissue engineering, Biomaterials 27 (2006) 6052-63.
50. M. Vallee, J.F. Cote, J. Fradette, Adipose-tissue engineering: taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells, Pathol Biol (Paris) 57 (2009) 309-17.
51. M.J. Oedayrajsingh-Varma, S.M. van Ham, M. Knippenberg, M.N. Helder, J. Klein-Nulend, T.E. Schouten, M.J. Ritt, F.J. van Milligen, Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure, Cytotherapy 8 (2006) 166-77.
52. F.E. Dubois, Zvonic S, Kilroy G, Wu X, Carling S, Halvorsen YD, Ravussin E, Gimble JM. (2008). Isolation of Human Adipose-derived Stem Cells from Biopsies and Liposuction Specimens. *In* "Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols" (P. D. Prockop DJ, Bunnel BA., Ed.), Humana Press, Totowa.
53. Y. Zhu, T. Liu, K. Song, X. Fan, X. Ma, Z. Cui, Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC, Cell Biochem Funct 26 (2008) 664-75.
54. B.M. Schipper, K.G. Marra, W. Zhang, A.D. Donnenberg, J.P. Rubin, Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells, Ann Plast Surg 60 (2008) 538-44.
55. A.V. Padoin, J. Braga-Silva, P. Martins, K. Rezende, A.R. Rezende, B. Grechi, D. Gehlen, D.C. Machado, Sources of processed lipoaspirate cells: influence of donor site on cell concentration, Plast Reconstr Surg 122 (2008) 614-8.
56. D. Matsumoto, K. Sato, K. Gonda, Y. Takaki, T. Shigeura, T. Sato, E. Aiba-Kojima, F. Iizuka, K. Inoue, H. Suga, K. Yoshimura, Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection, Tissue Eng 12 (2006) 3375-82.
57. E.H. Yoshimura K, Kato H, Doi K, and Suga H (2011). Adipose Stem Cells: From Liposuction to Adipose Tissue Engineering. *In* "Adipose Stem Cells and Regenerative Medicine" (A. S. Yves-Gérard Illouz, Ed.), Springer Heidelberg, New York.
58. D.O. Traktuev, S. Merfeld-Clauss, J. Li, M. Kolonin, W. Arap, R. Pasqualini, B.H. Johnstone, K.L. March, A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks, Circ Res 102 (2008) 77-85.
59. F.P. Barry, J.M. Murphy, Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization, Int J Biochem Cell Biol 36 (2004) 568-84.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

60. S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, H. Kluter, K. Bieback, Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue, Stem Cells 24 (2006) 1294-301.
61. D.A. De Ugarte, K. Morizono, A. Elbarbary, Z. Alfonso, P.A. Zuk, M. Zhu, J.L. Dragoo, P. Ashjian, B. Thomas, P. Benhaim, I. Chen, J. Fraser, M.H. Hedrick, Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow, Cells Tissues Organs 174 (2003) 101-9.
62. R.H. Lee, B. Kim, I. Choi, H. Kim, H.S. Choi, K. Suh, Y.C. Bae, J.S. Jung, Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue, Cell Physiol Biochem 14 (2004) 311-24.
63. S. Gronthos, D.M. Franklin, H.A. Leddy, P.G. Robey, R.W. Storms, J.M. Gimble, Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells, J Cell Physiol 189 (2001) 54-63.
64. J.B. Mitchell, K. McIntosh, S. Zvonic, S. Garrett, Z.E. Floyd, A. Kloster, Y. Di Halvorsen, R.W. Storms, B. Goh, G. Kilroy, X. Wu, J.M. Gimble, Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers, Stem Cells 24 (2006) 376-85.
65. K. McIntosh, S. Zvonic, S. Garrett, J.B. Mitchell, Z.E. Floyd, L. Hammill, A. Kloster, Y. Di Halvorsen, J.P. Ting, R.W. Storms, B. Goh, G. Kilroy, X. Wu, J.M. Gimble, The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro, Stem Cells 24 (2006) 1246-53.
66. Y.A. Romanov, A.N. Darevskaya, N.V. Merzlikina, L.B. Buravkova, Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities, Bull Exp Biol Med 140 (2005) 138-43.
67. B.G. Jeon, B.M. Kumar, E.J. Kang, S.A. Ock, S.L. Lee, D.O. Kwack, J.H. Byun, B.W. Park, G.J. Rho, Characterization and comparison of telomere length, telomerase and reverse transcriptase activity and gene expression in human mesenchymal stem cells and cancer cells of various origins, Cell Tissue Res 345 (2011) 149-61.
68. W.K. Safwani, S. Makpol, S. Sathapan, K.H. Chua, The impact of long-term in vitro expansion on the senescence-associated markers of human adipose-derived stem cells, Appl Biochem Biotechnol 166 (2012) 2101-13.
69. L.E. Zaragosi, G. Ailhaud, C. Dani, Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells, Stem Cells 24 (2006) 2412-9.
70. M. Wang, P.R. Crisostomo, C. Herring, K.K. Meldrum, D.R. Meldrum, Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 291 (2006) R880-4.
71. F. Guilak, K.E. Lott, H.A. Awad, Q. Cao, K.C. Hicok, B. Fermor, J.M. Gimble, Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells, J Cell Physiol 206 (2006) 229-37.
72. B. Peterson, J. Zhang, R. Iglesias, M. Kabo, M. Hedrick, P. Benhaim, J.R. Lieberman, Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue, Tissue Eng 11 (2005) 120-9.
73. P.A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J.W. Futrell, A.J. Katz, P. Benhaim, H.P. Lorenz, M.H. Hedrick, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, Tissue Eng 7 (2001) 211-28.
74. A. Dicker, K. Le Blanc, G. Astrom, V. van Harmelen, C. Gotherstrom, L. Blomqvist, P. Arner, M. Ryden, Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue, Exp Cell Res 308 (2005) 283-90.
75. Y. Xu, P. Malladi, D.R. Wagner, M.T. Longaker, Adipose-derived mesenchymal cells as a potential cell source for skeletal regeneration, Curr Opin Mol Ther 7 (2005) 300-5.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

