



Programa de doctorado en Biotecnología, Medicina y
Ciencias Biosanitarias

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES DE PLACENTA PARA SU EMPLEO
EN TERAPIAS AVANZADAS**

Elvira Herrero de Laorden

Directora:

Maite Iglesias Badiola

Pozuelo de Alarcón (Madrid), 2024

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis trata, en parte, de regeneración y elongación. Algo de eso hay también en todo el camino recorrido para su realización. Porque regenerarse, se ha regenerado y elongarse, se ha elongado. La tesis ha vivido un par de presidentes de gobierno, otros tantos papas, una pandemia y varias Champions League del Real Madrid. No obstante, una de las ventajas de que haya abarcado casi un 20% de mi vida es que he tenido el tiempo suficiente como para agradecer (a mi manera) a casi todas, sino todas, las personas que me han acompañado, ayudado y apoyado de una forma u otra en todo el proceso. Ya lo decía mi madre, que es de bien nacido ser agradecido. Todavía sigo sorprendiéndome de cómo os habéis organizado todos para preguntarte habitualmente: "Pichu, ¿y la tesis para cuándo?" Así que aprovecho estas líneas para volver a dar las gracias por vuestra empatía y tolerancia a la intensidad con la que, en general, vivo todo. Confío en que todos sintáis como vuestro parte de este trabajo, porque lo es. A partir de ahora podréis estar más tranquilos, porque empieza mi postdoc.

En primer lugar, gracias a mi directora de tesis, la Dra. Maite Iglesias, por confiar en mí y porque siempre has sabido que sería capaz de llegar hasta el final. Me has mostrado que la vida es una sucesión de retos, que a los experimentos se los pregunta y ellos responden y que es imprescindible poner los controles correctos. Gracias por empujarme y por hacer que no me pare y siga mejorando. Gracias a la UFV y la Escuela Internacional de Doctorado por la beca que he disfrutado y que me ha permitido realizar una estancia en Londres y compatibilizar mi trabajo con la realización de la tesis doctoral.

Ya desde los primeros años he tenido la suerte de contar con personas que me han ayudado. Gracias Dr. Cruz Santos, porque fuiste el primero que vio en mí la posible investigadora que llevaba dentro y me diste la oportunidad de empezar a trabajar en un laboratorio de investigación. Me has enseñado que trabajar bien y con alegría y humor es necesario y complementario y que así, los experimentos salen mejor y se disfruta más, que es de lo que se trata. A la Dra. Pilar Martín-Duque, por su primer empujón y al grupo de la Dra. Gunnel Halldén (Gunnel, Stella, Beta). I am deeply grateful to for your early encouragement and for warmly welcoming me into your lab.

A todos en el grupo de la Dra. Mayte Moreno y el Dr. Javier Sierra, por vuestro interés y cariño. Gracias Mayte no solo por la sabiduría enciclopédica que atesoras y la facilidad que tienes para explicarme las cosas, sino sobre todo por tu disponibilidad y por nuestros abrazotes que animan, felicitan, reconfortan y de los que es difícil despegarse. Gracias Kari. Aunque no tengas madera de docente, Portela, me has enseñado mucho más estos años que yo a ti en los 10 días en el Research. Por supuesto a Diana, la mitad de Diana Simon y

Vivi Garfunkel. No tengo ninguna duda de que sin ti y tus gafas, no hubiera terminado el proyecto a tiempo. Gracias por tantas ratas y ratos, por tu disponibilidad, ánimo y risas.

Gracias a los Drs. Pedro de Villa y Santiago Milla. Un agradecimiento enorme, Pedro, por acogernos con tanto interés y cariño a nosotras y a nuestro proyecto, por tus consejos y porque cada vez que aparecías, surgía un potencial. Gracias Santi por tu saber hacer, por la minuciosidad y rigurosidad con la que trabajáis. No sabía lo que significaba el concepto paciencia hasta que trabajamos en la electrofisiología. Te deseo mucha suerte en tus proyectos, porque lo mereces.

A las personas que han ido apareciendo a lo largo del tiempo. Gracias a todos en la UFV y en Facultad de CC Experimentales, porque ahí todos los días sale el sol, Compañeira chipirón. Muy especialmente a la SAL de mi vida, Protonita, Grande y Mellén, porque me habéis regalado lo que más vale en este mundo, vuestro tiempo. A Esterplanina, a Vallebenítez, que desde hace meses le huelo a doctora, Bonnin, Microl, Isa, Posada, MonteroMontero, Geilan, Águeda, Colinas, Sara, Bea, Dani *Hala Madrid* García, de los Monks, Marta, Rufus, Perezván, Berren, Calzada, por los ánimos constantes de Relimpio, a Pepa (hay un antes y un después) y todos en el Instituto de Investigaciones Biosanitarias UFV, Tarduchy y su deltadeltaceté, al departamento de Posgrado y Consultoría, a Crispin y al equipo de técnicos de laboratorio que me han salvado la vida varias veces (Carol, Bettina Fries, Patrizia, Sonia&Selena). Una línea especial a Gloria de Envigo, por su humor, porque llegó a apetecerme encargarte ratas.

Gracias Arroyo por nuestras conversaciones, que son en la mayoría de los casos sesiones de coaching personal que me enseñan a mirar las cosas desde las otras perspectivas que yo sola rara vez veo. Sigo buscando tu punto, Noe, y el porqué de que seas tan majuca conmigo. Haces fácil lo difícil, eres grande y sabes mucho, igualita que los helados Regma. ¡El manuscrito! He barajado la posibilidad de empezar otra tesis para que no te jubiles, Tolona y sigas dándonos lecciones de vida a todos. No pongas tu cara de estupefacción, que solo lo estoy barajando. Gracias de corazón, Pereda, porque, aunque me boicotees en los scape room, tu don para el dibujo ha subido mucho el nivel de las figuras de este trabajo. A los andaluces de Badajoz, Dani y Alicia, muy difícil no quererlos, majos.

Se me marca una enorme sonrisa cuando les llega el turno a mis yin y yan, Pozuelo y Grueso. Mil gracias porque me habéis mantenido la cara de la pala alta estos últimos meses.

La verdad es que Trani, no sabía bien dónde ponerte, si en la sección trabajo o en la personal, si al inicio de todo o en tus correcciones finales, porque has estado siempre y en todos los lados. Paradójicamente, me faltan las palabras. Gracias apañera.

