

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



CÉLULAS MESENQUIMALES HUMANAS DIFERENCIADAS *in vitro* A

CÉLULAS DE SCHWANN

Por

Q.B.P. Azalea Arreola Romero

**Como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias con
especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Octubre, 2011

CÉLULAS MESENQUIMALES HUMANAS DIFERENCIADAS *in vitro* A
CÉLULAS DE SCHWANN

Aprobación de la Tesis:




DRA. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

Directora de Tesis



PhD. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA

Co-Director de Tesis



DR. MED. OSCAR DE LA GARZA CASTRO

Co-Director de Tesis



DR. MED. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO

Sub-Director de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez y la co-dirección del Dr. med Oscar de la Garza Castro y del PhD. Julio Sepúlveda Saavedra.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CANACYT) y al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) por el apoyo económico otorgado durante esta maestría.

*Me gustaría dar mi más sincero agradecimiento a la **Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez** por darme la confianza, el apoyo y la orientación para realizar este trabajo; y lo más importante de todo, por compartir su conocimiento y de esta manera ayudarme a crecer como persona.*

*Al **Dr. Oscar de la Garza Castro** y al **Dr. Julio Sepúlveda Saavedra** por la disposición, el apoyo y sus comentarios, pero sobre todo por el interés que tuvieron y mostraron en cada momento para realizar este proyecto.*

*Al **Dr. Adolfo Soto Domínguez** y al **Dr. Jorge Lara Arias** por su colaboración, además de que sus enseñanzas y consejos que fueron muy valiosas para llevar a cabo este trabajo.*

*A todo el personal del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, pero de manera particular a **Juany Hinojos, Normita Estrella y Lupita Martínez**, porque siempre tienen la disposición de ayudar y así facilitar nuestro trabajo.*

*Y por último, pero no por eso menos importante, quiero agradecer a todos mis compañeros y amigos de generación y del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, pero especialmente a **Artemisa Luevano, Gloria López, Selene García, Sonia Lozano, Elsa Garza y Mario Simental**, por haber hecho más ameno cada momento en esta maestría, también, por brindarme su apoyo y ayuda en los momentos difíciles y sobre todo por ofrecerme su valiosa amistad, la cual nunca olvidare.*

DEDICATORIA

*A **Dios** por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.*

*A **mis padres Juan y Leticia** por darme su amor y apoyarme cada decisión que he tomado en mi vida, y porque la persona que soy el día de hoy, es debido al ejemplo y la guía que me han brindado durante toda la vida.*

*A **mi hermano Canek** y mis demás familiares, por el buen humor, cariño y ánimo que constantemente me dan; gracias por estar siempre ahí.*

ÍNDICE

Contenido	Página
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Lesión de médula espinal.....	1
1.1.1. Causas de la LME.....	2
1.1.2. Fisiopatología de la LME.....	3
1.1.3. Obstáculos en la regeneración de la LME.....	4
1.1.4. Tratamiento de las LME.....	6
1.2. Terapia celular.....	6
1.3. La terapia celular para la regeneración de la médula espinal.....	7
1.4. Tipos celulares utilizados en estudios de regeneración de LME.....	7
1.4.1. Células madre.....	7
1.4.1.1. Células madre embrionarias.....	8
1.4.1.2. Células madre adultas.....	9
1.4.1.2.1. Células madre neurales.....	10
1.4.1.2.2. Células madre mesenquimales derivadas de medula ósea.....	10
1.4.1.2.3. Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.....	12

1.4.2.	Otros tipos celulares.	13
1.4.2.1.	Células de Schwann.	14
1.4.2.2.	Marcadores de las células de Schwann.	15
1.5.	Factores neurotróficos.	18
1.5.1.	Neurotrofina 3.	19
JUSTIFICACIÓN.		20
OBJETIVOS.		21
3.1.	Objetivo general.	21
3.2.	Objetivos específicos.	21
MATERIALES Y MÉTODOS.		22
4.1.	Estrategia general.	22
4.2.	Aislamiento de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.	22
4.3.	Diferenciación de las ASC a células de tipo Schwann con factores de diferenciación.	24
4.4.	Construcción del vector pTracerCMV2-NT3.	24
4.5.	Transfección de las ASC con el vector de expresión pTracerCMV2-NT3.	27
4.6.	Extracción de RNA y RT-PCR.	28
4.7.	Inmunocitoquímica y análisis morfométrico.	29
RESULTADOS.		31
5.1.	Caracterización de los vectores plasmídicos comerciales utilizados y construcción del vector pTracer-CMV2-NT3.	31
5.2.	Estandarización de las condiciones de transfección y expresión de NT3 en las ASC transfectadas.	34

5.3. Morfología y expresión de p75 ^{NTR} , s100 y GFAP en las ASC diferenciadas.	36
DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXOS.....	53
9.1. Controles de técnicas utilizados en las inmunotinciones.	53

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
Tabla 1. Clasificación de las células madre.	8
Tabla 2. Perfil de expresión de marcadores de superficie de las CMM de médula ósea y de tejido adiposo.	13
Tabla 3. Reactivos empleados en las reacciones de RT-PCR.	28
Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de GAPDH y NT3.	29
Tabla 5. Reactivos empleados para la reacción de amplificación de GAPDH y NT3.	29
Tabla 6. Controles de técnicas utilizados para cada uno de los Anticuerpos empleados en las inmunocitoquímicas.	53

ÍNDICE DE FIGURAS.

	<i>Página</i>
Figura 1. Sección de la médula espinal dentro de la columna vertebral.....	2
Figura 2. Lesión de médula espinal	5
Figura 3. Linaje de las células de Schwann	16
Figura 4. Expresión de marcadores en células de Schwann inmaduras, mielinizantes y no mielinizantes.	17
Figura 5. Localización de los sitios de corte de las enzimas KpnI y XbaI dentro de los vectores utilizados.....	26
Figura 6. Caracterización del vector de expresión pTracer-CMV2.....	31
Figura 7. Caracterización del vector de expresión pCRBluntII-Topo-NT3.....	32
Figura 8. Linearización del vector pTracer-CMV2 y liberación del fragmento de 1,124pb correspondiente a NT3.....	33
Figura 9. Caracterización de las clonas obtenidas de la reacción de ligación.....	33
Figura 10. Representación gráfica del porcentaje de viabilidad y de la eficiencia de transfección.	34
Figura 11. Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo transfectadas con el vector pTracer-CMV2-NT3 expresando GFP.....	35
Figura 12. Detección de la expresión de NT3 y GAPDH en las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo transfectadas y sin transfectar.....	35

Figura 13. Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo no diferenciadas teñidas con hematoxilina-eosina.....	36
Figura 14. Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano diferenciadas a células de Schwann al cultivarlas en medio de diferenciación.....	37
Figura 15. Detección de la expresión de p75 ^{NTR} mediante inmunocitoquímica en células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo diferenciadas (dASC) a células de Schwann	38
Figura 16. Detección de la expresión de s100 mediante inmunocitoquímica en células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo diferenciadas (dASC) a células de Schwann	39
Figura 17. Detección de la expresión de GFAP mediante inmunocitoquímica en células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo diferenciadas (dASC) a células de Schwann	40
Figura 18. Representación gráfica del porcentaje de células positivas para los marcadores p75 ^{NTR} , s100 y GFAP, al día 2 de incubación	41
Figura 19. Representación gráfica del porcentaje de células positivas para los marcadores p75 ^{NTR} , s100 y GFAP, al día 8 de incubación	42

ABREVIATURAS

Ac	anticuerpo
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	ácido ribonucleico
ASC	células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo
ATRA	ácido trans-retinoico
BDNF	factor neurotrófico derivado de cerebro
bFGF	factor de crecimiento de fibroblastos-b
°C	grados centígrados
cm ²	centímetro cuadrado
CO ₂	dióxido de carbono
CS	células de Schwann
DAB	3-3'- diaminobenzidina
DAPI	4', 6-diaminidino-2-fenylindol
dNTP	desoxinucleótidos trifosfato
DTT	ditiotreitól
ESC	células madre embrionarias
H ₂ O	agua
GFAP	proteína ácida fibrilar glial

GFP	proteína verde fluorescente
GGF-2	factor de crecimiento glial- 2
h	hora
ICQ	inmunocitoquímica
LB	Luria-Bertani
LME	lesión de médula espinal
MAP	proteínas activadas por mitógenos
MgCl ₂	cloruro de magnesio
MPM	marcador de peso molecular
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MSC	células madre mesenquimales derivadas de médula ósea
ng	nanogramo
NGF	factor de crecimiento nervioso
NSC	células madre neurales
NT	neurotrofinas
NT3	neurotrofina 3
NT4/5	neurotrofina 4/5

NTR	receptor de neurotrofina
pb	pares de bases
PBS	solución amortiguadora de fosfatos
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDGF-AA	factor de crecimiento derivado de plaquetas-AA
rpm	revoluciones por minuto
RT-PCR	transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
SFB	suero fetal bovino
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico
TBST	solución de buffer tris salino con tween-20
TRS	solución recuperadora de antígenos
U	unidad
μg	microgramo
μL	microlitro
μM	micromolar

RESUMEN

Azalea Arreola Romero
2011

Fecha de Graduación: Septiembre,

Universidad Autónoma de Nuevo León.

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina.

Título del estudio: Células Mesenquimales Humanas Diferenciadas *in vitro* a Células de Schwann

Número de páginas: 68

Área de estudio: Terapia Celular

Introducción. Desde hace tiempo ha surgido el interés en el uso de las células madre mesenquimales de tejido adiposo para su aplicación en la terapia celular, esto debido a las ventajas que ofrecen sobre otros tipos celulares, como su fácil aislamiento y expansión *in vitro*, que no involucran cuestiones legales ni éticas, su abundancia en comparación con las células madre mesenquimales de médula ósea, además, de que tienen la capacidad de diferenciarse tanto a linajes mesenquimales como no mesenquimales, incluyéndose las células de Schwann (CS), las cuales juegan un papel importante en la regeneración de los axones. Por otro lado, la neurotrofina 3 (NT3), un factor neurotrófico, involucrado en la diferenciación y la sobrevivencia de neuronas tanto del Sistema Nervioso Central como del Periférico. Objetivo. Cultivar células mesenquimales obtenidas de tejido adiposo e inducir su diferenciación hacia células de Schwann por dos procedimientos diferentes y comparar los marcadores de diferenciación expresados por ellas. Material y Métodos. Se diferenciaron ASC de humano en CS, al colocar las células en medio con los factores de diferenciación: β -Mercaptoetanol, forskolina, bFGF, PDGF-AA y 1 β -heregulina humana. Además, se construyó el vector de expresión pTracerCMV2-NT3 (a partir de los vectores comerciales pTracerCMV2 y pCR-BluntII-TOPO-NT3), el cual fue transfectado en las ASC con Lipofectamina 2000. Se extrajo el RNA a los 2 y 8 días de cultivo, y luego se realizó la RT-PCR y se detectó la expresión de NT3; después, se transfectaron ASC, y posteriormente se cultivaron con los factores de diferenciación. Por último, se comparó la expresión de los marcadores de células de Schwann (s100, GFAP y p75^{NTR}) de las células diferenciadas por ambos métodos, así como de aquellas ASC que solo sobre-expresaban NT3. Resultados y Conclusión. Se observó que la transfección incrementó el número de células positivas para p75^{NTR} y s100, mientras lo contrario ocurrió para GFAP, lo anterior independientemente de que las células después de la transfección hayan sido cultivadas o no, en medio de diferenciación, lo que sugiere que la sobre-expresión de NT3 favoreció la diferenciación hacia células de tipo Schwann mielinizantes, aunque los mejores resultados se observaron al emplear los dos tratamientos combinados.

Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez
Directora de Tesis

CÁPITULO I

INTRODUCCIÓN

La lesión medular es una alteración que resulta en la pérdida parcial o completa de la función sensorial y/o motora de determinada parte del cuerpo, esto dependiendo del sitio donde se haya producido la lesión. Mundialmente, la lesión de médula espinal (LME) presenta una incidencia que varía de 12.1 a 57.8 casos por cada millón de habitantes por año [1], mientras que en México, no existen datos exactos de la incidencia y prevalencia de esta condición, se estima una incidencia de 18.1 casos por cada millón de habitantes por año. Este problema afecta sobre todo a la población productiva, ya que las personas que la padecen tienen en su mayoría entre 16 a 35 años de edad, además, se presenta con mayor frecuencia en hombres que en mujeres [2].

En la actualidad no existe un tratamiento para la LME que restaure por completo la pérdida de la función de manera que se pueda garantizar que la persona afectada pueda llevar una vida independiente[3], es por esto, que esta condición no solo afecta de forma física, sino que además, provoca un cambio a nivel psicológico, social y económico, no solo de la persona lesionada, sino que termina por repercutir en toda la familia[2].

1.1. Lesión de médula espinal.

La médula espinal, al igual que el encéfalo forma parte del sistema nervioso central (SNC), el cual está formado por células altamente especializadas, las neuronas, y por células encargadas de dar el soporte anatómico y funcional a las neuronas, que en conjunto se denominan glía o neuroglía. La médula espinal se encuentra alojada y protegida en el interior de la columna vertebral (conducto medular o raquídeo) (figura 1)[4].

En relación con la médula espinal se disponen un total de 31 pares de nervios periféricos (nervios raquídeos o espinales), los cuales traen información de todas partes del cuerpo hacia la médula, y a la vez permiten la salida de órdenes dirigidas hacia los músculos [4].

La LME es heterogénea tanto por las causas, como por las consecuencias que pudiera tener, y puede ser el resultado de una contusión, una compresión, una penetración o una maceración de la médula espinal. La LME produce la muerte de células, incluyendo: neuronas, oligodendrocitos, astrocitos y células precursoras; y las cavidades o quistes resultantes pueden interrumpir los tractos axonales descendentes o ascendentes [5].

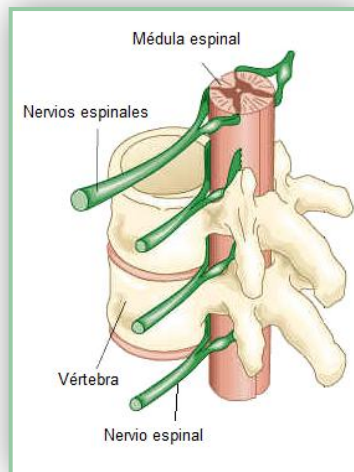


Figura 1. Sección de la médula espinal dentro de la columna vertebral. En este esquema se puede observar como la médula espinal corre por el canal espinal y está protegida por las vértebras.

1.1.1. Causas de la LME.

La LME es originada en primer lugar por algún tipo de trauma, donde los accidentes automovilísticos, las caídas, los accidentes deportivos y la violencia, se encuentran entre las principales causas; aunque, estas lesiones también pueden deberse a procesos no traumáticos (infecciones, compresión por tumor, enfermedades degenerativas, isquemia vascular, entre otros)[2].

En los pacientes con lesión por trauma de la médula espinal, el trauma mecánico rara vez ocasiona una sección total de la misma, sin embargo, el daño funcional observado puede ser completo (pérdida total de la función y de la sensibilidad por debajo de la vertebra afectada).