76. M.D. Lane, Q.Q. Tang, From multipotent stem cell to adipocyte, Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 73 (2005) 476-7.
77. S.B. Charge, M.A. Rudnicki, Cellular and molecular regulation of muscle regeneration, Physiol Rev 84 (2004) 209-38.
78. W.R. Otto, J. Rao, Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage, Cell Prolif 37 (2004) 97-110.
79. B.M. Strem, M. Zhu, Z. Alfonso, E.J. Daniels, R. Schreiber, R. Beygui, W.R. MacLellan, M.H. Hedrick, J.K. Fraser, Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury, Cytotherapy 7 (2005) 282-91.
80. G. Di Rocco, M.G. Iachininoto, A. Tritarelli, S. Straino, A. Zacheo, A. Germani, F. Crea, M.C. Capogrossi, Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells, J Cell Sci 119 (2006) 2945-52.
81. V. Planat-Benard, J.S. Silvestre, B. Cousin, M. Andre, M. Nibbelink, R. Tamarat, M. Clergue, C. Manneville, C. Saillan-Barreau, M. Duriez, A. Tedgui, B. Levy, L. Penicaud, L. Casteilla, Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives, Circulation 109 (2004) 656-63.
82. K.M. Safford, K.C. Hicok, S.D. Safford, Y.D. Halvorsen, W.O. Wilkison, J.M. Gimble, H.E. Rice, Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells, Biochem Biophys Res Commun 294 (2002) 371-9.
83. S.K. Kang, D.H. Lee, Y.C. Bae, H.K. Kim, S.Y. Baik, J.S. Jung, Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats, Exp Neurol 183 (2003) 355-66.
84. K. Timper, D. Seboek, M. Eberhardt, P. Linscheid, M. Christ-Crain, U. Keller, B. Muller, H. Zulewski, Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells, Biochem Biophys Res Commun 341 (2006) 1135-40.
85. M.J. Seo, S.Y. Suh, Y.C. Bae, J.S. Jung, Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo, Biochem Biophys Res Commun 328 (2005) 258-64.
86. R. Izadpanah, C. Trygg, B. Patel, C. Kriedt, J. Dufour, J.M. Gimble, B.A. Bunnell, Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue, J Cell Biochem 99 (2006) 1285-97.
87. B. Zavan, L. Michelotto, L. Lancerotto, A. Della Puppa, D. D'Avella, G. Abatangelo, V. Vindigni, R. Cortivo, Neural potential of a stem cell population in the adipose and cutaneous tissues, Neurol Res 32 (2010) 47-54.
88. M. Ramalho-Santos, S. Yoon, Y. Matsuzaki, R.C. Mulligan, D.A. Melton, "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells, Science 298 (2002) 597-600.
89. T.S. Tanaka, T. Kunath, W.L. Kimber, S.A. Jaradat, C.A. Stagg, M. Usuda, T. Yokota, H. Niwa, J. Rossant, M.S. Ko, Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals candidate genes associated with pluripotency and lineage specificity, Genome Res 12 (2002) 1921-8.
90. I.K. Park, Y. He, F. Lin, O.D. Laerum, Q. Tian, R. Bumgarner, C.A. Klug, K. Li, C. Kuhr, M.J. Doyle, T. Xie, M. Schummer, Y. Sun, A. Goldsmith, M.F. Clarke, I.L. Weissman, L. Hood, L. Li, Differential gene expression profiling of adult murine hematopoietic stem cells, Blood 99 (2002) 488-98.
91. Y. Luo, J. Cai, Y. Liu, H. Xue, F.J. Chrest, R.P. Wersto, M. Rao, Microarray analysis of selected genes in neural stem and progenitor cells, J Neurochem 83 (2002) 1481-97.
92. I. Chambers, D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie, A. Smith, Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells, Cell 113 (2003) 643-55.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

93. I. Chambers, J. Silva, D. Colby, J. Nichols, B. Nijmeijer, M. Robertson, J. Vrana, K. Jones, L. Grotewold, A. Smith, Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development, Nature 450 (2007) 1230-4.
94. H. Niwa, J. Miyazaki, A.G. Smith, Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells, Nat Genet 24 (2000) 372-6.
95. M. Ema, D. Mori, H. Niwa, Y. Hasegawa, Y. Yamanaka, S. Hitoshi, J. Mimura, Y. Kawabe, T. Hosoya, M. Morita, D. Shimosato, K. Uchida, N. Suzuki, J. Yanagisawa, K. Sogawa, J. Rossant, M. Yamamoto, S. Takahashi, Y. Fujii-Kuriyama, Kruppel-like factor 5 is essential for blastocyst development and the normal self-renewal of mouse ESCs, Cell Stem Cell 3 (2008) 555-67.
96. S. Masui, Y. Nakatake, Y. Toyooka, D. Shimosato, R. Yagi, K. Takahashi, H. Okochi, A. Okuda, R. Matoba, A.A. Sharov, M.S. Ko, H. Niwa, Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells, Nat Cell Biol 9 (2007) 625-35.
97. S.L. Palmieri, W. Peter, H. Hess, H.R. Scholer, Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation, Dev Biol 166 (1994) 259-67.
98. M. Pesce, H.R. Scholer, Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development, Stem Cells 19 (2001) 271-8.
99. J. Lee, H.K. Kim, J.Y. Rho, Y.M. Han, J. Kim, The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal, J Biol Chem 281 (2006) 33554-65.
100. Y. Atlasi, S.J. Mowla, S.A. Ziaee, P.J. Gokhale, P.W. Andrews, OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells, Stem Cells 26 (2008) 3068-74.
101. M.S. Tsai, S.M. Hwang, Y.L. Tsai, F.C. Cheng, J.L. Lee, Y.J. Chang, Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells, Biol Reprod 74 (2006) 545-51.
102. C. Moriscot, F. de Fraipont, M.J. Richard, M. Marchand, P. Savatier, D. Bosco, M. Favrot, P.Y. Benhamou, Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro, Stem Cells 23 (2005) 594-603.
103. W.L. Grayson, F. Zhao, B. Bunnell, T. Ma, Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells, Biochem Biophys Res Commun 358 (2007) 948-53.
104. P. Romagnani, F. Annunziato, F. Liotta, E. Lazzeri, B. Mazzinghi, F. Frosali, L. Cosmi, L. Maggi, L. Lasagni, A. Scheffold, M. Kruger, S. Dimmeler, F. Marra, G. Gensini, E. Maggi, S. Romagnani, CD14+CD34low cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitors, Circ Res 97 (2005) 314-22.
105. H. Yu, D. Fang, S.M. Kumar, L. Li, T.K. Nguyen, G. Acs, M. Herlyn, X. Xu, Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles, Am J Pathol 168 (2006) 1879-88.
106. A.P. Beltrami, D. Cesselli, N. Bergamin, P. Marcon, S. Rigo, E. Puppato, F. D'Aurizio, R. Verardo, S. Piazza, A. Pignatelli, A. Poz, U. Baccarani, D. Damiani, R. Fanin, L. Mariuzzi, N. Finato, P. Masolini, S. Burelli, O. Belluzzi, C. Schneider, C.A. Beltrami, Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow), Blood 110 (2007) 3438-46.
107. B. Sun, K.H. Roh, S.R. Lee, Y.S. Lee, K.S. Kang, Induction of human umbilical cord blood-derived stem cells with embryonic stem cell phenotypes into insulin producing islet-like structure, Biochem Biophys Res Commun 354 (2007) 919-23.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