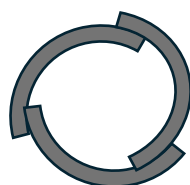
A los Amigotes todos de mi Segovia natal (Rohita, Eva María, Susoman, Iván, Juanan, Mer, Cristo, Gabi, Linda, Toño). Gracias y perdón, porque habéis estado ahí aun cuando os he descuidado mucho un montón. Me ha llegado todo el ánimo y la ilusión que me habéis enviado por Guadarrama y Somosierra, Laurita y Mari. Sólo os ha faltado poner os a escribir conmigo. Poco "transcuye" según nos gustaría, pero sé que podrás, Mari. A mis chicas segovianas, So y Pau, por estar desde hace más de 30 años presentes y pendientes. Se os quiere más que a la lunita de enero. A los Amigos Invisibles, que también he descuidado un poco mucho, pero habéis perdonado mis ausencias y mis presencias: López, Óscar y su tropa, Lucía, Yustres, Deivid, Tosti, Delia y Jose. A la Valponasca y la familia salesiana. Recé y confié en María Auxiliadora y, hala, otro milagro a la lista.

Gracias a Pérez-Leirós, Jota y Little Ines por incluirme en vuestra familia. Brindo por la alegría de vivir y disfrutar en el convento con Sorteó, Sortija y Sorpresa. Gracias, hermanas. Como no podía ser de otra manera, a mi inefable compañera de Compaun, Araceli Avendaño (y familia). Si ya lo sabías tú, que el vino era para que me lo bebiera. Y que no hacen falta unos buenos ojos para ver la vida llena de color. Solo hay que poner corazón, humor, ilusión y no dejar de soñar. Ñameseginalehu, Agüen.

A mis hombres favoritos Jus, Alejandro, Andrés y Guille, y a Salvaó y Marta. De alguna manera entendéis que es importante para mí y os habéis preocupado y ocupado de que supiera que no hay resultado experimental mejor que abrir la puerta y veros al otro lado sonriendo. Horus, de ti también me acuerdo, que eres uno más de nosotros.

Mis hermanos Hor y Alfon. Al igual que se lo dije a mamá, también os lo digo a vosotros: si Dios me hubiera preguntado, os habría elegido como hermanos mayores. Es imposible que me sienta sola o triste con vosotros orbitando a mi alrededor. Porque me cuidáis, me chincháis, me regañáis, me animáis y os reis de mí cuando toca. Todavía alucino de que sigáis contando conmigo para jugar con vosotros.

Por último, mamá. Eres la razón por la que esta tesis ha visto la luz. He cumplido mi palabra, como me enseñaste. Pero recuérdame que, la próxima vez que prometa algo, cuente hasta diez antes. Solo espero que, desde donde estás, hoy sonrías más que nunca, con Marujita, y estéis orgullosas. Solo así habrá merecido la pena.



ABREVIATURAS

AMP	Péptidos antimicrobianos	<i>Antimicrobial Peptides</i>
AMS	Atrofia multisistémica	
ASC	Células madre adultas	<i>Adult Stem Cells</i>
AT-MSC	Células madre mesenquimales/células mesenquimales estromales derivadas de tejido adiposo	<i>Adipose Tissue derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells</i>
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
bFGF	Factor básico de crecimiento de fibroblastos	<i>Basic Fibroblastic Growth Factor</i>
BM-MSC	Células madre mesenquimales/células mesenquimales estromales de médula	<i>Bone Marrow Mesenchymal Stromal/Stem Cells</i>
BMP	Proteína morfogenética de hueso	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
CCR	Receptor de quimioquinas	<i>Chemokine receptor</i>
CCL5	Ligando 5 de quimiocina (motivo CC)	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i>
CCL8	Ligando 8 de quimiocina (motivo CC)	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 8</i>
CD	Grupos de diferenciación	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFU-F	Unidades fibroblásticas formadoras de colonias	<i>Colony-Forming Unit Fibroblast</i>
CGR	Células ganglionares de la retina	
CNTF	Factor neurotrófico ciliar	<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>
CXCL12	Ligando 12 de quimiocina (motivo CXC)	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 12</i>
CXCR	Receptor C-X-C de quimioquinas	<i>C-X-C chemokine receptor</i>
DC	Célula dendrítica	<i>Dendritic Cell</i>
EGF	Factor de crecimiento endotelial	<i>Endotelial Growth Factor</i>
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica	
EPR	Epitelio pigmentario de la retina	
ESC	Células madre embrionarias	<i>Embryonic Stem Cells</i>
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos	<i>Fibroblast Growth Factor</i>

GDNF	Factor neurotrófico derivado de glía	<i>Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor</i>
GEO	Glía Envoltente Olfativa	
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
hAF	Fluido amniótico humano	<i>human Amniotic Fluid</i>
hAFSC	Células madre de fluido amniótico humano	<i>human Amniotic Fluid Stem Cells</i>
hAF-MSC	Células madre mesenquimales/células mesenquimales estromales de fluido amniótico humano	<i>human Amniotic Fluid Mesenchymal Stromal/Stem Cells</i>
hAEC	Células madre del epitelio amniótico	<i>human Amniotic Epithelial Cells</i>
hAMSC	Células madre mesenquimales/células mesenquimales estromales de membrana amniótica humana	<i>human Amniotic Mesenchymal Stromal/Stem Cells</i>
hAT-MSC	Células madre mesenquimales/células mesenquimales estromales de tejido adiposo humano	<i>human Adipose Tissue derived Mesenchymal Stromal Cells</i>
hBM-MSC	Células madre mesenquimales/células mesenquimales estromales de médula ósea humana	<i>human Bone Marrow Mesenchymal Stromal/Stem Cells</i>
hCMSC	Células madre mesenquimales/células mesenquimales estromales de membrana coriónica humana	<i>human Chorionic Mesenchymal Stromal/Stem Cells</i>
hCV-MSC	Células madre mesenquimales/células mesenquimales estromales de vellosidades coriónicas humanas	<i>human Chorionic Villi Mesenchymal Stromal/Stem Cells</i>
hDB-MSC	Células madre mesenquimales/células mesenquimales estromales de la decidua basal humana	<i>human Decidua Basalis Mesenchymal Stromal/Stem Cells</i>
hDP-MSC	Células madre mesenquimales/células mesenquimales estromales de la decidua parietal humana	<i>human Decidua Parietalis Mesenchymal Stromal/Stem Cells</i>
hESC	Células madre embrionarias humanas	<i>human Embryonic Stem Cells</i>
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HIF	Factor de transcripción inducible por hipoxia	<i>Hypoxia-Inducible Factor</i>
hiPSC	Células madre pluripotentes inducidas humanas	<i>human induced Pluripotent Stem Cells</i>
HLA	Antígeno leucocitario humano	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HRE	Elemento de Respuesta a Hipoxia	<i>Hypoxia-Response Element</i>

