

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

TRABAJO DE TESIS

“Diferenciación de oligodendrocitos a partir de células madre neurales, como una estrategia *in vitro* para la comprensión del sistema nervioso”

Por: José A. Thomas

DIRECTORES DE TESIS:

Diego Reginensi

Tesis presentada como uno de los requisitos para optar al grado de Maestro en Ciencias Biológicas Orientada a la Biología Molecular

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2022

Profesor(a) del Departamento de
en la Universidad de Panamá.

CERTIFICA QUE: José Antonio Thomas Argüelles. Ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis de Maestría, con el título:

“Diferenciación de oligodendrocitos a partir de células madre neurales, como una estrategia *in vitro* para la comprensión del sistema nervioso”

Revisado este trabajo, autorizan su presentación para ser juzgado y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Panamá el ____ de _____

RESUMEN

Las enfermedades desmielinizantes constituyen un grupo de afecciones de etiología autoinmune dirigida contra la mielina del sistema nervioso central y que involucra su pérdida progresiva en el tiempo. La mielinización en el sistema nervioso central es el proceso por el cual los oligodendrocitos forman vainas de mielina alrededor de los axones de las neuronas permitiendo que las neuronas transmitan información de manera más rápida y eficiente y permite funciones cerebrales más complejas. En nuestro proyecto titulado: "Diferenciación de oligodendrocitos a partir de células madre neurales, como una estrategia *in vitro* para la comprensión del sistema nervioso". El objetivo general de la investigación fue el desarrollar un sistema *in vitro* capaz de estudiar los procesos de mielinización, a partir de células madre, mediante la utilización de estrategias interdisciplinarias, novedosas y de punta del área de biotecnología médica.

ABSTRACT

Demyelinating diseases constitute a group of conditions of autoimmune etiology directed against the myelin of the central nervous system and which involves its progressive loss over time. Myelination in the central nervous system is the process by which oligodendrocytes form myelin sheaths around the axons of neurons allowing neurons to transmit information more quickly and efficiently and enabling more complex brain functions. In our project entitled: "Differentiation of oligodendrocytes from neural stem cells, as an *in vitro* strategy for understanding the nervous system." The general objective of the research was to develop an *in vitro* system capable of studying myelination processes, from stem cells, through the use of interdisciplinary, innovative and cutting-edge strategies in the area of medical biotechnology.

Agradecimientos.

En primer lugar, me gustaría agradecer a la secretaria nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT), Este proyecto de tesis de maestría no hubiese sido posible sin el apoyo económico a los programas de Maestría y la adjudicación de fondos de investigación de a través de la Convocatoria Nuevos Investigadores. A la Universidad de Panamá, que, a través de sus profesores y administrativos, me han brindado todo el apoyo en mi formación académica, dando gracias en especial a el Profesor Jordi Querol-Audi. A mi asesor Diego Reginensi. A los colegas del Laboratorio de Bionanomateriales, en particular a la biotecnóloga Andrea Revete, Andrea Burillo y a Sebastián Valerio por su excelente orientación en el mundo del cultivo de células; por todos los consejos y ayuda que recibí en el laboratorio durante el proceso de formación.

Agradezco a mi amigo Alberto Bethancourt, a la profesora Nidia Sandoval y Nivia Ríos por sus consejos, motivaciones y por su apoyo en momentos difíciles. Muchas gracias a mi madre Esther Argüelles de Thomas por siempre apoyarme en estos viajes de superación, a mis hermanas por siempre estar al pendiente de mí. Finalmente, me gustaría agradecer a la futura PhD Abigail Esther De Ávila y a mis hijas Šucy y Fher, por ser mi constante apoyo durante la realización de la Tesis de Maestría y por ser pilares importante en mi vida.

Contenido

RESUMEN	3
Agradecimientos	4
ANTECEDENTES.....	6
1. Terapia celular, basada en células madre	6
2. En búsqueda de la comprensión de las enfermedades desmielinizantes.	8
3. Objetivos del proyecto.....	8
4. Justificación	9
MARCO TEÓRICO	14
1. Células madre	15
1.1 Células Madre Embrionarias.....	19
1.2 Células Madre Adultas	20
1.3 Auto-regeneración	22
1.4 Plasticidad celular	24
1.5 Potencialidad	25
2. El sistema nervioso.....	28
2.1 Formación y desarrollo temprano.....	30
2.2 Regulación de la neurogénesis embrionaria.....	31
2.3 Neurogénesis en la corteza cerebral	33
2.4 Diferenciación de células madre a oligodendrocitos	34
3. Complejidad del daño neuronal	35
3.1 Las enfermedades desmielinizantes, un problema sin resolver en biomedicina	36
METODOLOGÍA	44
1.1 Protocolo de cultivo de célula madre neuronales	46
1.2 Preparación de la matriz	49
1.3 Sembrado y Diferenciación de NSC	52
RESULTADOS	55
1. Establecimiento de Cultivos de células madre neuronales.	56
2. Diferenciación de Neuroprogenitores a Oligodendrocitos	58
DISCUSIÓN	59
1. Cultivos celulares.....	61
1.1 Cultivo y expansión de NPSC	62
1.2 Diferenciación neuronal de NPSC utilizando factores de diferenciación y maduración neuronal	64
2. Expresión Proteica.....	65
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

ANTECEDENTES

1. Terapia celular, basada en células madre.

Las células madre, son las células del cuerpo con una capacidad excepcional para autorrenovarse (Singh et al., 2016) y programarse (Betschinger, 2017), para un compromiso de múltiples linajes (diferenciación celular). Según su origen pueden ser, embrionarias (Rivron et al., 2018)(Rivron et al., 2018) o adultas en el cuerpo humano o podemos clasificarla según a su nivel de potencia basándonos en la capacidad para dar origen a diferentes tipos celulares con fenotipos especializados (p.e totipotentes, pluripotentes, unipotentes) (Gulias-Cañizo & Castro-Muñozledo, 2016).

La implementación de células madres en el campo de la medicina ofrece alternativas para el tratamiento de diversas enfermedades, proponiendo además en el futuro llegar a ser la fuente para la solución de todas las enfermedades existentes, desde diabetes (Rahim et al., 2018), infarto de miocardio (Kurazumi et al., 2017), leucemias (Chang et al., 2014), esquizofrenia (Gonzalez-Mantilla et al., 2016), enfermedad de Alzheimer (Verheggen et al., 2018), enfermedad del Parkinson (Sonntag et al., 2018), corea de Huntington (Cho et al., 2019) e isquemia cerebral (Grochowski et al., 2018). Actualmente, los estudios basados en el estudio de la biología células madre *in vitro* son una alternativa interesante de explorar en tratamientos biomédicos y, con ello, poder ser aplicados en modelos animales y generar datos que puedan extrapolarse fácilmente al organismo humano.

A nivel biológico, el sistema de mayor complejidad estructural es el cerebro humano, lo cual dificulta la detección y el tratamiento de los trastornos neurológicos y por esto se deben buscar nuevas estrategias moleculares y celulares para la generación de linajes celulares cerebrales. Actualmente, mediante protocolos de diferenciación especializados, los modelos de cultivo 2D tienen la capacidad de producir poblaciones cerebrales altamente específicas, como las neuronas corticales excitadoras (Mossahebi-Mohammadi et al., 2020; Zhou et al., 2020), cerebelosas inhibitorias (Chen et al., 2015), neuronas dopaminérgicas (Sonntag et al., 2018) y las neuronas motoras (Ribeiro et al., 2018). En este instante, la comprensión de la biología de las células madre es crítica debido a que múltiples neuropatologías podrían ser mitigadas con su aplicación, como también permitirían la generación de estructuras celulares tridimensionales.

2. En búsqueda de la comprensión de las enfermedades desmielinizantes.

La mielinización en el sistema nervioso central es el proceso por el cual los oligodendrocitos forman vainas de mielina alrededor de los axones de las neuronas (Harrington et al., 2020) La mielinización permite que las neuronas transmitan información de manera más rápida y eficiente, como también permite el procesamiento cerebral complejo; sin embargo, sorprendentemente, el mecanismo subyacente por el cual ocurre la mielinización todavía no se comprende completamente (Alcover-Sanchez et al., 2020). La ausencia de mielina genera una transducción de los impulsos nerviosos es más lenta y, también que los axones sean más vulnerables a la atrofia y los déficits

funcionales debido a la falta de soporte trófico de los oligodendrocitos. La desmielinización es un proceso patológico en el cual se daña la capa de mielina de las fibras nerviosas (Harrington et al., 2020; Reiche et al., 2019). La pérdida de las vainas de mielina en los axones de las neuronas es el distintivo de las llamadas enfermedades desmielinizantes; esta destrucción puede implicar el mal funcionamiento de órganos o músculos (Schwartz & Domowicz, 2018). Cuando la mielina es destruida, la conducción de las señales a lo largo de los nervios se ve seriamente afectada, en consecuencia, los nervios se “atrofian” conllevando la pérdida de velocidad de conducción del impulso y de respuesta, que puede ser parcial o total, un consumo energético poco eficiente y una desorganización de las conexiones del sistema nervios. La desmielinización o desmielinización (desarrollo inadecuado o pérdida de mielina, respectivamente) ocurre en muchos trastornos neurológicos, como la esclerosis múltiple (EM), la enfermedad de Pelizaeus Merzbacher (PMD) y las leucodistrofias, y como consecuencia conducen a la alteración de la conductividad del impulso eléctrico, atrofia de las neuronas y déficits funcionales permanentes (Frattoni et al., 2015). Así es como, el trasplante de células exógenas y el reclutamiento de células endógenas se han propuesto como enfoques terapéuticos para restaurar la mielina. Para obtener resultados exitosos, es esencial establecer y mantener señales tanto promotoras como permisivas de la mielinización.

De manera complementaria, la nanotecnología ha permitido la implementación de dispositivos de microfluidos que hacen posible el estudio de sistemas compartimentalizados que sean capaces de imitar el microambiente celular *in vivo*. De manera convencional, los cultivos tradicionales de células individuales solo proporcionan información limitada sobre el comportamiento celular debido a la falta de interacciones con otros tipos de células y no son representativos con el microambiente

altamente complejo *in vivo* (Biterge-Süt, 2018). Así es como, la flexibilidad de los dispositivos de microfluidos contribuye en gran medida al desarrollo de estudios que permitan imitar los patrones espaciales *in vivo* en una placa de Petri (Tong et al., 2014). Por ello, los sistemas compartimentalizados podrían entregar una mejor comprensión de la biología básica de los oligodendrocitos y la mielina, como también permitir entender las moléculas que controlan el proceso de mielinización. En consecuencia, el desarrollo ensayos de mielinización *in vitro* basados en sistemas nanotecnológicos, quizás, podrían ser una forma de nueva, novedosa e innovadora forma de interpretar la biología de los oligodendroocitos y los procesos de mielinización y, que podrían ser clave para la comprensión de las enfermedades desmielinizantes, como también el desarrollar diversas posibles terapias que promuevan los procesos de mielinización.

3 Objetivos del proyecto.

OBJETIVO PRINCIPAL:

Establecer un sistema *in vitro* de formación de mielina a partir de células madre neurales basado en la utilización de sistemas de microfluídica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS POR REALIZAR

1. Establecer el cultivo de células madre neurales mediante cultivo convencional.
2. Promover la diferenciación de células madre neuronales en oligodendrocitos.

4. Justificación.

El desarrollo de nuestro proyecto interdisciplinario se alinea dentro del marco de la comprensión del sistema nervioso central. A partir de este punto derivan distintos temas prioritarios del Programa del plan estratégico panameño, tales como: el estudio de enfermedades desmielinizantes. Nuestro proyecto de investigación aportaría a nivel de: ciencia, investigación e innovación para el desarrollo sostenible, en la búsqueda de conocimiento del cerebro y posibles aplicaciones diagnósticas y terapéuticas en el área de las enfermedades neurológicas que permitiría la mejora de la calidad de vida de la población panameña y el desarrollo de la ciencia y de las capacidades científicas, mediante: la creación de conocimiento científico en temas de biomedicina, la generación y el fortalecimiento de la línea de investigación en neurociencia nacional y la generación de nuevo recurso humano especializado en investigación

1.1 Impacto de la actividad realizado investigación.

1.1.1 Complejidad del daño neuronal.

La complejidad de poder estudiar el cerebro humano (Ju et al, 2014), representa un obstáculo en la aplicación de tratamientos y la erradicación de trastornos cerebrales tales como la enfermedad de Alzheimer (Gonzalez-Mantilla et al., 2016), la enfermedad de Parkinson (Verheggen, et al, 2018) y las esclerosis múltiples (Popescu et al., 2012). Estas enfermedades neurológicas afectan a nivel mundial a unos 50 millones de personas, de las cuales alrededor del 60% viven en países de ingresos medios y bajos (WHO, 2008). Se ha estipulado que el número de personas con enfermedades neurológicas para 2030 aumentaran un 449% en el istmo centroamericano (Informe ADI/Bupa, 2013). Así que es importante la búsqueda de estrategias para resolver este problema sociosanitario. Así es como las células madre aparecen como una alternativa tangible para la comprensión de estos trastornos (Sheridan, et al. 2011); también se ha considerado su uso como posible tratamiento individual en medicina regenerativa para el desarrollo de posibles tratamientos terapéuticos de enfermedades humanas (Yamanaka, 2009).

1.1.2 Las enfermedades desmielinizantes, un problema sin resolver en biomedicina.

La biología de la mielina, como también las enfermedades desmielinizantes siguen siendo una interrogante sin resolver a fecha de hoy en el ámbito de la biomedicina. Las enfermedades desmielinizantes corresponden a cualquier afección que provoque un daño en la vaina de mielina que rodea las fibras nerviosas del cerebro, los nervios ópticos y la médula espinal. Cuando la vaina de mielina se daña, los impulsos nerviosos se

ralentizan o incluso se detienen, causando problemas neurológicos. La esclerosis múltiple es la enfermedad desmielinizante más común del sistema nervioso central. La esclerosis múltiple y otras enfermedades desmielinizantes suelen provocar pérdida de visión, debilidad muscular, rigidez y espasmos musculares, pérdida de coordinación, cambios en la sensibilidad, dolor y cambios en la función de la vejiga y el intestino (Popescu et al., 2012). Actualmente, no existe una cura para las enfermedades desmielinizantes y su avance, y los síntomas son diferentes para cada persona. El tratamiento de estas patologías se centra en: minimizar los efectos de los ataques, modificar el curso de la enfermedad y manejar de los síntomas; sin la existencia de diagnóstico anticipado, ni tampoco de tratamiento terapéutico. Por ello, es de gran importancia la búsqueda de nuevos abordajes que permitan la comprensión de los procesos de mielinización en el sistema nervioso central.