108. S. Bilodeau, M.H. Kagey, G.M. Frampton, P.B. Rahl, R.A. Young, SetDB1 contributes to repression of genes encoding developmental regulators and maintenance of ES cell state, Genes Dev 23 (2009) 2484-9.
109. Y.S. Ang, S.Y. Tsai, D.F. Lee, J. Monk, J. Su, K. Ratnakumar, J. Ding, Y. Ge, H. Darr, B. Chang, J. Wang, M. Rendl, E. Bernstein, C. Schaniel, I.R. Lemischka, Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core transcriptional network, Cell 145 (2011) 183-97.
110. L.S. Yeap, K. Hayashi, M.A. Surani, ERG-associated protein with SET domain (ESET)-Oct4 interaction regulates pluripotency and represses the trophectoderm lineage, Epigenetics Chromatin 2 (2009) 12.
111. P. Yuan, J. Han, G. Guo, Y.L. Orlov, M. Huss, Y.H. Loh, L.P. Yaw, P. Robson, B. Lim, H.H. Ng, Eset partners with Oct4 to restrict extraembryonic trophoblast lineage potential in embryonic stem cells, Genes Dev 23 (2009) 2507-20.
112. X. Wang, J. Dai, Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology, Stem Cells 28 (2010) 885-93.
113. M. Wegner, From head to toes: the multiple facets of Sox proteins, Nucleic Acids Res 27 (1999) 1409-20.
114. Y. Kamachi, M. Uchikawa, A. Tanouchi, R. Sekido, H. Kondoh, Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development, Genes Dev 15 (2001) 1272-86.
115. A.A. Avilion, S.K. Nicolis, L.H. Pevny, L. Perez, N. Vivian, R. Lovell-Badge, Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function, Genes Dev 17 (2003) 126-40.
116. M.V. Zappone, R. Galli, R. Catena, N. Meani, S. De Biasi, E. Mattei, C. Tiveron, A.L. Vescovi, R. Lovell-Badge, S. Ottolenghi, S.K. Nicolis, Sox2 regulatory sequences direct expression of a (beta)-geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in CNS stem cells, Development 127 (2000) 2367-82.
117. V. Graham, J. Khudyakov, P. Ellis, L. Pevny, SOX2 functions to maintain neural progenitor identity, Neuron 39 (2003) 749-65.
118. A.L. Ferri, M. Cavallaro, D. Braida, A. Di Cristofano, A. Canta, A. Vezzani, S. Ottolenghi, P.P. Pandolfi, M. Sala, S. DeBiasi, S.K. Nicolis, Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain, Development 131 (2004) 3805-19.
119. V. Episkopou, SOX2 functions in adult neural stem cells, Trends Neurosci 28 (2005) 219-21.
120. J.L. Chew, Y.H. Loh, W. Zhang, X. Chen, W.L. Tam, L.S. Yeap, P. Li, Y.S. Ang, B. Lim, P. Robson, H.H. Ng, Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells, Mol Cell Biol 25 (2005) 6031-46.
121. S. Okumura-Nakanishi, M. Saito, H. Niwa, F. Ishikawa, Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells, J Biol Chem 280 (2005) 5307-17.
122. T. Kuroda, M. Tada, H. Kubota, H. Kimura, S.Y. Hatano, H. Suemori, N. Nakatsuji, T. Tada, Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression, Mol Cell Biol 25 (2005) 2475-85.
123. D.J. Rodda, J.L. Chew, L.H. Lim, Y.H. Loh, B. Wang, H.H. Ng, P. Robson, Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2, J Biol Chem 280 (2005) 24731-7.
124. H. Yuan, N. Corbi, C. Basilico, L. Dailey, Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3, Genes Dev 9 (1995) 2635-45.
125. A. Rizzino, Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells, Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med 1 (2009) 228-36.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

126. L. Hyslop, M. Stojkovic, L. Armstrong, T. Walter, P. Stojkovic, S. Przyborski, M. Herbert, A. Murdoch, T. Strachan, M. Lako, Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages, Stem Cells 23 (2005) 1035-43.
127. F. Cavaleri, H.R. Scholer, Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra, Cell 113 (2003) 551-2.
128. S.Y. Hatano, M. Tada, H. Kimura, S. Yamaguchi, T. Kono, T. Nakano, H. Suemori, N. Nakatsuji, T. Tada, Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity, Mech Dev 122 (2005) 67-79.
129. T. Hamazaki, M. Oka, S. Yamanaka, N. Terada, Aggregation of embryonic stem cells induces Nanog repression and primitive endoderm differentiation, J Cell Sci 117 (2004) 5681-6.
130. D. Pei, Regulation of pluripotency and reprogramming by transcription factors, J Biol Chem 284 (2009) 3365-9.
131. D.M. Panchision, R.D. McKay, The control of neural stem cells by morphogenic signals, Curr Opin Genet Dev 12 (2002) 478-87.
132. R.D. Riddle, R.L. Johnson, E. Laufer, C. Tabin, Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA, Cell 75 (1993) 1401-16.
133. Y. Echelard, D.J. Epstein, B. St-Jacques, L. Shen, J. Mohler, J.A. McMahon, A.P. McMahon, Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity, Cell 75 (1993) 1417-30.
134. P.W. Ingham, A.P. McMahon, Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles, Genes Dev 15 (2001) 3059-87.
135. A.P. McMahon, P.W. Ingham, C.J. Tabin, Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling, Curr Top Dev Biol 53 (2003) 1-114.
136. A. Lee, J.D. Kessler, T.A. Read, C. Kaiser, D. Corbeil, W.B. Huttner, J.E. Johnson, R.J. Wechsler-Reya, Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum, Nat Neurosci 8 (2005) 723-9.
137. V. Palma, D.A. Lim, N. Dahmane, P. Sanchez, T.C. Brionne, C.D. Herzberg, Y. Gitton, A. Carleton, A. Alvarez-Buylla, A. Ruiz i Altaba, Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain, Development 132 (2005) 335-44.
138. S. Ahn, A.L. Joyner, In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog, Nature 437 (2005) 894-7.
139. R. Favaro, M. Valotta, A.L. Ferri, E. Latorre, J. Mariani, C. Giachino, C. Lancini, V. Tosetti, S. Ottolenghi, V. Taylor, S.K. Nicolis, Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh, Nat Neurosci 12 (2009) 1248-56.
140. M. Agathocleous, M. Locker, W.A. Harris, M. Perron, A general role of hedgehog in the regulation of proliferation, Cell Cycle 6 (2007) 156-9.
141. G. Bhardwaj, B. Murdoch, D. Wu, D.P. Baker, K.P. Williams, K. Chadwick, L.E. Ling, F.N. Karanu, M. Bhatia, Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation, Nat Immunol 2 (2001) 172-80.
142. C. Cai, J. Thorne, L. Grabel, Hedgehog serves as a mitogen and survival factor during embryonic stem cell neurogenesis, Stem Cells 26 (2008) 1097-108.
143. J.X. Zhou, L.W. Jia, W.M. Liu, C.L. Miao, S. Liu, Y.J. Cao, E.K. Duan, Role of sonic hedgehog in maintaining a pool of proliferating stem cells in the human fetal epidermis, Hum Reprod 21 (2006) 1698-704.
144. E. Dessaud, L.L. Yang, K. Hill, B. Cox, F. Ulloa, A. Ribeiro, A. Mynett, B.G. Novitch, J. Briscoe, Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism, Nature 450 (2007) 717-20.
145. M. Varjosalo, J. Taipale, Hedgehog: functions and mechanisms, Genes Dev 22 (2008) 2454-72.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

146. M.P. Matise, A.L. Joyner, Gli genes in development and cancer, Oncogene 18 (1999) 7852-9.
147. J.A. Goetz, L.M. Suber, X. Zeng, D.J. Robbins, Sonic Hedgehog as a mediator of long-range signaling, Bioessays 24 (2002) 157-65.
148. A. Ruiz i Altaba, C. Mas, B. Stecca, The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer, Trends Cell Biol 17 (2007) 438-47.
149. A. Ruiz i Altaba, V. Palma, N. Dahmane, Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain, Nat Rev Neurosci 3 (2002) 24-33.
150. P. Aza-Blanc, H.Y. Lin, A. Ruiz i Altaba, T.B. Kornberg, Expression of the vertebrate Gli proteins in Drosophila reveals a distribution of activator and repressor activities, Development 127 (2000) 4293-301.
151. Y. Pan, C.B. Bai, A.L. Joyner, B. Wang, Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation, Mol Cell Biol 26 (2006) 3365-77.
152. B. Wang, J.F. Fallon, P.A. Beachy, Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb, Cell 100 (2000) 423-34.
153. A. Ruiz i Altaba, Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog, Development 125 (1998) 2203-12.
154. L. Ling, V. Nurcombe, S.M. Cool, Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells, Gene 433 (2009) 1-7.
155. P.J. Morin, A.B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC, Science 275 (1997) 1787-90.
156. J. Jiang, G. Struhl, Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb, Nature 391 (1998) 493-6.
157. T. Ishitani, J. Ninomiya-Tsuji, S. Nagai, M. Nishita, M. Meneghini, N. Barker, M. Waterman, B. Bowerman, H. Clevers, H. Shibuya, K. Matsumoto, The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF, Nature 399 (1999) 798-802.
158. M. Katoh, M. Katoh, Notch ligand, JAG1, is evolutionarily conserved target of canonical WNT signaling pathway in progenitor cells, Int J Mol Med 17 (2006) 681-5.
159. J. Dejmek, A. Safholm, C. Kamp Nielsen, T. Andersson, K. Leandersson, Wnt-5a/Ca2+-induced NFAT activity is counteracted by Wnt-5a/Yes-Cdc42-casein kinase 1alpha signaling in human mammary epithelial cells, Mol Cell Biol 26 (2006) 6024-36.
160. D. Zechner, Y. Fujita, J. Hulsken, T. Muller, I. Walther, M.M. Taketo, E.B. Crenshaw, 3rd, W. Birchmeier, C. Birchmeier, beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system, Dev Biol 258 (2003) 406-18.
161. S.L. Etheridge, G.J. Spencer, D.J. Heath, P.G. Genever, Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells, Stem Cells 22 (2004) 849-60.
162. T. Reya, Regulation of hematopoietic stem cell self-renewal, Recent Prog Horm Res 58 (2003) 283-95.
163. H.H. Cho, Y.J. Kim, S.J. Kim, J.H. Kim, Y.C. Bae, B. Ba, J.S. Jung, Endogenous Wnt signaling promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation in human adipose derived stromal cells, Tissue Eng 12 (2006) 111-21.
164. D.C. Lie, S.A. Colamarino, H.J. Song, L. Desire, H. Mira, A. Consiglio, E.S. Lein, S. Jessberger, H. Lansford, A.R. Dearie, F.H. Gage, Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis, Nature 437 (2005) 1370-5.
165. T. Kuwabara, J. Hsieh, A. Muotri, G. Yeo, M. Warashina, D.C. Lie, L. Moore, K. Nakashima, M. Asashima, F.H. Gage, Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis, Nat Neurosci 12 (2009) 1097-105.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