El daño o lesión inicial de una LME puede modificarse y empeorar debido a cambios biomecánicos, manipulaciones inadecuadas en el momento mismo de la emergencia, por las intervenciones llevadas a cabo en los primeros cuidados de las terapias intensivas y por los cambios fisiopatológicos, siendo estos últimos de especial importancia, ya que no solo incrementan la muerte celular y el daño axonal, sino que además, generan una serie de obstáculos que impiden la regeneración de la lesión[6].

1.1.2. Fisiopatología de la LME.

Algunos estudios han demostrado una recuperación significativa de la LME después de un tratamiento médico temprano, sin embargo, aun no existe un procedimiento efectivo que cure completamente la lesión. Por lo que es importante entender los eventos fisiopatológicos que siguen después del sufrimiento de la lesión, los cuales son complejos, multifactoriales, multifacéticos y se pueden clasificar en dos fases:

a) Lesión primaria.

La arquitectura normal de la médula espinal humana puede ser alterada radicalmente por una lesión. La LME es el resultado directo de la contusión, la compresión, la penetración o la maceración de la médula espinal [5], resultando generalmente afectada el área cervical o lumbar de ésta. El trauma inicial ocasiona daños a nivel tisular, caracterizados por la muerte celular (incluyendo a neuronas, oligodendrocitos, astrocitos y células precursoras) y la ruptura de vasos sanguíneos, generando una isquemia local aguda, la cual contribuye a una degeneración secundaria[6,7].

b) Lesión secundaria.

Después del daño primario, la lesión secundaria puede describirse como un daño complejo que ocurre a nivel celular. Esta fase se puede dividir en varios eventos patológicos: muerte celular masiva debida a que el sistema inmune del individuo responde a la lesión; el daño oxidativo y la excitotoxicidad, que contribuyen a la necrosis y/o apoptosis neuronal producidas, así como también al daño axonal y a la desmielinización [6,7,8,9].

1.1.3. Obstáculos en la regeneración de la LME.

El daño inicial después de la LME causa daño celular e induce a la cicatrización, este daño celular conlleva a una liberación de toxinas, las cuales son las responsables de la necrosis de las células en el sitio de la lesión y alrededor de éste (figura 2). Los eventos subsiguientes incluyen:

a) Formación de cavidad quística.

Después de la lesión y de la necrosis subsiguiente, se forma una cavidad llena de líquido, la cual se puede expandir a segmentos de la médula espinal, anteriores y posteriores al sitio de la lesión, causando un incremento en la muerte celular y en la pérdida de la función. Esta cavidad quística es una barrera física para la regeneración espontánea [10].

b) Formación de una cicatriz glial.

Muchos tipos celulares (macrófagos, precursores de oligodendrocitos y células meníngeas) migran al sitio de la lesión a diferentes tiempos. Sin embargo, la cicatriz glial está formada principalmente por astrocitos activos, los cuales secretan moléculas inhibitorias (proteoglicanos sulfatados y glucoproteínas) hacia la matriz extracelular, dificultando la recuperación de las neuronas dañadas en el sitio de la lesión, ya que estas moléculas han mostrado inhibir la regeneración axonal [10].

c) *Desmielinización de los axones.*

La *desmielinización* que ocurre después de la lesión, produce varios inhibidores por ejemplo: las proteínas Nogo (las cuales son expresas por las células formadoras de mielina del SNC y tienen la función de inhibir el crecimiento de las neuritas [11]), las glucoproteínas derivadas de la mielina y las glucoproteínas derivadas de oligodendrocitos (como la tenacina-R, involucrada también en la inhibición del crecimiento axonal) [10,12].

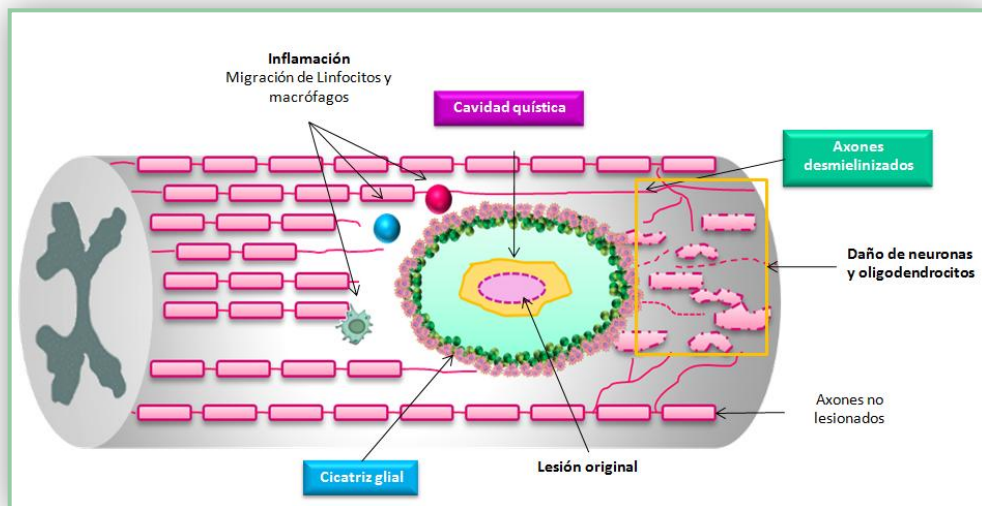


Figura 2. Lesión de médula espinal. En este esquema se puede observar que en el sitio de la lesión se presenta migración de linfocitos y macrófagos, así como la desmielinización de los axones en las neuronas y oligodendrocitos dañados, además se forma una cicatriz glial que puede interferir con la reparación de la lesión.

1.1.4. Tratamiento de las LME.

Su atención abarca principalmente tratamiento de soporte y estabilización espinal, si existe subluxación o dislocación, se realiza una descompresión cerrada o abierta. Posteriormente la mayoría de los pacientes requiere un procedimiento de descompresión o estabilización quirúrgica. Además, se les puede administrar esteroides (ej. metilprednisolona, cuyo beneficio es controversial) como antiinflamatorio. Después de la fase aguda, el tratamiento lo dicta el equipo de rehabilitación [8]. Como se mencionó anteriormente, no existe un tratamiento que restaure completamente la función sensorial y motora perdida a causa de la LME, por lo que en los últimos años se ha prestado especial atención en la terapia celular.

1.2. Terapia celular.

La terapia celular es la única estrategia terapéutica que busca el remplazo de células disfuncionales, dañadas o que se hayan perdido, con células sanas. Esta reparación o remplazo se puede deber a la misma administración de células exógenas, o bien a la activación de las células reparadoras endógenas que responden trófica, inmune o inflamatoriamente a las células trasplantadas [13]. La fuente de las células puede ser heteróloga (otra especie), alogénica (misma especie, otro individuo) o autóloga (mismo individuo); de forma ideal, se busca el uso de células autólogas, ya que con ello se evita el rechazo y el uso de inmunosupresores [14].

A pesar de que las terapias modernas se centran en tratamientos medicinales sintéticos y naturales para la reparación del Sistema Nervioso; muchos de estos tratamientos y prescripciones no tienen el resultado deseado, o solo tienen la habilidad de retardar la progresión de la enfermedad o lesión neurológica. Por lo que la terapia celular sigue siendo el tratamiento más convincente para las enfermedades neurodegenerativas, desórdenes y lesiones, incluyendo la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y las lesiones de cerebro o de médula espinal [13].

1.3. La terapia celular para la regeneración de la médula espinal.

Muchas de las estrategias actuales para el tratamiento de las LME involucran el uso de la terapia celular, con el objetivo de: cerrar los quistes o cavidades formadas como resultado de los procesos fisiopatológicos, reemplazar las células muertas (por ejemplo, para proporcionar nuevas neuronas o células mielinizantes), y por último, crear un entorno favorable para la regeneración del axón[5]. Para poder cumplir con lo anterior, se deben considerar los obstáculos impuestos tanto por el sitio de la lesión, así como también aquellos que se presentan debido a cuestiones relacionadas con la fuente de las células y la reproducibilidad de los sistemas de cultivo celular empleados [10].

1.4. Tipos celulares utilizados en estudios de regeneración de LME.

Una amplia gama de tipos celulares se han investigado para su uso en el tratamiento de las LME, así como también se han discutido las ventajas y desventajas de cada uno de ellos. Dentro de los tipos celulares que se han estado empleando destacan las células madre, debido a las características que éstas presentan. También, se han investigado otro tipo de células principalmente células de Schwann, fibroblastos y células del bulbo olfatorio [10].

1.4.1. Células madre.

Por definición, una célula madre es aquella que tiene la habilidad de dividirse (*auto-renovarse*) por periodos indefinidos a lo largo de la vida del organismo. Bajo las condiciones adecuadas, las células madre pueden dar lugar (*diferenciarse*) a los distintos tipos celulares que componen el organismo [3,13]. Es decir, las células madre tienen el potencial de desarrollarse en células maduras que tienen formas características y funciones especializadas, como las células del corazón, las células de la piel y las células nerviosas [13].

De forma idónea, una células madre para ser utilizada en la medicina regenerativa, debe reunir los siguientes criterios: a) deben encontrarse en cantidades abundantes (de millones a billones de células), b) deben poderse obtener a través de un procedimiento lo menos invasivo posible, c) deben poder diferenciarse en múltiples linajes celulares de una manera reproducible, y por último, d) deben poder trasplantarse de forma segura y efectiva tanto de manera autóloga como alogénica [15].

Una células madre verdadera es una célula *totipotencial* (tabla1), la cual puede llegar a formar cualquier tipo celular presente en un organismo. Muchos consideran al cigoto como la única célula totipotencial verdadera, ya que puede diferenciarse en células de la placenta, así como también en células embrionarias. Otros definen las células de la masa celular interna del blastocisto como células madre embrionarias (por sus siglas en inglés: ESC, *Embryonic Stem Cell*). Además, células indiferenciadas pueden ser encontradas entre las células diferenciadas de tejidos específicos después del nacimiento, estas células son conocidas como células madre adultas [3]. La plasticidad y la diferenciación de las células madre son reguladas por el microambiente en el cual ellas residen.

Tabla 1. Clasificación de las células madre[16].

Tipos de células madre	Propiedades
Totipotencial	Capaz de diferenciarse en todos los tipos celulares incluyendo a la placenta.
Pluripotencial	Se puede diferenciar en tipos celulares del mesodermo, ectodermo y endodermo.
Multipotencial	Se diferencian hacia un linaje celular en particular.
Unipotencial	Solo se pueden diferenciar en un tipo celular en particular, y difiere de las células maduras, en que éstas si se pueden renovar.

1.4.1.1. Células madre embrionarias.

Estas células son especialmente atractivas debido a que presentan dos características, que son *pluripotenciales*, al tener la capacidad de desarrollarse en más de 200 diferentes tipos celulares; y en segundo lugar, poseen la capacidad de autorrenovación [3,10]. Debido a lo anterior, las ESC son consideradas útiles para diferentes aplicaciones.

En el laboratorio, las ESC se han podido diferenciar en oligodendrocitos y se han trasplantado en la médula espinal de ratones mutantes *shiverer* (deficientes en mielina), donde se observó que las células migraron al tejido del huésped, produjeron mielina y mielinizaron los axones[17]. En otro trabajo, se vió como las ESC que sobre-expresaban el factor anti-apoptótico *bcl-2* trasplantadas en el cerebro post-isquémico de rata, pueden sobrevivir y diferenciarse en varios tipos celulares presentes en un cerebro normal (neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y células del endotelio)[18]. Además, se ha demostrado que las ESC se pueden diferenciar en células tipo Schwann después de ser implantadas en el nervio ciático dañado, sin embargo, la regeneración de los axones mielinizados no fue suficiente para restaurar los niveles normales[19].

Por otro lado, el uso de ESC tiene desventajas como los son las controversias éticas que restringen su uso[16], además, de que el trasplante de estas células puede resultar en la formación de teratomas, así como también son propensas a ser rechazadas después de la inyección en el tejido adulto y de que el tratamiento a largo plazo puede requerir de la administración de inmunosupresores[3].

1.4.1.2. Células madre adultas.

Debido a las preocupaciones éticas y a las restricciones gubernamentales involucradas en las investigaciones de tejido embrionario y fetal, se ha expandido la búsqueda de fuentes alternas de células madre. Más recientemente, las células madre adultas, las cuales pueden ser encontradas en todos los tejidos y órganos adultos, han representado un gran avance en el campo de la investigación con células madre. Las células madre adultas, al igual que las células madre embrionarias, se auto-renuevan por largos periodos de tiempo, y pueden producir células maduras con una morfología definida y funciones específicas. Su función principal es mantener la homeostasis y reemplazar aquellas células que murieron durante una lesión o una enfermedad. Las células madre adultas usualmente generan un tipo o tipos celulares

intermedios (comúnmente llamados células precursoras o progenitoras) antes de que se diferencien completamente [13,20].

1.4.1.2.1. Células madre neurales.

Son células *multipotenciales* que se pueden diferenciar en neuronas, oligodendrocitos y astrocitos, se localizan tanto en tejido embrionario como en tejido adulto, se auto-renuevan y se pueden propagar eficientemente *in vitro*. [7,10]. Se sabe que después de la LME, estas células proliferan y se producen cerca de 2 millones de células en el sitio de la lesión durante el mes posterior al daño, sin embargo, la activación de estas células no promueve la recuperación, por el contrario la mayoría de ellas se diferencia a astrocitos, los cuales contribuyen a la formación de una cicatriz glial [7].

Se ha demostrado que las Células Madre Neurales (por sus siglas en inglés: NSC, *Neural Stem Cell*) humanas, expandidas como una masa celular en presencia de mitógenos (como el factor de crecimiento epidérmico o el factor de crecimiento de fibroblastos 2) llamadas neuroesferas [21], sobreviven, migran y expresan marcadores de diferenciación nerviosa y de oligodendrocitos después de un injerto a largo plazo en ratones NOD-*scid* (inmunodeficientes) con lesión de médula espinal. También se observó remielinización en el sitio de la lesión tanto en ratones NOD- *scid*, como en ratones *shiverer* [22].

1.4.1.2.2. Células madre mesenquimales derivadas de médula ósea.

En los últimos años se ha prestado interés en desarrollar terapias celulares y genéticas con células madre adultas derivadas de médula ósea, originalmente referidas como unidades formadoras de colonias de células fibroblastoides, ahora nombradas células madre mesenquimales (por sus siglas en inglés: MSC, *Mesenchymal Stem Cell*) [23]. Estas células tienen dos importantes capacidades, la primera, es que al ser *multipotenciales* pueden

diferenciarse en células de tejido mesenquimal como hueso, cartílago, músculo, ligamento y tejido adiposo, contribuyendo a la regeneración de estos tejidos. Segunda, las CMM secretan un amplio espectro de moléculas bioactivas que son inmunorreguladoras y que sirven para estructurar el microambiente regenerativo de los tejidos lesionados [24].

Las MSC son aparentemente la base de la terapia celular porque: se aíslan rápidamente del paciente (se pueden utilizar en trasplantes autólogos), se expanden con facilidad *in vitro*, son genéticamente modificables, no son tumorigénicas a menos de que se sometan a estrés o sean cultivadas *in vitro* por muchas generaciones y forman parte del sistema natural de reparación[23].