El alcance e impacto de este proyecto en tres aspectos y que son: (i) a nivel investigación, buscaría la generación de nuevas líneas de investigación de neurociencia en Panamá, en temáticas novedosas e innovadoras, (ii) a nivel social, al poder promover la creación de una charla abierta en universidades nacionales, con el objetivo de acercar a la población panameña a la divulgación científica y (iii) a nivel económico, este estudio podría ayudar, en un futuro, a comprender diversas patologías cerebrales y, con ello, disminuir el enorme de gastos de las enfermedades neurológicas debido a que estas patologías son uno de los principales problemas sanitarios económicos y sociales a los que se enfrenta la región de Latinoamérica y el Caribe. Se estima que estas enfermedades representan un coste aproximado de

235.800 millones de dólares en 2010. Los costes sociales de los problemas neurológicos por persona son muy elevados y el número de personas afectadas cada día va en ascenso. La pertinencia de la propuesta se encuentra alineada dentro de la línea estratégica nacional de ciencia y tecnologías e innovación (PENCIYT) 2015-2019, en el ámbito de enfermedades neurodegenerativas y desmielinizantes que afectan la calidad de vida y la esperanza de vida de las personas afectad

MARCO TEÓRICO

Durante su desarrollo temprano, el embrión de mamífero se compone enteramente de células madre. De alguna manera, estas células saben exactamente qué hacer y adónde ir para formar la estructura fascinante de un organismo vivo. Las células madre están estrictamente reguladas, tanto por factores ambientales como por señales intrínsecas (Lu et al., 2019; Savatier & Malashicheva, 2004). Siempre se enfrentan a la elección de dividirse, diferenciarse, migrar o morir. Tomar una decisión equivocada puede tener consecuencias fatales, dando lugar a malformaciones o tumores (Sedaghat et al., 2019). Además de todo lo que las células madre pueden decirnos sobre la biología del desarrollo, también pueden usarse con fines clínicos. El sistema nervioso central, a diferencia de muchos otros tejidos, tiene una capacidad limitada de autorreparación en respuesta a una lesión (Simon & Iff, 2016). En los últimos años, el creciente conocimiento sobre las células madre neurales ha generado la esperanza de que la terapia con células madre pueda usarse en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson (Sonntag et al., 2018) y la enfermedad de Alzheimer (Liu et al., 2020). Para que esto se haga realidad, necesitamos saber qué controla la proliferación de las células madre, así como la diferenciación de sus células hijas y su migración a destinos específicos dentro del sistema nervioso central.

1. Células madre

Las células madre son células indiferenciadas que pueden autorrenovarse y dar lugar al menos a uno, pero a menudo a muchos tipos de células especializadas

(Pimentel-Parra & Murcia-Ordoñez, 2017). La primera célula madre en el mamífero en desarrollo es el óvulo fertilizado (Zigoto) (ver **Figura 1**). Esta célula es totipotente y genera tanto el embrión como la placenta. Las células madre embrionarias (células ES) pueden derivarse de la masa celular interna de los blastocistos (Fogarty et al., 2017). Las células ES son pluripotentes, lo que significa que pueden dar lugar a todos los diferentes tipos de células en el embrión, pero no al tejido extraembrionario.

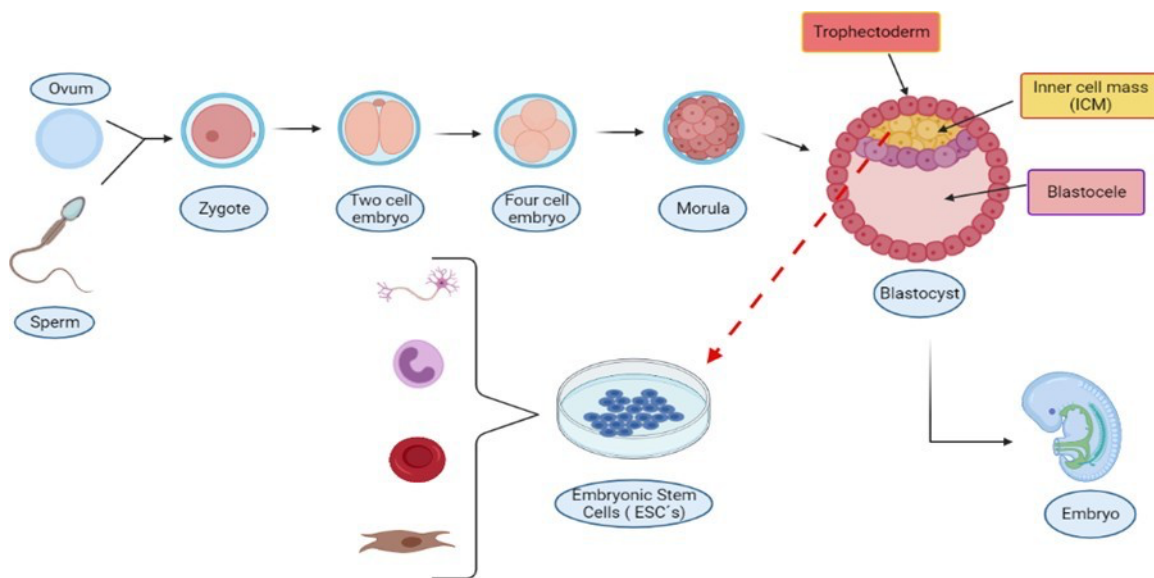


Figura 1. Esquema que representa cómo se derivan las (ESC). Los ESC se derivan de la masa celular interna de un embrión en división en la etapa de blastocisto y se cultivan en el laboratorio en medios nutritivos.

En etapas posteriores del desarrollo, las células madre se localizan en los diferentes órganos, donde dan lugar a células maduras que construyen ese tejido específico (Bacakova et al., 2018). Para mantener una población estable de células madre y, al mismo tiempo, producir células hijas restringidas, la división de las células madre suele ser asimétrica (P. Smith et al., 2017), de modo que una de las células hijas

se diferencia en una progenie madura, mientras que la otra sigue siendo una célula madre (Hubatsch et al., 2019).

Aunque la definición que las células madre deberían poder dividirse sin límites, no tiene que dividirse rápidamente; de hecho, más tarde en la vida, muchas células madre se dividen a un ritmo relativamente bajo. Una amplia variedad de tejidos de mamíferos adultos, incluidos la médula ósea, el tejido nervioso, el músculo esquelético, el intestino, el páncreas, el hígado y la epidermis, albergan células madre (Ruiz et al., 2018; Yang et al., 2020; Zhou et al., 2020). Estas células, llamadas células madre somáticas, son necesarias para mantener homeostasis y reparar el tejido dañado después de una lesión. Aunque gran parte de la investigación se ha centrado en las células madre en los últimos años, quedan muchas preguntas fundamentales por responder:

- ¿Qué señales deciden si una célula madre se divide o permanece inactiva?
- ¿Qué determina si una determinada célula hija se diferencia o sigue siendo una célula madre?
- Cuando una célula madre puede dar lugar a varios tipos de células maduras, ¿qué regula qué vía de diferenciación se sigue?

Las células madre presentan una serie de características que permiten identificarlas, como ser la expresión de ciertos marcadores en su superficie celular, la expresión de factores transcripcionales, receptores de factores de crecimiento, o la producción de ciertas moléculas (Lu et al., 2019; Schwartz & Domowicz, 2018; Steinhart & Angers, 2018).

Mientras que hay algunas de ellas que son comunes a distintos tipos de células madre, en general, las células madre de diferentes tejidos poseen características específicas que permiten distinguirlas (Bacakova et al., 2018; Steinhart & Angers, 2018). Muchos de los términos usados para definir una célula madre, obedecen al comportamiento de éstas en diferentes condiciones *in vivo* o *in vitro*, de ahí que existan diversas clasificaciones.

De acuerdo con la potencialidad, es decir, con el tipo de tejido que originan, existen cuatro tipos de células madre: totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes. El término “totipotencial” (del latín *totus*, que significa completo) hace referencia al potencial que tienen estas células de generar un embrión completo (tejido embrionario y extraembrionario), como es el caso del cigoto. “Pluri” (del latín *plures*, que significa muchos o varios), es utilizado para describir las células madre que pueden dar origen a progenitores que forman cualquiera de las tres capas germinales embrionarias: mesodermo, endodermo y ectodermo.

Para que una célula madre pueda considerarse como pluripotente tiene que cumplir las siguientes condiciones: en primer lugar, una única célula debe ser capaz de diferenciarse a progenitores especializados procedentes de cualquier capa embrionaria; en segundo lugar, demostrar la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de las células en las que se ha diferenciado, y, finalmente, que se produzca un asentamiento claro y persistente de éstas en el tejido blanco, tanto en presencia como en ausencia de daño en los tejidos en los cuales se injerta. Ejemplos de células madre pluripotenciales son las células madre embrionarias y las células pluripotentes inducidas (Frattini et al., 2015; Galiakberova & Dashinimaev, 2020).

La mayoría de los tejidos adultos tienen células madre multipotenciales que son aquellas que pueden dar origen a precursores relacionados solamente con una de las tres capas embrionarias; por ejemplo, células madre que dan origen a tejidos derivados exclusivamente del endodermo como tejido pancreático o pulmonar. Finalmente, la última categoría corresponde a las células madre unipotenciales, que corresponden a las células que sólo pueden generar células hijas que se diferencian a lo largo de una única línea celular, tal como su nombre lo refiere (del latín *unus*: uno) (**Figura 2**).

La mayoría de las células madre de un tejido específico que no ha sufrido ningún tipo de agresión o daño son del tipo unipotenciales y son las responsables de la fase fisiológica de autorrenovación tisular, donde la cantidad de células perdidas es igual al número de nuevas células. Sin embargo, si el tejido es alterado en su estructura básica a través de un fenómeno lesivo y se requiere de diversos tipos celulares para su reparación, se pueden activar células del tipo multipotencial para reparar el daño.

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

1.1 Células Madre Embrionarias

Las células madre embrionarias pueden ser obtenidas a partir de las primeras etapas de formación del embrión, del macizo celular interno (MCI) del blastocisto

preimplantatorio (células madre embrionarias, ESCs), o de las crestas gonadales del embrión postimplantatorio (células madre embrionarias germinales, EGCs) (**Figura 1**). Ambos tipos de células son capaces de replicarse y dividirse en cultivos por largos períodos de tiempo sin mostrar alteraciones cromosómicas. Además, expresan una serie de marcadores característicos de progenitores pluripotenciales que facilitan su identificación, y se diferencian *in vitro* espontáneamente en estructuras multicelulares conocidas como “cuerpos embrionarios”, los cuales contienen elementos de las tres capas germinales a partir de las cuales se pueden formar varios tipos de células como ser cardiomiocitos, neuronas y progenitores hematopoyéticos, entre otros. Sin embargo, las células madre embrionarias derivadas del blastocisto y las células germinales difieren del tejido de donde provienen y de su comportamiento *in vivo*, ya que las células madre embrionarias humanas son capaces de generar teratomas cuando son implantadas en ratones inmunocomprometidos mientras que las células germinales humanas no. Algunas de las ventajas del uso de células madre embrionarias en investigación es su capacidad de proliferar indefinidamente y de generar una gran variedad de grupos celulares.

1.2 Células Madre Adultas

Además de las células madre embrionarias, se han identificado células madre adultas que se pueden encontrar en la mayoría de los tejidos de un individuo, como ser la médula ósea, el tejido adiposo, el sistema nervioso, el aparato digestivo, el músculo esquelético, el músculo cardíaco, el hígado, el páncreas y el pulmón, entre otros (ver **Figura 2**). Esta “habilidad biológica”, propia de las células madre adultas, se fundamenta en la capacidad que tienen de alterar drásticamente su fenotipo en

respuesta a los cambios del microambiente donde se desarrollan, y se la conoce en la actualidad como “fenómeno de plasticidad”.

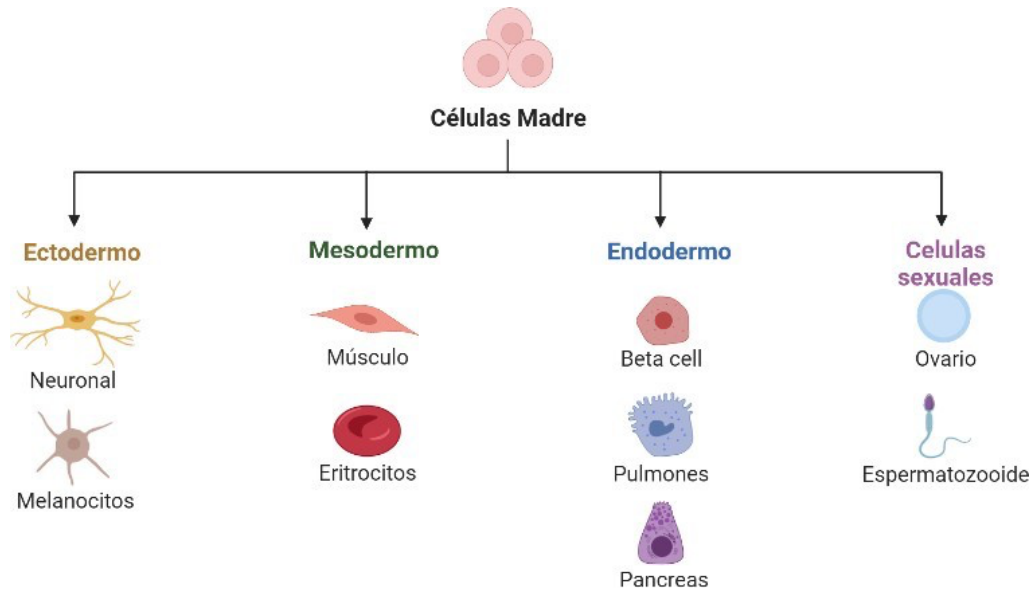


Figura 2. Diferenciación celular dependiente del tejido germinal.

En un principio, se pensó que las células madre adultas estaban predeterminadas a diferenciarse a tipos celulares procedentes de su mismo tejido de origen o, al menos, de su misma capa embrionaria (Hanna et al., 2018). Sin embargo, esta idea ha sido reevaluada por varios grupos de investigadores cuyos estudios sugieren que las células madre adultas son capaces de diferenciarse funcionalmente a células especializadas procedentes de capas embrionarias distintas a las de su origen (Cruciani et al., 2019); incluso, algunos de estos grupos han sido capaces de probar la pluripotencialidad de células madre procedentes de la médula ósea (Almalki & Agrawal, 2017) o del sistema nervioso central .

Los mecanismos moleculares que llevan a los cambios de linaje celular están siendo estudiados; sin embargo, los resultados más recientes acerca de la “plasticidad”

de las células madre adultas contradicen el dogma sobre la diferenciación de las células madre restringida a su tejido de origen, planteando la idea de que las restricciones en los destinos celulares no son permanentes, sino más bien flexibles, reversibles y dependientes de nicho o microambiente en el cual se encuentren (L. R. Smith et al., 2018).

1.3 Auto-regeneración

La auto regeneración se define como la capacidad de una célula madre en generar células idénticas que mantengan sus mismas características fenotípicas (indiferenciadas o comprometidas). Se han descrito dos mecanismos que pueden explicar cómo las células madre ejercen esta capacidad auto- regenerativa: por mitosis asimétricas, y por ciclos mitóticos diferenciados (Cruciani et al., 2019).