166. Q. Qu, G. Sun, W. Li, S. Yang, P. Ye, C. Zhao, R.T. Yu, F.H. Gage, R.M. Evans, Y. Shi, Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/beta-catenin signalling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal, Nat Cell Biol 12 (2010) 31-40; sup pp 1-9.
167. M. Kasai, K. Satoh, T. Akiyama, Wnt signaling regulates the sequential onset of neurogenesis and gliogenesis via induction of BMPs, Genes Cells 10 (2005) 777-83.
168. C. Christodoulides, C. Lagathu, J.K. Sethi, A. Vidal-Puig, Adipogenesis and WNT signalling, Trends Endocrinol Metab 20 (2009) 16-24.
169. R. Benezra, R.L. Davis, D. Lockshon, D.L. Turner, H. Weintraub, The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins, Cell 61 (1990) 49-59.
170. S. Pesce, R. Benezra, The loop region of the helix-loop-helix protein Id1 is critical for its dominant negative activity, Mol Cell Biol 13 (1993) 7874-80.
171. R.W. Deed, S. Armitage, J.D. Norton, Nuclear localization and regulation of Id protein through an E protein-mediated chaperone mechanism, J Biol Chem 271 (1996) 23603-6.
172. Y. Yokota, Id and development, Oncogene 20 (2001) 8290-8.
173. M.B. Einarson, M.V. Chao, Regulation of Id1 and its association with basic helix-loop-helix proteins during nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells, Mol Cell Biol 15 (1995) 4175-83.
174. R.M. Gangemi, M. Perera, G. Corte, Regulatory genes controlling cell fate choice in embryonic and adult neural stem cells, J Neurochem 89 (2004) 286-306.
175. D. Lyden, A.Z. Young, D. Zagzag, W. Yan, W. Gerald, R. O'Reilly, B.L. Bader, R.O. Hynes, Y. Zhuang, K. Manova, R. Benezra, Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts, Nature 401 (1999) 670-7.
176. M. Duncan, E.M. DiCicco-Bloom, X. Xiang, R. Benezra, K. Chada, The gene for the helix-loop-helix protein, Id, is specifically expressed in neural precursors, Dev Biol 154 (1992) 1-10.
177. S.M. Evans, T.X. O'Brien, Expression of the helix-loop-helix factor Id during mouse embryonic development, Dev Biol 159 (1993) 485-99.
178. T. Neuman, A. Keen, M.X. Zuber, G.I. Kristjansson, P. Gruss, H.O. Nornes, Neuronal expression of regulatory helix-loop-helix factor Id2 gene in mouse, Dev Biol 160 (1993) 186-95.
179. S.F. Tzeng, J. de Vellis, Id1, Id2, and Id3 gene expression in neural cells during development, Glia 24 (1998) 372-81.
180. V. Riechmann, F. Sablitzky, Mutually exclusive expression of two dominant-negative helix-loop-helix (dnHLH) genes, Id4 and Id3, in the developing brain of the mouse suggests distinct regulatory roles of these dnHLH proteins during cellular proliferation and differentiation of the nervous system, Cell Growth Differ 6 (1995) 837-43.
181. V. Riechmann, I. van Cruchten, F. Sablitzky, The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3, Nucleic Acids Res 22 (1994) 749-55.
182. H.L. Chen, D.M. Panchision, Concise review: bone morphogenetic protein pleiotropism in neural stem cells and their derivatives--alternative pathways, convergent signals, Stem Cells 25 (2007) 63-8.
183. D.A. Lim, A.D. Tramontin, J.M. Trevejo, D.G. Herrera, J.M. Garcia-Verdugo, A. Alvarez-Buylla, Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis, Neuron 28 (2000) 713-26.
184. S. Artavanis-Tsakonas, M.D. Rand, R.J. Lake, Notch signaling: cell fate control and signal integration in development, Science 284 (1999) 770-6.
185. E.C. Lai, Notch signaling: control of cell communication and cell fate, Development 131 (2004) 965-73.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

186. A. Fischer, M. Gessler, Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors, Nucleic Acids Res 35 (2007) 4583-96.
187. T. Iso, L. Kedes, Y. Hamamori, HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway, J Cell Physiol 194 (2003) 237-55.
188. J.G. Corbin, N. Gaiano, S.L. Juliano, S. Poluch, E. Stancik, T.F. Haydar, Regulation of neural progenitor cell development in the nervous system, J Neurochem 106 (2008) 2272-87.
189. R. Kageyama, T. Ohtsuka, H. Shimojo, I. Imayoshi, Dynamic regulation of Notch signaling in neural progenitor cells, Curr Opin Cell Biol 21 (2009) 733-40.
190. H. Okano, Neural stem cells: progression of basic research and perspective for clinical application, Keio J Med 51 (2002) 115-28.
191. S. Temple, The development of neural stem cells, Nature 414 (2001) 112-7.
192. F.H. Gage, Mammalian neural stem cells, Science 287 (2000) 1433-8.
193. J. Altman, Are new neurons formed in the brains of adult mammals?, Science 135 (1962) 1127-8.
194. N. Uchida, D.W. Buck, D. He, M.J. Reitsma, M. Masek, T.V. Phan, A.S. Tsukamoto, F.H. Gage, I.L. Weissman, Direct isolation of human central nervous system stem cells, Proc Natl Acad Sci U S A 97 (2000) 14720-5.
195. P. Taupin, F.H. Gage, Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals, J Neurosci Res 69 (2002) 745-9.
196. C. Lois, A. Alvarez-Buylla, Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain, Science 264 (1994) 1145-8.
197. D.R. Kornack, P. Rakic, The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain, Proc Natl Acad Sci U S A 98 (2001) 4752-7.
198. V. Pencea, K.D. Bingaman, L.J. Freedman, M.B. Luskin, Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain, Exp Neurol 172 (2001) 1-16.
199. S.A. Goldman, M.B. Luskin, Strategies utilized by migrating neurons of the postnatal vertebrate forebrain, Trends Neurosci 21 (1998) 107-14.
200. N. Sanai, A.D. Tramontin, A. Quinones-Hinojosa, N.M. Barbaro, N. Gupta, S. Kunwar, M.T. Lawton, M.W. McDermott, A.T. Parsa, J. Manuel-Garcia Verdugo, M.S. Berger, A. Alvarez-Buylla, Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration, Nature 427 (2004) 740-4.
201. E.A. Markakis, F.H. Gage, Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles, J Comp Neurol 406 (1999) 449-60.
202. N.B. Hastings, E. Gould, Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells, J Comp Neurol 413 (1999) 146-54.
203. P.S. Eriksson, E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, A.M. Alborn, C. Nordborg, D.A. Peterson, F.H. Gage, Neurogenesis in the adult human hippocampus, Nat Med 4 (1998) 1313-7.
204. M.A. Curtis, V.F. Low, R.L. Faull, Neurogenesis and progenitor cells in the adult human brain: a comparison between hippocampal and subventricular progenitor proliferation, Dev Neurobiol 72 (2012) 990-1005.
205. F. Doetsch, I. Caille, D.A. Lim, J.M. Garcia-Verdugo, A. Alvarez-Buylla, Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain, Cell 97 (1999) 703-16.
206. T. Imura, H.I. Kornblum, M.V. Sofroniew, The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP, J Neurosci 23 (2003) 2824-32.
207. B. Seri, J.M. Garcia-Verdugo, B.S. McEwen, A. Alvarez-Buylla, Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus, J Neurosci 21 (2001) 7153-60.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