Aparte de su capacidad para diferenciarse en células de tejidos mesenquimales, también se ha demostrado que se pueden diferenciar en células no mesenquimales, como lo son las neuronas [25], lo cual las coloca como una opción viable para el tratamiento de múltiples enfermedades que involucren al sistema nervioso. Cabe mencionar que se ha estudiado el efecto de las MSC sobre las LME en ratones, en los que se observó que células trasplantadas 7 días después de producida la lesión, podían sobrevivir y mejoraban el puntaje de la escala funcional Basso, Beattie, Bresnahan (utilizada para evaluar la capacidad de recuperación locomotora) de los ratones trasplantados, en comparación con los controles [26]. Además, en un co-trasplante con NSC, se promovió la diferenciación *in vivo* de las MSC en células neuronales y de la glía, esto debido a que las MSC proveían factores tróficos [27]. Por otro lado, al tratar lesiones cerebrales causadas por trauma con las MSC, se demostró que se puede mejorar el funcionamiento neuronal durante la fase aguda de la lesión, ya que el aumento de factores neurotróficos secretados por las MSC puede llevar a una disminución de la apoptosis neuronal [28].

Sin embargo, las MSC son escasas en la médula ósea, representando aproximadamente 1 de cada 10,000 hasta 1 de cada 1'000,000 de células nucleadas y la frecuencia puede verse afectada por factores como la edad, el índice de masa corporal, el género, la presencia de osteoporosis y la exposición a quimioterapia o radiaciones. [23,29,30].

1.4.1.2.3. Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

Si bien es enorme el potencial de las células madre embrionarias, muchas cuestiones éticas y políticas han limitado su utilización, es por esto que las MSC han sido propuestas como una fuente alternativa para la terapia celular. Sin embargo, su obtención de médula ósea para su uso clínico ha presentado problemas, incluyendo dolor, morbilidad (uso de anestesia general), y un bajo número de células cosechadas. Lo que ha conducido a los investigadores a buscar fuentes alternativas de células madre mesenquimales. Siendo el tejido adiposo, al igual que la médula ósea, un derivado del mesoderma, y que además, contiene un estroma fácilmente aislable, éste puede representar una fuente de células madre que puedan ser utilizadas en varios campos [31].

Las células derivadas de tejido adiposo y de médula ósea, presentan una morfología similar, formándose dos tipos de colonias, las colonias grandes que presentan células pequeñas fusiformes mientras que las colonias pequeñas, muestran células grandes poligonales. Además, ambos tipos de células comparten fenotipo de marcadores de superficie muy similar (tabla 2), en donde solo varían en la expresión de CD49d y CD106 [20,30,31,32]. Sin embargo, y de manera muy importante, el tejido adiposo presenta una mayor cantidad de células madre, ya que en éste se presentan con una frecuencia de 1 por cada 1,000 hasta 1 por cada 30 células nucleadas[23]. Por otro lado, en un análisis de la cinética de crecimiento, se mostró que la población de células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (por sus siglas en inglés: ASC, *adipose-derived stem cells*, término acordado por *The International Fat Applied Technology Applied*) se incrementaba linealmente por lo menos hasta el pase 8, mientras que la cinética de crecimiento de la células derivadas de la médula ósea decrecía en el pase 5 [32].

Al igual que las MSC, las ASC tienen la capacidad de llevar a cabo la diferenciación hacia linajes mesenquimales (adipogénesis, condrogénesis, osteogénesis y miogénesis) [31] y no mesenquimales (neurogénesis, miogénesis esquelética y cardiogénesis). La diferenciación a linajes neuronales ha sido demostrada para las ASC, en las que se ha detectado la presencia de marcadores neuronales tempranos en células diferenciadas *in vitro* [33]. También, se han

diferenciado las ASC de ratón a células tipo Schwann con morfología, fenotipo y función característicos de estas células [34].

Tabla 2. Perfil de expresión de marcadores de superficie de las CMM de médula ósea y de tejido adiposo[30].

Marcador de superficie	Patrón de expresión	
	ASCs	BMSC
CD9	+	+
CD10	+	+
CD13	+	+
CD29	+	+
CD31	-	-
CD34	-	-
CD44	+	+
CD45	-	-
CD49d	+	-
CD49e	+	+
CD54	+	+
CD55	+	+
CD59	+	+
CD90	+	+
CD105	+	+
CD106	-	+
CD117	+	+
CD146	+	+
CD166	+	+
STRO-1	+	+

Se mostró que los ratones con isquemia cerebral (por oclusión de la arteria cerebral media) tratados con ASC de humanos mejoraron en su examen neurológico, y hubo una mejor respuesta en aquellos animales tratados con las ASC de humanos que fueron transducidas con el gen de factor neurotrófico derivado de cerebro (por sus siglas en inglés: BDNF, *brain derived neurotrophic factor*) [35].

1.4.2. Otros tipos celulares.

Adicionalmente, se ha investigado el uso de células diferenciadas, tales como células de Schwann, células olfatorias de la glía, y fibroblastos, para el tratamiento de las LME. Las células de Schwann pueden ser aisladas del mismo paciente a partir del nervio periférico, las células

olfatorias de la glía se pueden obtener para trasplantes autólogos a partir de una biopsia nasal y crecerse en cultivo hasta ser requeridas, mientras que los fibroblastos pueden ser aislados de la piel[10].

1.4.2.1. Células de Schwann.

A través de la historia de la neurociencia, se han considerado a las células de la glía tanto del sistema nervioso periférico (SNP) como del SNC como el “adhesivo” que mantiene unido física y metabólicamente el sistema nervioso.

Las células de Schwann (CS) son células de la glía formadoras de mielina que se encargan de mantener estructural y funcionalmente las células neuronales presentes en el SNP y tienen un papel crucial en el desarrollo y regeneración de los nervios periféricos [34].

En la actualidad, existe una gran cantidad de evidencia que define las múltiples funciones de las CS que no están relacionadas con la mielinización, lo que enfatiza la relación simbiótica de éstas con las células nerviosas, donde unas depende de las otras para poder desarrollarse, funcionar y mantenerse adecuadamente. Por ejemplo, es el axón el que controla la iniciación de la mielinización, el número de láminas de mielina y el mantenimiento de la compleja organización de las CS. Sin embargo, son las CS las que regulan el diámetro del axón, la fosforilación y el espaciamiento de los neurofilamentos, el agrupamiento de los canales iónicos en los nódulos de Ranvier en los axones mielinizados. Las CS y su lámina basal extracelular están involucrados en la regeneración y en dirigir a los axones a su destino final.

Todas las neuronas del SNP están íntimamente en contacto físico con las células de Schwann y satélite, sin tomar en cuenta cuales de ellas son mielinizantes o no mielinizantes, sensoriales o motoras. Todos los axones de los nervios periféricos están envainados por células de Schwann, ya sea que una célula de Schwann envuelva a un solo axón, o que una célula de Schwann recubra múltiples axones no mielinizados, conformando el haz de Remak. [36].

Si bien todas las CS provienen de la cresta neural, las CS en el SNP maduro pueden ser clasificadas de acuerdo a su morfología, fenotipo antigénico y localización anatómica de la siguiente manera: *CS mielinizantes*, *CS no mielinizantes*, *CS perisinápticas* de las uniones neuromusculares, y en células satélites, que recubren o envainan el cuerpo celular de las neuronas.

En las lesiones del SNP, las CS tienen un papel muy importante, ya que parte del poder regenerativo del SNP se debe a las propiedades intrínsecas de las CS. La regeneración axonal en el SNP ocurre a través de la iniciación de la cascada de señalización que activa a las CS a producir factores neurotróficos, citocinas, moléculas de matriz extracelular y de adhesión celular, los cuales ayudan a que el nervio lesionado vuelva a crecer. Estas habilidades contrastan con la neuroglía del SNC, particularmente con los astrocitos, los cuales producen un ambiente hostil para la regeneración axonal en respuesta a la lesión. Debido a esto, es que se han considerado a las CS como candidatas para su uso en la terapia celular de enfermedades (degenerativas o lesiones) del SNP y del SNC [36].

Es bien conocido el potencial de los injertos de las CS para promover la regeneración axonal en las LME. Igualmente, se ha demostrado que estas células pueden sintetizar varios tipos de factores neurotróficos, moléculas de adhesión celular y de matriz extracelular, todos estos son prerequisites para la supervivencia y la regeneración axonal de las neuronas dañadas [37]. Sin embargo, es difícil y consume mucho tiempo obtener suficiente cantidad de células de Schwann humanas, a partir de cultivo primarios, para su utilización clínica[19].

1.4.2.2. Marcadores de las células de Schwann.

Las células de la glía del nervio periférico adulto, las células de Schwann mielinizantes y no mielinizantes, se generan a partir de las células de la cresta neural, y se han definido por tres transiciones principales: 1) de células de la cresta neural a precursores de células de Schwann, 2) de precursores de células de Schwann a células de Schwann inmaduras, y 3) la divergencia

de esta población en los dos tipos maduros de células de Schwann, unas que sintetizan mielina y otras que no lo hacen (figura 3). La mayor parte de estos eventos dependen de las señales de sobrevivencia, de las señales mitogénicas y de las señales de diferenciación derivadas de los axones con los cuales están continuamente asociados tanto los precursores de las células de Schwann como las células de Schwann maduras [38].

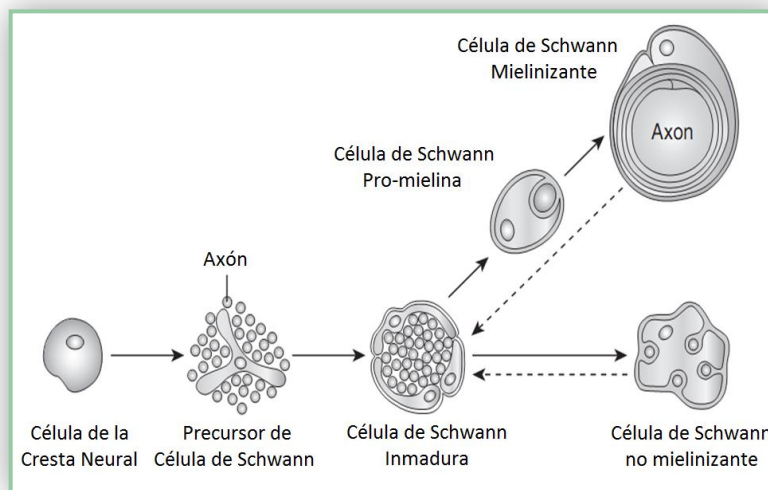


Figura 3. Linaje de las células de Schwann. Ilustración esquemática de los principales tipos celulares y las transiciones en el desarrollo de las células de Schwann.

Cada etapa del linaje de las células de Schwann puede ser caracterizada por un conjunto de marcadores de diferenciación molecular que se superponen parcialmente. Anteriormente, el análisis de la progresión del linaje fue obstaculizado por la falta de otros marcadores que no fueran el s100 y la proteína ácida fibrilar glial (por sus siglas en inglés: GFAP, *glial fibrillary acidic protein*), las cuales aparecen después del desarrollo embrionario del nervio [38].

Un conjunto de marcadores han sido utilizados para definir la diferenciación de células de Schwann inmaduras a células de Schwann mielinizantes y no mielinizantes, y el proceso reverso, la desdiferenciación, el cual se presenta después de una lesión al nervio o cuando las células de Schwann son puestas en cultivo. La mielinización es caracterizada por la sobre-

regulación (up-regulation) del factor de transcripción Krox-20 y de las proteínas relacionadas con la mielina (P0, PMP22, proteína básica de mielina (MBP), proteína del proteolípidio (PLP), proteína MAL y periaxina), junto con los lípidos sulfatados y galactocerebrósidos. También, durante la mielinización hay una baja regulación de un conjunto de marcadores que caracterizan a las células de Schwann inmaduras y a las CS no mielinizantes, incluyendo el receptor neurotrófico p75, L1, y las moléculas de adhesión celular neural (N-CAM). Las CS no mielinizantes maduras también expresan los lípidos sulfatados y galactocerebrósidos, y poseen un perfil proteínico similar pero no idéntico al de las CS inmaduras [38] (figura 4).

Diversos estudios en los cuales se han diferenciado células madre mesenquimales a células tipo Schwann, se analizan la expresión de proteínas características de las CS como lo son s100 (proteína de unión a calcio, y se ha encontrado que en las CS estimula e induce la regeneración axonal), GFAP (proteína que forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto de las células de la glía tales como los astrocitos y las CS) y p75^{NTR} (receptor de baja afinidad que interactúa con las diferentes neurotrofinas) [34,39,40].

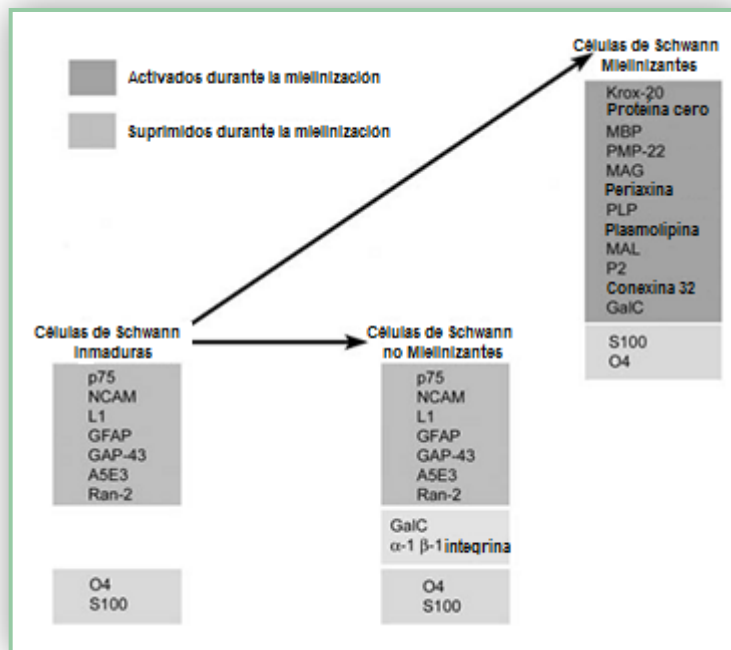


Figura 4. Expresión de marcadores en células de Schwann inmaduras, mielinizantes y no mielinizantes.

1.5. Factores neurotróficos.

El desarrollo de las neuronas, tanto del SNC como del SNP, requiere varios cambios. Ellas deben migrar a su localización adecuada, prolongar su axón hacia su blanco post-sináptico y sobrevivir por un periodo de tiempo, hasta que ocurra la muerte celular de forma natural. El dogma del desarrollo neurobiológico sustenta que mientras las neuronas en desarrollo prolongan sus axones hacia sus tejidos blancos, su supervivencia depende de factores solubles liberados en cantidades limitantes desde los tejidos blancos. Después de una lesión que afecte a los axones, las neuronas dañadas deben que enfrentar los mismos retos que las neuronas en desarrollo [41].

Las neurotrofinas (NT) son factores de crecimiento que intervienen en la proliferación, diferenciación, supervivencia y muerte de células neuronales y no neuronales. Éstas conforman una familia conservada de proteínas que se encuentran en especies de mamíferos, e incluyen a: el factor de crecimiento nervioso (por sus siglas en inglés: NGF, *nerve growth factor*), factor neurotrófico derivado de cerebro, neurotrofina 3 (NT3) y Neurotrofina 4/5 (NT4/5). Estas proteínas son sintetizadas como pro-proteínas que son escindidas intracelularmente por parte de la furin proteasa, la cual genera la proteína madura. Las subunidades que se generan, forman dímeros unidos no covalentemente, los cuales son secretados [42,43]. Todas las neurotrofinas tienen seis residuos de cisteínas que están involucradas en la formación de tres puentes disulfuro y todas comparten el 55% de la secuencia aminoacídica [44].