El primer mecanismo se basa en la presencia de una cinética mitótica de tipo asimétrico (*asymmetric cell kinetics, ACK*). Según este mecanismo, cada vez que una célula madre sufre una división mitótica da origen a dos células hijas con características fenotípicamente distintas: una de ellas mantiene la misma condición no diferenciada de la célula de origen, la otra, por su parte, se orienta a la proliferación de subtipos intermedios que darán origen a células diferenciadas (Gönczy & Rose, 2005; Shahriyari & Komarova, 2013). El mecanismo fue propuesto a partir del estudio de la embriogénesis de *D. melanogaster* y *C. elegans* (Vella & Slack, 2005). En mamíferos se ha observado un patrón similar en células madre de tejido adulto (*adult stem cell, ASC*). Estudios con ASC en condiciones *in vitro* han demostrado la existencia de factores reguladores de

este proceso tanto a nivel intracelular como extracelular, lo que pone en evidencia la importancia de una continua comunicación con las demás células vecinas (Ding et al., 2020).

El segundo mecanismo propuesto es el de la diferenciación estocástica (*stochastic model*). El modelo fue desarrollado a partir del estudio de células madre hematopoyéticas (Moris et al., 2016) y de células madre tumorigénicas (Sedaghat et al., 2019). Las células madre que siguen este mecanismo se dividen “de manera alterna”, mientras una célula da origen a dos células hijas orientadas a la diferenciación celular, otra célula da origen a dos células hijas con características semejantes a la célula madre original (Park et al., 2019). De este modo, a nivel poblacional, se mantiene una proporción estable de uno y otro tipo de células.

1.4 Plasticidad celular

El factor clave en la formación de clones celulares de autorrenovación es la presencia de células madre, ya sea del tejido de origen o de células madre que migran desde otras áreas (Atlasi & Stunnenberg, 2017) y su asentamiento exitoso en un nicho vacío del tejido dañado (Grochowski et al., 2018). La plasticidad de las células madre es la capacidad de las células madre específicas para cambiar a nuevas identidades (Ottoboni et al., 2020).

La plasticidad hace referencia a un fenómeno que se presenta también de manera natural y que se define por la capacidad de las células multipotentes para dar origen a tejidos derivados de líneas germinales distintas a la suya (Schwartz & Domowicz, 2018). La plasticidad sucede, por ejemplo, en el proceso de cicatrización y regeneración de la

piel (de origen ectodérmico), donde se ha comprobado una activa participación de células madre de origen mesodérmico (Harrison et al., 2017). La transdiferenciación, por su parte, hace referencia a la capacidad de inducir en el laboratorio la diferenciación de células multipotentes en células de líneas germinales distintas a la suya.

1.5 Potencialidad

La potencialidad es la capacidad de una célula de dividirse y producir células con características morfológicas y funcionales distintas a la célula original. Se sabe que no todas las células madre presentan esta condición de igual manera pudiendo variar en función de la célula y del ambiente en el cual se encuentre. Se trata de un fenómeno complejo y no bien entendido y que ha llevado a cierta controversia sobre los criterios de clasificación que se han desprendido a partir de él (Pimentel-Parra & Murcia-Ordoñez, 2017). En la literatura científica, por ejemplo Bacakova et al (2018); Baker & Pera (2018); Pimentel-Parra & Murcia-Ordoñez (2017), es posible encontrar hasta cinco niveles de clasificación: (i) totipotencia, (ii) pluripotencia, (iii) multipotencia, (iv) oligopotencia, y (v) unipotencia (**Figura 3**). Conforme la potencialidad disminuye resulta más difícil encontrar un criterio sólido de diferencia entre un nivel y otro.

1.5.1 Células totipotentes

En condiciones naturales, la totipotencialidad es la capacidad que tienen ciertas células para generar a partir de sí mismas todos los tipos celulares que constituyen el organismo adulto del cual derivan (Atlasi & Stunnenberg, 2017; York & McCauley, 2020).

capaces de dar origen a los tres linajes celulares primordiales del organismo humano. En etapas más avanzadas del desarrollo e incluso en la vida adulta esta potencialidad se va perdiendo e incluso desaparece. Sólo algunas regiones específicas del organismo adulto mantienen esta condición. En condiciones *in vitro* ha sido posible obtener células madre pluripotenciales a partir de embriones en estado de blastocisto, por inducción celular, y por transferencia nuclear. [ICM: inner cell mass; SCNT: somatic cell nuclear transfer; iPS: induced pluripotent stem cells]. Adaptado de Mitalipov, 2009.

1.5.2 Células pluripotentes

Durante los primeros estados de la embriogénesis, el embrión pasa de mórula a blástula (Rivron et al., 2018). En esta etapa de desarrollo se hacen visibles dos zonas de distinto crecimiento celular: una envoltura externa (trofoectodermo) y el embrioblasto o masa celular interna (*inner mass cell*, ICM). Las células que forman parte de la ICM tienen la capacidad de dar origen a cualquiera de las tres líneas germinales precursoras de las distintas partes del organismo adulto: el endodermo (Baker & Pera, 2018), el ectodermo (Li et al., 2015) y el mesodermo (Senft et al., 2019). Sin embargo, estas células no tienen la capacidad de dar origen a un individuo adulto por sí mismas puesto que han perdido la capacidad de formar los tejidos extraembrionarios, derivados del trofoectodermo, que son necesarios para la formación del mismo durante el desarrollo embrionario y fetal (Fogarty et al., 2017). Por tal razón, se dice que estas células son pluripotentes. De hecho, el glosario de términos del MeSH (*Pluripotent Stem Cells - MeSH - NCBI*, 2022), define a las células pluripotentes como aquellos tipos celulares que dan origen a células de cualquiera de las tres líneas germinales.

Como ocurre con la totipotencialidad, la pluripotencialidad también puede ser inducida en condiciones *in vitro* (Lee et al., 2015; Zakrzewski et al., 2019). Un complejo proceso que se explicará en detalle más adelante y que lleva a la formación de células madre con pluripotencialidad inducida.

1.5.3 Células multipotentes

Durante el proceso de embriogénesis y como consecuencia de la formación de las tres capas germinales antes mencionadas, se observa la formación de tres poblaciones distintas de células (Rodríguez-Fraticelli et al., 2020). Estas células presentan el potencial de dar lugar a los múltiples linajes celulares que constituyen la línea germinal de la cual derivan (Douthwaite et al., 2022). En este grupo de células se incluyen las células progenitoras tales como las células madre hematopoyéticas (*hematopoietic stem cells*, HSCs) y mesenquimales (*mesenchymal stem cells*, MSC), derivadas del mesodermo, y que son responsables de dar origen a diversas responsables de dar origen a los distintos tipos de células que forman parte del tejido sanguíneo, pero que en condiciones naturales no dan lugar a tejidos derivados de otras líneas germinales (Shi et al., 2019).

2. El sistema nervioso

El sistema nervioso se divide en dos partes principales: (i) el sistema nervioso central (*Central Nervous System, CNS*), formado por el encéfalo y la médula espinal; (ii) el sistema nervioso periférico (*Peripheral Nervous System, PNS*), formado por los nervios que unen tanto el encéfalo y la médula espinal con todas las demás estructuras del cuerpo humano. Tradicionalmente, los autores subdividen este último en tres: (i) el sistema nervioso somático (*somatic nervous system, SNS*) o de control voluntario, (ii) el sistema nervioso autónomo (*autonomic nervous system, ANS*) o de control involuntario, y (iii) el sistema nervioso entérico (*enteric nervous system, ENS*). Esta división, aunque puede resultar didácticamente útil, no deja de ser artificial dado que biológicamente el sistema nervioso, como el resto del cuerpo humano, funciona como un todo en continua comunicación con el resto del cuerpo y no como la suma de estructuras aisladas e independientes entre sí. En esta sección se tratará de hacer una breve revisión del proceso de formación y desarrollo del sistema nervioso haciendo especial énfasis en los procesos neurogénicos que son de central interés para este estudio.

2.1 Formación y desarrollo temprano

El desarrollo humano se inicia con la fecundación en el momento en que un espermatozoide y un ovocito se unen para formar un embrión unicelular o cigoto. Como ya se mencionó en el apartado anterior, el cigoto es una célula totipotente capaz de conducir a la formación de todas las estructuras constitutivas del cuerpo de un ser humano adulto. En condiciones *in vivo*, la fecundación da lugar al inicio de un intenso proceso de división celular que llevará a lo largo de la vida a la transformación de un organismo unicelular, el cigoto, en uno multicelular, el ser humano adulto. Esta

transformación es posible gracias a complejos procesos de migración, crecimiento y diferenciación celulares que en el desarrollo embrionario y fetal se traducen en la formación de los diversos tejidos, órganos y sistemas.

2.2 Regulación de la neurogénesis embrionaria

La neurogénesis se inicia con la formación del tubo neural, el cual en su estado más temprano está constituido por una capa individual de células (Obernier & Alvarez-Buylla, 2019; Xie & Dorsky, 2017). A medida que avanza la neurogénesis, las células neuroprogenitoras experimentan un número considerable de divisiones celulares que lleva a la formación de un tubo mucho más grueso en el que se observa la formación de una zona adyacente al ventrículo o zona ventricular, una zona intermedia, y una zona marginal más periférica (Obernier & Alvarez-Buylla, 2019). Las células localizadas en la zona ventricular son las precursoras de las neuronas y de las células de la glía (Mira & Morante, 2020).

Estas células experimentan entre uno y dos ciclos celulares diarios al inicio de la neurogénesis. Las divisiones que sufren estas células en algunos casos son simétricas (Corballis, 2019) pero en otros son asimétricas (Chhabra & Booth, 2021). Esta diferencia está asociada con la orientación del huso mitótico de la célula en división respecto a la superficie del canal central (Hubatsch et al., 2019). Así, se ha observado que, si el plano de división durante la metafase es perpendicular al canal, es decir que el huso mitótico es paralelo a la superficie del canal, las dos células hijas mantienen la condición neuroprogenitora de la célula madre (división simétrica). Si, por el contrario, el plano de división va en paralelo a la superficie del canal, es decir, la orientación del huso mitótico es perpendicular, el destino de las células hijas será como sigue: la célula orientada a la

zona ventricular mantendrá la condición neuroprogenitora de la madre, en cambio aquella que resulta orientada a la zona marginal abandonará el ciclo e iniciará un rápido proceso de migración en dirección a dicha zona donde se diferenciará (división asimétrica). Se sabe que esta célula post-mitótica, a diferencia de la neuroprogenitora, hereda una alta concentración de receptores de gran importancia en la neurogénesis. Estos receptores tipo Notch (Cheng & Scadden, 2014; Méndez-Maldonado et al., 2020), presentes en su membrana celular debido a una distribución asimétrica de los mismos en los estados mitóticos previos a la citocinesis (McNeely & Dwyer, 2021) .

2.3 Neurogénesis en la corteza cerebral

La fuente de la cual procede la mayor parte de las células del CNS es el conjunto de células madre multipotenciales que constituyen el neuroectodermo (Kanton et al., 2019; York & McCauley, 2020). Estas células experimentan continuas mitosis antes de transformarse en las células neuroprogenitoras precursoras de las células neuroprogenitoras neuronales y gliales (Hogberg et al., 2013). Se sabe que la decisión por alguno de los dos linajes obedece a un cambio en la expresión de sus genes. Uno de éstos es el gen responsable de la producción de nestina (Zhang et al., 2019), un filamento intermedio cuya expresión se ve disminuida conforme las células avanzan en su proceso de diferenciación. Un proceso similar a lo observado con la β -catenina (Xie & Dorsky, 2017), la reducción de la expresión de nestina ha sido asociada al paso de células neuroprogenitoras comunes a dos tipos de células neuroprogenitoras intermedias: las células neuroprogenitoras neuronales, responsables de generar los diversos tipos de neuronas, y las células neuroprogenitoras gliales, responsables de la

formación de los distintos tipos de células de la glía. En un primer momento, las células neuroprogenitoras de la zona ventricular experimentan ciclos mitóticos simétricos en los que dan lugar a células neuroprogenitoras intermedias fenotípicamente semejantes a las primeras (Mira & Morante, 2020). En un segundo momento, algunas de las células neuroprogenitoras neuronales pasan de tener ciclos simétricos a tener ciclos asimétricos. De estos ciclos se producen células post-mitóticas que migran a la pre-placa de la zona marginal adyacente a la cara interna de la piamadre.

Una porción de estas células se diferencia, en la región más marginal, a células de Cajal-Retzius; otras en cambio lo hacen hacia neuronas que se ubican en la sub-placa más ventricular de la zona intermedia. Una vez se ha completado este proceso, algunas células neuroprogenitoras de la glía empiezan a diferenciarse a células de la glía radial (Mercurio et al., 2019).

Los mecanismos moleculares responsables de este complejo proceso han sido materia de amplio estudio, no obstante, al día de hoy siguen siendo muchos los puntos que aún quedan por resolver. Lo que no está del todo claro es el tipo de comunicación existente entre los mecanismos de diferenciación, no obstante, se ha visto que la supresión de cualquiera de los factores descritos en el **Cuadro 1**, afecta seriamente todo el proceso de compromiso celular.

2.3.1 Desarrollo neuronal

En los vertebrados, el SNC, que incluye el cerebro, la médula espinal y la retina del ojo, surge del ectodermo. Tras una señal inductiva del mesodermo subyacente, una amplia región del ectodermo se espesa y forma la placa neural. A través de la

neurulación, la placa neural se pliega y forma el tubo neural (Miyamoto & Wada, 2013) . Al principio, el tubo neural consta de una sola capa de células madre neurales que se dividen rápidamente. A medida que el tubo se engrosa, las células de la zona ventricular, las más cercanas a la luz del tubo neural, continúan dividiéndose (Spector et al., 2015). La división celular simétrica inicial se reemplaza por división asimétrica y se forman células precursoras neurales (Alizadeh & Karimi-Abdolrezaee, 2016). Según Harrison et al.(2017) y Vieira et al (2018), la identidad de las células en diferentes posiciones a lo largo del eje dorsal-ventral del tubo se especifica mediante la señalización antagónica de la proteína morfogenética ósea (BMP) y el Sonic hedgehog (SHH). El eje anteroposterior está especificado por varios morfógenos (ver Figura 4.), que incluyen factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), proteínas Wnt y ácido retinoico. FGF, BMP, Wnt y SHH también son mitógenos que promueven la proliferación de las células que instruyen (Park et al., 2019; Savatier & Malashicheva, 2004).

A nivel molecular recientes estudios (Harrison et al., 2017; Steinhart & Angers, 2018)han demostrado que la β -catenina de la ruta Wnt juega un importante papel regulador en el proceso de diferenciación de las células neuroprogenitoras que migran desde las SVZ hasta los bulbos olfatorios. Como ya se describió previamente, la liberación de β -catenina disminuye conforme las células neuroprogenitoras entran en un proceso de diferenciación durante la neurogénesis embrionaria. Estudios recientes (Buechler & Salinas, 2018; Jin et al., 2020), con ratones transgénicos deficientes en Wnt han demostrado este mismo comportamiento tanto en la SVZ como en la migración de estas células a los bulbos olfatorios. Esto parece corroborar la idea de que las células

madre adultas del CNS son capaces de regular el mantenimiento de su propia capacidad auto regenerativa a través de la secreción de diversos tipos de factores que estarían actuando como señales autocrinas (Z. Xu et al., 2016) y paracrinas (Sharma & Bhone, 2020), entre el SVZ y los bulbos olfatorios. Del mismo modo a lo observado en la SZV, se ha descrito la acción esencial de Wnt y β -catenina en el mantenimiento de la neurogénesis adulta en la SGZ del hipocampo.