208. F.T. Merkle, A.D. Tramontin, J.M. Garcia-Verdugo, A. Alvarez-Buylla, Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone, Proc Natl Acad Sci U S A 101 (2004) 17528-32.
209. A. Carleton, L.T. Petreanu, R. Lansford, A. Alvarez-Buylla, P.M. Lledo, Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb, Nat Neurosci 6 (2003) 507-18.
210. R. Rietze, P. Poulin, S. Weiss, Mitotically active cells that generate neurons and astrocytes are present in multiple regions of the adult mouse hippocampus, J Comp Neurol 424 (2000) 397-408.
211. M. Zhao, S. Momma, K. Delfani, M. Carlen, R.M. Cassidy, C.B. Johansson, H. Brismar, O. Shupliakov, J. Frisen, A.M. Janson, Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra, Proc Natl Acad Sci U S A 100 (2003) 7925-30.
212. N.U. Takemura, Evidence for neurogenesis within the white matter beneath the temporal neocortex of the adult rat brain, Neuroscience 134 (2005) 121-32.
213. C. Walther, P. Gruss, Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS, Development 113 (1991) 1435-49.
214. I. Hanson, V. Van Heyningen, Pax6: more than meets the eye, Trends Genet 11 (1995) 268-72.
215. C. Dohrmann, P. Gruss, L. Lemaire, Pax genes and the differentiation of hormone-producing endocrine cells in the pancreas, Mech Dev 92 (2000) 47-54.
216. N. Osumi, The role of Pax6 in brain patterning, Tohoku J Exp Med 193 (2001) 163-74.
217. M. Manuel, D.J. Price, Role of Pax6 in forebrain regionalization, Brain Res Bull 66 (2005) 387-93.
218. J.C. Quinn, M. Molinek, B.S. Martynoga, P.A. Zaki, A. Faedo, A. Bulfone, R.F. Hevner, J.D. West, D.J. Price, Pax6 controls cerebral cortical cell number by regulating exit from the cell cycle and specifies cortical cell identity by a cell autonomous mechanism, Dev Biol 302 (2007) 50-65.
219. N. Heins, P. Malatesta, F. Cecconi, M. Nakafuku, K.L. Tucker, M.A. Hack, P. Chapouton, Y.A. Barde, M. Gotz, Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6, Nat Neurosci 5 (2002) 308-15.
220. C. Englund, A. Fink, C. Lau, D. Pham, R.A. Daza, A. Bulfone, T. Kowalczyk, R.F. Hevner, Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex, J Neurosci 25 (2005) 247-51.
221. M. Maekawa, N. Takashima, Y. Arai, T. Nomura, K. Inokuchi, S. Yuasa, N. Osumi, Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis, Genes Cells 10 (2005) 1001-14.
222. J. Nacher, E. Varea, J.M. Blasco-Ibanez, E. Castillo-Gomez, C. Crespo, F.J. Martinez-Guijarro, B.S. McEwen, Expression of the transcription factor Pax 6 in the adult rat dentate gyrus, J Neurosci Res 81 (2005) 753-61.
223. M. Kohwi, N. Osumi, J.L. Rubenstein, A. Alvarez-Buylla, Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb, J Neurosci 25 (2005) 6997-7003.
224. J.F. Brunet, A. Ghysen, Deconstructing cell determination: proneural genes and neuronal identity, Bioessays 21 (1999) 313-8.
225. K. Tomita, K. Moriyoshi, S. Nakanishi, F. Guillemot, R. Kageyama, Mammalian achaete-scute and atonal homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system, Embo J 19 (2000) 5460-72.
226. M. Nieto, C. Schuurmans, O. Britz, F. Guillemot, Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors, Neuron 29 (2001) 401-13.
227. N. Bertrand, D.S. Castro, F. Guillemot, Proneural genes and the specification of neural cell types, Nat Rev Neurosci 3 (2002) 517-30.
228. S.E. Ross, M.E. Greenberg, C.D. Stiles, Basic helix-loop-helix factors in cortical development, Neuron 39 (2003) 13-25.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

229. L. Roybon, T. Deierborg, P. Brundin, J.Y. Li, Involvement of Ngn2, Tbr and NeuroD proteins during postnatal olfactory bulb neurogenesis, Eur J Neurosci 29 (2009) 232-43.
230. Y. Sun, M. Nadal-Vicens, S. Misono, M.Z. Lin, A. Zubiaga, X. Hua, G. Fan, M.E. Greenberg, Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms, Cell 104 (2001) 365-76.
231. S.J. Morrison, Neuronal potential and lineage determination by neural stem cells, Curr Opin Cell Biol 13 (2001) 666-72.
232. J.D. Norton, R.W. Deed, G. Craggs, F. Sablitzky, Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation, Trends Cell Biol 8 (1998) 58-65.
233. R. Kageyama, T. Ohtsuka, The Notch-Hes pathway in mammalian neural development, Cell Res 9 (1999) 179-88.
234. C. Akazawa, Y. Sasai, S. Nakanishi, R. Kageyama, Molecular characterization of a rat negative regulator with a basic helix-loop-helix structure predominantly expressed in the developing nervous system, J Biol Chem 267 (1992) 21879-85.
235. T. Ohtsuka, M. Ishibashi, G. Gradwohl, S. Nakanishi, F. Guillemot, R. Kageyama, Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation, Embo J 18 (1999) 2196-207.
236. A. Bordey, Enigmatic GABAergic networks in adult neurogenic zones, Brain Res Rev 53 (2007) 124-34.
237. Y. Ben-Ari, Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture, Nat Rev Neurosci 3 (2002) 728-39.
238. S. Ge, D.A. Pradhan, G.L. Ming, H. Song, GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis, Trends Neurosci 30 (2007) 1-8.
239. Y. Tozuka, S. Fukuda, T. Namba, T. Seki, T. Hisatsune, GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells, Neuron 47 (2005) 803-15.
240. S. Ge, E.L. Goh, K.A. Sailor, Y. Kitabatake, G.L. Ming, H. Song, GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain, Nature 439 (2006) 589-93.
241. D.F. Owens, A.R. Kriegstein, Is there more to GABA than synaptic inhibition?, Nat Rev Neurosci 3 (2002) 715-27.
242. A. Marty, I. Llano, Excitatory effects of GABA in established brain networks, Trends Neurosci 28 (2005) 284-9.
243. E. Gascon, A.G. Dayer, M.O. Sauvain, G. Potter, B. Jenny, M. De Roo, E. Zgraggen, N. Demaurex, D. Muller, J.Z. Kiss, GABA regulates dendritic growth by stabilizing lamellipodia in newly generated interneurons of the olfactory bulb, J Neurosci 26 (2006) 12956-66.
244. J.C. Platel, K.A. Dave, A. Bordey, Control of neuroblast production and migration by converging GABA and glutamate signals in the postnatal forebrain, J Physiol 586 (2008) 3739-43.
245. J.C. Platel, T. Heintz, S. Young, V. Gordon, A. Bordey, Tonic activation of GLUK5 kainate receptors decreases neuroblast migration in whole-mounts of the subventricular zone, J Physiol 586 (2008) 3783-93.
246. V. Di Giorgi-Gerevini, D. Melchiorri, G. Battaglia, L. Ricci-Vitiani, C. Ciceroni, C.L. Busceti, F. Biagioni, L. Iacovelli, A.M. Canudas, E. Parati, R. De Maria, F. Nicoletti, Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors supports the proliferation and survival of neural progenitor cells, Cell Death Differ 12 (2005) 1124-33.
247. A. Nissant, C. Bardy, H. Katagiri, K. Murray, P.M. Lledo, Adult neurogenesis promotes synaptic plasticity in the olfactory bulb, Nat Neurosci 12 (2009) 728-30.
248. P. Ambrogini, D. Lattanzi, S. Ciuffoli, D. Agostini, L. Bertini, V. Stocchi, S. Santi, R. Cuppini, Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of

maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus, Brain Res 1017 (2004) 21-31.
249. J. Nacher, E. Varea, J. Miguel Blasco-Ibanez, M.A. Gomez-Climent, E. Castillo-Gomez, C. Crespo, F.J. Martinez-Guijarro, B.S. McEwen, N-methyl-d-aspartate receptor expression during adult neurogenesis in the rat dentate gyrus, Neuroscience 144 (2007) 855-64.
250. A. Tashiro, V.M. Sandler, N. Toni, C. Zhao, F.H. Gage, NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus, Nature 442 (2006) 929-33.
251. C. Schmidt-Hieber, P. Jonas, J. Bischofberger, Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus, Nature 429 (2004) 184-7.
252. B.P. Williams, C.J. Milligan, M. Street, F.M. Hornby, J. Deuchars, N.J. Buckley, Transcription of the M1 muscarinic receptor gene in neurons and neuronal progenitors of the embryonic rat forebrain, J Neurochem 88 (2004) 70-7.
253. C. Zhou, Z.X. Wen, D.M. Shi, Z.P. Xie, Muscarinic acetylcholine receptors involved in the regulation of neural stem cell proliferation and differentiation in vitro, Cell Biol Int 28 (2004) 63-7.
254. R.R. Resende, A.S. Alves, L.R. Britto, H. Ulrich, Role of acetylcholine receptors in proliferation and differentiation of P19 embryonal carcinoma cells, Exp Cell Res 314 (2008) 1429-43.
255. F. Balordi, G. Fishell, Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons, J Neurosci 27 (2007) 5936-47.
256. C.B. Chambers, Y. Peng, H. Nguyen, N. Gaiano, G. Fishell, J.S. Nye, Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors, Development 128 (2001) 689-702.
257. M. Carlen, K. Meletis, C. Goritz, V. Darsalia, E. Evergren, K. Tanigaki, M. Amendola, F. Barnabe-Heider, M.S. Yeung, L. Naldini, T. Honjo, Z. Kokaia, O. Shupliakov, R.M. Cassidy, O. Lindvall, J. Frisen, Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke, Nat Neurosci 12 (2009) 259-67.
258. G. Kempermann, S. Jessberger, B. Steiner, G. Kronenberg, Milestones of neuronal development in the adult hippocampus, Trends Neurosci 27 (2004) 447-52.
259. A. Kriegstein, A. Alvarez-Buylla, The glial nature of embryonic and adult neural stem cells, Annu Rev Neurosci 32 (2009) 149-84.
260. R.D. Hodge, T.D. Kowalczyk, S.A. Wolf, J.M. Encinas, C. Rippey, G. Enikolopov, G. Kempermann, R.F. Hevner, Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: Tbr2 expression and coordinate regulation of neuronal output, J Neurosci 28 (2008) 3707-17.
261. B. Steiner, F. Klempin, L. Wang, M. Kott, H. Kettenmann, G. Kempermann, Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis, Glia 54 (2006) 805-14.
262. Y. Liu, T. Namba, J. Liu, R. Suzuki, S. Shioda, T. Seki, Glial fibrillary acidic protein-expressing neural progenitors give rise to immature neurons via early intermediate progenitors expressing both glial fibrillary acidic protein and neuronal markers in the adult hippocampus, Neuroscience 166 (2010) 241-51.
263. T. Seki, Expression patterns of immature neuronal markers PSA-NCAM, CRMP-4 and NeuroD in the hippocampus of young adult and aged rodents, J Neurosci Res 70 (2002) 327-34.
264. C. Zhao, E.M. Teng, R.G. Summers, Jr., G.L. Ming, F.H. Gage, Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus, J Neurosci 26 (2006) 3-11.
265. M. Rodbell, Localization of Lipoprotein Lipase in Fat Cells of Rat Adipose Tissue, J Biol Chem 239 (1964) 753-5.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

266. M. Rodbell, Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis, J Biol Chem 239 (1964) 375-80.
267. H. Hauner, G. Entenmann, M. Wabitsch, D. Gaillard, G. Ailhaud, R. Negrel, E.F. Pfeiffer, Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium, J Clin Invest 84 (1989) 1663-70.
268. H. Hauner, M. Wabitsch, E.F. Pfeiffer, Differentiation of adipocyte precursor cells from obese and nonobese adult women and from different adipose tissue sites, Horm Metab Res Suppl 19 (1988) 35-9.
269. R.L. Van, C.E. Bayliss, D.A. Roncari, Cytological and enzymological characterization of adult human adipocyte precursors in culture, J Clin Invest 58 (1976) 699-704.
270. B.M. Strem, K.C. Hicok, M. Zhu, I. Wulur, Z. Alfonso, R.E. Schreiber, J.K. Fraser, M.H. Hedrick, Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells, Keio J Med 54 (2005) 132-41.
271. A. Sen, Y.R. Lea-Currie, D. Sujkowska, D.M. Franklin, W.O. Wilkison, Y.D. Halvorsen, J.M. Gimble, Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous, J Cell Biochem 81 (2001) 312-9.
272. Y.D. Halvorsen, D. Franklin, A.L. Bond, D.C. Hitt, C. Auchter, A.L. Boskey, E.P. Paschalis, W.O. Wilkison, J.M. Gimble, Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells, Tissue Eng 7 (2001) 729-41.
273. B.C. Heng, T. Cao, L.W. Stanton, P. Robson, B. Olsen, Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro, J Bone Miner Res 19 (2004) 1379-94.
274. G.R. Erickson, J.M. Gimble, D.M. Franklin, H.E. Rice, H. Awad, F. Guilak, Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo, Biochem Biophys Res Commun 290 (2002) 763-9.
275. H.A. Awad, Y.D. Halvorsen, J.M. Gimble, F. Guilak, Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells, Tissue Eng 9 (2003) 1301-12.
276. Y.S. Levy, D. Merims, H. Panet, Y. Barhum, E. Melamed, D. Offen, Induction of neuron-specific enolase promoter and neuronal markers in differentiated mouse bone marrow stromal cells, J Mol Neurosci 21 (2003) 121-32.
277. K. Mareschi, M. Novara, D. Rustichelli, I. Ferrero, D. Guido, E. Carbone, E. Medico, E. Madon, A. Vercelli, F. Fagioli, Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: Evidence for expression of neural markers and eag K+ channel types, Exp Hematol 34 (2006) 1563-72.
278. H. Tao, R. Rao, D.D. Ma, Cytokine-induced stable neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a serum/feeder cell-free condition, Dev Growth Differ 47 (2005) 423-33.
279. D. Woodbury, E.J. Schwarz, D.J. Prockop, I.B. Black, Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons, J Neurosci Res 61 (2000) 364-70.
280. M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem 72 (1976) 248-54.
281. M.A. Cousin, Use of FM1-43 and other derivatives to investigate neuronal function, Curr Protoc Neurosci Chapter 2 (2008) Unit 2 6.
282. T.A. Ryan, H. Reuter, Measurements of vesicle recycling in central neurons, News Physiol Sci 16 (2001) 10-4.
283. G. Bai, N. Sheng, Z. Xie, W. Bian, Y. Yokota, R. Benezra, R. Kageyama, F. Guillemot, N. Jing, Id sustains Hes1 expression to inhibit precocious neurogenesis by releasing negative autoregulation of Hes1, Dev Cell 13 (2007) 283-97.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