HSC	Células madre hematopoyéticas	<i>Hematopoyetic Stem Cells</i>
hUCB-MSC	Células madre mesenquimales/células mesenquimales estromales de sangre del cordón umbilical humana	<i>human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stromal/Stem Cells</i>
hUCVEC-MSC	Células madre mesenquimales/células mesenquimales estromales del subendotelio de la vena y arterias de cordón umbilical	<i>human Umbilical Cord Vein Endotelial Cells Mesenchymal Stromal/Stem Cells</i>
hWJC-MSC	Células madre mesenquimales/células mesenquimales estromales de la gelatina de Wharton humana	<i>human Wharton's jelly Mesenchymal Stromal/Stem Cells</i>
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenasa	<i>Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1</i>
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IL-1 α	Interleucina-1 α	<i>Interleukin-1α</i>
IL-2	Interleucina-2	<i>Interleukin-2</i>
IL-6	Interleucina-6	<i>Interleukin-6</i>
IL-8	Interleucina-8	<i>Interleukin-8</i>
IL-10	Interleucina-10	<i>Interleukin-10</i>
IL-12	Interleucina-12	<i>Interleukin-12</i>
iPSC	Células madre pluripotentes inducidas	<i>induced Pluripotent Stem Cells</i>
ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular y Génica	<i>International Society for Cell & Gene Therapy</i>
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos	<i>Keratinocyte Growth Factor</i>
LIF	Factor inhibidor de leucemia	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
MA	Mesodermo Amniótico	
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos	<i>Colony stimulating factor</i>
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMP	Metaloproteinasa de la matriz	<i>Matrix metalloproteinase</i>
MSC	Células madre mesenquimales/células mesenquimales estromales	<i>Mesenchymal Stromal/Stem Cells</i>
mTOR	Diana de rapamicina de mamíferos	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>

NF-M	Neurofilamento M	
NGF	Factor de crecimiento nervioso	<i>Nerve Growth Factor</i>
NK	Células natural killer	<i>Natural killer</i>
NO	Óxido nítrico	<i>Nitric Oxide</i>
NOS	Óxido nítrico sintasa	<i>Nitric Oxide Synthase</i>
NSC	Células madre neurales	<i>Neural Stem Cells</i>
NT	Neurotrofinas	<i>Neurotrophins</i>
NT3	Neurotrofina	<i>Neurotrophin 3</i>
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehído	
PGE ₂	Prostaglandina E ₂	<i>Prostaglandin E₂</i>
PHD	Prolil-hidroxilasas	<i>Prolyl hydroxylases</i>
PLL	Poli-L-lisina	
PSC	Células madre pluripotentes	<i>Pluripotent Stem Cells</i>
RIN	Número de integridad de ARN	<i>RNA Integrity Number</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SDF-1 α	Factor 1 α derivado de células estromales	<i>Stromal cell-Derived Factor 1α</i>
SNC	Sistema Nervioso Central	
SNP	Sistema Nervioso Periférico	
SSEA-1, 3 y 4	antígenos embrionarios 1, 3 y 4 específicos de estadio	<i>Stage-Specific Embryonic Antigens 1, 3 y 4</i>
SV2A	Proteína de vesículas sinápticas 2A	<i>Synaptic Vesicle Protein 2A</i>
T _d	Tiempo de duplicación	
TERT	Telomerasa transcriptasa inversa	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>

TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante beta 1	<i>Transforming Growth Factor-β1</i>
TIMPs	Inhibidores tisulares de metaloproteinasa	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
TNF α	Factor de necrosis tumoral α	<i>Tumour Necrosis Factor α</i>
TNT	Nanotubos de efecto túnel	<i>Tunneling nanotubes</i>
TRA-1-60, TRA-1-81	Antígenos de rechazo a tumor	<i>Tumor Reject Antigen</i>
Trk	Receptores tirosina kinasa relacionadas con tropomiosina	<i>Tropomyosin Receptor Kinase</i>
VCAM-1	Proteína de adhesión celular vascular 1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
VE	Vesículas extracelulares	
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular	<i>Vascular Endotelial Growth Factor</i>
VGSC	Canales de sodio activados por voltaje	<i>Voltage-gated sodium channels</i>
VHL	Proteína Von Hippel-Lindau	<i>Von Hippel-Lindau protein</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Clasificación de las células madre en función de su potencial de diferenciación	26
Figura 2	Fuentes de MSC en tejidos perinatales y adultos	32
Figura 3	Regulación de la transcripción por HIF en normoxia e hipoxia	34
Figura 4	Efectos paracrinos de las MSC y sus vesículas extracelulares	37
Figura 5	Estructura de la placenta humana a término y localizaciones de las MSC perinatales	42
Figura 6	Estructura de la membrana amniótica	43
Figura 7	Potencial de diferenciación de las hAMSC	47
Figura 8	Efectos inmunomoduladores de las hAMSC	51
Figura 9	Síntesis, procesamiento y secreción de precursores y neurotrofinas e interacción con sus receptores Trk y vías de señalización activadas	54
Figura 10	Estructura de la retina de vertebrados	60
Figura 11	Modelo de estudio de regeneración axonal mediada por las hAMSC	76
Figura 12	Caracterización morfológica de las hAMSC	88
Figura 13	Inmunofenotipo de las hAMSC	89
Figura 14	Estudio de la capacidad de diferenciación de las hAMSC a los tres linajes mesodérmicos	90
Figura 15	Análisis de expresión de marcadores mesenquimales y moléculas de adhesión	91
Figura 16	Expresión del marcador epitelial E-cadherina en las hAMSC	92
Figura 17	Expresión de marcadores neuronales y de células gliales en las hAMSC	93
Figura 18	Expresión de marcadores de pluripotencia	94
Figura 19	Dinámica de proliferación de las hAMSC <i>in vitro</i>	96
Figura 20	Evaluación de la capacidad de migración <i>in vitro</i> de las hAMSC	98
Figura 21	Evaluación de la capacidad neuroregenerativa de las hAMSC mediante co-cultivos con CGR axotomizadas de rata adulta	100
Figura 22	Evaluación del efecto de factores neurotróficos secretados por las hAMSC en neuroregeneración	103
Figura 23	Síntesis de factores neurotróficos por las hAMSC	105

Figura 24	Secreción de factores neurotróficos por las hAMSC	108
Figura 25	Efecto de la neutralización de factores neurotróficos en la neurorregeneración mediada por las hAMSC	111
Figura 26	Estudio del estado de desarrollo de axones regenerados	112
Figura 27	Estudio del estado de maduración de axones regenerados	113
Figura 28	Expresión y localización de canales de sodio dependientes de voltaje en axones regenerados	114
Figura 29	Estudio de las propiedades eléctricas de los axones regenerados	116