El efecto de las NT depende tanto de sus niveles de disponibilidad, así como de su afinidad de unión a los receptores de membrana y de la cascada de señalización que desencadenan después de que se unen a sus receptores [45].

1.5.1. Neurotrofina 3.

La neurotrofina 3 es un miembro de la familia las neurotrofinas, las cuales se requieren para estimular el crecimiento, la diferenciación y la sobrevivencia de las neuronas tanto del Sistema Nervioso Central como del Periférico, durante el desarrollo o el daño de las células nerviosas.

La NT3 es una proteína de 14kDa (119 amino ácidos), y al igual de el NGF, la molécula bioactiva es un homodímero ligado de manera no covalente, el cual se une a receptores de superficie celular para su función biológica. La proteína madura es idéntica en el humano, el ratón y la rata. El transcrito del NT3 se ha detectado en el cerebelo, el hipocampo, la placenta, el corazón, la piel y el músculo esquelético [44,46].

Esta neurotrofina ha demostrado promover la diferenciación de células madre embrionarias a neuronas a través de la activación en cascada de MAP cinasas (proteínas cinasas activadas por mitógenos) [47].

CÁPITULO II

JUSTIFICACIÓN

En vista de que en la actualidad no existe un tratamiento satisfactorio disponible para las LME, es preciso que se desarrolle una terapia, que permita restaurar las células formadoras de mielina que se pierden después de una lesión y que adicionalmente se incremente la plasticidad de los axones.

Por lo tanto, es necesario realizar estudios *in vitro*, en los cuales se facilite la diferenciación de las células madre mesenquimales, para que expresen las características fenotípicas morfológicas de las células de Schwann.

Ya que el tejido adiposo es una fuente importante de células mesenquimales, en este trabajo se propuso utilizarlas para diferenciarlas *in vitro* a células de Schwann y caracterizarlas por métodos inmunocitoquímicos.

CÁPITULO III

OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

Cultivar células mesenquimales obtenidas de tejido adiposo e inducir su diferenciación hacia células de Schwann por dos procedimientos diferentes y comparar los marcadores de diferenciación expresados por ellas.

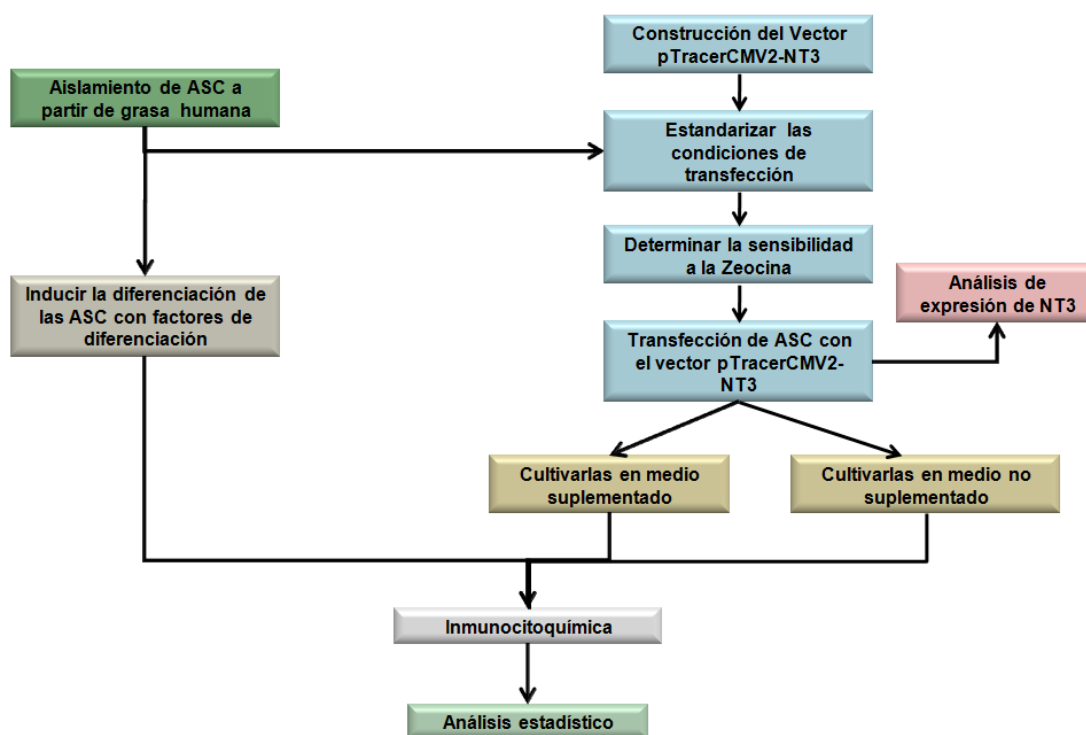
3.2. Objetivos específicos.

1. Inducir la diferenciación de las ASC hacia células tipo Schwann cultivándolas en medio suplementado con factores de diferenciación.
2. Construir el vector de expresión pTracer-CMV2-NT3, transfectar las ASC con el vector construido y posteriormente incubarlas en medio suplementado con los factores de diferenciación o en medio sin suplementar.
3. Evaluar por inmunocitoquímica la presencia de marcadores de diferenciación en las células tratadas en las condiciones antes descritas, para así realizar un estudio morfométrico que permita cuantificar y comparar los resultados obtenidos en ambas condiciones.

CÁPITULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Estrategia general.



4.2. Aislamiento de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

Las ASC se obtuvieron a partir de tejido adiposo de humano, obtenido como material de desecho en cirugías. El tejido se colocó en PBS estéril con el antibiótico gentamicina, 50µg/mL (LABORATORIOS QUIMICA SON'S, S.A DE C.V. Puebla, México), y anfotericina B, 0.25µg/mL (GIBCO®/INVITROGEN™, Grand Island, NY, USA) como antimicótico. Después, dentro de la campana de cultivo, la muestra se colocó en una caja de cultivo estéril y se fragmentó el tejido con un bisturí hasta obtener fragmentos pequeños. Luego, se realizaron lavados con PBS estéril adicionado con antibiótico y antimicótico, mezclando por inversión y dejando reposar para

que se llevara a cabo la separación de las fases, se eliminó la fase inferior y se repitió el proceso hasta que la fase inferior se observara clara.

Después, se llevó a cabo la digestión agregando una solución de PBS estéril, con Colagenasa tipo I, 200U/mL (GIBCO®/Invitrogen™, Grand Island, NY, USA) con la misma mezcla de antibiótico/antimicótico mencionada anteriormente. La muestra se incubó a 37°C con agitación suave durante 1 hora, hasta observar una mezcla más homogénea y espesa, revisando cada 15 minutos su consistencia. Al terminar el proceso de digestión, se añadió PBS adicionado con antibiótico/antimicótico, se mezcló suavemente y después se centrifugó a 2000rpm durante 5 minutos. En el precipitado se obtuvo una pequeña cantidad de adipocitos y células mesenquimales. Luego se descartó la parte superior, y la pastilla de células se resuspendió al añadir PBS adicionado con antibiótico/antimicótico y se volvió a centrifugar a 2000rpm a temperatura ambiente por 5min, repitiendo este proceso 2 veces más. Por último, las células se resuspendieron en medio MEM-Alpha + GlutaMax™-I (GIBCO®/Invitrogen™, Grand Island, NY, USA) adicionado de Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% (GIBCO®/Invitrogen™, Grand Island, NY, USA) y antibióticos/antimicóticos. Las células se sembraron en botellas de cultivo de 25cm² (CORNING®-Corning Incorporated, Corning, NY, USA) incubándolas a 37°C con 5% de CO₂. A los tres días se les realizó el cambio de medio y se dejó expandir el cultivo [48].

Cuando el cultivo llegó al 80-90% de confluencia, las células se cosecharon utilizando tripsina al 0.25% (GIBCO®/ Invitrogen™, Grand Island, NY, USA) y se contaron. Después, una parte de las células se congeló y la otra parte se subcultivó, sembrando de 3,500-4,000 células por cm² de la caja [15].

4.3. Diferenciación de las ASC a células de tipo Schwann con factores de diferenciación.

Se realizó la diferenciación a partir de células del tercer pase. Estas células fueron subcultivadas a una densidad de 1×10^5 células/mL en cámaras de cultivo (Lab-Tek Chamber-Slide™ System, Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) de 4 pozos. Al día siguiente, las células fueron lavadas con PBS y se les cambió el medio MEM-Alpha + GlutaMax™-I, al cual se le adicionó con β -Mercaptoetanol 1mM (SIGMA-ALDRICH; St, Louis, MO, USA). Pasadas 24 h, se cambió el medio y se agregó medio MEM-Alpha + GlutaMax™-I con SFB al 10% adicionado con ácido trans-retinoico (ATRA) 0.1mM (Calbiochem®, © Merck KGaA Darmstadt, Alemania), este medio se dejó por 72 h. Finalmente, a las células se les agregó medio MEM-Alpha + GlutaMax™-I con SFB al 10%, forskolina 5mM (Calbiochem®, © Merck KGaA Darmstadt, Alemania), factor de crecimiento de fibroblastos humano recombinante-b (bFGF) 10ng/mL (PREPROTECH, INC., Rocky Hill, NJ, USA), factor de crecimiento derivado de plaquetas humanas recombinante-AA (PDGF-AA) 10ng/mL (PREPROTECH, INC., Rocky Hill, NJ, USA) y 1 β -heregulina humana recombinante 200ng/mL (PREPROTECH, INC., Rocky Hill, NJ, USA). Este último medio se conservó de 2 a 8 días, renovándose de acuerdo al crecimiento de las células [34].

4.4. Construcción del vector pTracerCMV2-NT3.

Para la construcción del vector de expresión que contuviera el ADNc de la neurotrofina, se utilizaron:

- El vector de clonación pCR-BluntII-TOPO-NT3 que contiene el ADNc de NT3 (Open Biosystems Inc., Huntsville, AL, USA).
- El vector de expresión pTracerCMV2 (Invitrogen™, Grand Island, NY, USA).

EL vector pCR-BluntII-TOPO-NT3 fue proporcionado en células de *E. coli* DH10B TonA, las cuales fueron sembradas en placas de agar LB (SIGMA®-ALDRICH™, USA) que contenían kanamicina (GIBCO®/ Invitrogen™, Grand Island, NY, USA) como agente de selección.

De las placas anteriores se seleccionaron 8 clonas, las cuales se crecieron en medio LB (US Biological, Swampscott, MA, USA) con kanamicina durante 12h, posteriormente se realizó la extracción de ADN plasmídico a pequeña escala. Luego se procedió a realizar la caracterización del plásmido pCR-BluntII-TOPO-NT3, utilizando la enzima de restricción EcoRV (Promega Corporation, Madison, WI, USA) y NcoI (New England BioLabs®_{inc}, Ipswich, MA, USA).

Por otro lado, se transformaron células calcio-competentes de *E. coli* Top10 con el vector pTracerCMV2 y se sembraron en placas de agar LB con Ampicilina (SIGMA-ALDRICH; St, Louis, MO, USA), como agente de selección. Se seleccionaron 8 clonas, las cuales se crecieron durante 12h en medio LB con Ampicilina, para posteriormente realizar la extracción de DNA plasmídico. Después se realizó la caracterización del plásmido con la enzima XhoI (New England BioLabs®_{inc}, Ipswich, MA, USA).

Una vez caracterizados ambos vectores, se realizó la digestión del vector el pCR-BluntII-TOPO-NT3 con las enzimas KpnI (New England BioLabs®_{inc}, Ipswich, MA, USA) y XbaI (Promega Corporation, Madison, WI, USA), para liberar el fragmento de 1124pb correspondiente al ADNc de NT3, para posteriormente subclonarlo en el vector pTracerCMV2, que contiene el promotor de citomegalovirus y el gen reportero de la proteína verde fluorescente (por sus siglas en inglés: GFP, *Green Fluorescent Protein*) (figura 5).

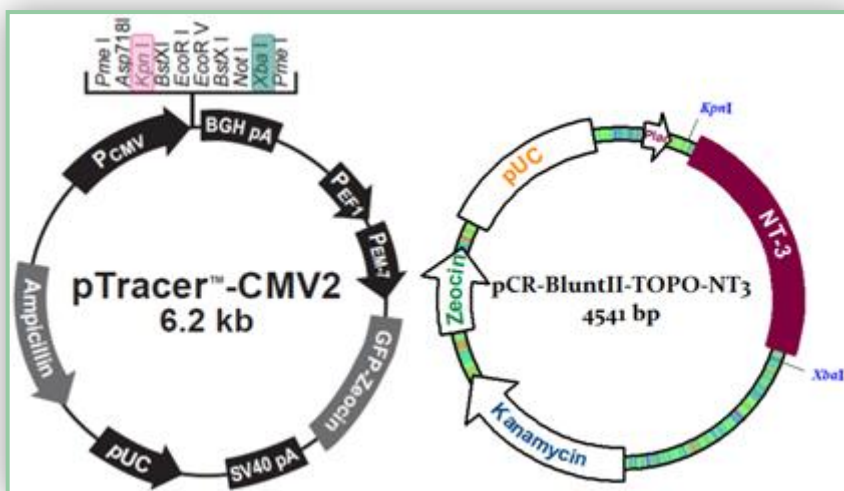


Figura 5. Localización de los sitios de corte de las enzimas KpnI y XbaI dentro de los vectores utilizados.

Después de la restricción de ambos plásmidos con las enzimas KpnI y XbaI, se corrió un gel de agarosa (Invitrogen™, Grand Island, NY, USA) al 0.8%, a partir del cual se recuperaron las bandas de interés, las cuales fueron purificadas con el estuche comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, WI, USA), para posteriormente ser ligadas utilizando la enzima Ligasa T4 (Promega Corporation, Madison, WI, USA). A partir de la reacción de ligación se transformaron células calcio-competentes de *E. coli* Top10, que se sembraron en placas con agar LB con ampicilina, después de la incubación a 37°C durante toda la noche, se seleccionaron 19 clonas, las cuales fueron crecidas en medio LB con ampicilina, para después realizar la extracción del ADN plasmídico, las clonas fueron caracterizadas con las enzimas NdeI (New England BioLabs® Inc, Ipswich, MA, USA) y SphI (New England BioLabs® Inc, Ipswich, MA, USA). Se seleccionó una de las clonas que presentó el patrón de restricción deseado. Después, se preparó y se purificó el plásmido obtenido, para utilizarlos en los ensayos de transfección mediante una mediana escala empleando el estuche comercial QIAGEN® Plasmid Midi Kit (QIAGEN Inc., USA) y se cuantificó empleando el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

4.5. Transfección de las ASC con el vector de expresión pTracerCMV2-NT3.

Se sembraron ASC del segundo pase en placas de cultivo de 35x10mm (CORNING®-Corning Incorporated, Corning, NY, USA) con 1×10^5 células por pozo con 2mL de medio de cultivo Opti-MEM® (GIBCO®/Invitrogen™, Grand Island, NY, USA) sin antibiótico, se dejó que las células alcanzaran del 90-95% de confluencia al momento de la transfección. En algunos de los pozos se colocaron cubre-objetos antes de sembrar, con el propósito de recuperar las células, y posteriormente determinar la eficiencia de transfección por microscopía de fluorescencia.