2.3.2 Componentes del Nicho Neurogénico del Hipocampo

Los factores metodológicos parecen contribuir a las discrepancias entre los estudios que describen la presencia o ausencia de neurogénesis en la circunvolución dentada (DG) del adulto humano (Boldrini et al., 2016) .Se necesitarán investigaciones futuras que utilicen diferentes enfoques para comprender cómo se generan las células granulares (CG) nacidas en adultos (Sorrells et al., 2018). Estudios recientes describen que la neurogénesis del hipocampo humano persiste durante la novena década de la vida y se asocia con el estado cognitivo en pacientes con EA, lo que proporciona evidencia de la potencial relevancia de este proceso para muchos trastornos.

La característica definitoria de las células madre neurales (NSC) es su capacidad para multiplicarse mediante divisiones simétricas y proliferación, y diferenciación mediante y divisiones asimétricas; lo que permite el mantenimiento de la reserva de células madre y da lugar a diferenciación de tipos de células del sistema nervioso central (SNC). Es necesario un estricto control del espacio temporal de la diferenciación del NSC, ya que sus alteraciones se asocian a disfunciones neurológicas y, en algunos casos, a la muerte. En este trabajo se revisa el estado actual de los mecanismos

moleculares que regulan la transcripción en las NSC, organizados según si el origen del estímulo que desencadena la cascada molecular en el SNC es interno (factores intrínsecos) o si es el resultado del microambiente que rodea el SNC (factores extrínsecos).

La creciente evidencia muestra un papel importante para las NSC como reguladores de su propio nicho, influyendo en el desarrollo de su progenie en diferentes etapas neurogénicas. VEGF, neurotrofina-3 (NT3), pleiotrofina (PTN) y BDNF son algunos de los factores liberados por las NSC (Viciomini et al., 2020). Dando a entender que el nicho neuro progenitor del hipocampo adulto es un microambiente especializado y dinámico, que involucra componentes celulares y no celulares del DG. Esto indica que, las células y las señales producidas por ellas pueden regular el proceso oligodendrogénico actuando a diferentes niveles desde la proliferación hasta la integración funcional (Gudi et al., 2011; Hao et al., 2017; Mistri et al., 2020).

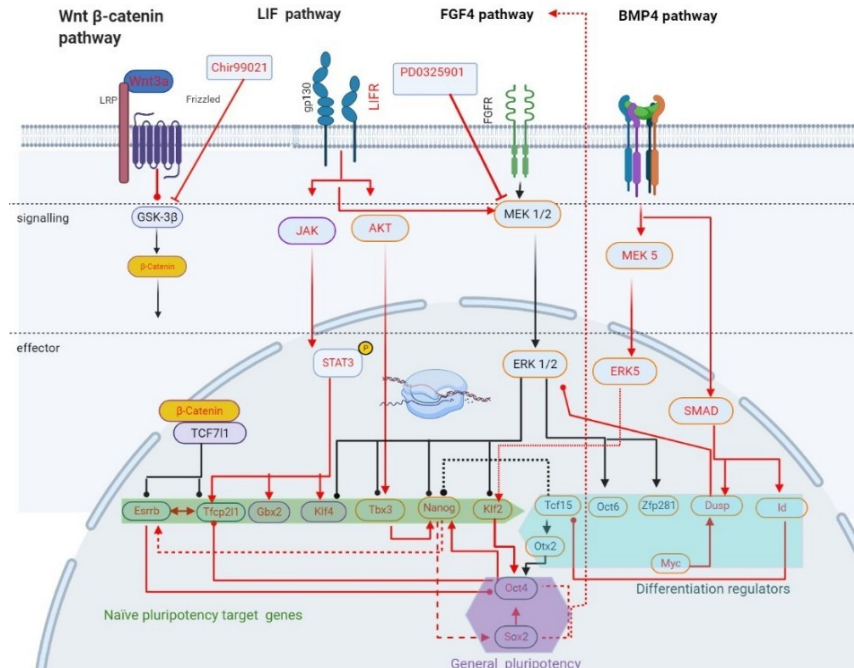


Figura 4. Vías de señalización que regulan la biología de las células madre. Esquemas simplificados de las vías de señalización de BMP, LIF, FGF y Wnt que funcionan individualmente o en combinación para controlar la autorrenovación de células madre frente a la diferenciación. Diagrama de red de mecanismos en autorrenovación (rojo) y diferenciación (negro). Las flechas indican activación y las líneas con cabeza de círculo significan inhibición. El cableado de TF de pluripotencia general, reguladores de diferenciación y la autorrenovación.

In vitro, las células madre neurales pueden inducirse a proliferar simplemente mediante la adición de mitógenos solubles al medio de cultivo (Cruciani et al., 2019). Las células de diferentes regiones del SNC parecen diferir en sus requerimientos de factores de crecimiento. Algunos pueden expandirse con EGF o FGF-2 solos, pero otros requieren una combinación de estos factores (Cochard et al., 2021). Se ha sugerido que las células madre neurales cultivadas en presencia de FGF-2 tienen una mayor

probabilidad de generar neuronas que las células propagadas en EGF (Mossahebi-Mohammadi et al., 2020; Son et al., 2020). Las células madre neurales tempranas y tardías también difieren en su capacidad de respuesta a diferentes mitógenos. En las primeras etapas de desarrollo, las células madre neurales proliferan en respuesta a FGF-2, pero no a EGF. En células madre embrionarias tardías y adultas, por otra parte, la expresión de receptores de EGF aumenta y las células responden al ligando de EGF (Huang et al., 2020).

2.4 Diferenciación de células madre a oligodendrocitos

Las células neurales surgen de la capa germinal ectodérmica (Baker & Pera, 2018). Este proceso requiere que el ectodermo embrionario naciente, reciba una señal positiva de un grupo especializado de células mesodérmicas dorsales, denominadas “*organizador*”, la cual guían a las células ectodérmicas adyacentes a adoptar un destino neural. Es conocido que las moléculas de señalización secretadas por el tejido organizador, tales como noggin (Harrison et al., 2017; Izrael et al., 2007), ejercen potentes efectos neutralizantes. Sin embargo, más tarde se descubrió que los efectos de neurogénesis de estos factores dependían de interacciones inhibitorias con proteínas morfogénicas óseas (BMP), de modo que la neurogénesis se reprime de forma proactiva (Barros et al., 2014; Mercurio et al., 2019).

Las células progenitoras de oligodendrocitos (OPC) son subtipos de células gliales responsables de la regeneración de la mielina. Los oligodendrocitos (OL) se originan a partir de OPC y son las células mielinizantes del sistema nervioso central (SNC). Estas células están presentes en la materia blanca y la materia gris del SNC adulto (Barros et al., 2014; Grochowski et al., 2018) ; la caracterización de la trayectoria de desarrollo de

las OPC es de gran interés dada la importancia de estas células en el proceso de mielinización. Sin embargo, los estudios del desarrollo de OPC humano siguen estando limitados por la disponibilidad de muestras de células completas y material que abarca un amplio rango de edad, incluido el momento pico en el proceso de mielinización; donde una vez que las OPC se diferencian en OLG maduras, extienden múltiples procesos que envuelven individualmente los axones y luego proceden a generar las capas concéntricas de la membrana celular modificada que componen la mielina (Chien, 2011; Kanton et al., 2019).

Los estudios sobre el desarrollo de oligodendrocitos indican que la diferenciación de OPC, sigue una secuencia compleja, estrictamente regulada, de varios pasos con patrones de expresión génica identificables (Baldassarro et al., 2021) y una red reguladora de genes descrita en linajes oligodendrogiales, los cuales incluyen los factores de transcripción Olig2 (Hogg et al., 2010; Lara Vellosillo, 2015; Kanton et al., 2019), Sox10 (Mercurio et al., 2019), Nkx2.2 (Mercurio et al., 2019) y Myrf (Perlman et al., 2020; Weider et al., 2018) como determinantes principales de la diferenciación y mielinización. Olig2 se expresa en el momento de la especificación e induce a Sox10. Una vez inducido, Sox10 contribuye al mantenimiento de la expresión de Olig2 en un bucle de retroalimentación positiva. Sox10 también estimula la expresión de Nkx2.2 e induce Myrf antes del inicio de la diferenciación. también cabe destacar que las interacciones proteína-proteína (Rasband & Peles, 2015).

2.4.1 Factores solubles difusibles en oligodendrocitos

La gliogénesis, es una vía de investigación menos explorada pero igual de importante, especialmente la oligodendrogénesis, la creación de nuevos OL, ha surgido como un mecanismo que infiere la plasticidad dependiente de la experiencia en el cerebro adulto y en el desarrollo. Los OL son células gliales del sistema nervioso central que producen mielina, una membrana rica en lípidos que envuelve y aísla los axones (Gupta et al., 2012; Hester & Hood, 2017). La mielina es canónicamente conocida por su papel en la mejora de la velocidad de transmisión neuronal (Song & Dityatev, 2018) Sin embargo, también se ha encontrado que los OL y su mielina asociada regulan la plasticidad. Específicamente, las proteínas de mielina inhiben el brote axonal y se cree que cierran los períodos críticos y cristalizan los circuitos. En el cerebro adulto, la mielina puede sufrir una reorganización considerable en respuesta a la actividad neuronal; esta mielinización dependiente de la experiencia contribuye en última instancia a la función motora, el aprendizaje espacial y motor, el comportamiento social y el afecto emocional. La plasticidad de la mielina en el sistema nervioso central se produce a través de alteraciones de la mielina existente. la adición de nuevos segmentos de mielina de OL existentes, y la incorporación de nuevos OL y mielina a través de oligodendrogénesis.

La evidencia reciente sugiere que los cambios en la mielinización, incluida la hipermielinización y la hipomielinización, también pueden desempeñar un papel en numerosas enfermedades neurológicas y psiquiátricas (Breton *et al.*, 2021; Long *et al.*, 2021; McPhie *et al.*, 2018). Por lo tanto, proteger la mielina y promover la remielinización es crucial para crear un tratamiento contra una amplia gama de trastornos.

Los oligodendrocitos (OLG) son las células responsables de la producción y el mantenimiento de la mielina en el sistema nervioso central (SNC). Se requiere la mielinización de los axones para la transmisión rápida de impulsos en el sistema nervioso (Harrington et al., 2020; Stadelmann et al., 2019). La mielina también mantiene la integridad de las fibras nerviosas asociadas a través de la activación de señales que afectan la estructura y función de las fibras nerviosas (Hester & Hood, 2017; Zhang et al., 2019). Por lo tanto, la erosión de la vaina de mielina provoca alteraciones neurológicas como las que se observan en pacientes con esclerosis múltiple (Lau et al., 2013; Reiche et al., 2019).

Por esta razón comprender mejor el proceso de mielinización, es esencial caracterizar la secuencia de eventos que ocurren durante la diferenciación de OLG.

La diferenciación de OLG es un proceso complejo que requiere la interacción de muchos factores de transcripción reguladores del ciclo celular, modificadores epigenéticos y represores transcripcionales que controlan la formación de mielina. Sin embargo, las vías de transducción de señales que promueven que un progenitor de oligodendrocitos (OLP) se convierta en un OLG mielinizado maduro no están bien definidas; pero hay varios factores clave (ver **Cuadro 1**).

Cuadro 1. Principales moduladores de la oligodendrogénesis en el cerebro

Señal	Efecto
Morfógenos	

Wnt	Estimula la proliferación y renovación de las NSC (Austin et al., 2021)
Notch	Requerido por las NSC para mantenerse en proliferación (Bekri et al., 2019; Méndez-Maldonado et al., 2020)
Shh	Requerido para el mantenimiento de las NSC e inducción a Oligoprogenitores (Almazan, 2016; Traiffort et al., 2016)
BMP	Inhibe la oligodendrogénesis (Govier-Cole et al., 2019; Petersen et al., 2018)
Factores de crecimiento	
EGF	Estimula la proliferación y migración de OPC (Cochard et al., 2021)
FGF-2	Induce proliferación de las OPC (Méndez-Maldonado et al., 2020; Son et al., 2020)
IGF-1	Estimula la diferenciación a Oligodendrocitos (Gudi et al., 2011; Hakuno & Takahashi, 2018)
PDGF	Induce proliferación y diferenciación a OPC

Marcadores

Epigenéticos

miRNA-7a

Promueve el compromiso a OPC

Metilación de la

Favorece la producción de OPC (Sharma & Bhonde,2020).

Histona

NSC: neural stem cell; OPC: oligodendrocyte precursor cell; pMN: progenitors of motor neurons; Shh: sonic hedgehog; BMP: bone morphogenic protein; EGF: epidermal growth factor; FGF-2: fibroblast growth factor-2; IGF-1: insulin-like growth factor-1; PDGF: platelet-derived growth factor.

2.4.2 La Epigenética Durante la Diferenciación y el desarrollo de las Células Madre Neurales.

El epigenoma, consta de varios grados de mecanismos reguladores, que determinan el perfil de expresión génica de las células a diferenciar, entre ellas los factores epigenéticos, como HAT (Histona **A**cetyl **T**ransferasa), HDAC (Histonas **D**es-**A**cetiladas) y metiltransferasas de ADN (DNMT). Las ESC experimentan acetilación al inicio del proceso de diferenciación en la histona 3 lisina 9 (H3K9) la cual es una modificación activa relacionada con la eucromatina. Su nivel es casi indetectable en la ESC y aumenta cuando las células abandonan el estado indiferenciado (L. Xu & Jiang,

2020). Esto conlleva a un aumento de la expresión génica; pero al encontrarse en un estado de diferenciación temprana, las células aún no se encuentran comprometidas a un linaje celular (Sharma & Bhonde, 2020).

Las NSC están marcadas por dominios de cromatina bivalentes (Baker & Pera, 2018), que contienen marcas de modificación de histonas tanto activantes (H3K4me3), como represivas (H3K9me3; H3K27me3). Estos dominios de cromatina bivalentes se resuelven posteriormente durante el proceso de diferenciación en regiones que contienen solo un tipo de estas marcas de histonas, lisina 4 (K4), trimetilada en regiones transcripcionalmente activas y lisina 27 (K27), trimetilada en regiones transcripcionalmente reprimidas. Además, durante la diferenciación, se activan reguladores de genes específicos de linaje (Baker & Pera, 2018; van Holde & Zlatanova, 2018; Moreno & Mobbs, 2017). La metilación del ADN (ADN-me) desempeña un papel importante en la diferenciación de las ESC hacia NSC, regulando la expresión de genes y facilitando la especificación del linaje (Aiba *et al.*, 2017; Kraushaar & Zhao, 2013).

En el caso de las células madres embrionarias, el genoma está altamente hipo metilado (pérdida del grupo metilo en el nucleótido 5-metilcitosina), mientras que los niveles globales de metilación generalmente aumentan a medida que las células se comprometen con un cierto linaje y se diferencian; regulando negativamente los genes encargados de la pluripotencia, mediante la metilación de las regiones promotoras (Sedaghat *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2013).