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Fenotipo de las hAMSC indiferenciadas	45
Tabla 2	Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la detección de marcadores mesenquimales, epiteliales y neurales	75
Tabla 3	Anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas intracelulares	80
Tabla 4	Anticuerpos utilizados para la evaluación de la neurorregeneración mediante inmunofluorescencia	81
Tabla 5	Anticuerpos utilizados para la evaluación de la maduración axonal mediante inmunofluorescencia	82

RESUMEN Y ABSTRACT

RESUMEN

En las últimas décadas, las células madre mesenquimales o células mesenquimales estromales (MSC) se han convertido en la piedra angular de la terapia celular, debido a sus características únicas. Las MSC derivadas de membrana amniótica humana (hAMSC) son fáciles de aislar, produciendo un gran número de células mediante técnicas no invasivas que no conllevan problemas éticos. Nuestros resultados muestran las cualidades de las hAMSC que las convierten en candidatas ideales para estudios en medicina regenerativa. Presentan un alto potencial proliferativo y de diferenciación, además de una elevada habilidad para migrar a focos de lesión. Por otra parte, el mantenimiento de estas células en concentraciones bajas de oxígeno *in vitro* favorece significativamente el despliegue de estas características.

Los estudios clásicos de Ramón y Cajal pusieron de manifiesto la limitada capacidad regenerativa de las neuronas del Sistema Nervioso Central (SNC), lo que representa un desafío en el tratamiento de lesiones y enfermedades neurodegenerativas. Antes de la implementación *in vivo* o los ensayos clínicos, es esencial determinar *in vitro* la capacidad neuroregenerativa de las poblaciones celulares que se utilizarían en la terapia celular. Mediante un modelo de co-cultivos *in vitro* de hAMSC y células ganglionares de retina (CGR) de rata adulta axotomizadas, hemos demostrado la capacidad de las hAMSC para estimular la regeneración neuronal promoviendo el crecimiento de axones tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia. También hemos determinado los factores neurotróficos expresados y secretados por las hAMSC en ambas concentraciones de oxígeno. De esta forma hemos confirmado que la capacidad regenerativa de las hAMSC es dependiente del contacto celular y del efecto de factores secretados al medio. Además, para confirmar el éxito de nuestra aproximación terapéutica, hemos analizado la actividad fisiológica de las neuronas regeneradas. Utilizando la técnica de *patch clamp* para estudiar las corrientes iónicas en células vivas aisladas individuales, hemos confirmado que en nuestro modelo las neuronas regeneradas son electrofisiológicamente activas en ambas condiciones de cultivo.

El potencial regenerador de axones de las hAMSC ofrece una vía prometedora para el abordaje de lesiones de la retina o, en general, del SNC. Además, nuestros resultados abren la posibilidad de utilizar estas células en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson o en trastornos neurodegenerativos visuales. Profundizando en el conocimiento de los mecanismos que regulan la regeneración neuronal y aprovechando el potencial terapéutico de las MSC y su preconditionamiento en hipoxia, podrían desarrollarse enfoques terapéuticos más eficaces y personalizados para promover la reparación y el crecimiento de los tejidos nerviosos dañados.

ABSTRACT

In the last decades, mesenchymal stromal cells (MSC) have become the cornerstone of cell therapy due to their unique characteristics. Human amniotic membrane-derived MSC (hAMSC) are easy to isolate, yielding a large number of cells through non-invasive techniques that pose no ethical issues. Our results highlight the qualities of hAMSC that make them ideal candidates for regenerative medicine studies. They exhibit high proliferative and differentiation potential, along with a significant ability to migrate to injury sites. Maintaining these cells in low oxygen concentrations *in vitro* significantly enhances these properties.

Classical studies by Ramón y Cajal revealed the limited regenerative capacity of neurons in the Central Nervous System (CNS) which presents a challenge in the treatment of injuries and neurodegenerative diseases. Before *in vivo* implementation or future clinical trials, it would be essential to determine *in vitro* the neuroregenerative capacity of the cell populations that would be used in cell therapy. Using an *in vitro* co-culture model of hAMSC and axotomized adult rat retinal ganglion cells (RGC), we demonstrated the ability of hAMSC to stimulate neuronal regeneration by promoting axonal growth under both normoxic and hypoxic conditions. We also identified the neurotrophic factors expressed and secreted by hAMSC under both oxygen concentrations. Thus, we confirmed that the regenerative capacity of hAMSC is cell contact-dependent and secreted factors-dependent. Additionally, we analyzed the physiological activity of the regenerated neurons. Using the patch clamp technique to study ionic currents in isolated living cells, we confirmed that in our model, the regenerated neurons are electrophysiologically active under both culture conditions.

The axonal regenerative potential of hAMSC offers a promising avenue for addressing retinal injuries or, more broadly, CNS injuries. Moreover, our results open the possibility of using these cells as therapy in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's, as well as in visual neurodegenerative disorders. By deepening our understanding of the mechanisms that regulate neuronal regeneration and leveraging the therapeutic potential of MSC and their preconditioning in hypoxia, more effective and personalized therapeutic approaches could be developed to promote the repair and growth of damaged nervous tissues.

ÍNDICE

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	25
1.1	TERAPIAS AVANZADAS: TERAPIA CELULAR	25
1.2	CÉLULAS MADRE	25
1.3	CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES MULTIPOTENTES	28
1.3.1	Concepto biológico: perspectiva histórica y definición	28
1.3.2	Criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular y Génica	29
1.3.3	Ontogenia y origen de las MSC	30
1.3.4	Nicho y localización anatómica	31
1.3.5	Hipoxia	32
1.3.6	Características de MSC para su empleo en terapia celular	34
1.4	LA PLACENTA HUMANA COMO FUENTE DE MSC	39
1.4.1	Estructura de la placenta humana	39
1.4.2	Células mesenquimales estromales de placenta humana	40
1.5	CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES DE MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA (hAMSC)	42
1.5.1	Marcadores de expresión de hAMSC	45
1.5.2	Aplicaciones terapéuticas de las hAMSC (Características de las hAMSC para su empleo en terapia celular)	46
1.6	REPARACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE MAMÍFEROS	52
1.6.1	Factores neurotróficos potenciales para la neuroprotección y regeneración de SNC	53
1.6.2	Terapia celular en patologías del Sistema Nervioso Central	56
1.6.3	Aplicación de las hAMSC en neuroregeneración	57
1.6.4	Sistema visual como modelo de estudio de regeneración de SCN	58
1.6.5	La retina	59
1.6.6	Las células ganglionares de la retina	60
1.6.7	Modelo de reparación de nervio óptico	61
2	OBJETIVOS	65
3	MATERIALES Y MÉTODOS	69
3.1	CULTIVOS CELULARES	69
3.1.1	Mantenimiento de células en cultivo	69
3.1.2	Líneas celulares	69
3.2	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES DE MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA	70
3.2.1	Caracterización fenotípica	70
3.2.2	Expresión de marcadores de superficie mediante citometría de flujo	70
3.2.3	Diferenciación celular	71
3.3	EXPRESIÓN DE MARCADORES DE PLURIPOTENCIA MEDIANTE RT-PCR	72
3.4	ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR	73
3.5	ENSAYOS DE MOVILIDAD CELULAR <i>IN VITRO</i> – “HERIDA EN PLACA”	74
3.6	INMUNOFLUORESCENCIA DE MARCADORES MESENQUIMALES, EPITELIALES Y NEURALES	74