Para estandarizar la transfección se probaron distintas cantidades de ADN plasmídico, y cada una de ellas se probó con cantidades diferentes de Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen™, Grand Island, NY, USA).

Para cada pozo que se transfectó, se prepararon los siguientes complejos:

- Se diluyó el DNA plasmídico (pTracerCMV2-NT3) hasta un volumen de 250µL con medio Opti-MEM® sin suero y sin antibiótico, y se mezclaron suavemente.
- Se mezcló suavemente la Lipofectamina™ 2000 antes de usar, después se diluyó con medio Opti-MEM® (sin suero ni antibióticos) hasta un volumen de 250µL. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

Después, se combinó el DNA diluido con la Lipofectamina™ 2000 diluida ($V_{total} = 500\mu\text{L}$). Se mezcló suavemente y se incubó durante 20 min. Los complejos formados son estables durante 6 h.

Luego, se agregaron 500µL del complejo a cada pozo y se mezcló suavemente. A la placa que sirvió como control negativo de transfección se le añadió Lipofectamina™ 2000 diluida con 250µL de medio Opti-MEM®. Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Se cambió el medio después de 4-6 h. A las 48 h se verificó la eficiencia de transfección por microscopía de fluorescencia, tiñendo los núcleos con 4', 6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI), y por último, la viabilidad celular con azul tripan.

Una vez seleccionadas las mejores condiciones para llevar a cabo la transfección, se transfectaron las ASC de humano para posteriormente cultivarlas con los factores de diferenciación como se describió anteriormente.

4.6. Extracción de RNA y RT-PCR.

Se obtuvo el RNA a partir de células transfectadas con el vector pTracerCMV2-NT3, para esto se utilizó el *PURESCRIPT® RNA Purification System* (GENTRA SYSTEMS, Minneapolis, MN, USA). Se utilizaron iniciadores específicos para la detección del gen constitutivo de la glicelaldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), así como para NT3, cuya secuencia y tamaño de los fragmentos amplificados se muestran en la tabla 4. Para llevar a cabo la RT-PCR se empleó la enzima M-MLV (Invitrogen™, Grand Island, NY, USA), estas reacciones (tabla 3) se montaron en el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem), la *reacción 1* se incubó a 74°C/ 10min, 3min en hielo, en seguida, se agregó la *reacción 2*, y se siguieron las condiciones de 25°C/10min, 37°C/1h, 95°C/5min y 4°C/10min.

Tabla 3. Reactivos empleados en las reacciones de RT-PCR.

Reacción 1		Reacción 2	
Componente	Volumen (μL)	Componente	Volumen (μL)
Random primers (3μg/μL)	1.0	Buffer (5x)	4.0
H ₂ O DEPC	5.5	DTT (0.1M)	2.0
RNA	5.0	RNase Out (40 U/ μL)	0.5
Total	11.5	dNTP (10mM)	1.0
		Enzima MMLV (200 U/ μL)	1.0
		Total	8.5

Las condiciones para la amplificación por PCR de NT3 fueron 95°C/5min, 40ciclos (95°C/55s, 64°C/45s, 72°C/30s) y 72°C/7min; y para GAPDH fueron 94°C/5min, 40ciclos (94°C/1min, 60°C/1min, 72°C/1min) y 72°C/5min. El volumen de cada reacción se detalla en la tabla 5 y se empleó la enzima GoTaq® Flexi (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Los productos de

PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1.5% y las bandas obtenidas se observaron en el Gel Doc (Gel Documentation System1000, BIORAD).

Por último, se realizó el análisis densitométrico de las bandas obtenidas con ayuda del programa ImageJ, se utilizó GAPDH para normalizar los datos.

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de GAPDH y NT3.

Iniciador	Secuencia	Tamaño del producto amplificado
GAPDH	Forward 5'-CCATCACCATCTTCCAGGAGCG-3'	470pb
	Reverse 5'-AAGGCCATGCCAGTGAGCTTC-3'	
NT3	Forward 5'-GAAACGCGATGTAAGGAAGC-3'	185pb
	Reverse 5'-TTTCTCGACAAGGCACACAC-3'	

Tabla 5. Reactivos empleados para la reacción de amplificación de GAPDH y NT3.

Componentes	Volumen (μL)	
	GAPDH	NT3
H ₂ O	2.9	3.0
Buffer (5x)	2.0	2.0
MgCl ₂ (25mM)	0.8	0.7
dNTP (10mM)	0.2	0.2
Iniciador Forward (5 μM)	1.0	1.0
Iniciador Reverse (5 μM)	1.0	1.0
GoTaq [®] Flexi (5U/ μL)	0.1	0.1
DNA(40 ng/ μL)	2.0	2.0
Total	10.0	10.0

4.7. Inmunocitoquímica y análisis morfométrico.

Las células bajo los diferentes tratamientos se lavaron con PBS, para posteriormente fijarlas con una solución de metanol/acetona (1:1) durante 10min a -20°C, después las células se volvieron a lavar con PBS, se dejó que se secaran y se almacenaron a 4°C hasta su utilización. Se emplearon los anticuerpos (Ac) dirigidos contra p75^{NTR} (US Biological), s100 (Dako, Carpinteria, CA, USA) y GFAP (Dako, Carpinteria, CA, USA), los cuales son marcadores de células de Schwann. Primero se estandarizó la dilución de cada uno de los Ac empleados sobre muestras de tejidos incluidas en parafina. Una vez seleccionado el tipo de tejido empleado como control de técnica y la dilución que se emplearía de cada uno de los Ac, se trabajó con las muestras, para ésto se empleó el sistema de detección EnVison[™] (Dako, Carpinteria, CA,

USA). Los controles de técnica fueron desparafinizados colocándolos a 90°C durante 15 min, para posteriormente hidratarlos gradualmente. Después se realizó la exposición de antígenos en solución recuperadora de antígenos (por sus siglas en inglés TRS, *Target Retrieval Solution*), en seguida tanto los controles de técnica como las muestras fueron colocados en TBST (*Tris-Buffered-Saline-Tween 20*) durante 5min, después se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% durante 10 min a 37°C, se hizo un lavado en TBST durante 5 min y después se colocó el Ac primario (s100 y GFAP se incubaron 45 min, mientras que p75^{NTR}, se incubó durante toda la noche, a 4°C), luego se lavaron con TBST y se agregó el Ac secundario conjugado con peroxidasa de rábano, donde se incubaron a 37°C/45 min, se volvieron a lavar con TBST y se agregó la 3-3'- diaminobenzidina (DAB) durante 10min. Por último, se retiró el DAB y se lavaron las muestras y los controles con agua destilada para después contrateñir con Hematoxilina de Gill, y después, deshidratar gradualmente con soluciones crecientes de etanol (70-100%) hasta llegar a xilol, para enseguida montar las laminillas con Entellan® (Merck, Darmstadt, Germany). Las laminillas se observaron en el *Sistema analizador de imágenes* (Microscopio Nikon 50i /Software NIS-elements BR 2.30).

Los ensayos se realizaron por triplicado, y para llevar a cabo el análisis morfométrico que permitiera cuantificar y comparar los resultados obtenidos, de cada repetición se tomaron 8 campos consecutivos y se determinó el porcentaje de células positivas respecto al número total de células. Por último, para el análisis estadístico se aplicó la prueba t de student, considerando como significativos los resultados que presentaron un valor de p<0.05.

CÁPITULO V

RESULTADOS

5.1. Caracterización de los vectores plasmídicos comerciales utilizados y construcción del vector pTracer-CMV2-NT3.

La construcción de vector de expresión pTracer-CMV2-NT3 se realizó a partir de los vectores comerciales pTracer-CMV2 y pCRBluntII-TOPO-NT3. Se caracterizó el plásmido pTracer-CMV2 con la enzima de restricción XhoI, obteniendo los fragmentos de restricción esperados (figura 6). También, se caracterizó el vector pCRBluntII-TOPO-NT3, con las enzimas de restricción EcoRV y NcoI (figura 7)

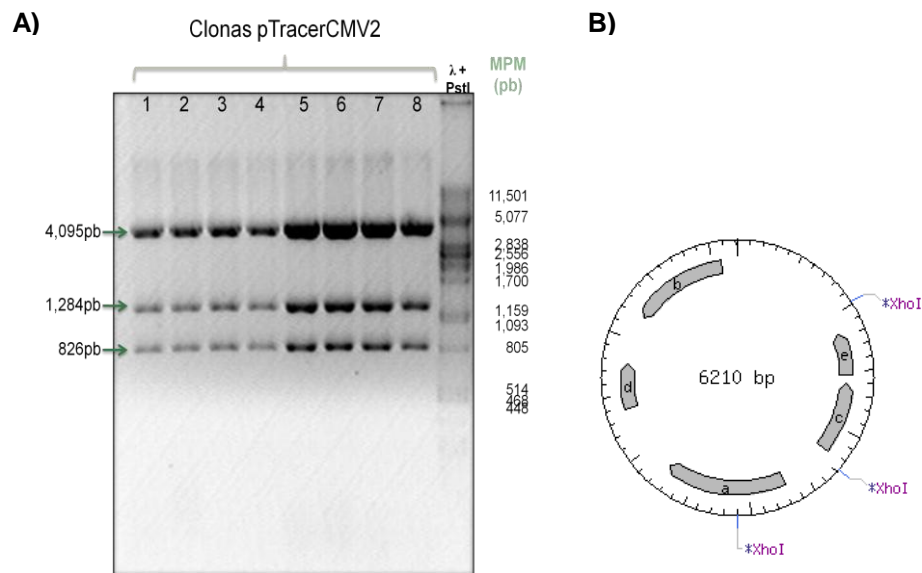


Figura 6. Caracterización del vector de expresión pTracer-CMV2. A) ADN plasmídico de las clonas, digerido con la enzima XhoI, obteniendo los fragmentos de 4,095pb, 1,284pb y 826pb. El marcador de peso molecular (MPM) empleado fue $\lambda+$ PstI. B) Esquema del plásmido mostrando los sitios de corte de la enzima XhoI.

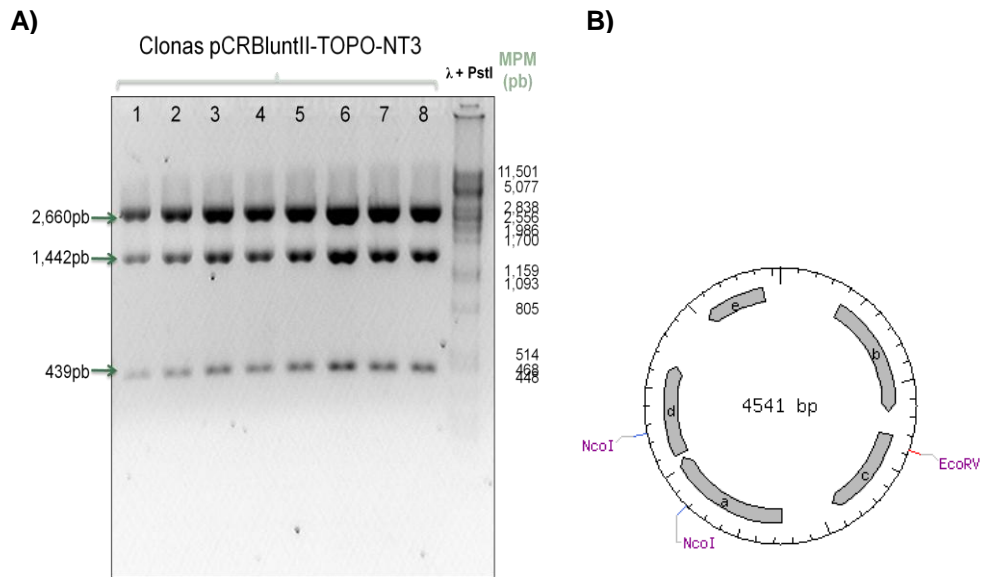


Figura 7. Caracterización del vector de expresión pCRBluntII-Topo-NT3. A) ADN plasmídico de las clonas, digerido con las enzimas NcoI y EcoRV, obteniendo los fragmentos de 4,095pb, 1,284pb y 826pb. El MPM empleado fue $\lambda+$ PstI. B) Esquema del plásmido mostrando los sitios de corte de las enzimas NcoI y EcoRV.

Una vez caracterizados los plásmidos anteriores, se seleccionó la clona 5 de cada uno de ellos, y se cortaron con las enzimas de restricción XbaI y KpnI, para linearizar el vector pTracer-CMV2 (obteniendo una banda de 6,140pb), y liberar del vector pCRBluntII-TOPO-NT3 el fragmento de 1,124pb que contiene el ADNc de NT3 (figura 8). Después, los fragmentos deseados se purificaron y ligaron. A partir de la reacción de ligación se transformaron células *E. coli* Top 10 calcio-competentes. De las clonas obtenidas se extrajo el ADN plasmídico y se caracterizaron con las enzimas NdeI y SphI.

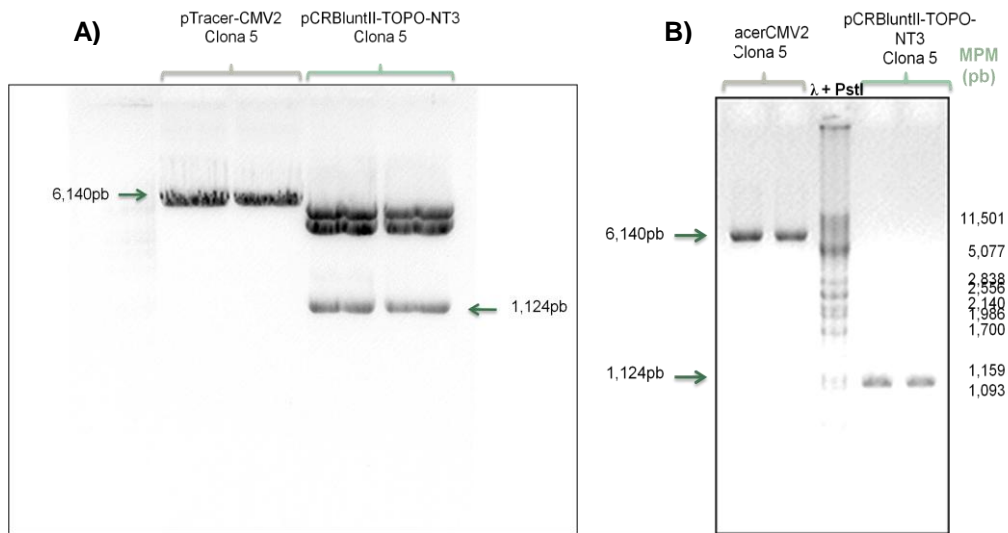


Figura 8. Linearización del vector pTracer-CMV2 y liberación del fragmento de 1,124pb correspondiente a NT3. A) Vectores pTracer-CMV2 y pCRBluntII-TOPO-NT3 cortados con las enzimas XbaI y KpnI. B) Bandas purificadas de 6,140pb y de 1,124pb correspondientes al pTracer-CMV2 y al NT3, respectivamente.