3. Complejidad del daño neuronal.

La complejidad de poder estudiar el cerebro humano (Ju et al, 2014), representa un obstáculo en la aplicación de tratamientos y la erradicación de trastornos cerebrales

tales como la enfermedad de Alzheimer (Gonzalez-Mantilla et al., 2016), la enfermedad de Parkinson (Verheggen, et al, 2018) y las esclerosis múltiples (Popescu et al., 2012). Estas enfermedades neurológicas afectan a nivel mundial a unos 50 millones de personas, de las cuales alrededor del 60% viven en países de ingresos medios y bajos (WHO, 2008). Se ha estipulado que el número de personas con enfermedades neurológicas para 2030 aumentaran un 449% en el istmo centroamericano (Informe ADI/Bupa, 2013). Así que es importante la búsqueda de estrategias para resolver este problema socio-sanitario. Así es como las células madre aparecen como una alternativa tangible para la comprensión de estos trastornos (Sheridan, et al. 2011); también se ha considerado su uso como posible tratamiento individual en medicina regenerativa para el desarrollo de posibles tratamientos terapéuticos de enfermedades humanas (Yamanaka, 2009).

3.1 Las enfermedades desmielinizantes, un problema sin resolver en biomedicina.

La biología de la mielina, como también las enfermedades desmielinizantes siguen siendo una interrogante sin resolver a fecha de hoy en el ámbito de la biomedicina. Las enfermedades desmielinizantes corresponden a cualquier afección que provoque un daño en la vaina de mielina que rodea las fibras nerviosas del cerebro, los nervios ópticos y la médula espinal. Cuando la vaina de mielina se daña, los impulsos nerviosos se ralentizan o incluso se detienen, causando problemas neurológicos. La esclerosis múltiple es la enfermedad desmielinizante más común del sistema nervioso central. La esclerosis múltiple y otras enfermedades desmielinizantes suelen provocar pérdida de visión, debilidad muscular, rigidez y espasmos musculares, pérdida de coordinación, cambios en la sensibilidad, dolor y cambios en la función de la vejiga y el

intestino (Popescu et al., 2012). Actualmente, no existe una cura para las enfermedades desmielinizantes y su avance, y los síntomas son diferentes para cada persona. El tratamiento de estas patologías se centra en: minimizar los efectos de los ataques, modificar el curso de la enfermedad y manejar de los síntomas; sin la existencia de diagnóstico anticipado, ni tampoco de tratamiento terapéutico. Por ello, es de gran importancia la búsqueda de nuevos abordajes que permitan la comprensión de los procesos de mielinización en el sistema nervioso central.

METODOLOGÍA

1. Establecer el cultivo de células madre neurales mediante cultivo convencional.

1.1 Protocolo de cultivo de célula madre neuronales.

A partir de una población de NSC, las células se diferenciaron hacia un destino neuronal durante 3 a 7 días. Las condiciones óptimas para la diferenciación neuronal de NSC dependen del método de derivación de NSC monocapa. La línea de NSC utilizada para llevar a cabo los estudios de sobreexpresión de factores de transcripción neurales se cultivaron tal y como describe la casa comercial. Las células recibieron mantenimiento y expansión en medio de cultivo compuesto por DMEM suplementado con: 10% suero fetal bovino, 1% Penstrep y 2 mM glutamina (todos obtenidos de Gibco-BRL) en condiciones estándar de temperatura y humedad (37°C/5%CO₂). El medio se cambia cada dos días y/o cuando las células alcanzan un 80-90% de confluencia se pasan realizando una dilución 1:10

1.2 Preparación de la matriz

1.2.1 Recubrimiento de recipientes de cultivo con Matrigel

Se utilizó una alícuota 240uL de Matrigel del congelador a -20°C y se mantuvo en una cubeta con hielo. Posteriormente se tomó 12mL de DMEM-F12 frío para resuspender el Matrigel, el cual fue transferido el medio a las placas de cultivo e incubado a 37°C durante más de 30-45 min (~1 h), Aspire Matrigel y lave 1X con PBS los recipientes para cultivo de células inmediatamente. Siempre teniendo en cuenta que la matriz de matrigel se gelifica rápidamente entre 22°C y 35°C. Las placas recubiertas con matrigel que no eran

utilizadas el mismo día, eran almacenadas con PBS a 4°C, para evitar la evaporación, por hasta 4 días.

1.3 Sembrado y Diferenciación de NSC

Se resuspendieron las NSC descongeladas en 5 a 10 ml de DPBS–/–. Para posteriormente centrifugar las células a 300 x g durante 5 minutos y aspirar el sobrenadante. Se vuelve a suspender las NSC en 1 a 2 ml de Neurobasal Media precalentado a 37°C..Se determino la concentración de células viables usando Trypan Blue.

Se sacaron las placas recubiertas con Matrigel de la incubadora. Justo antes del uso, se aspiró la solución de PBS de cada pozo y flask T25; se enjuagaron una vez más con DPBS –/–, antes de sembrar las células. Una vez agregadas las células, se complementaba con el Neurobasal Media suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS). Moviendo las placas de cultivo con varios movimientos rápidos de un lado a otro para dispersar las NSC por la superficie, y se colocaron con cuidado en una incubadora humidificada a 37 °C y CO2 al 5 % durante 24 horas.

Después de la incubación de 24 horas, se realizó un cambio de medio con Neurobasal suplementado, con el fin de eliminar remanentes de DMSO, que pudiesen encontrarse en las células. Los cambios de medio fueron luego reprogramados cada 48 horas. El proceso se repitió hasta que las células adoptaron una morfología similar a la de las neuronas y estarán listas para la maduración neuronal.

1.3.1 Maduración y mantenimiento células madre neuronales.

Una vez que las células adopten una morfología neuronal, se retiró la mitad del medio gastado y se reemplazó con un volumen igual de B-27 Plus NMM completo fresco (Neurobasal, 2% B27, 1% N2, 10 ng/ml BDNF, 50 ng/ml IGF, 0,1 μ M c-AMP, 1 μ M AA y 10 ng/ml β -NGF), atemperado a 37°C. Y se repitió este proceso cada 3 o 4 días (para cultivos de alta densidad, se cambió el medio cada 2 o 3 días). Cuando se cambiaba el medio, se retire la mitad del medio gastado de cada pocillo y agregue el mismo volumen de B-27 Plus NMM fresco precalentado en cada pocillo de las placas y devuelva los cultivos a una incubadora humidificada a 37 °C, 5 % de CO₂.

2. Promover la diferenciación de células madre neuronales en oligodendrocitos.

2.1 Generación de cultivo de oligodendrocitos a partir de células madre neuronales.

En esta etapa se promueve la inducción de las células madre en oligodendrocitos. La generación de oligodendrocitos corresponde a una etapa experimental muy delicada, de alta destreza experimental y extensa en el tiempo, que se expone a continuación.

En primer lugar, las células madre neurales fueron sembradas en medio de cultivo (p.e TeSR1, DMEM- F12) (Día0) suplementado con 1000 U/ml de factor inhibidor de la leucemia (LIF; Millipore), diariamente, para la generación de progenitores neurales como indica el estudio de Marchetto y cols. (Marchetto et al., 2008) utilizando diversos factores, tales como: ácido retinoico (RA), Sonic hedgehog (SHH), PDGFR-alfa. Las células se mantienen en crecimiento y diferenciación durante 5-7 días.

En segundo lugar, la diferenciación de OPC (día7) comenzaría por inducción de los progenitores neurales en medio de diferenciación que consiste en el protocolo implementado por Douvaras & Fossati (2015) : medio N2/B27 complementado con IGF1 y PDGF α (R&D Systems). Posteriormente, a las células precursoras de oligodendrocitos (Día 15) se les agregaría medio de maduración que consiste en medio N2/B27 suplementado con PDGF, IGF-1, HGF, NT3, insulina y T3 (Sigma-Aldrich) y se realizó un diseño esquemático del protocolo de diferenciación de células madre hacia oligodendrocitos (ver figura 5). Las células se mantienen en crecimiento y diferenciación durante 25-28 días y son visualizadas mediante microscopía óptica (Día 28).

En tercer lugar, se realizó inmunofluorescencia para observar la presencia Olig2 (olig2) y visualización en microscopio de fluorescencia (Gaspard et al., 2009).

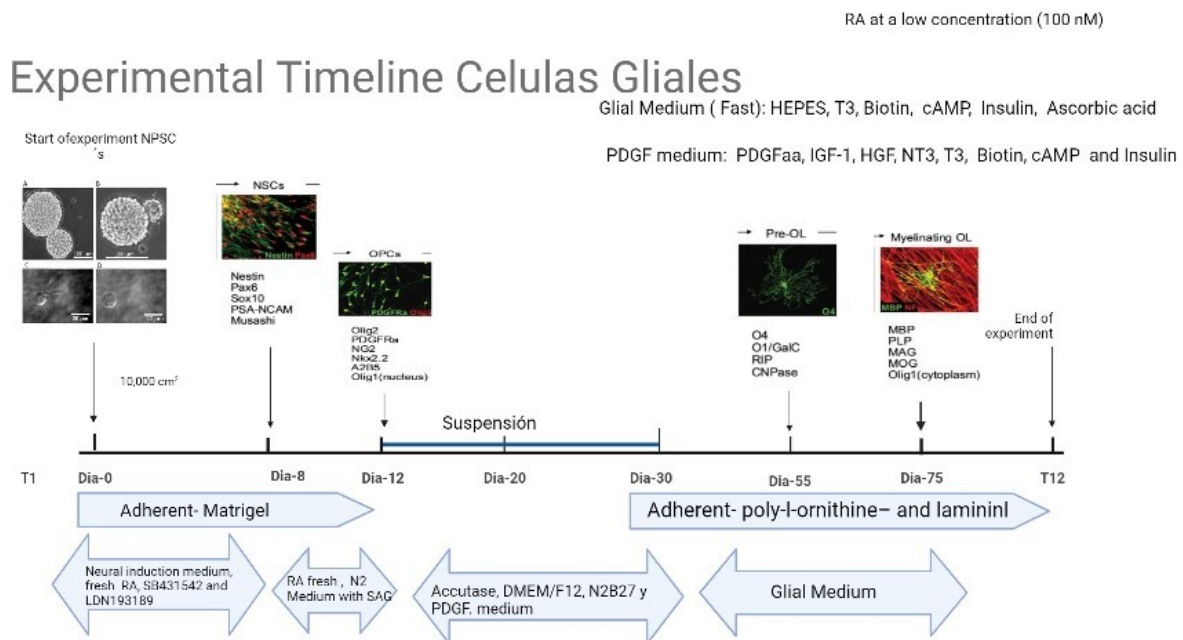


Figura 5. La línea de tiempo de nuestro protocolo de diferenciación de A) Oligodendrocitos y B) Neuronas. En todas las etapas de diferenciación, las células se cultivan en incubadoras con CO₂ al 5 %. En la primera etapa, "Preparación de cultivos de células madre para la diferenciación de linaje glial", las células madre se sembraron como células individuales a baja densidad (10.000 células por cm²) en las placas de cultivo adherente. Esta configuración no requiere una cantidad significativa expansión celular por pozo (80% confluyente) en una placa de seis pozos contiene suficientes células para diferenciación glial (Día 1 - Día 12). En la segunda etapa, las vías de señalización que se han inducido para generar oligodendrocitos se seleccionaron sobre la base de conocimiento obtenido de estudios de embriones de médula espinal de roedores desarrollo, acorde a literatura establecida. La señalización in vitro de RA y SHH que imitan el microambiente cerebral, induciendo la diferenciación de las células madre en células progenitoras neurales y oligodendrocitos (Día 12 - Día 45).

RESULTADOS

1. Establecimiento de Cultivos de células madre neuronales.

Las células madre neuronales que se adhirieron al plástico, tienen morfología fibroblastoide. Una vez sembrada en los flask T25, las células se adheridas presentaron una población celular heterogénea con diferentes morfologías, incluyendo células redondeadas y pequeñas, como también células grandes, planas y con forma ahusada. Las células ahusadas, con morfología fibroblastoide, se volvieron gradualmente predominantes en los sucesivos pasajes, con un crecimiento y división celular continuos a lo largo del cultivo. Cabe destacar que, durante el proceso de cultivo y mantenimiento celular, no se presentaron indicios de contaminación bacterianos, ni mycoplasmaticos; permitiendo cumplir los tiempos de cultivos establecidos (**Figura 6**).

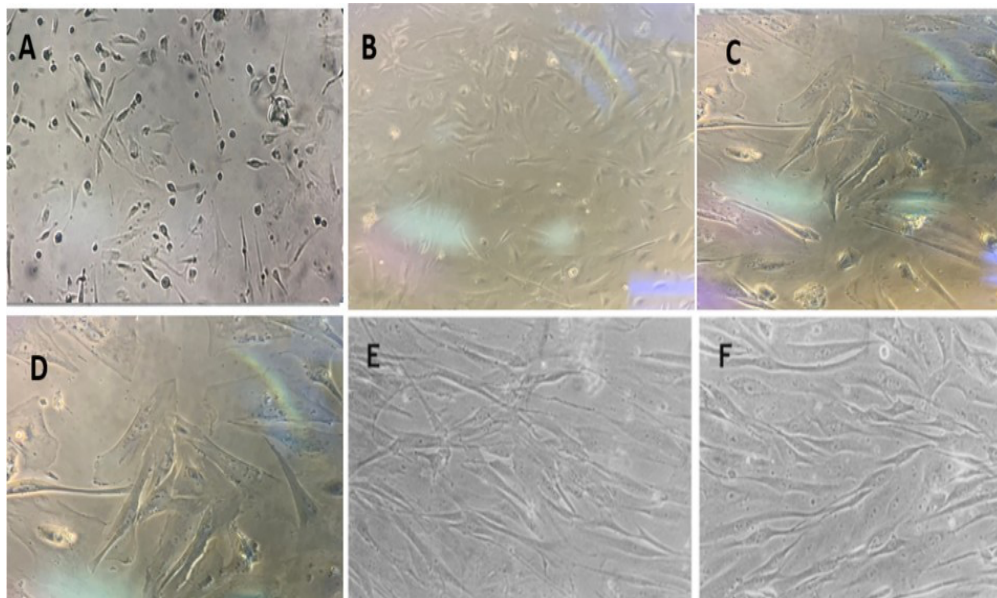


Figura 6. Fotografías microscópicas mostrando la morfología de las NPSCs, sembradas en flask T25, en los días 0 (A), 1 (B), 2 (C), 3 (D), 4 (E) y 5 (F), donde se observa la morfología celular ahusada, tipo fibroblastoide.