3.7	EVALUACIÓN DE LA REGENERACIÓN AXONAL	76
3.7.1	Co-cultivos directos de hAMSC y GEO con neuronas ganglionares de retina de rata adulta	76
3.7.2	Co-cultivos indirectos de hAMSC y GEO con neuronas ganglionares de retina de rata adulta (sistema transwell)	77
3.7.3	Evaluación de la regeneración axonal producida por medios condicionados	78
3.7.4	Anticuerpos bloqueantes de factores neurotróficos	78
3.7.5	Inmunodetección de factores neurotróficos y factor inducido por hipoxia	79
3.7.6	Cuantificación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento nervioso (NGF) y neurotrofina 3 (NT-3)	80
3.7.7	Cuantificación de la capacidad neurorregenerativa de hAMSC	81
3.8	ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE LOS AXONES REGENERADOS	82
3.8.1	Detección de la expresión de vesículas sinápticas maduras y canales de sodio activados por voltaje	82
3.8.2	Electrofisiología	83
3.9	Análisis estadístico	83
4	RESULTADOS	87
4.1	CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA	87
4.1.1	Caracterización de hAMSC como MSC	87
4.1.2	Expresión de otros marcadores epiteliales, mesenquimales, neuronales y moléculas de adhesión	90
4.1.3	Expresión de marcadores de pluripotencia	93
4.1.4	Proliferación celular y tiempo de duplicación	94
4.1.5	Análisis de la capacidad migratoria <i>in vitro</i>	97
4.2	EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD NEURORREGENERATIVA DE hAMSC	98
4.2.1	Evaluación del potencial neurorregenerador de hAMSC mediante co-cultivos directos	99
4.3	ESTUDIO DEL MECANISMO DE NEURORREGENERACIÓN MEDIADA POR hAMSC	102
4.3.1	Evaluación del potencial neurorregenerador de hAMSC mediante co-cultivos indirectos (sistema Transwell) y medios condicionados	102
4.3.2	Expresión intracelular de factores neurotróficos por hAMSC	104
4.3.3	Secreción de factores neurotróficos por hAMSC	107
4.3.4	Análisis del papel de los factores neurotróficos secretados por hAMSC en la neurorregeneración	110
4.4	ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE LOS AXONES REGENERADOS	112
4.4.1	Estudio de la maduración de axones regenerados	112
4.4.2	Detección de la expresión y localización de canales de sodio dependientes de voltaje	114
4.4.3	Electrofisiología de los axones regenerados	115
5	DISCUSIÓN	119
6	CONCLUSIONES	141
7	BIBLIOGRAFÍA	145
8	ANEXOS	177

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 TERAPIAS AVANZADAS: TERAPIA CELULAR

Las terapias avanzadas son aproximaciones innovadoras que emplean genes (terapia génica), células (terapia celular) o tejidos (ingeniería de tejidos). Representan actualmente la vanguardia de la medicina moderna, desplegando un gran potencial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y tratamientos personalizados de patologías para las que no se dispone de terapias efectivas (Chancellor et al., 2023).

La terapia celular se ha consolidado como una prometedora terapia avanzada para tratar una amplia variedad de enfermedades y lesiones crónicas, abarcando desde la medicina regenerativa hasta la inmunoterapia y el tratamiento del cáncer. Se fundamenta en la idea revolucionaria de transferir material celular a un paciente con el objetivo de reparar, reemplazar o regenerar la función de células o tejidos dañados (Golchin & Farahany, 2019). Este material celular puede ser de origen autólogo, alogénico, singénico o xenogénico, y puede consistir en células madre o células diferenciadas. Las diversas aproximaciones terapéuticas se desarrollan utilizando tratamientos unicelulares, multicelulares o mediante vesículas extracelulares. Además, la terapia puede incluir la manipulación celular previa o la modificación por ingeniería genética. Por último, las vías de administración abarcan desde aplicaciones tópicas, inyecciones, infusiones locales o sistémicas, hasta la posibilidad del empleo de andamiajes o plataformas biocompatibles (El-Kadiry et al., 2021).

Actualmente, la terapia celular se centra en el empleo de células madre y sus derivados por su capacidad única para autorrenovarse, diferenciarse en diversos tipos celulares y secretar una amplia variedad de moléculas y factores tróficos (Hoang et al., 2022).

1.2 CÉLULAS MADRE

En la actualidad, existe un relativo consenso en la definición de célula madre, aunque no exento de controversia. Las células madre o células troncales son células autorrenovables, con potencial clonogénico, capaces de división simétrica y asimétrica, de origen embrionario, fetal o adulto, no especializadas y con la habilidad de diferenciarse a todos o muchos tipos celulares (Cai et al., 2004; Zipori, 2005; Bacakova et al., 2018; El-Kadiry et al., 2021).

INTRODUCCIÓN

Existen en la literatura dos formas de clasificación de las células madre. Por un lado, teniendo en cuenta su origen o la fase del desarrollo del que proceden, podemos hablar de células madre embrionarias, fetales o adultas. Y, por otro, atendiendo a su capacidad de originar células especializadas, las células madre pueden ser toti, pluri, multi, oligo o unipotentes. El aspecto que determina a cuántos tipos celulares se puede diferenciar una célula madre se denomina potencial de diferenciación.