284. M. Jurga, L. Buzanska, M. Malecki, A. Habich, K. Domanska-Janik, Function of ID1 protein in human cord blood-derived neural stem-like cells, J Neurosci Res 84 (2006) 993-1002.
285. N. Gaiano, G. Fishell, The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates, Annu Rev Neurosci 25 (2002) 471-90.
286. A.W. Duncan, F.M. Rattis, L.N. DiMascio, K.L. Congdon, G. Pazianos, C. Zhao, K. Yoon, J.M. Cook, K. Willert, N. Gaiano, T. Reya, Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance, Nat Immunol 6 (2005) 314-22.
287. S. Chiba, Notch signaling in stem cell systems, Stem Cells 24 (2006) 2437-47.
288. K. Deisseroth, S. Singla, H. Toda, M. Monje, T.D. Palmer, R.C. Malenka, Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells, Neuron 42 (2004) 535-52.
289. M.D. Plotkin, E.Y. Snyder, S.C. Hebert, E. Delpire, Expression of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a possible mechanism underlying GABA's excitatory role in immature brain, J Neurobiol 33 (1997) 781-95.
290. C. Wang, C. Shimizu-Okabe, K. Watanabe, A. Okabe, H. Matsuzaki, T. Ogawa, N. Mori, A. Fukuda, K. Sato, Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the rat brain, Brain Res Dev Brain Res 139 (2002) 59-66.
291. M. Fukui, N. Nakamichi, M. Yoneyama, S. Ozawa, S. Fujimori, Y. Takahata, N. Nakamura, H. Taniura, Y. Yoneda, Modulation of cellular proliferation and differentiation through GABA(B) receptors expressed by undifferentiated neural progenitor cells isolated from fetal mouse brain, J Cell Physiol 216 (2008) 507-19.
292. H.E. Rice, E.W. Hsu, H. Sheng, D.A. Evenson, A.J. Freemerman, K.M. Safford, J.M. Provenzale, D.S. Warner, G.A. Johnson, Superparamagnetic iron oxide labeling and transplantation of adipose-derived stem cells in middle cerebral artery occlusion-injured mice, AJR Am J Roentgenol 188 (2007) 1101-8.
293. G. Pavlova, T. Lopatina, N. Kalinina, E. Rybalkina, Y. Parfyonova, V. Tkachuk, A. Revishchin, In Vitro Neuronal Induction of Adipose-Derived Stem Cells and Their Fate after Transplantation into Injured Mouse Brain, Curr Med Chem (2012).
294. H. Orbay, A.C. Uysal, H. Hyakusoku, H. Mizuno, Differentiated and undifferentiated adipose-derived stem cells improve function in rats with peripheral nerve gaps, J Plast Reconstr Aesthet Surg 65 (2012) 657-64.
295. T. Scholz, A. Sumarto, A. Krichevsky, G.R. Evans, Neuronal differentiation of human adipose tissue-derived stem cells for peripheral nerve regeneration in vivo, Arch Surg 146 (2011) 666-74.
296. P.H. Ashjian, A.S. Elbarbary, B. Edmonds, D. DeUgarte, M. Zhu, P.A. Zuk, H.P. Lorenz, P. Benhaim, M.H. Hedrick, In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors, Plast Reconstr Surg 111 (2003) 1922-31.
297. N. Baal, K. Reisinger, H. Jahr, R.M. Bohle, O. Liang, K. Munstedt, C.V. Rao, K.T. Preissner, M.T. Zygmunt, Expression of transcription factor Oct-4 and other embryonic genes in CD133 positive cells from human umbilical cord blood, Thromb Haemost 92 (2004) 767-75.
298. J.H. Kim, M.K. Jee, S.Y. Lee, T.H. Han, B.S. Kim, K.S. Kang, S.K. Kang, Regulation of adipose tissue stromal cells behaviors by endogenic Oct4 expression control, PLoS One 4 (2009) e7166.
299. M. Gotz, Y.A. Barde, Radial glial cells defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons, Neuron 46 (2005) 369-72.
300. G. Kronenberg, K. Reuter, B. Steiner, M.D. Brandt, S. Jessberger, M. Yamaguchi, G. Kempermann, Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli, J Comp Neurol 467 (2003) 455-63.
301. J. Nacher, C. Crespo, B.S. McEwen, Doublecortin expression in the adult rat telencephalon, Eur J Neurosci 14 (2001) 629-44.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

302. R.J. Mullen, C.R. Buck, A.M. Smith, NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates, Development 116 (1992) 201-11.
303. H.A. Cameron, C.S. Woolley, B.S. McEwen, E. Gould, Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat, Neuroscience 56 (1993) 337-44.
304. D.N. Abrous, M. Koehl, M. Le Moal, Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology, Physiol Rev 85 (2005) 523-69.
305. S.J. Morrison, P.M. White, C. Zock, D.J. Anderson, Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells, Cell 96 (1999) 737-49.
306. G.M. Kruger, J.T. Mosher, S. Bixby, N. Joseph, T. Iwashita, S.J. Morrison, Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness, Neuron 35 (2002) 657-69.
307. J. Cayuso, E. Marti, Morphogens in motion: growth control of the neural tube, J Neurobiol 64 (2005) 376-87.
308. R. Dono, Fibroblast growth factors as regulators of central nervous system development and function, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 284 (2003) R867-81.
309. M. Sensenbrenner, J.C. Deloulme, C. Gensburger, Proliferation of neuronal precursor cells from the central nervous system in culture, Rev Neurosci 5 (1994) 43-53.
310. X. Qian, A.A. Davis, S.K. Goderie, S. Temple, FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells, Neuron 18 (1997) 81-93.
311. T.D. Palmer, E.A. Markakis, A.R. Willhoite, F. Safar, F.H. Gage, Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS, J Neurosci 19 (1999) 8487-97.
312. J. Mey, P. McCaffery, Retinoic acid signaling in the nervous system of adult vertebrates, Neuroscientist 10 (2004) 409-21.
313. P.J. McCaffery, J. Adams, M. Maden, E. Rosa-Molinar, Too much of a good thing: retinoic acid as an endogenous regulator of neural differentiation and exogenous teratogen, Eur J Neurosci 18 (2003) 457-72.
314. G. Bain, W.J. Ray, M. Yao, D.I. Gottlieb, Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture, Biochem Biophys Res Commun 223 (1996) 691-4.
315. Y. Okada, T. Shimazaki, G. Sobue, H. Okano, Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells, Dev Biol 275 (2004) 124-42.
316. S.A. Ross, P.J. McCaffery, U.C. Drager, L.M. De Luca, Retinoids in embryonal development, Physiol Rev 80 (2000) 1021-54.
317. W.J. Betz, F. Mao, G.S. Bewick, Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals, J Neurosci 12 (1992) 363-75.
318. K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, Cell 131 (2007) 861-72.
319. T. Vierbuchen, A. Ostermeier, Z.P. Pang, Y. Kokubu, T.C. Sudhof, M. Wernig, Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors, Nature 463 (2010) 1035-41.
320. J.A. Byrne, S. Simonsson, P.S. Western, J.B. Gurdon, Nuclei of adult mammalian somatic cells are directly reprogrammed to oct-4 stem cell gene expression by amphibian oocytes, Curr Biol 13 (2003) 1206-13.
321. R.H. Xu, R.M. Peck, D.S. Li, X. Feng, T. Ludwig, J.A. Thomson, Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells, Nat Methods 2 (2005) 185-90.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