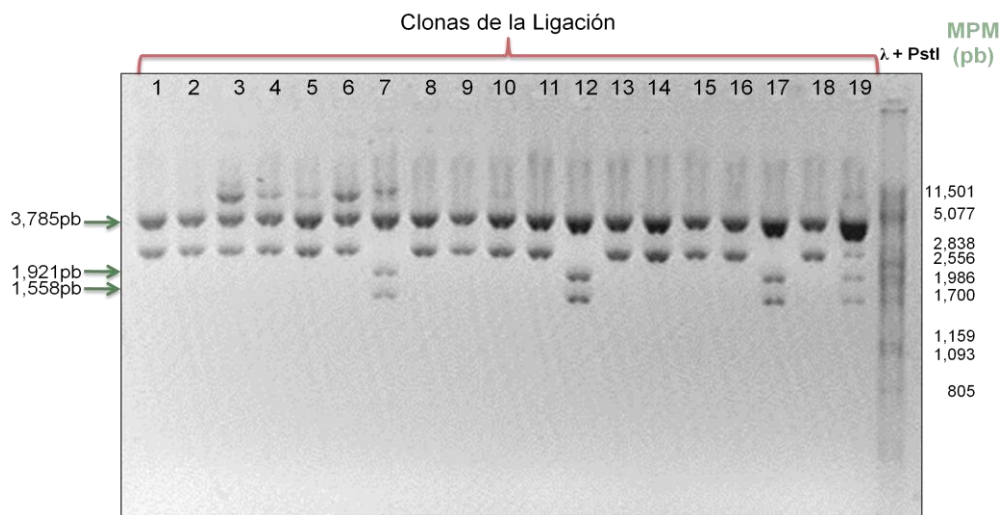


Figura 9. Caracterización de las clonas obtenidas de la reacción de ligación. ADN plasmídico de las clonas 1-19, digerido con la enzima NdeI y SphI, obteniendo los fragmentos de 3,785pb, 1,921pb y 1,558pb, que indican la adquisición del fragmento correspondiente al ADNc de NT3.

5.2. Estandarización de las condiciones de transfección y expresión de NT3 en las ASC transfectadas.

Para establecer cuanto del vector pTracer-CMV2-NT3 y de Lipofectamina™ 2000 se utilizarían en la transfección de las ASC, se probaron varias cantidades de cada uno, y se determinó el porcentaje de viabilidad y la eficiencia de transfección. En la figura 10, se puede observar que la relación de 2 µg de ADN plasmídico con 4 µL de Lipofectamina™ 2000, mostró una viabilidad del $77.83 \pm 5.53\%$, que de manera significativa fue más alto, comparado con las relaciones 2 µg: 6 µL y 4 µg: 12 µL de ADN plasmídico: Lipofectamina™ 2000. En cuanto a la eficiencia de transfección no se encontró una diferencia significativa para ninguna de las relaciones de ADN plasmídico: Lipofectamina™ 2000 que se utilizaron (todos los experimentos se realizaron por triplicado).

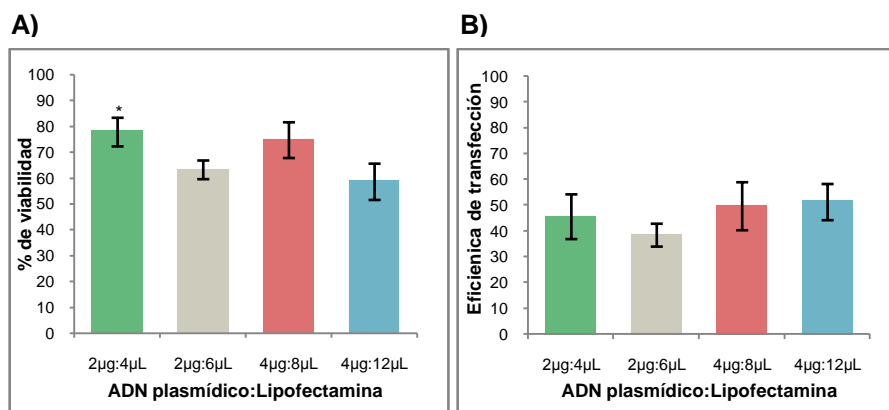


Figura 10. Representación gráfica del porcentaje de viabilidad y de la eficiencia de transfección. A) Porcentaje de viabilidad que se obtuvo bajo las diferentes relaciones de ADN plasmídico (µg):Lipofectamina™ 2000 (µL) que se utilizaron. B) Eficiencia de transfección bajo las mismas condiciones empleadas. * p<0.05

La eficiencia de transfección se determinó mediante el uso de la microscopía de fluorescencia con la que se observó la expresión del gen reportero de la GFP con el que cuenta el vector pTracer-CMV2-NT3 (figura 11).

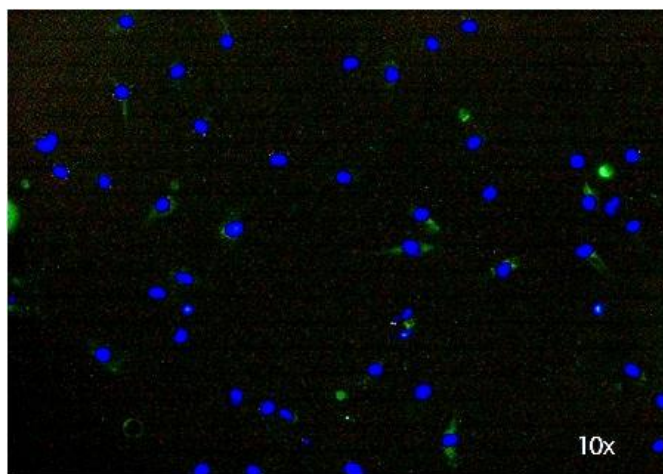


Figura 11. Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo transfectadas con el vector pTracer-CMV2-NT3 expresando GFP. Núcleos en azul teñidos con DAPI.

A partir del RNA extraído de ASC transfectadas con el vector pTracer-CMV2-NT3, se realizó la retrotranscripción y posteriormente la PCR para NT3 y GAPDH. En la figura 12, se puede observar que hubo una expresión muy similar del gen de la GAPDH, para todas las células. Para el caso de NT3, aunque las células sin transfectar muestran una expresión basal de la neurotrofina, de forma visual es evidente un incremento en la expresión de NT3 en las células transfectadas con el vector. En el análisis densitométrico de las bandas obtenidas, se determinó que en comparación con las células sin transfectar, hubo un incremento en la expresión de NT3 de 2.25 y de 2.10 veces en los días 2 y 8 posteriores a la transfección, respectivamente.

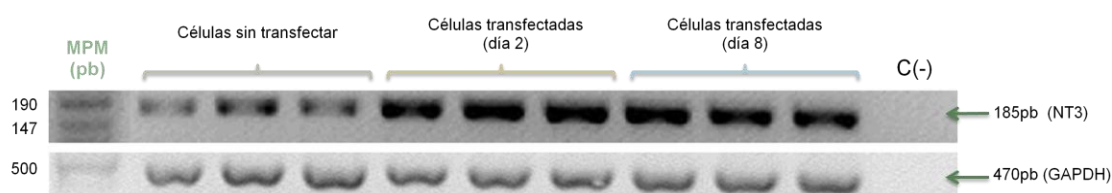


Figura 12. Detección de la expresión de NT3 (banda superior) y GAPDH (banda inferior) en las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo transfectadas y sin transfectar. El MPM empleado fue Puc+ Mspl.

5.3. Morfología y expresión de p75^{NTR}, s100 y GFAP en las ASC diferenciadas.

Los cultivos primarios obtenidos a partir del tejido adiposo mostraron morfología heterogénea y se tenían una gran cantidad de eritrocitos, los cuales con el lavado de los cultivos y los cambios de medios fueron eliminándose, dejando únicamente las células adheridas, las cuales en su mayoría presentaron una morfología fibroblastoide, aunque algunas otras células eran de mayor tamaño, expandidas y con un núcleo más grande (figura 13).

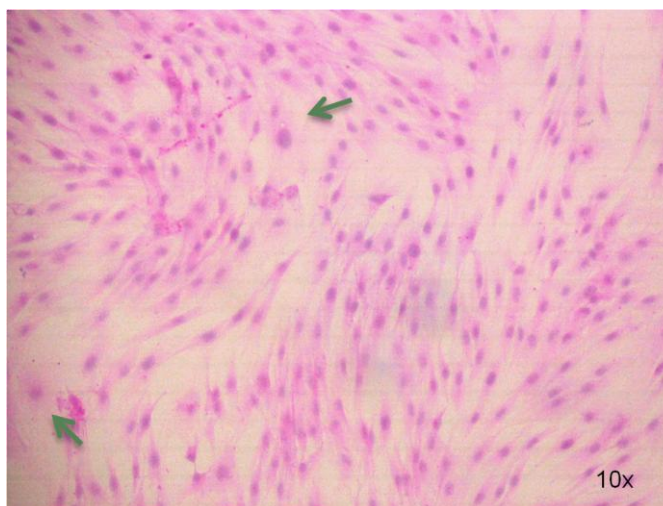


Figura 13. Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo no diferenciadas teñidas con hematoxilina-eosina. Las flechas señalan las células de gran tamaño y con un núcleo más grande.

Una parte de las ASC se diferenciaron al cultivarlas en medio de diferenciación; otras de ellas fueron transfectadas con el vector pTracer-CMV2-NT3, para que sobre-expresaran NT3; y por último, otro grupo de células fueron primero transfectadas con el vector, y posteriormente, se les adicionó el medio de diferenciación. Las células bajo cada uno de los diferentes tratamientos, se incubaron por 2 y 8 días, después fueron fijadas y se almacenaron hasta la realización de las ICQ, para observar la expresión de p75^{NTR}, s100 y GFAP, los cuales son marcadores de células de Schwann. Por último, se realizó el análisis cuantitativo de expresión de cada uno de los marcadores.

Las células bajo los diferentes tratamientos de diferenciación mostraron cambios en su morfología. Las células que fueron transfectadas en general fueron más grandes con un citoplasma más extenso. Por otro lado, las células cultivadas en medio de diferenciación (sin transfectar y transfectadas), en su mayoría mostraron una forma ahusada y con largas prolongaciones de la membrana; en cuanto al tamaño, éste fue variado, puesto que se observó la presencia de célula grandes, pero también se identificaron células muy pequeñas con escaso citoplasma y la mayoría de las veces se encontraron en parejas (figura 14).

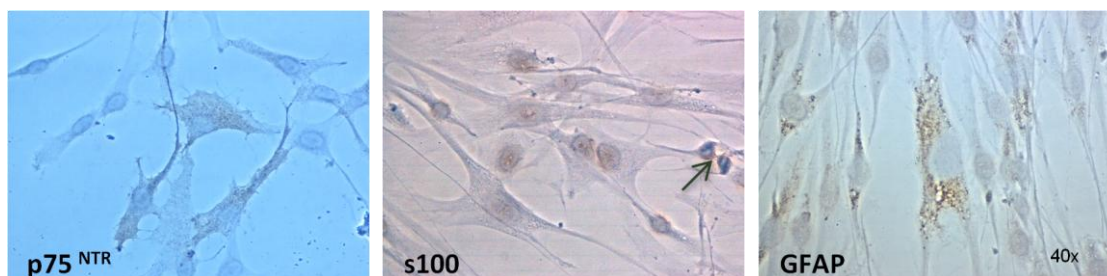


Figura 14. Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano diferenciadas a células de Schwann al cultivarlas en medio de diferenciación. ASC diferenciadas teñidas por inmunocitoquímica para tres de los marcadores de células de Schwann: p75^{NTR}, s100 y GFAP. Las células de menor tamaño con escaso citoplasma y en pares están señaladas con una flecha.

En las figuras 15-17, aparecen las imágenes de ICQ de las ASC, bajo los distintos tratamientos de diferenciación, para cada uno de los Ac utilizados; y en las figuras 18-19, se muestran las gráficas de los valores cuantitativos obtenidos una vez realizado el análisis morfométrico de las imágenes de ICQ.

La figura 15, muestra que hubo positividad de p75^{NTR} en las células bajo cada uno de los tratamientos empleados, sin embargo, se puede apreciar visualmente, que en las células con el tratamiento combinado en el día 8, hay un mayor número de células positivas.

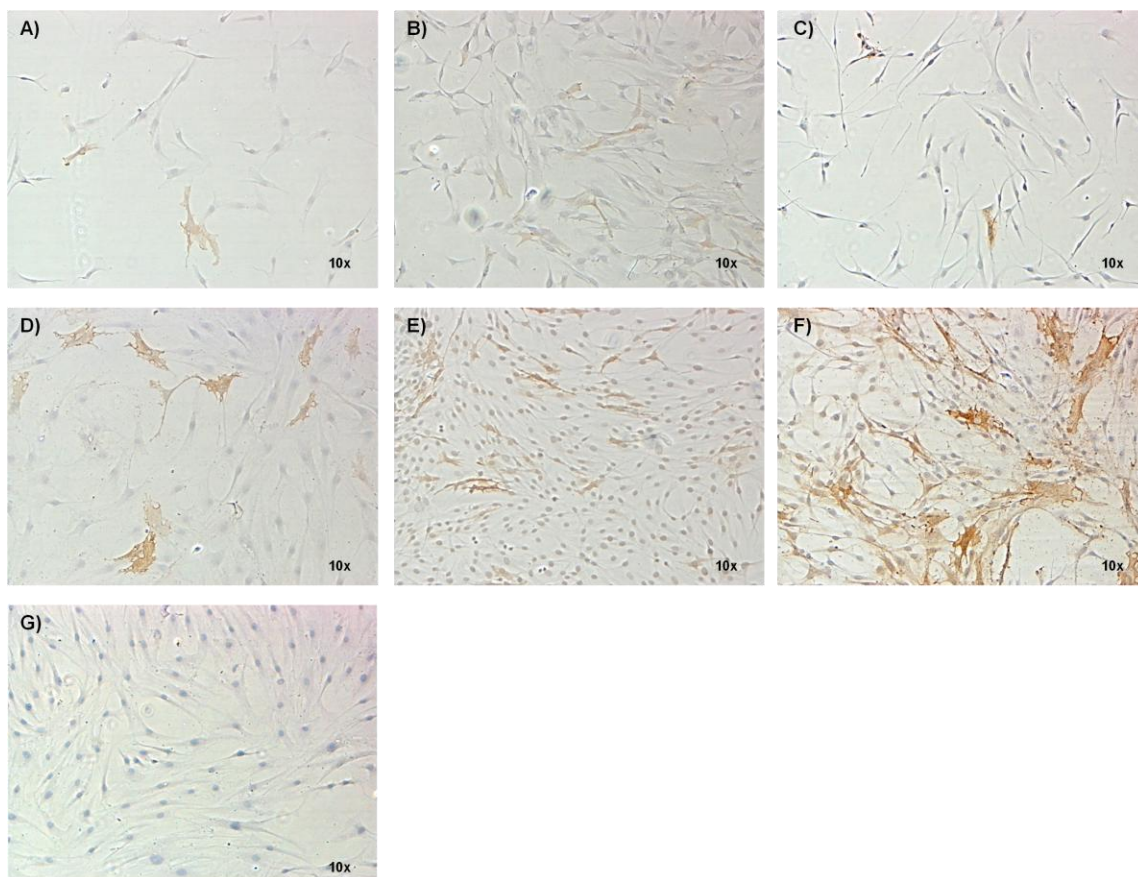


Figura 15. Detección de la expresión de p75^{NTR} mediante inmunocitoquímica en células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo diferenciadas (dASC) a células de Schwann. A) y D) dACS transfectadas que sobre-expresaban NT3, a los 2 y 8 días, respectivamente. B) y E) dASC en medio de diferenciación transfectadas, a los 2 y 8 días, respectivamente. C) y F) dACS transfectadas que sobre-expresaban NT3 y en medio de diferenciación, a los 2 y 8 días, respectivamente. G) ASC sin tratar a los 8 días.