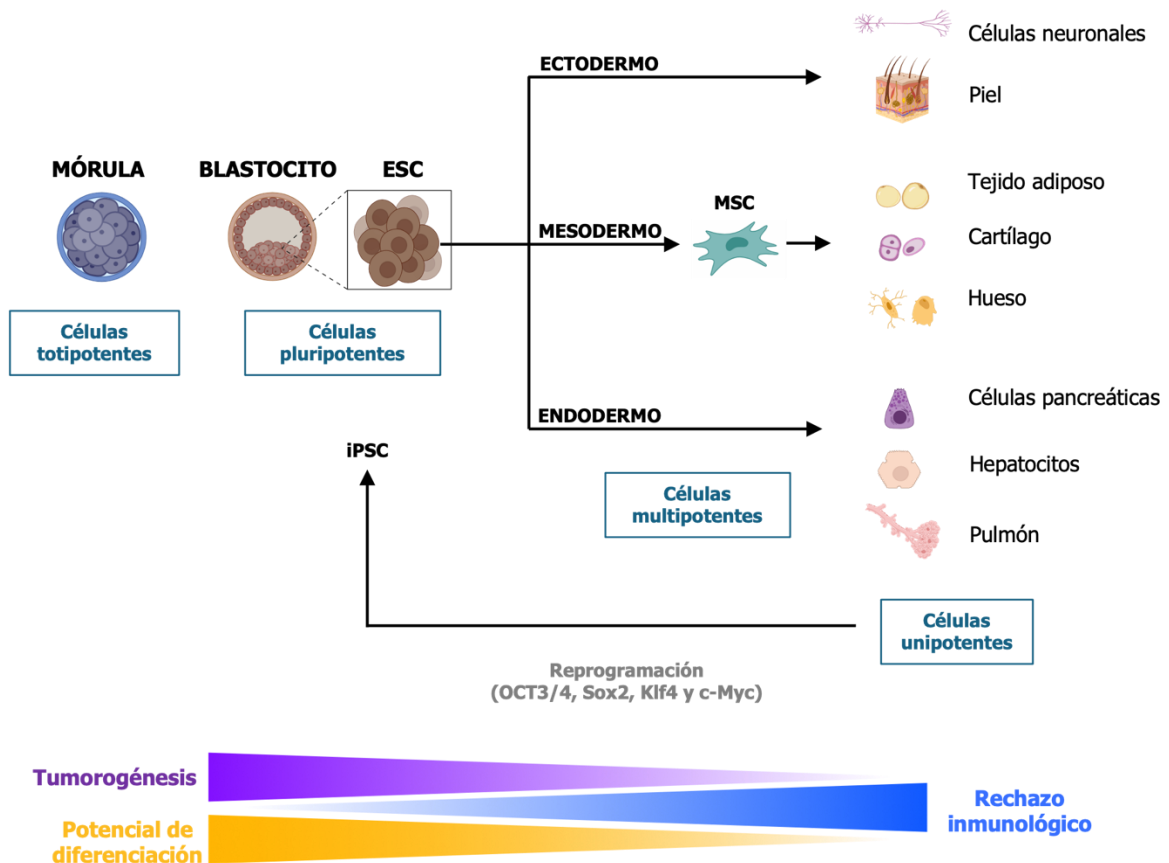


Figura 1: Clasificación de células madre en función de su potencial de diferenciación. Representación esquemática de los diferentes tipos de células madre en orden decreciente de potencial de diferenciación: células totipotentes (mórula), células pluripotentes (células de la masa interna del blastocito e iPSC, del inglés, *induced pluripotent stem cells*), células multipotentes, entre las que se encuentran MSC (del inglés, *mesenchymal stromal/stem cells*) y las células diferenciadas (unipotentes). El potencial de diferenciación disminuye progresivamente según avanza la especialización celular. El riesgo de tumorigénesis y de rechazo inmunológico al ser administradas a un paciente varían de manera inversa. Adaptado de Hoang et al., 2022.

El potencial de diferenciación (**figura 1**) implica un proceso jerárquico continuo, en el que la habilidad de diferenciación y la capacidad de autorrenovación se van reduciendo progresivamente (Zakrzewski et al., 2019; El-Kadiry et al., 2021). Así, comenzando con

el estado de totipotencia (mayor grado), el potencial se va restringiendo secuencialmente a pluripotencia, multipotencia, oligopotencia y, finalmente, a células unipotentes, que presentan un limitado número de divisiones y sólo pueden originar su propio tipo celular (Zakrzewski et al., 2019; El-Kadiry et al., 2021).

El cigoto y las células que forman el embrión pre-implantacional en los 2-3 primeros días tras la fecundación o mórula (denominadas blastómeros) son las únicas células totipotentes que existen, ya que son capaces de originar todos los tipos celulares, tanto embrionarios como extraembrionarios, es decir, son capaces de originar un individuo adulto completo. Sin embargo, en sentido estricto, a los blastómeros no se les puede considerar células madre, ya que no poseen la capacidad de autorrenovación.

Las células madre pluripotentes (PSC, del inglés, *pluripotent stem cells*) se definen como células autorrenovables con la habilidad de diferenciarse a todas las células de las tres líneas germinales embrionarias. Dicho de otro modo, dan lugar a todas las células de un embrión, pero, a diferencia de las células totipotentes, no a todas las células necesarias para el desarrollo de un embrión.

Las primeras líneas de células madre pluripotentes embrionarias humanas (hESC, del inglés, *human embryonic stem cells*), derivadas de la masa celular interna del blastocito pre-implantacional, fueron obtenidas en 1998 por el grupo de James Thomson (Thomson et al., 1998). Aunque la pluripotencia ocurre de manera natural únicamente en las ESC (del inglés, *embryonic stem cells*), es posible inducir experimentalmente el paso del estado pluripotente a células diferenciadas. Este proceso se conoce como reprogramación y consiste en convertir células somáticas diferenciadas en líneas iPSC (del inglés, *induced pluripotent stem cells*) capaces de originar todos los tipos celulares de un organismo. El grupo liderado por Shinya Yamanaka generó células madre pluripotentes artificiales de células somáticas adultas y embrionarias de ratón y humanas, mediante la expresión de los factores de transcripción OCT3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc (Takahashi & Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). Desde entonces, las hiPSC (del inglés, *human induced pluripotent stem cells*) han sido empleadas para el estudio de la patogénesis de numerosas enfermedades, así como para el desarrollo de nuevas drogas y terapias celulares personalizadas (El-Kadiry et al., 2021; Hoang et al., 2022).

1.3 CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES MULTIPOTENTES

El impulso que sufrió la terapia celular después del descubrimiento de las células madre pluripotentes (hESC e iPSC) se vio frenado por los problemas éticos y técnicos derivados del uso de estos tipos celulares. Esto condujo a la comunidad científica a la búsqueda de nuevas fuentes alternativas de células madre en tejidos adultos y perinatales.