322. Q.L. Ying, J. Nichols, I. Chambers, A. Smith, BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3, Cell 115 (2003) 281-92.
323. S.E. Ross, N. Hemati, K.A. Longo, C.N. Bennett, P.C. Lucas, R.L. Erickson, O.A. MacDougald, Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling, Science 289 (2000) 950-3.
324. C.N. Bennett, S.E. Ross, K.A. Longo, L. Bajnok, N. Hemati, K.W. Johnson, S.D. Harrison, O.A. MacDougald, Regulation of Wnt signaling during adipogenesis, J Biol Chem 277 (2002) 30998-1004.
325. C. Hartmann, C.J. Tabin, Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb, Development 127 (2000) 3141-59.
326. D. Maric, I. Maric, Y.H. Chang, J.L. Barker, Prospective cell sorting of embryonic rat neural stem cells and neuronal and glial progenitors reveals selective effects of basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor on self-renewal and differentiation, J Neurosci 23 (2003) 240-51.
327. J. Viti, A. Gulacsi, L. Lillien, Wnt regulation of progenitor maturation in the cortex depends on Shh or fibroblast growth factor 2, J Neurosci 23 (2003) 5919-27.
328. J. Papkoff, Identification and biochemical characterization of secreted Wnt-1 protein from P19 embryonal carcinoma cells induced to differentiate along the neuroectodermal lineage, Oncogene 9 (1994) 313-7.
329. V. Easwaran, M. Pishvaian, Salimuddin, S. Byers, Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways, Curr Biol 9 (1999) 1415-8.
330. N. Israsena, M. Hu, W. Fu, L. Kan, J.A. Kessler, The presence of FGF2 signaling determines whether beta-catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells, Dev Biol 268 (2004) 220-31.
331. T.O. Alexson, S. Hitoshi, B.L. Coles, A. Bernstein, D. van der Kooy, Notch signaling is required to maintain all neural stem cell populations--irrespective of spatial or temporal niche, Dev Neurosci 28 (2006) 34-48.
332. M. Sugimori, M. Nagao, N. Bertrand, C.M. Parras, F. Guillemot, M. Nakafuku, Combinatorial actions of patterning and HLH transcription factors in the spatiotemporal control of neurogenesis and gliogenesis in the developing spinal cord, Development 134 (2007) 1617-29.
333. J. Cai, Y. Wu, T. Mirua, J.L. Pierce, M.T. Lucero, K.H. Albertine, G.J. Spangrude, M.S. Rao, Properties of a fetal multipotent neural stem cell (NEP cell), Dev Biol 251 (2002) 221-40.
334. K. Baer, P.S. Eriksson, R.L. Faull, M.I. Rees, M.A. Curtis, Sox-2 is expressed by glial and progenitor cells and Pax-6 is expressed by neuroblasts in the human subventricular zone, Exp Neurol 204 (2007) 828-31.
335. M.H. Farah, J.M. Olson, H.B. Sucic, R.I. Hume, S.J. Tapscott, D.L. Turner, Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells, Development 127 (2000) 693-702.
336. C.M. Parras, C. Schuurmans, R. Scardigli, J. Kim, D.J. Anderson, F. Guillemot, Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity, Genes Dev 16 (2002) 324-38.
337. L. Sommer, Q. Ma, D.J. Anderson, neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS, Mol Cell Neurosci 8 (1996) 221-41.
338. R.F. Hevner, R.D. Hodge, R.A. Daza, C. Englund, Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus, Neurosci Res 55 (2006) 223-33.
339. L. Roybon, T. Hjalt, S. Stott, F. Guillemot, J.Y. Li, P. Brundin, Neurogenin2 directs granule neuroblast production and amplification while NeuroD1 specifies neuronal fate during hippocampal neurogenesis, PLoS One 4 (2009) e4779.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

340. N. Bayatti, S. Sarma, C. Shaw, J.A. Eyre, D.A. Vouyiouklis, S. Lindsay, G.J. Clowry, Progressive loss of PAX6, TBR2, NEUROD and TBR1 mRNA gradients correlates with translocation of EMX2 to the cortical plate during human cortical development, Eur J Neurosci 28 (2008) 1449-56.
341. P.R. Moult, Neuronal glutamate and GABAA receptor function in health and disease, Biochem Soc Trans 37 (2009) 1317-22.
342. G. Barbin, H. Pollard, J.L. Gaiarsa, Y. Ben-Ari, Involvement of GABAA receptors in the outgrowth of cultured hippocampal neurons, Neurosci Lett 152 (1993) 150-4.
343. L. Zhang, I. Spigelman, P.L. Carlen, Development of GABA-mediated, chloride-dependent inhibition in CA1 pyramidal neurones of immature rat hippocampal slices, J Physiol 444 (1991) 25-49.
344. C. Rivera, J. Voipio, J.A. Payne, E. Ruusuvuori, H. Lahtinen, K. Lamsa, U. Pirvola, M. Saarma, K. Kaila, The K+/Cl- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation, Nature 397 (1999) 251-5.
345. A.R. Kriegstein, D.F. Owens, GABA may act as a self-limiting trophic factor at developing synapses, Sci STKE 2001 (2001) pe1.
346. A. Cardozo, M. Ielpi, D. Gomez, P. Argibay, Differential expression of Shh and BMP signaling in the potential conversion of human adipose tissue stem cells into neuron-like cells in vitro, Gene Expr 14 (2010) 307-19.
347. A.J. Cardozo, D.E. Gomez, P.F. Argibay, Transcriptional characterization of Wnt and Notch signaling pathways in neuronal differentiation of human adipose tissue-derived stem cells, J Mol Neurosci 44 (2011) 186-94.
348. M. Ishibashi, K. Moriyoshi, Y. Sasai, K. Shiota, S. Nakanishi, R. Kageyama, Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system, Embo J 13 (1994) 1799-805.
349. J.M. Olson, A. Asakura, L. Snider, R. Hawkes, A. Strand, J. Stoeck, A. Hallahan, J. Pritchard, S.J. Tapscott, NeuroD2 is necessary for development and survival of central nervous system neurons, Dev Biol 234 (2001) 174-87.

Para citar este documento

Alejandra Johana Cardozo. (2015). Mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación neuronal de células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo (Tesis de posgrado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina: Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto. Disponible en: http://ridaa.demo.unq.edu.ar/