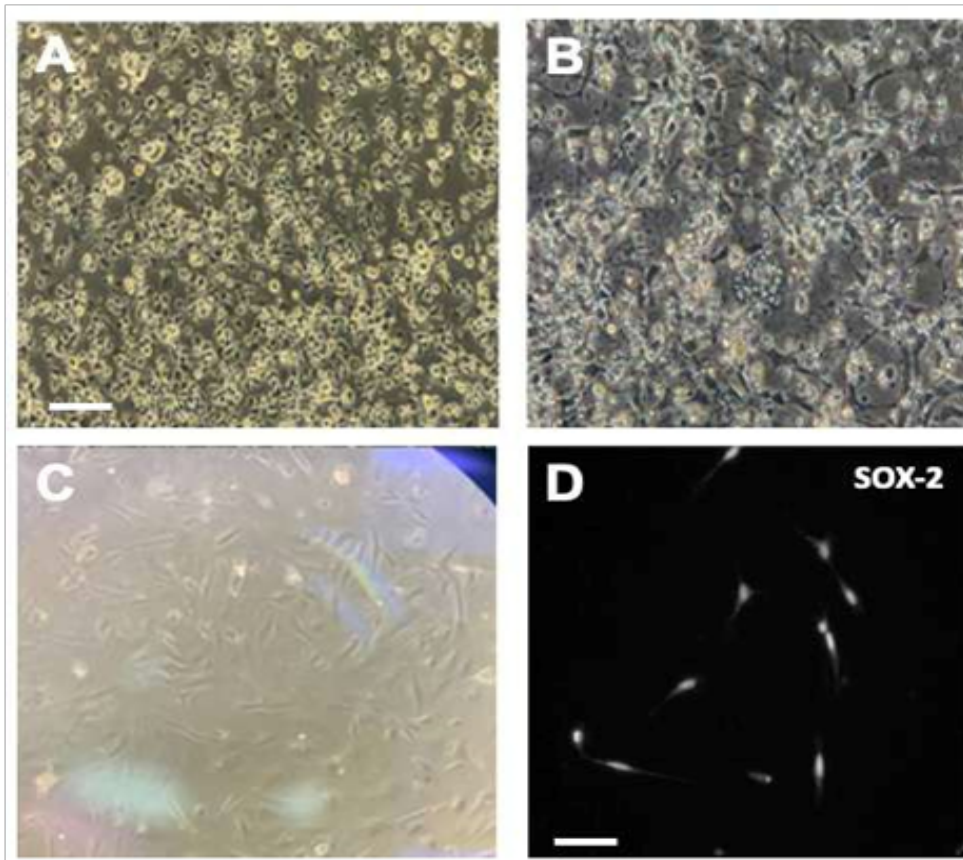


Figura 7. Microfotografía de cultivo de células madre mediante análisis de microscopía óptica y de fluorescencia. (A-B) Registro fotográfico de microscopía óptica de células madre neurales en pocillos de 6 (NSC); (C) Cultivo de neuroprogenitores transcurridos los 7-12 días de expansión; (D) Registro de microscopía de fluorescencia de células madre neuronales que expresan un marcador fenotípico celular.

Durante la formación de las células neurales, sus tamaños aumentan gradualmente. En los 4-7 días de cultivo celular, se exhibieron principalmente morfologías fusiformes, con un pequeña tamaño y forma transparente de forma redonda u ovalada (**Figura 7 A-B**). Después de ser cultivadas durante una semana (7 días), algunas células se agregaron para formar agregados celulares, que fueron agrandado gradualmente con el tiempo (**Figura 7C**) a través de microscopía óptica. Después de 10 días, estaban los agregados celulares comienzan a desarrollar un fenotipo más estrellado que mediante tinción ligada a inmunohistoquímica de células madre indiferenciadas (**Figura 7D**)

mediante microscopia de fluorescencia. Además, esto nos permite la conservación del stock celular para los experimentos a futuro, tanto por microscopia óptica (morfología), como también por microscopia de fluorescencia (expresión de marcadores).

El cultivo celular de las células madre presenta una expansión progresiva en el tiempo hasta lograr la confluencia. Los resultados obtenidos evidenciado en las microfotografías microscopia de fluorescencia (Figura 7D) entran con las características morfológicas e inmunohistoquímicas según lo observado en trabajos tales como Wegener et al,(2015), donde describen que la sobreexpresión de Olig2 es indicativo de cultivos diferenciados a oligodendrocitos con capacidades mielinizantes. Zhang et al.(2022), agrega que OLIG2 promueve la modificación H3K9me3 en el gen Sox11, lo que conduce a la inhibición de la expresión de Sox11, permitiendo que las células progenitoras de oligodendrocitos (OPC), pasen a ser oligodendrocitos inmaduros (iOL).

2. Diferenciación de Neuroprogenitores a Oligodendrocitos

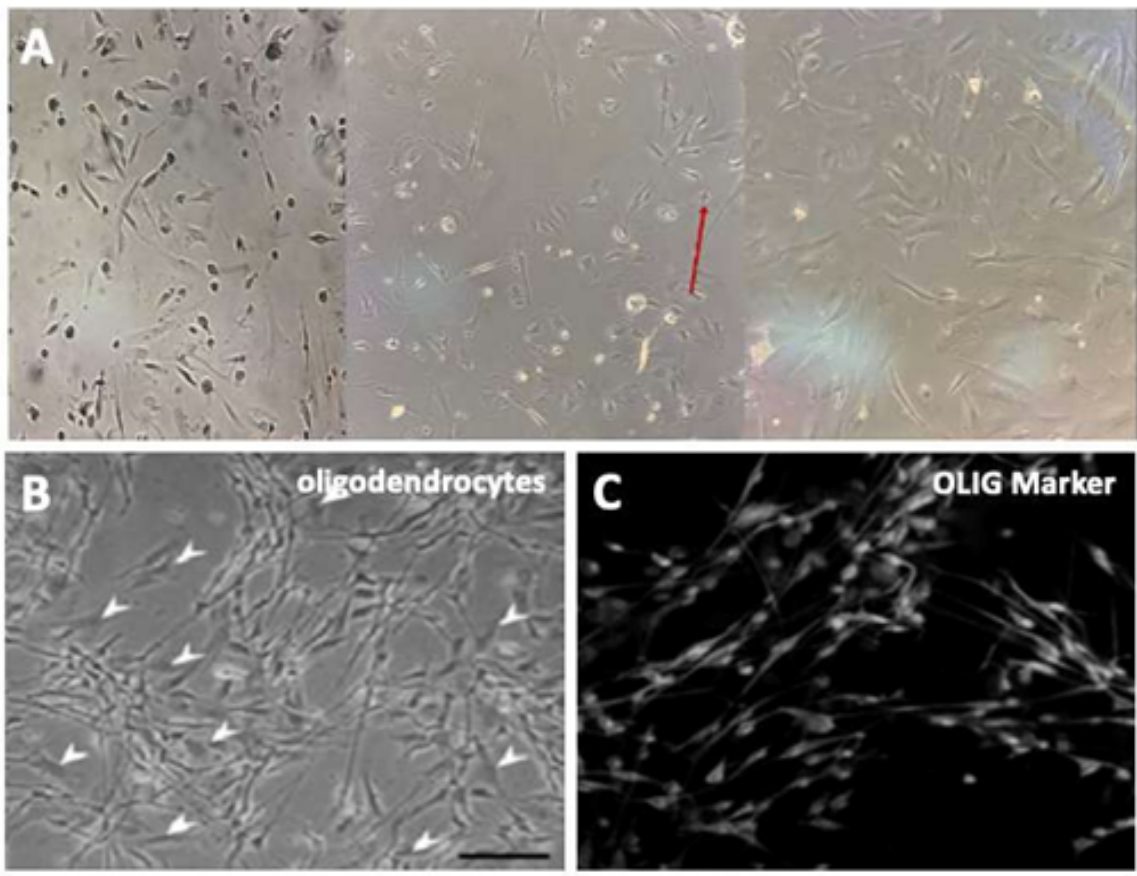


Figura 8. Registro microfotográfico de células madre diferenciadas a oligodendrocitos mediante microscopía óptica (FIGURA 8B) y microscopía de fluorescencia (FIGURA 8C).

En presencia de los factores de crecimiento/citoquinas conocidas por inducir diferenciación neuronal y oligodendrocitos (ver figura 8), como son el RA y el bFGF, las células madre neuronales se diferencian en oligodendrocitos tras estimulación con factores de oligodendrocitos y se observa la expresión del del marcador: Olig-2.

DISCUSIÓN

1. Cultivos celulares

1.1 Cultivo y expansión de NPSC

Para el desarrollo de nuevas e innovadoras terapias celulares basadas en el uso de células madre, es fundamental que seamos capaces de mantener y confirmar la identidad de la población de las células base, la cual es la materia prima. Este trabajo demostramos que es posible cultivar NPSC con población de células viables (**Figura 7**). También pudimos confirmar que, a medida que las células se expandían, no presentaban contaminación ligada a cultivos celulares. Los resultados confirmaron que los cultivos de NPSC se mantuvieron indiferenciadas ($\geq 90\%$), y que fueron positivas para los marcadores Sox2 (Masui, Nakatake et al. 2007), utilizados regularmente en la literatura de investigación para confirmar la potencia celular y la población en el cultivo. Esto significa el establecimiento de células de reserva para futuras pruebas e investigaciones.

1.2 Diferenciación neuronal de NPSC utilizando factores de diferenciación y maduración neuronal

Se demostró que las células expandidas conservaban su capacidad de diferenciación a los linajes de células neuronales dado que cuando eran tratadas con factores de crecimiento neuronal específicos (p.e: BDNF), se observó la diferenciación NPSC a células neuronales. Aunque, no fue posible determinar los subtipos de estas neuronas, ni se contempló el modelo matemático para determinar la calidad de la diferenciación. Este trabajo se inspiró en la investigación de Mercurio et al (2019), los cuales indican que la expresión endógena de los primeros marcadores neuronales tales

como Sox2 por parte de los NPSC podría indicar que ya están preparados para la diferenciación a Neuronas, lo que reafirma el diseño experimental en este trabajo, para determinar las rutas de diferenciación y maduración a neuronas con factores de diferenciación BDNF y β -NGF; mientras que para oligodendrocitos las células fueron suplementadas con factores de diferenciación tales como PDGF, NT3 y T3.

Las células sembradas y suplementadas con factores específicos para oligodendrocitos, presentaban características de viabilidad para un cultivo in vitro: plasticidad, expansión y posterior diferenciación. Esto se debe a las características de los factores utilizados en el diseño de diferenciación.

En el caso del factor de diferenciación neurotrofina-3 (NT-3), en combinación PDGF y en presencia de insulina, actúa como un mitógeno para los precursores oligodendrogiales, es decir células neuroprogenitoras comprometidas a la diferenciación de progenitores de oligodendrocitos OP, promueve la supervivencia de oligodendrocitos in vitro. Los factores de transcripción empleados se han utilizado en diversos estudios, entre los que resaltamos el trabajo de Douvaras & Fossati, (2015), en donde se establece un protocolo de generación y diferenciación rápida. Suponemos es debido a los receptores de Tirosina quinasa, los cuales se expresan en la membrana de las células y activan las principales vías de señalización responsables de impulsar la diferenciación, entre las que podemos mencionar a: PI3K/Akt/mTOR (Adams et al., 2021) Erk1/2-MAPK (Alcover-Sanchez et al., 2020) y Wnt/ β -catenina (Xie & Dorsky, 2017). Aunque aún no es claro como estas cascadas de señalización afectan la diferenciación hacia los Oligodendrocitos, ya que varios estudios indican que el Factor NT-3 promueve la diferenciación hacia Neuronas.

2. Expresión Proteica

Los objetivos del estudio para el análisis molecular de muestras de cultivo celular eran el detectar la expresión proteica mediante transferencia Inmuno-Western probar y optimizar los anticuerpos utilizados en la caracterización de diferenciación citados en la literatura. El Western blot se usa regularmente como ensayo para confirmar la presencia de proteínas específicas pertenecientes a los tipos de células en la muestra. Por lo tanto, el establecimiento del método Western blot fue extremadamente importante para la realización de estudios adicionales. Se realizaron varias diluciones de anticuerpos y diferentes condiciones de bloqueo e incubación de anticuerpos con cada anticuerpo. Pero consideramos que debido a algún cambio en una condición en el protocolo de almacenamiento pudo causar la degradación de las muestras, no permitiendo que los anticuerpos pudiesen detectar la presencia de proteínas, por lo que se recomienda optimizar los protocolos de almacenamiento y conservación de las proteínas.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las células madre neuronales exhiben propiedades que las hacen una población interesante a la hora de pensar en la “célula ideal” a utilizar en medicina regenerativa: fácil obtención, expansión *in vitro*, multipotencia e inmunogenicidad.

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

Hasta el momento, la NPSC utilizadas en este proyecto en células de tipo neuronal han podido ser llevadas a cabo a través del agregado de varios factores, citoquinas y/o antioxidantes. Sin embargo, no podemos asegurar que la eficiencia de estas estrategias de diferenciación sea suficiente para aplicaciones terapéuticas. Por tal razón, buscamos elucidar los mecanismos moleculares subyacentes a la diferenciación neuronal y glial de estas células. Lo que permitiría determinar si estas células tienen la capacidad de diferenciarse al sub-linaje neurales como también incrementar la eficiencia de la misma.

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

Se espera que este trabajo sea el cimiento para futuras investigaciones que permitan reemplazar directamente a las neuro-gliales pérdidas durante una enfermedad, de restaurar la función de los circuitos neuronales a través de mecanismos que involucren la diferenciación y el mantenimiento de fenotipos neuronales robustos, siendo capaces de contribuir a la reparación neural a través de otros mecanismos. Por lo tanto, estudios adicionales son necesarios para determinar cómo las interacciones de células, neurales, permitirían la reparación de sitios lesionados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, K. L., Dahl, K. D., Gallo, V., & Macklin, W. B. (2021). Intrinsic and extrinsic regulators of oligodendrocyte progenitor proliferation and differentiation. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 116(October), 16–24.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.10.002>
- Aiba, T., Saito, T., Hayashi, A., Sato, S., Yunokawa, H., Maruyama, T., Fujibuchi, W., Kurita, H., Tohyama, C., & Ohsako, S. (2017). Methylated site display (MSD)-AFLP, a sensitive and affordable method for analysis of CpG methylation profiles. *BMC Molecular Biology*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12867-017-0083-2>
- Alcover-Sanchez, B., Garcia-Martin, G., Wandosell, F., & Cubelos, B. (2020). R-ras gtpases signaling role in myelin neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21165911>
- Alizadeh, A., & Karimi-Abdolrezaee, S. (2016). Microenvironmental regulation of oligodendrocyte replacement and remyelination in spinal cord injury. *Journal of Physiology*, 594(13), 3539–3552. <https://doi.org/10.1113/JP270895>
- Almalki, S. G., & Agrawal, D. K. (2017). Key Transcription Factors in the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Physiology & Behavior*, 176(10), 139–148.
<https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.02.005.Key>
- Almazan, L. W. G. (2016). Role of Sonic Hedgehog Signaling in Oligodendrocyte Differentiation. *Neurochemical Research*, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2061-3>

- Atlasi, Y., & Stunnenberg, H. G. (2017). The interplay of epigenetic marks during stem cell differentiation and development. *Nature Reviews Genetics*, *18*(11), 643–658. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.57>
- Austin, S. H. L., Gabarró-Solanas, R., Rigo, P., Paun, O., Harris, L., Guillemot, F., & Urbán, N. (2021). Wnt/ β -catenin signalling is dispensable for adult neural stem cell homeostasis and activation. *Development (Cambridge, England)*, *148*(20), 1–54. <https://doi.org/10.1242/dev.199629>
- Bacakova, L., Zarubova, J., Travnickova, M., Musilkova, J., Pajorova, J., Slepicka, P., Kasalkova, N. S., Svorcik, V., Kolska, Z., Motarjemi, H., & Molitor, M. (2018). Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. *Biotechnology Advances*, *36*(4), 1111–1126. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.011>
- Baker, C. L., & Pera, M. F. (2018). Capturing Totipotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, *22*(1), 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.12.011>
- Baldassarro, V. A., Giardino, L., & Calzà, L. (2021). *Oligodendrocytes in a dish for the drug discovery pipeline : the risk of oversimplification*. *16*(2), 291–293.
- Barros, C. S., Franco, S. J., Müller, U., Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M., Hynes, R. O., Naba, A., Huttenlocher, A., Horwitz, A. R., Geiger, B., Yamada, K. M., Adams, J. C., Lawler, J., Munger, J. S., & Sheppard, D. (2014). Extracellular Matrix: Functions in the Nervous System. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1–25. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005108>
- Bekri, A., Liao, M., & Drapeau, P. (2019). Glycine regulates neural stem cell proliferation

during development via Lnx1-dependent notch signaling. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12(February), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00044>