Las células madre adultas o somáticas (ASC, del inglés, *adult stem cells*), también llamadas células madre de tejido o células madre postnatales, son células no diferenciadas multipotentes que se encuentran distribuidas, en un estado quiescente, entre las células especializadas en tejidos y órganos del individuo desarrollado. Su capacidad de auto-renovación y diferenciación es más limitada que las iPSC, restringiéndose al linaje tisular del que proceden. Recae sobre ellas la función del mantenimiento de la homeostasis tisular, el reemplazamiento de células muertas, el crecimiento de tejido y la cicatrización en respuesta a daño o enfermedad (Pessina & Gribaldo, 2006; Choumerianou et al., 2008; Alison & Islam, 2009; Barker et al., 2010; Clevers & Watt, 2018).

De entre las ASC, las más estudiadas son las células madre hematopoyéticas (HSC, del inglés, *hematopoietic stem cells*) y las células madre mesenquimales/células mesenquimales estromales multipotentes (MSC, del inglés, *mesenchymal stromal/stem cells*). Las células madre multipotentes encontradas en médula ósea ocupan un lugar destacado en cuanto a su conocimiento y aplicación, ya que se utilizan en clínica desde los años 60 (Choumerianou et al., 2008).

1.3.1 Concepto biológico: perspectiva histórica y definición

En 1968, el científico ruso Alexander Friedenstein identificó una población de células en la médula ósea de roedores y cobayas que originaban, *in vitro*, colonias clónicas de células adherentes con morfología fibroblástica, capaces, además, de generar tejido óseo y reticular *in vivo* al ser trasplantadas heterotópicamente. Denominó a estas células unidades fibroblásticas formadoras de colonias (CFU-F, del inglés, *colony-forming unit fibroblast*) (Friedenstein et al., 1968). Más tarde, el mismo grupo describió que estas CFU-F originadas a partir de una única célula (clónicas) tenían la capacidad, además de diferenciación osteogénica, de originar tejido adiposo y condrogénico en cultivo (Friedenstein et al., 1974). En 1999, Pittinger refirió la presencia en la médula ósea de humanos de una subpoblación de células estromales multipotentes capaces de generar

colonias individuales con habilidad de diferenciación a las tres líneas mesenquimales (Pittenger et al., 1999). Desde entonces, se han sucedido las publicaciones sobre el aislamiento y cultivo de células de la fracción estromal de multitud de tejidos de diferentes especies con las mismas propiedades de expansión y diferenciación *in vitro* a los tres linajes mesodérmicos que las referidas por Friedenstein y Pittinger (Nombela-Arrieta et al., 2011).

El término “célula madre mesenquimal” (MSC, del inglés, *mesenchymal stem cell*) fue acuñado por primera vez por Arnold Caplan en 1991 (Caplan, 1991). A lo largo de los años, el acrónimo MSC ha servido para referirse a diferentes significados, como células madre mesenquimales, células mesenquimales estromales o células estromales multipotentes. Mientras que la noción original de MSC se refería específicamente a las células estromales de médula ósea (BM-MSC, del inglés, *bone marrow mesenchymal stromal cells*), el sentido actual se ha extendido para incluir a células de otras localizaciones y, de hecho, de casi todos los tejidos conectivos postnatales. Esta es la definición que se ha establecido y perdurado durante décadas para investigadores y clínicos. Sin embargo, es inexacta y continúa, aún hoy, generando debate (Bianco et al., 2008, 2010; Keating, 2012; Wakitani et al., 2023).

Con el objetivo de clarificar la terminología existente, la Sociedad Internacional de Terapia Celular y Génica (ISCT, del inglés, *International Society for Cell & Gene Therapy*) ha definido oficialmente las MSC como células estromales mesenquimales multipotentes, lo que sugiere que se trata de la fracción adherente del estroma de tejidos (Horwitz et al., 2005; Dominici et al., 2006).

1.3.2 Criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular y Génica

Los criterios mínimos establecidos por el Comité de Células Madre Mesenquimales y de Tejido (*Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee*) de la ISCT con el objetivo de estandarizar el aislamiento y la identificación de MSC son (Dominici et al., 2006):

- Adherencia a superficie y morfología fibroblástica en cultivos *in vitro*.
- Expresión positiva ($\geq 95\%$) de los marcadores de superficie CD105, CD73 y CD90 y expresión negativa ($\leq 2\%$) de los marcadores de superficie CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 y HLA-II (sin estimulación por IFN γ).
- Potencial de diferenciación *in vitro* a los tres linajes mesodérmicos: osteogénesis, adipogénesis y condrogénesis.

INTRODUCCIÓN

La expresión de estos marcadores no es homogénea, ya que varía en función del origen celular, el método de aislamiento y los procedimientos de cultivo. En cualquier caso, son válidos para explicar el fenotipo de las células cultivadas *in vitro* y no tienen por qué ser representativos de las MSC *in vivo*. Si estas características son mostradas por las MSC *in vivo* o, por el contrario, son un artefacto producto de la manipulación es, hoy en día, una incógnita por resolver (Nombela-Arrieta et al., 2011; Murray et al., 2014; Fitzsimmons et al., 2018).

1.3.3 Ontogenia y origen de las MSC

El mesénquima es el tejido conectivo embrionario, formado por células derivadas de la tercera línea germinal o mesodermo. Durante el desarrollo embrionario, estas células se dispersan por todo el embrión dando lugar al tejido conectivo de los órganos adultos. Este proceso de migración y diferenciación está confirmado por la expresión en estos órganos de marcadores como vimentina, laminina $\beta 1$, fibronectina y osteopontina, que son característicos de las células del mesodermo durante el desarrollo embrionario (Andrzejewska et al., 2019).

En la literatura se hipotetiza un origen dual de las MSC: por un lado, un origen mesodérmico y, por otro, un origen en la cresta neural (ectodérmico). Dado su potencial de diferenciación mesenquimal, parece lógico sugerir que poblaciones de MSC deriven de precursores mesodérmicos, como los mesenquimoangioblastos de la aorta dorsal embrionaria (Vodyanik et al., 2010; Murray et al., 2014). En ratones, estos mesenquimoangioblastos no expresan nestina (marcador de progenitores neurales), proliferan intensamente y forman el esqueleto. Sin embargo, hasta el momento, no han sido identificados ni caracterizados los precursores mesodérmicos inmediatos que dan lugar a líneas de MSC multipotentes (Murray et al., 2014; Andrzejewska et al., 2019).