En la figura 16, se muestran las imágenes de ICQ para s100, en las cuales se puede apreciar el incremento del porcentaje de células positivas en las ASC que fueron transfectadas, ya sea que posteriormente se les hayan cultivado o no en el medio de diferenciación. Además, se puede observar el cambio en la morfología de las células únicamente transfectadas, puesto que al principio (día 2) las células se encuentran más ahusadas, y para el día 8, se aprecia como el citoplasma se extendió pareciendo las células de un mayor tamaño.

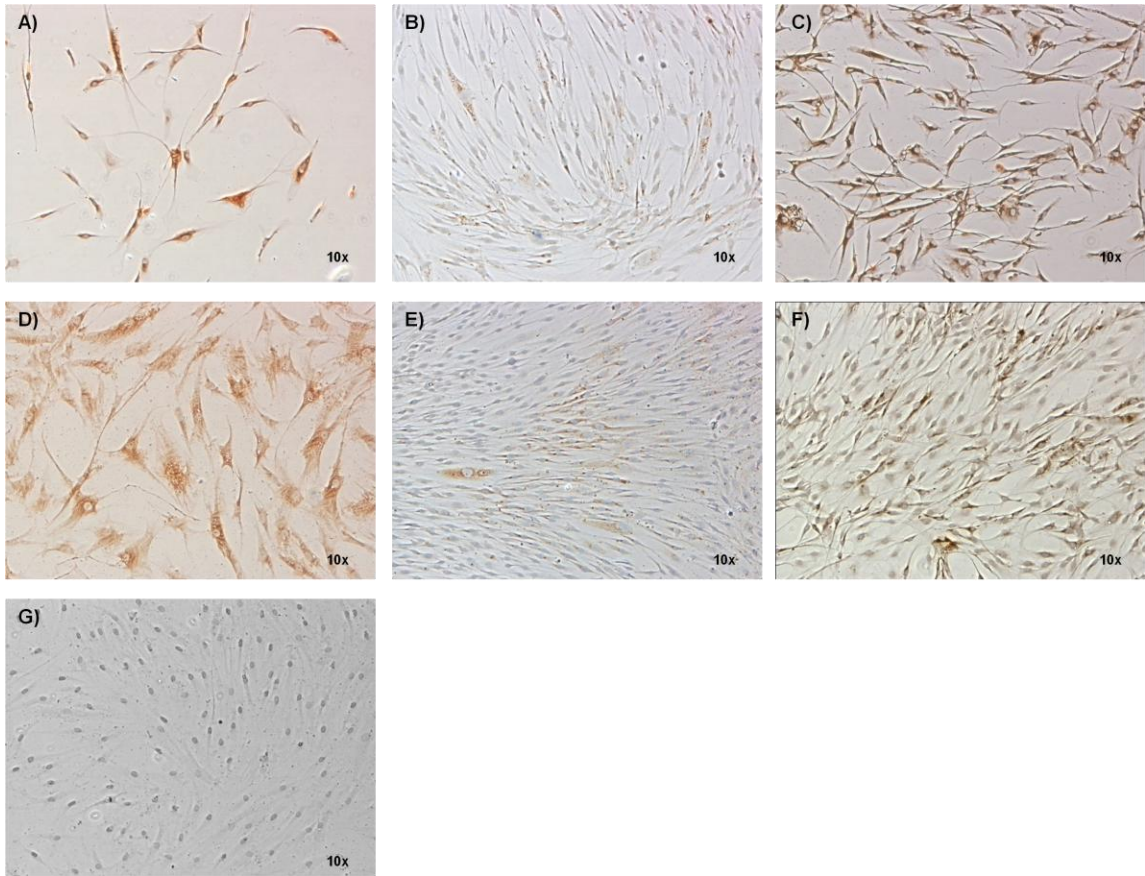


Figura 16. Detección de la expresión de s100 mediante inmunocitoquímica en células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo diferenciadas (dASC) a células de Schwann. A) y D) dACS transfectadas que sobre-expresaban NT3, a los 2 y 8 días, respectivamente. B) y E) dASC en medio de diferenciación transfectadas, a los 2 y 8 días, respectivamente. C) y F) dACS transfectadas que sobre-expresaban NT3 y en medio de diferenciación, a los 2 y 8 días, respectivamente. G) ASC sin tratar a los 8 días.

En la figura 17, se puede apreciar que casi todas las células cultivadas en medio de diferenciación (en ambos tiempos) tuvieron positividad para GFAP, observándose lo contrario para los otros dos tratamientos.

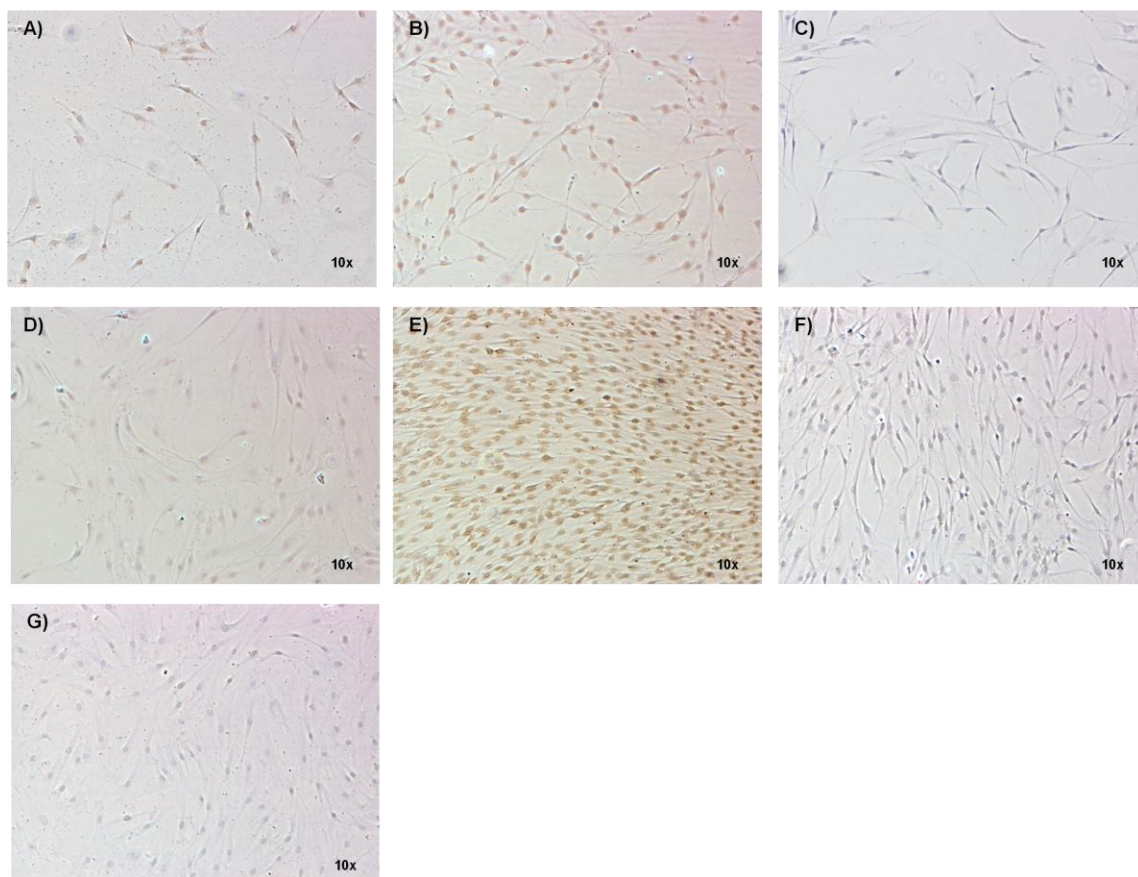


Figura 17. Detección de la expresión de GFAP mediante inmunocitoquímica en células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo diferenciadas (dASC) a células de Schwann. A) y D) dACS transfectadas que sobre-expresaban NT3, a los 2 y 8 días, respectivamente. B) y E) dASC en medio de diferenciación transfectadas, a los 2 y 8 días, respectivamente. C) y F) dACS transfectadas que sobre-expresaban NT3 y en medio de diferenciación, a los 2 y 8 días, respectivamente. G) ASC sin tratar a los 8 días.

Los resultados cuantitativos para el día 2 se muestran en la figura 18, en la cual se puede ver que la expresión de $p75^{NTR}$, no tuvo una variación significativa en ninguno de los tratamientos utilizados. En el caso de s100, las células cultivadas en medio de diferenciación mostraron un $25.10 \pm 5.57\%$ de células positivas para el marcador, este porcentaje se incrementó de manera significativa tanto en las células transfectadas como en las células transfectadas y cultivadas en medio de diferenciación, presentando valores de $97.08 \pm 1.84\%$ y de 100% , respectivamente

Por otro lado, al comparar la expresión de GFAP en las células cultivadas en medio de diferenciación con las células transfectadas, estas últimas mostraron una disminución significativa en el porcentaje de células positivas al presentar un $84.98 \pm 3.21\%$, respecto a las primeras que tuvieron un $97.75 \pm 1.15\%$; además, las células transfectadas y cultivadas en medio de diferenciación al presentar un $0.83 \pm 0.38\%$, también mostró una disminución significativa respecto a los otros dos tratamientos.

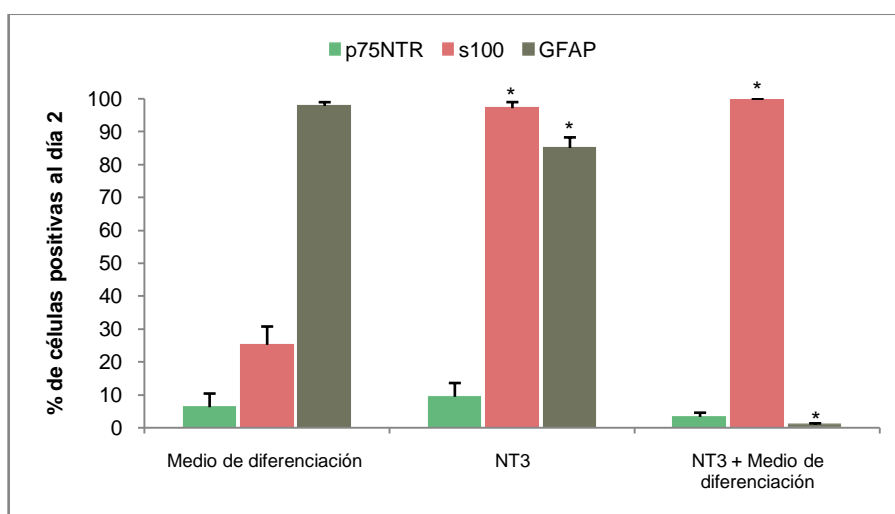


Figura 18. Representación gráfica del porcentaje de células positivas para los marcadores p75^{NTR}, s100 y GFAP, al día 2 de incubación. * p<0.05

En la figura 19, se muestran de manera gráfica los resultados cuantitativos para el día 8, en esta se puede apreciar como las células transfectadas y posteriormente cultivadas en medio de diferenciación, al presentar un $21.69 \pm 1.29\%$ de células positivas para el marcador p75^{NTR}, presentaron un incremento significativo, en comparación con las células bajo los otros dos tratamientos. Por otro lado, las células cultivadas con el tratamiento combinado, presentaron un $65.14 \pm 1.99\%$ de células positivas para el marcador s100, valor que fue significativamente mayor al que se encontró en las células cultivadas en medio de diferenciación, siendo éste de $16.25 \pm 3.04\%$; en el caso de las células transfectadas se observó un incremento significativo en

comparación con los otros dos tratamientos, ya que mostraron un 100% de células positivas. Por último, se encontró un descenso significativo en el porcentaje de células positivas para el marcador GFAP en las células transfectadas tanto en las cultivadas como en las no cultivadas en medio de diferenciación, al presentar un $3.14 \pm 0.49\%$ y un $2.99 \pm 0.73\%$, respectivamente, en comparación con el $99.79 \pm 0.05\%$ que mostraron las células cultivadas en medio de diferenciación (figura 19).

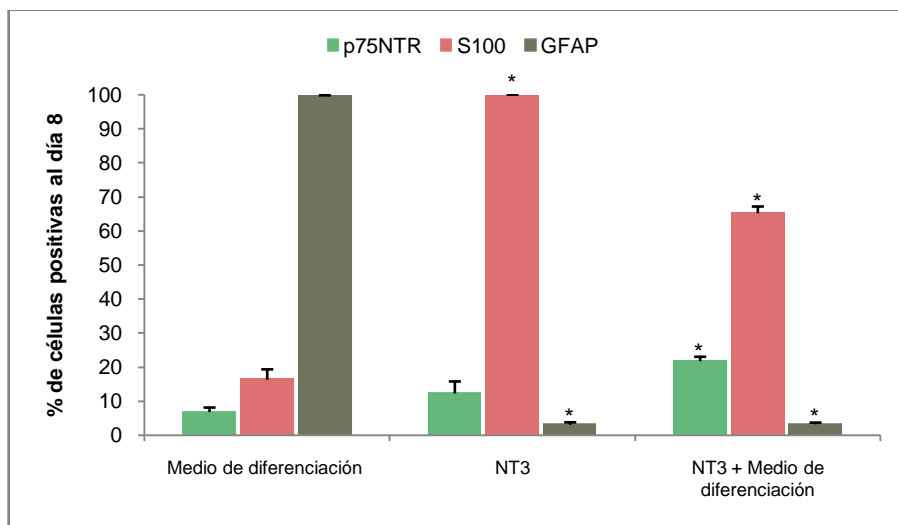


Figura 19. Representación gráfica del porcentaje de células positivas para los marcadores p75^{NTR}, s100 y GFAP, al día 8 de incubación. * p<0.05

CÁPITULO VI

DISCUSIÓN

Desde hace tiempo se conoce el potencial que tienen las ASC para su uso en la terapia celular, debido a las ventajas que presentan sobre otros tipos celulares, como por ejemplo que no representan ningún problema ético y/o legal, su fácil aislamiento y expansión *in vitro*, y que se pueden diferenciar a varios linajes celulares, dentro de los cuales se encuentran las células de Schwann.

En el 2001, Dezawa y colaboradores, desarrollaron un protocolo para diferenciar las MSC de rata en células de Schwann, en el cual utilizaron distintos factores de diferenciación adicionados al medio e incubaron las células durante 7 días. Si bien ellos no mostraron datos cuantitativos, reportaron que casi todas las células diferenciadas expresaron p75^{NTR} y s100, mientras que GFAP solo se expresó en algunas de las células [49]. Después, Jiang y colaboradores (2008), analizaron la expresión de GFAP y s100 en las ASC de rata diferenciadas a células de Schwann a los 2, 5 y 8 días, y encontraron que los porcentajes de células positivas más altos fueron al día 5, siendo estos de 78% y 72% para s100 y GFAP, respectivamente, disminuyendo estos valores para el día 8 a 61% y 59%, respectivamente [34]. A pesar del descenso en el porcentaje de células positivas para los marcadores que ellos utilizaron, también se pudo observar que los valores entre un marcador y otro, fueron muy cercanos, lo cual difiere a lo reportado por Dezawa y colaboradores. Como en ambos trabajos utilizaron el mismo protocolo de diferenciación, las diferencias encontradas se pueden deber principalmente al tipo de tejido del cual se extrajeron las células mesenquimales, ya que en el primero las células se obtuvieron de médula ósea, mientras que en el segundo se aislaron de tejido adiposo. Ya anteriormente se ha reportado que la capacidad de diferenciación en las células mesenquimales varía de acuerdo al tejido del cual se hayan extraído [32].