Biterge-Süt, B. (2018). Epigenetic regulation mechanisms in stem cell differentiation. *MOJ Cell Science & Report*, 5(2), 52–54. <https://doi.org/10.15406/mojcsr.2018.05.00114>

Boldrini, M., Fulmore, C. A., Tartt, A. N., & Simeon, L. R. (2016). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell*, 33(8), 839–841. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.015.Human>

Breton, J. M., Long, K. L. P., Barraza, M. K., Perloff, O. S., & Kaufer, D. (2021). Hormonal regulation of oligodendrogenesis II: Implications for myelin repair. *Biomolecules*, 11(2), 1–26. <https://doi.org/10.3390/biom11020290>

Buechler, J., & Salinas, P. C. (2018). Deficient Wnt Signaling and Synaptic Vulnerability in Alzheimer's Disease: Emerging Roles for the LRP6 Receptor. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 10(October), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2018.00038>

Casser, E., Israel, S., Schlatt, S., Nordhoff, V., & Boiani, M. (2018). Retrospective analysis: Reproducibility of interblastomere differences of mRNA expression in 2-cell stage mouse embryos is remarkably poor due to combinatorial mechanisms of blastomere diversification. *Molecular Human Reproduction*, 24(7), 388–400. <https://doi.org/10.1093/molehr/gay021>

Casser, E., Israel, S., Witten, A., Schulte, K., Schlatt, S., Nordhoff, V., & Boiani, M. (2017). Totipotency segregates between the sister blastomeres of two-cell stage

mouse embryos. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08266-6>

Chang, Y. J., Wang, Y., & Huang, X. J. (2014). Haploidentical stem cell transplantation for the treatment of leukemia: Current status. *Expert Review of Hematology*, 7(5), 635–647. <https://doi.org/10.1586/17474086.2014.954543>

Chen, J., Leyrat, A. A., West, J. A., Kriegstein, A. R., Pollen, A. A., Nowakowski, T. J., Chen, J., Retallack, H., & Sandoval-espinosa, C. (2015). Molecular Identity of Human Outer Radial Glia during Article Molecular Identity of Human Outer Radial Glia during Cortical Development. *Cell*, 163(1), 55–67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.004>

Cheng, T., & Scadden, D. T. (2014). Cell Cycle Regulators in Stem Cells. In *Essentials of Stem Cell Biology: Third Edition* (Third Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409503-8.00008-1>

Chhabra, S. N., & Booth, B. W. (2021). Asymmetric cell division of mammary stem cells. *Cell Division*, 16(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13008-021-00073-w>

Chien, C. (2011). Neural Stem Cell Markers : Cytoskeletons. *Medicine*.

Cho, I. K., Hunter, C. E., Ye, S., Pongos, A. L., & Chan, A. W. S. (2019). Combination of stem cell and gene therapy ameliorates symptoms in Huntington’s disease mice. *Npj Regenerative Medicine*, 4(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41536-019-0066-7>

Christians, E. S. (2016). *Totipotency continuity from zygote to early blastomeres: a model under revision Michele*.

Cochard, L. M., Levros, L. C., Joppé, S. E., Pratesi, F., Aumont, A., & Fernandes, K. J.

L. (2021). Manipulation of EGFR-Induced Signaling for the Recruitment of Quiescent Neural Stem Cells in the Adult Mouse Forebrain. *Frontiers in Neuroscience*, 15(March), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.621076>

Corballis, M. C. (2019). Evolution of cerebral asymmetry. In *Progress in Brain Research* (1st ed., Vol. 250). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2019.04.041>

Cruciani, S., Santaniello, S., Montella, A., Ventura, C., & Maioli, M. (2019).

Orchestrating stem cell fate: Novel tools for regenerative medicine. *World Journal of Stem Cells*, 11(8), 464–475. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i8.464>

Ding, L., Cao, J., Lin, W., Chen, H., Xiong, X., Ao, H., Yu, M., Lin, J., & Cui, Q. (2020).

The roles of cyclin-dependent kinases in cell-cycle progression and therapeutic strategies in human breast cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 6, pp. 1–28). <https://doi.org/10.3390/ijms21061960>

Douthwaite, H., Arteagabeitia, A. B., & Mukhopadhyay, S. (2022). Differentiation of

Human Induced Pluripotent Stem Cell into Macrophages. *Bio-Protocol*, 12(6). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4361>

Douvaras, P., & Fossati, V. (2015). Generation and isolation of oligodendrocyte

progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, 10(8), 1143–1154. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.075>

Fogarty, N. M. E., McCarthy, A., Snijders, K. E., Powell, B. E., Kubikova, N., Blakeley,

P., Lea, R., Elder, K., Wamaita, S. E., Kim, D., Maciulyte, V., Kleinjung, J., Kim, J. S., Wells, D., Vallier, L., Bertero, A., Turner, J. M. A., & Niakan, K. K. (2017).

Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature*, 550(7674), 67–73. <https://doi.org/10.1038/nature24033>

Frattini, E., Ruggieri, M., Salani, S., Faravelli, I., Zanetta, C., Nizzardo, M., Simone, C., Magri, F., & Corti, S. (2015). Pluripotent stem cell-based models of spinal muscular atrophy. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 64, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2014.12.005>

Galiakberova, A. A., & Dashinimaev, E. B. (2020). Neural Stem Cells and Methods for Their Generation From Induced Pluripotent Stem Cells in vitro. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(October). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00815>

Gönczy, P., & Rose, L. S. (2005). Asymmetric cell division and axis formation in the embryo. In *WormBook : the online review of C. elegans biology* (pp. 1–20). <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.30.1>

Gonzalez-Mantilla, A. J., Moreno-De-Luca, A., Ledbetter, D. H., & Martin, C. L. (2016). A cross-disorder method to identify novel candidate genes for developmental brain disorders. *JAMA Psychiatry*, 73(3), 275–283. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2015.2692>

Govier-Cole, A. E., Wood, R. J., Fletcher, J. L., Gonsalvez, D. G., Merlo, D., Cate, H. S., Murray, S. S., & Xiao, J. (2019). Inhibiting bone morphogenetic protein 4 type i receptor signaling promotes remyelination by potentiating oligodendrocyte differentiation. *ENeuro*, 6(2). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0399-18.2019>

Grochowski, C., Radzikowska, E., & Maciejewski, R. (2018). Neural stem cell therapy—Brief review. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 173, 8–14.

<https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2018.07.013>

Gudi, V., Škuljec, J., Yildiz, Ö., Frichert, K., Skripuletz, T., Moharregh-Khiabani, D., Voß, E., Wissel, K., Wolter, S., & Stangel, M. (2011). Spatial and temporal profiles of growth factor expression during CNS demyelination reveal the dynamics of repair priming. *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022623>

Gulias-Cañizo, R., & Castro-Muñozledo, F. (2016). Mitos y realidades del uso de las células troncales en la terapia oftalmológica. *Revista Mexicana de Oftalmología*, 90(6), 284–294. <https://doi.org/10.1016/j.mexoft.2015.09.006>

Gupta, N., Henry, R. G., Strober, J., Kang, S. M., Lim, D. A., Bucci, M., Caverzasi, E., Gaetano, L., Mandelli, M. L., Ryan, T., Perry, R., Farrell, J., Jeremy, R. J., Ulman, M., Huhn, S. L., Barkovich, A. J., & Rowitch, D. H. (2012). Neural stem cell engraftment and myelination in the human brain. *Science Translational Medicine*, 4(155). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004373>

Hakuno, F., & Takahashi, S. I. (2018). 40 years of IGF1: IGF1 receptor signaling pathways. *Journal of Molecular Endocrinology*, 61(1), T69–T86. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0311>

Hanna, H., Mir, L. M., & Andre, F. M. (2018). In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0942-x>

Hao, P., Duan, H., Hao, F., Chen, L., Sun, M., Fan, K. S., Sun, Y. E., Williams, D., Yang, Z., & Li, X. (2017). Neural repair by NT3-chitosan via enhancement of endogenous neurogenesis after adult focal aspiration brain injury. *Biomaterials*,

140, 88–102. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.04.014>

Harrington, E. P., Bergles, D. E., & Calabresi, P. A. (2020). Immune cell modulation of oligodendrocyte lineage cells. *Neuroscience Letters*, 715, 134601.

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134601>

Harrison, S. E., Sozen, B., Christodoulou, N., Kyprianou, C., & Zernicka-Goetz, M. (2017). Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro. *Science*, 356(6334).

<https://doi.org/10.1126/science.aal1810>

Hester, E. M., & Hood, B. A. (2017). Stem Cell Technologies in Neuroscience. In *Cryopreservation, Standardized* (Vol. 126, pp. 193–203).

<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7024-7>

Hogberg, H. T., Bressler, J., Christian, K. M., Harris, G., Makri, G., O'Driscoll, C., Pamies, D., Smirnova, L., Wen, Z., & Hartung, T. (2013). Toward a 3D model of human brain development for studying gene/environment interactions. *Stem Cell Research and Therapy*, 4(SUPPL.1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/scrt365>

Hogg, K., Etherington, S. L., Young, J. M., Mcneilly, A. S., & Colin, W. (2010). *Hogg 2010 Inhibitor of Differentiation (Id) genes are expressed in the.pdf*. 151(3), 1247–1256. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0914.Inhibitor>

Huang, J. Y., Krebs, B. B., Miskus, M. L., Russell, M. L., Duffy, E. P., Graf, J. M., & Lu, H. C. (2020). Enhanced FGFR3 activity in postmitotic principal neurons during brain development results in cortical dysplasia and axonal tract abnormality. *Scientific Reports*, 10(1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75537-0>

- Hubatsch, L., Peglion, F., Reich, J. D., Rodrigues, N. T. L., Hirani, N., Illukkumbura, R., & Goehring, N. W. (2019). A cell-size threshold limits cell polarity and asymmetric division potential. *Nature Physics*, *15*(10), 1078–1085.
<https://doi.org/10.1038/s41567-019-0601-x>
- Izrael, M., Zhang, P., Kaufman, R., Shinder, V., Ella, R., Amit, M., Itskovitz-eldor, J., Chebath, J., & Revel, M. (2007). *Human oligodendrocytes derived from embryonic stem cells : Effect of noggin on phenotypic differentiation in vitro and on myelination in vivo*. *34*, 310–323. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.11.008>
- Jin, Y. R., Han, X. H., Nishimori, K., Ben-Avraham, D., Oh, Y. J., Shim, J. W., & Yoon, J. K. (2020). Canonical WNT/ β -Catenin Signaling Activated by WNT9b and RSPO2 Cooperation Regulates Facial Morphogenesis in Mice. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*(May), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00264>
- Kanton, S., Boyle, M. J., He, Z., Santel, M., Weigert, A., Sanchís-Calleja, F., Guijarro, P., Sidow, L., Fleck, J. S., Han, D., Qian, Z., Heide, M., Huttner, W. B., Khaitovich, P., Pääbo, S., Treutlein, B., & Camp, J. G. (2019). Organoid single-cell genomic atlas uncovers human-specific features of brain development. In *Nature* (Vol. 574, Issue 7778). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1654-9>
- Kraushaar, D. C., & Zhao, K. (2013). The epigenomics of embryonic stem cell differentiation. *International Journal of Biological Sciences*, *9*(10), 1134–1144.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.7998>
- Kurazumi, H., Hosoyama, T., & Hamano, K. (2017). Cell therapy for ischemic heart disease. *Therapeutic Angiogenesis*, *February*, 81–98. <https://doi.org/10.1007/978->

Lara Velloso. (2015). *DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS ESTROMALES DE TEJIDO ADIPOSO DE RATA PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS CON FENOTIPO OLIGODENDROGLIAL.*

Lau, L. W., Cua, R., Keough, M. B., Haylock-Jacobs, S., & Yong, V. W. (2013). Pathophysiology of the brain extracellular matrix: A new target for remyelination. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(10), 722–729. <https://doi.org/10.1038/nrn3550>

Lee, C. T., Bendriem, R. M., Kindberg, A. A., Worden, L. T., Williams, M. P., Drgon, T., Mallon, B. S., Harvey, B. K., Richie, C. T., Hamilton, R. S., Chen, J., Errico, S. L., Tsai, S. Y. A., Uhl, G. R., & Freed, W. J. (2015). Functional consequences of 17q21.31/WNT3-WNT9B amplification in hPSCs with respect to neural differentiation. *Cell Reports*, 10(4), 616–632. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.050>

Li, L., Song, L., Liu, C., Chen, J., Peng, G., Wang, R., Liu, P., Tang, K., Rossant, J., & Jing, N. (2015). Ectodermal progenitors derived from epiblast stem cells by inhibition of Nodal signaling. *Journal of Molecular Cell Biology*, 7(5), 455–465. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv030>

Liu, X. Y., Yang, L. P., & Zhao, L. (2020). Stem cell therapy for alzheimer's disease. *World Journal of Stem Cells*, 12(8), 787–802. <https://doi.org/10.4252/WJSC.V12.I8.787>

Long, K. L. P., Breton, J. M., Barraza, M. K., Perloff, O. S., & Kaufer, D. (2021). Hormonal regulation of oligodendrogenesis i: Effects across the lifespan.