Otros de los investigadores que también diferenciaron ASC de rata fueron Kingham y colaboradores (2007), pero ellos sustituyeron la heregulina, uno de los factores empleados por

Dezawa, por el factor de crecimiento glial- 2 (por sus siglas en ingles: GGF-2, *Glial Growth Factor-2*), y reportaron que alrededor del 50% de las células diferenciadas expresaron GFAP y s100, mientras que para p75^{NTR} aproximadamente el 40% de las células fueron positivas, esto después dos semanas con el medio de diferenciación [40], siendo estos resultados más parecidos a los publicados por Jiang y colaboradores (2008) [34].

Brohlin y colaboradores (2009), publicaron el único reporte que hay hasta ahora en el que han diferenciado MSC de humano a células de Schwann, por lo que se convierten en el referente más cercano a este trabajo, aunque ellos emplearon células mesenquimales de médula ósea. Ellos reportaron que el 80% de las células expresaron los marcadores s100 y p75^{NTR}. Por otro lado, nosotros encontramos que el 6%, un 16% y un 99% de positividad en las células cultivadas en medio de diferenciación, para p75^{NTR}, s100 y GFAP, respectivamente, cuando utilizamos el procedimiento de diferenciación únicamente agregando factores de crecimiento. Estas diferencias podrían deberse a la fuente de MSC empleadas ya que ellos las obtuvieron de médula ósea y nosotros de tejido adiposo.

Por otro lado, tampoco antes se habían transfectado ASC para que sobre-expresaran NT3, para luego someterlas al proceso de diferenciación con el medio suplementado con los factores de crecimiento. En la transfección se obtuvo una eficiencia que varió de entre un 38% a un 51% (figura 10), si bien existen líneas celulares, como la HEK 293, en la cual se ha reportado eficiencia de transfección (utilizando LipofectaminaTM 2000) por encima del 90% [50], hay que tomar en cuenta que, dicha eficiencia depende en gran medida de la línea celular, además, de las propiedades del ADN y del agente de transfección con la que se esté trabajando. La eficiencia de transfección obtenida en este trabajo fue de 58% lo cual puede considerarse un porcentaje bastante bueno para esta tipo de células, puesto que Madeira y colaboradores en el 2010, reportaron una eficiencia de transfección de un 35% en MSC de humano utilizando también LipofectaminaTM 2000 [51].

En cuanto al efecto que tuvo la sobre-expresión de NT3, en la diferenciación de las ASC, el marcador que menos variación mostró entre los distintos tratamientos y los tiempos con los que

se trabajó fue p75^{NTR}, ya que sólo se observó un incremento significativo en las células que fueron tanto transfectadas, como cultivadas en medio de diferenciación al día 8, mostrando un 21% de células positivas.

Por otro lado, fue evidente en el caso del s100 de que hubo un incremento significativo del número de células positivas en las células que sobre-expresaban NT3, independientemente de que después se hayan cultivado en presencia o ausencia de los factores de diferenciación, esto en comparación con las células únicamente cultivadas en presencia de ellos. Sin embargo, en las células que fueron recibieron el tratamiento combinado, hubo un 100% de células positivas para el día 2 para el marcador s100, las cuales disminuyeron al 65% para el día 8. Lo anterior se pudo deber a que tal vez quedaron algunas células sin diferenciar las cuales comenzaron a dividirse más rápido que las ya diferenciadas. Para el marcador GFAP se observó lo contrario que para s100, puesto que las células que sobre-expresaron NT3, hayan sido o no cultivadas en medio de diferenciación, mostraron una disminución significativa en comparación con las células únicamente cultivadas en medio de diferenciación. La disminución tan marcada de la expresión de GFAP, en las células que sobre-expresaron NT3, puede deberse a que tanto este marcador como p75^{NTR}, son proteínas que se expresan únicamente en las células de Schwann inmaduras y no mielinizantes, y se sabe que GFAP disminuye en las células de Schwann mielinizantes [38]; en lo que respecta a s100, este marcador se expresa en todos los linajes de las células de Schwann. Por lo anterior, se podría sugerir que en la diferenciación de las ASC de humano a células de Schwann, la sobre-expresión de NT3 incrementa el número de células mielinizantes, no obstante es necesario realizar experimento que ayuden a comprobar y confirmar lo anterior.

CÁPITULO VI

CONCLUSIONES

1. Se logró la diferenciación ASC de humano a células de Schwann.
2. Se observó que la sola sobre-expresión de NT3 en las ASC tuvo un efecto un en la expresión de los marcadores de células de Schwann cultivadas en las dos condiciones ensayadas, es decir suplementando el medio o no con los factores de crecimiento utilizados por Desawa y colaboradores.
3. Los mejores resultados se observaron en el tratamiento combinado de transfección con el ADNc de la neurotrofina 3, más la adición de los factores de crecimiento.

CÁPITULO VIII

BIBLIOGRAFÍA.

1. van den Berg ME, Castellote JM, Mahillo-Fernandez I, de Pedro-Cuesta J (2010) Incidence of spinal cord injury worldwide: a systematic review. *Neuroepidemiology* 34: 184-192; .
2. Centro Nacional de Rehabilitación (2009) Lesión medular. Discapacinet. Fecha de consulta: Agosto 3, 2010, de <http://discapacinet.gob.mx/discapacidades-prevencion-y-rehabilitacion/discapacinet/salud-y-seguridad-social/discapacidades-prevencion-y-rehabilitacion/lesion-medular.html>.
3. Nandoe Tewarie RS, Hurtado A, Bartels RH, Grotenhuis A, Oudega M (2009) Stem cell-based therapies for spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 32: 105-114.
4. Jiménez-Castellanos JB, Catalina CJH, Carmona AB (2002) Neuroanatomía. Anatomía Humana General: Universidad de Sevilla. pp. 161-164.
5. Thuret S, Moon LD, Gage FH (2006) Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 7: 628-643.
6. Rodríguez A (2004) Lesión de la médula espinal: mecanismos del daño medular. Boletín del Departamento de Docencia e Investigación IREP. pp. 69-73.
7. Ronaghi M, Erceg S, Moreno-Manzano V, Stojkovic M (2010) Challenges of stem cell therapy for spinal cord injury: human embryonic stem cells, endogenous neural stem cells, or induced pluripotent stem cells? *Stem Cells* 28: 93-99.
8. Estrada MS, Carreon RA, Parra CM, Ibarra PC, Velasquillo MC, Vacani AC, Belkind GJ (2007) Lesión de médula espinal y medicina regenerativa. *Salud Publica Mex* 49: 437-444.
9. Kwon BK, Borisoff JF, Tetzlaff W (2002) Molecular targets for therapeutic intervention after spinal cord injury. *Mol Interv* 2: 244-258.
10. Willerth SM, Sakiyama-Elbert SE (2008) Cell therapy for spinal cord regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 263-276.

11. Wang M, Han Y, Zhang XP, Lu YP (2006) Nogo, a star protein in reticulon family. *Neurosci Bull* 22: 183-186.
12. Apostolova I, Irintchev A, Schachner M (2006) Tenascin-R restricts posttraumatic remodeling of motoneuron innervation and functional recovery after spinal cord injury in adult mice. *J Neurosci* 26: 7849-7859.
13. Sanberg CD, Sanberg PR, editors (2006) *Cell Therapy, Stem Cells and Brain Repair*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. 391 p.
14. Fabres C (2010) Técnicas del futuro: ingeniería de tejidos y uso de células madre en medicina reproductiva. *REV MED CLIN CONDES* 21 488 - 493.
15. Bunnell BA, Flaatt M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C (2008) Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 45: 115-120.
16. Rosenfeld JV, Bandopadhyay P, Goldschlager T, Brown DJ (2008) The Ethics of the Treatment of Spinal Cord Injury: Stem Cell Transplants, Motor Neuroprosthetics, and Social Equity. *Top Spinal Cord Inj Rehabil* 14: 76-88.
17. Liu S, Qu Y, Stewart TJ, Howard MJ, Chakraborty S, Holekamp TF, McDonald JW (2000) Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6126-6131.
18. Wei L, Cui L, Snider BJ, Rivkin M, Yu SS, Lee CS, Adams LD, Gottlieb DI, Johnson EM, Yu SP, Choi DW. (2005) Transplantation of embryonic stem cells overexpressing Bcl-2 promotes functional recovery after transient cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 19: 183-193.
19. Cui L, Jiang J, Wei L, Zhou X, Fraser JL, Snidu SP (2008) Transplantation of embryonic stem cells improves nerve repair and functional recovery after severe sciatic nerve axotomy in rats. *Stem Cells* 26: 1356-1365.
20. Pawitan JA (2009) Prospect of Adipose Tissue Derived Mesenchymal stem cells in Regenerative Medicine. *Cell & Tissue Transplantation & Therapy* 7-9.

21. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL (2000) Direct isolation of human central nervous system stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 14720-14725.
22. Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, Salazar DL, Hooshmand M, Summers R, Gage FH, Anderson AJ (2005) Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 14069-14074.
23. Wolfe M, Pochampally R, Swaney W, Reger RL (2008) Isolation and Culture of Bone Marrow-Derived Human Multipotent Stromal Cells (hMSCs). In: Prockop DJ, Phinney DG, Bunnell BA, editors. Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols. New Jersey: Humana Press. pp. 3-26.
24. Caplan AI (2007) Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. J Cell Physiol 213: 341-347.
25. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB (2000) Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J Neurosci Res 61: 364-370.
26. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, Olson L stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 2199-2204.
27. Wu S, Suzuki Y, Ejiri Y, Noda T, Bai H, Kitada M, Kataoka K, Ohta M, Chou M, Ide C (2003) Bone marrow stromal cells enhance differentiation of cocultured neurosphere cells and promote regeneration of injured spinal cord. J Neurosci Res 72: 343-351.
28. Kim HJ, Lee JH, Kim SH (2010) Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells on traumatic brain injury in rats: secretion of neurotrophic factors and inhibition of apoptosis. J Neurotrauma 27: 131-138.
29. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J (2007) Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Stem Cells 25: 2739-2749.

30. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH (2005) Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54: 132-141.
31. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279-4295.
32. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I (2007) Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 327: 449-462.
33. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE (2002) Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 371-379.
34. Jiang L, Zhu JK, Liu XL, Xiang P, Hu J, Yu WH (2008) Differentiation of rat adipose tissue-derived stem cells into Schwann-like cells *in vitro*. *Neuroreport* 19: 1015-1019.
35. Kang SK, Lee DH, Bae YC, Kim HK, Baik SY, Jung JS (2003) Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp Neurol* 183: 355-366.
36. Armati P, editor (2007) *The Biology of Schwann Cells. Development, Differentiation and Immunomodulation*. New York: CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS. 249 p.
37. Guo JS, Zeng YS, Li HB, Huang WL, Liu RY, Li XB, Ding Y, Wu LZ, Cai DZ (2007) Cotransplant of neural stem cells and NT-3 gene modified Schwann cells promote the recovery of transected spinal cord injury. *Spinal Cord* 45: 15-24.
38. Mirsky R, Jessen KR (2007) Early events in Schwann cell development. In: Armati P, editor. *The Biology of Schwann Cells Development, Differentiation and Immunomodulation*. New York: Cambridge University Press. pp. 13-36.
39. Lin W, Chen X, Wang X, Liu J, Gu X (2008) Adult rat bone marrow stromal cells differentiate into Schwann cell-like cells *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 44: 31-40.

40. Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, Wiberg M, Terenghi G (2007) Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol* 207: 267-274.
41. Selzer ME, Cohen LP, Clarke S, Duncan PW, Gage FH (2006) Textbook of neural repair and rehabilitation. Cambridge ; New York: Cambridge University Press. 725 p.
42. Chao MV (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4: 299-309.
43. Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72: 609-642.
44. R&D Systems I NT-3. Fecha de consulta: Agosto 03, 2010, de http://www.rndsystems.com/molecule_detail.aspx?m=1920.
45. Chao MV, Rajagopal R, Lee FS (2006) Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci (Lond)* 110: 167-173.
46. Li ZY, Fan JH, Yuan JM (2002) Single-column purification of recombinant human neurotrophin-3 (hNT3) by using the intein mediated self-cleaving system. *Biotechnology Letters* 24 1723–1727.
47. Willerth SM, Sakiyama-Elbert SE (2009) Kinetic analysis of neurotrophin-3-mediated differentiation of embryonic stem cells into neurons. *Tissue Eng Part A* 15: 307-318.
48. Fraser JK, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z (2008) Adipose-Derived Stem Cells. In: Prockop DJ, Phinney DG, Bunnell BA, editors. *Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols*. New Jersey: Humana Press. pp. 59-68.
49. Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H (2001) Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci* 14: 1771-1776.
50. Maurisse R, De Semir D, Emamekhoo H, Bedayat B, Abdolmohammadi A, Parsi H, Gruenert DC (2010) Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages. *BMC Biotechnol* 10: 9.

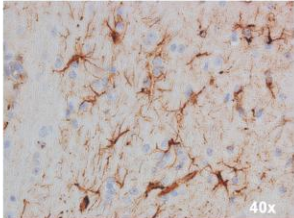
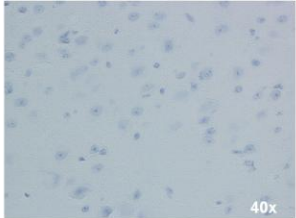
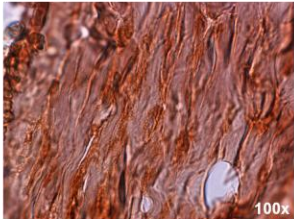
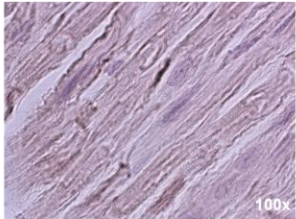
51. Madeira C, Mendes RD, Ribeiro SC, Boura JS, Aires-Barros MR, da Silva CL, Cabral JM (2010) Nonviral gene delivery to mesenchymal stem cells using cationic liposomes for gene and cell therapy. J Biomed Biotechnol 2010: 735349.

CÁPITULO IX

ANEXOS

9.1. Controles de técnicas utilizados en las inmunotinciones.

Tabla 6. Controles de técnicas utilizados para cada uno de los Anticuerpos empleados en las inmunocitoquímicas.

Ac dirigido contra	Control de técnica utilizado	Dilución utilizada	Imagen	
			Control (+)	Control (-)
GFAP	Corte de cerebro (ratón)	1:50 (Dako)		
p75 ^{NTR}	Corte de nervio periférico (humano)	1:250 (USbiological)		
s100	Corte de nervio periférico (humano)	1:1500 (Dako)	