Biomolecules, 11(2), 1–36. <https://doi.org/10.3390/biom11020283>

Lu, Y., Qu, H., Qi, D., Xu, W., Liu, S., Jin, X., Song, P., Guo, Y., Jia, Y., Wang, X., Li, H., Li, Y., & Quan, C. (2019). OCT4 maintains self-renewal and reverses senescence in human hair follicle mesenchymal stem cells through the downregulation of p21 by DNA methyltransferases. *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1120-x>

McNeely, K. C., & Dwyer, N. D. (2021). Cytokinetic Abscission Regulation in Neural Stem Cells and Tissue Development. *Current Stem Cell Reports*, 7(4), 161–173. <https://doi.org/10.1007/s40778-021-00193-7>

McPhie, D. L., Nehme, R., Ravichandran, C., Babb, S. M., Ghosh, S. D., Staskus, A., Kalinowski, A., Kaur, R., Douvaras, P., Du, F., Ongur, D., Fossati, V., Eggan, K., & Cohen, B. M. (2018). Oligodendrocyte differentiation of induced pluripotent stem cells derived from subjects with schizophrenias implicate abnormalities in development. *Translational Psychiatry*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0284-6>

Méndez-Maldonado, K., Vega-López, G. A., Aybar, M. J., & Velasco, I. (2020). Neurogenesis From Neural Crest Cells: Molecular Mechanisms in the Formation of Cranial Nerves and Ganglia. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(August). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00635>

Mercurio, S., Serra, L., & Nicolis, S. K. (2019). More than just stem cells: Functional roles of the transcription factor Sox2 in differentiated glia and neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/ijms20184540>

- Mira, H., & Morante, J. (2020). Neurogenesis From Embryo to Adult – Lessons From Flies and Mice. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(June), 1–20.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00533>
- Mistri, T. K., Kelly, D., Mak, J., Colby, D., Mullin, N., & Chambers, I. (2020). *Characterisation of interactions between the pluripotency transcription factors Nanog, Oct4 and Sox2*. <https://doi.org/10.1101/2020.06.24.169185>
- Miyamoto, N., & Wada, H. (2013). Hemichordate neurulation and the origin of the neural tube. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3713>
- Moreno, C. L., & Mobbs, C. V. (2017). Epigenetic mechanisms underlying lifespan and age-related effects of dietary restriction and the ketogenic diet. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 455, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.11.013>
- Moris, N., Pina, C., & Arias, A. M. (2016). Transition states and cell fate decisions in epigenetic landscapes. *Nature Reviews Genetics*, 17(11), 693–703.
<https://doi.org/10.1038/nrg.2016.98>
- Mossahebi-Mohammadi, M., Quan, M., Zhang, J. S., & Li, X. (2020). FGF Signaling Pathway: A Key Regulator of Stem Cell Pluripotency. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(February), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00079>
- Obernier, K., & Alvarez-Buylla, A. (2019). Neural stem cells: Origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Development (Cambridge)*, 146(4).
<https://doi.org/10.1242/dev.156059>
- Ottoboni, L., von Wunster, B., & Martino, G. (2020). Therapeutic Plasticity of Neural

Stem Cells. *Frontiers in Neurology*, 11(March).

<https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00148>

Park, C. S., Lewis, A., Chen, T., & Lacorazza, D. (2019). Concise Review: Regulation of Self-Renewal in Normal and Malignant Hematopoietic Stem Cells by Krüppel-Like Factor 4. *Stem Cells Translational Medicine*, 8(6), 568–574.

<https://doi.org/10.1002/sctm.18-0249>

Perlman, K., Couturier, C. P., Yaqubi, M., Tanti, A., Cui, Q. L., Pernin, F., Stratton, J. A., Ragoussis, J., Healy, L., Petrecca, K., Dudley, R., Srour, M., Hall, J. A., Kennedy, T. E., Mechawar, N., & Antel, J. P. (2020). Developmental trajectory of oligodendrocyte progenitor cells in the human brain revealed by single cell RNA sequencing. *GLIA*, 68(6), 1291–1303. <https://doi.org/10.1002/glia.23777>

Petersen, M. A., Ryu, J. K., Chang, K., Etxeberria, A., Mendiola, A. S., Kamau-devers, W., Fancy, S. P. J., Thor, A., Bushong, E. A., Baeza-rajá, B., Syme, C. A., Wu, M. D., Coronado, P. E. R., Meyer-franke, A., Yahn, S., Pous, L., Jae, K., Schachtrup, C., Lassmann, H., ... Han, M. H. (2018). Fibrinogen activates BMP signaling in oligodendrocyte progenitor cells and inhibits remyelination after vascular damage. *Neuron*, 96(5), 1003–1012. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.008>. Fibrinogen

Pimentel-Parra, G. A., & Murcia-Ordoñez, B. (2017). Células madre, una nueva alternativa médica. *Perinatología y Reproducción Humana*, 31(1), 28–33.

<https://doi.org/10.1016/j.rprh.2017.10.013>

Pluripotent Stem Cells - MeSH - NCBI. (n.d.). Retrieved December 10, 2022, from

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh?Db=mesh&Cmd=DetailsSearch&Term=%22Plu>

ripotent+Stem+Cells%22%5BMeSH+Terms%5D

Rahim, F., Arjmand, B., Shirbandi, K., Payab, M., & Larijani, B. (2018). Stem cell therapy for patients with diabetes: A systematic review and meta-analysis of metabolomics-based risks and benefits. *Stem Cell Investigation*, 5(November). <https://doi.org/10.21037/sci.2018.11.01>

Rasband, M. N., & Peles, E. (2015). *The Nodes of Ranvier : Molecular Assembly and Maintenance*. 1–16.

Reiche, L., Küry, P., & Göttle, P. (2019). Aberrant oligodendrogenesis in down syndrome: Shift in gliogenesis? *Cells*, 8(12), 4–8. <https://doi.org/10.3390/cells8121591>

Ribeiro, L. F., Verpoort, B., & de Wit, J. (2018). Trafficking mechanisms of synaptogenic cell adhesion molecules. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 91(January), 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.04.003>

Rivron, N. C., Frias-Aldeguer, J., Vrij, E. J., Boisset, J. C., Korving, J., Vivié, J., Truckenmüller, R. K., Van Oudenaarden, A., Van Blitterswijk, C. A., & Geijsen, N. (2018). Blastocyst-like structures generated solely from stem cells. *Nature*, 557(7703), 106–111. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0051-0>

Rodriguez-Fraticelli, A. E., Weinreb, C., Wang, S. W., Migueles, R. P., Jankovic, M., Usart, M., Klein, A. M., Lowell, S., & Camargo, F. D. (2020). Single-cell lineage tracing unveils a role for TCF15 in haematopoiesis. *Nature*, 583(7817), 585–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2503-6>

- Ruiz, M. A., Junior, R. L. K., Piron-Ruiz, L., Peña-Arciniegas, T., Saran, P. S., & De Quadros, L. G. (2018). Hematopoietic stem cell transplantation for Crohn's disease: Gaps, doubts and perspectives. *World Journal of Stem Cells*, *10*(10), 134–137. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v10.i10.134>
- Savatier, P., & Malashicheva, A. (2004). Cell-Cycle Control in Embryonic Stem Cells. In *Handbook of Stem Cells* (Vol. 1). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-012436643-5/50014-6>
- Schwartz, N. B., & Domowicz, M. S. (2018). Proteoglycans in brain development and pathogenesis. *FEBS Letters*, *592*(23), 3791–3805. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13026>
- Sedaghat, F., Cheraghpour, M., Hosseini, S. A., Pourvali, K., Teimoori-Toolabi, L., Mehrtash, A., Talaei, R., & Zand, H. (2019). Hypomethylation of NANOG promoter in colonic mucosal cells of obese patients: A possible role of NF-κB. *British Journal of Nutrition*, *122*(5), 499–508. <https://doi.org/10.1017/S000711451800212X>
- Senft, A. D., Bikoff, E. K., Robertson, E. J., & Costello, I. (2019). Genetic dissection of Nodal and Bmp signalling requirements during primordial germ cell development in mouse. *Nature Communications*, *10*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09052-w>
- Shahriyari, L., & Komarova, N. L. (2013). Symmetric vs. asymmetric stem cell divisions: an adaptation against cancer? *PloS One*, *8*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076195>
- Sharma, S., & Bhonde, R. (2020). Genetic and epigenetic stability of stem cells:

- Epigenetic modifiers modulate the fate of mesenchymal stem cells. *Genomics*, 112(5), 3615–3623. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.04.022>
- Shi, J., Shi, W., Ni, L., Xu, X., Su, X., Xia, L., Xu, F., Chen, J., & Zhu, J. (2013). OCT4 is epigenetically regulated by DNA hypomethylation of promoter and exon in primary gliomas. *Oncology Reports*, 30(1), 201–206. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2456>
- Simon, M. J., & Iliff, J. J. (2016). Regulation of cerebrospinal fluid (CSF) flow in neurodegenerative, neurovascular and neuroinflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1862(3), 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.014>
- Smith, L. R., Cho, S., & Discher, D. E. (2018). Stem cell differentiation is regulated by extracellular matrix mechanics. *Physiology*, 33(1), 16–25. <https://doi.org/10.1152/physiol.00026.2017>
- Smith, P., Azzam, M., & Hinck, L. (2017). *Asymmetric Cell Division in Development, Differentiation and Cancer*. 61, 351–373. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-53150-2>
- Son, J., Tae, J.-Y., Min, S., Ko, Y., & Park, J.-B. (2020). Fibroblast growth factor-4 maintains cellular viability while enhancing osteogenic differentiation of stem cell spheroids in part by regulating RUNX2 and BGLAP expression. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2013–2020. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8951>
- Song, I., & Dityatev, A. (2018). Crosstalk between glia, extracellular matrix and neurons. *Brain Research Bulletin*, 136, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.03.003>

- Sonntag, K. C., Song, B., Lee, N., Jung, J. H., Cha, Y., Leblanc, P., Neff, C., Kong, S. W., Carter, B. S., Schweitzer, J., & Kim, K. S. (2018). Pluripotent stem cell-based therapy for Parkinson's disease: Current status and future prospects. *Progress in Neurobiology*, 168(2010), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.04.005>
- Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K. I., Chang, E. F., Gutierrez, A. J., Kriegstein, A. R., Mathern, G. W., Oldham, M. C., Huang, E. J., Garcia-Verdugo, J. M., Yang, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*, 555(7696), 377–381. <https://doi.org/10.1038/nature25975>
- Spector, R., Keep, R. F., Robert Snodgrass, S., Smith, Q. R., & Johanson, C. E. (2015). A balanced view of choroid plexus structure and function: Focus on adult humans. *Experimental Neurology*, 267, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.02.032>
- Stadelmann, C., Timmler, S., Barrantes-Freer, A., & Simons, M. (2019). Myelin in the central nervous system: Structure, function, and pathology. *Physiological Reviews*, 99(3), 1381–1431. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2018>
- Steinhart, Z., & Angers, S. (2018). Wnt signaling in development and tissue homeostasis. *Development (Cambridge, England)*, 145(11), 1–8. <https://doi.org/10.1242/dev.146589>
- Tong, Z., Seira, O., Casas, C., Reginensi, D., Homs-Corbera, A., Samitier, J., & Del Río, J. A. (2014). Engineering a functional neuro-muscular junction model in a chip.

RSC Advances, 4(97), 54788–54797. <https://doi.org/10.1039/c4ra10219c>

Traiffort, E., Zakaria, M., Laouarem, Y., & Ferent, J. (2016). *Hedgehog : A Key Signaling in the Development of the Oligodendrocyte Lineage or neonatal. Figure 1*, 1–20.

<https://doi.org/10.3390/jdb4030028>

van Holde, K. E., & Zlatanova, J. (2018). Development and Differentiation. *The Evolution of Molecular Biology*, 135–147. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812917-3.00013-9>

Vella, M. C., & Slack, F. J. (2005). *C. elegans* microRNAs. In *WormBook : the online review of C. elegans biology* (pp. 1–9). <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.26.1>

Verheggen, I. C. M., Van Boxtel, M. P. J., Verhey, F. R. J., Jansen, J. F. A., & Backes, W. H. (2018). Interaction between blood-brain barrier and glymphatic system in solute clearance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 90(October 2017), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.03.028>

Vieira, M. S., Santos, A. K., Vasconcellos, R., Goulart, V. A. M., Parreira, R. C., Kihara, A. H., Ulrich, H., & Resende, R. R. (2018). Neural stem cell differentiation into mature neurons: Mechanisms of regulation and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 36(7), 1946–1970.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.08.002>

Weider, M., Starost, L. J., Groll, K., Küspert, M., Sock, E., Wedel, M., Fröb, F., Schmitt, C., Baroti, T., Hartwig, A. C., Hillgärtner, S., Piefke, S., Fadler, T., Ehrlich, M., Ehlert, C., Stehling, M., Albrecht, S., Jabali, A., Schöler, H. R., ... Wegner, M. (2018). Nfat/calcineurin signaling promotes oligodendrocyte differentiation and

myelination by transcription factor network tuning. *Nature Communications*, 2018(MARCH), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03336-3>

Xie, Y., & Dorsky, R. I. (2017). Development of the hypothalamus: Conservation, modification and innovation. *Development (Cambridge)*, 144(9), 1588–1599. <https://doi.org/10.1242/dev.139055>

Xu, L., & Jiang, H. (2020). Writing and Reading Histone H3 Lysine 9 Methylation in Arabidopsis. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00452>

Xu, Z., Robitaille, A. M., Berndt, J. D., Davidson, K. C., Fischer, K. A., Mathieu, J., Potter, J. C., Ruohola-Baker, H., & Moon, R. T. (2016). Wnt/ β -catenin signaling promotes self-renewal and inhibits the primed state transition in naïve human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(42), E6382–E6390. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613849113>

Yang, H. M., Kim, J. Y., Cho, H. J., Lee, J. E., Jin, S., Hur, J., Kwon, Y. W., Seong, M. W., Choi, E. K., Lee, H. Y., Lee, H. S., Jeon, M., Kim, J., Yang, J., Oh, S., Suh, K. S., Yoon, S. S., Kim, K. B., Oh, B. H., ... Kim, H. S. (2020). NFATc1+CD31+CD45– circulating multipotent stem cells derived from human endocardium and their therapeutic potential. *Biomaterials*, 232, 119674. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119674>

Yanhong Shi, Haruhisa Inoue, Joseph C. Wu, and S. Y. (2019). Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–

148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>

York, J. R., & McCauley, D. W. (2020). The origin and evolution of vertebrate neural crest cells. *Open Biology*, *10*(1). <https://doi.org/10.1098/rsob.190285>

Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Research and Therapy*, *10*(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>

Zhang, Y., Lu, X. Y., Casella, G., Tian, J., Ye, Z. Q., Yang, T., Han, J. J., Jia, L. Y., Rostami, A., & Li, X. (2019). Generation of oligodendrocyte progenitor cells from mouse bone marrow cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*(June), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00247>

Zhou, P., Xu, P., Guan, J., Zhang, C., Chang, J., Yang, F., Xiao, H., Sun, H., Zhang, Z., Wang, M., Hu, J., & Mao, Y. (2020). Promoting 3D neuronal differentiation in hydrogel for spinal cord regeneration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *194*(June), 111214. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111214>



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

Cert. FCNET/DIP/M-007-23

A QUIEN CONCIERNA

La Suscrita directora de la Dirección de Investigación y Postgrado, de la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, de la Universidad de Panamá.

CERTIFICA QUE:

El Dr. Diego Reginensi, fue Asesor (director) de la Tesis del estudiante José Thomas del programa de Maestría en Ciencias Biológicas con Énfasis en Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología. La misma fue sustentada el viernes 16 de diciembre de 2022 a las 10:00am de manera virtual.

Título de tesis: **"Diferenciación de oligodendrocitos, a partir de células madre neurales, en sistemas de microfluidica: una estrategia in vitro para la comprensión del proceso de mielinización del sistema nervioso central"**.

Atentamente,

Dra. Magaly de Chial
Directora
Dirección de Investigación y Postgrado



Dado en la Ciudad Universitaria "Octavio Méndez Pereira" a los cinco (5) días del mes de enero del dos mil veintitrés (2023).

2022: "45 Años de los Tratados Torrijos Carter"
Ciudad Universitaria Octavio Méndez Pereira
Estafeta Universitaria, Panamá, Rép. De Panamá
Tel.:(507)523-6246 / dipmaestria.facinet@up.ac.pa