Por otro lado, trabajos sobre neuroepitelio en embriones murinos apuntan a la cresta neural y neuroectodermo embrionarios como posible origen de las MSC. Células Sox1 positivas derivadas de neuroepitelio embrionario expresan nestina, no se dividen y en el adulto contribuyen al nicho de las HSC (Takashima et al., 2007). Hallazgos similares se han reportado de embriones de codornices, pollo y rata (Fitzsimmons et al., 2018; Andrzejewska et al., 2019). Esto explicaría la capacidad de las MSC de diferenciarse a células neurales. Estos datos parecen indicar, además, que estas células Sox1⁺ son las primeras en aparecer en el embrión, surgiendo posteriormente las derivadas del mesodermo. En el caso de humanos, esta hipótesis está sustentada por experimentos

que demuestran que hESC diferenciadas *in vitro* hacia un fenotipo de células de la cresta neural pueden originar neuronas y glía cuando se cultivan en condiciones libres de suero, mientras que, si se cultivan en medio que contiene suero, dan lugar a células con un fenotipo similar a MSC, capaces de diferenciarse a células mesodérmicas (Murray et al., 2014; Fitzsimmons et al., 2018).

1.3.4 Nicho y localización anatómica

Desde su primera descripción en 1999 (Pittenger et al., 1999), se han aislado MSC de la mayoría, sino de todos, los tejidos adultos (**figura 2**). El hecho de que se hayan obtenido MSC de un elevado número de tejidos adultos sugiere la idea de un nicho ubicuo y común en el organismo. Algunas evidencias apuntan a que las MSC se sitúan cerca de vasos sanguíneos y constituyen una subpoblación de pericitos o células murales de capilares y vénulas (Fitzsimmons et al., 2018; Murray et al., 2014). Crisan *et al.*, en 2008, mostró que pericitos aislados mediante citometría de flujo de diferentes órganos humanos (NG2⁺, CD146⁺ y PDGFR-β⁺) y cultivados *in vitro* eran indistinguibles de las BM-MSc convencionales en términos de morfología, proliferación, expresión de antígenos de superficie y potencial de diferenciación *in vitro* e *in vivo* (Crisan et al., 2008; Caplan, 2008; Nombela-Arrieta et al., 2011; Murray et al., 2014). Además, ambos tipos celulares, pericitos y MSC, comparten muchos antígenos de superficie. Sin embargo, no todos los pericitos son MSC y no todas las MSC derivan de pericitos (Nombela-Arrieta et al., 2011; Andrzejewska et al., 2019).

Además del origen perivascular, se ha demostrado que células aisladas de la túnica adventicia (capa más externa) de arterias y venas CD34⁺, CD31⁻, CD146⁻, CD45⁻ muestran un perfil antigénico y potencial de diferenciación similar a MSC (Corselli et al., 2012; Murray et al., 2014).

Los progenitores vasculares de las MSC parecen estar organizados jerárquicamente, siendo las células adventicias una población más "primitiva", con mayor tasa de proliferación, que expresan genes asociados con pluripotencia, como *Nanog*, *c-Myc*, *Klf2*, *-4*, *-6* y actuarían como precursores de los pericitos, diferenciándose a éstos en condiciones adecuadas. No se han encontrado otras poblaciones con el potencial de dar lugar a MSC en cultivo (Pittenger et al., 1999; Corselli et al., 2012; Andrzejewska et al., 2019).

INTRODUCCIÓN

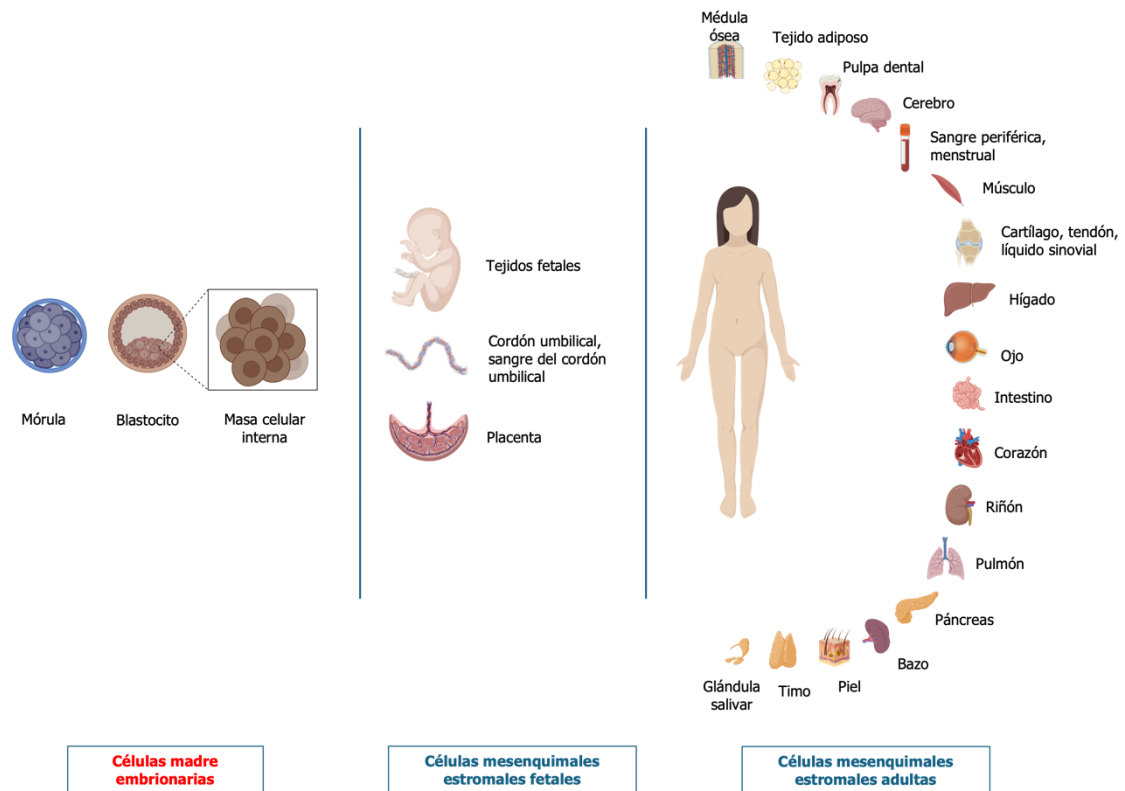


Figura 2: Fuentes de MSC en tejidos perinatales y adultos. Localizaciones anatómicas de diferentes tipos de células madre y mesenquimales en diversas etapas de desarrollo embrionario y en tejidos adultos. Las ESC y FSC forman la mórula y la masa celular interna del blastocito, respectivamente. Las células mesenquimales estromales fetales se localizan en tejidos perinatales como la membrana amniótica, el cordón umbilical (gelatina de Wharton) y la placenta. Las células mesenquimales estromales de tejidos adultos se localizan en multitud de tejidos del individuo adulto. Elaboración propia mediante BioRender.

1.3.5 Hipoxia

De manera habitual, los cultivos de MSC se mantienen en condiciones consideradas como normóxicas, con una concentración de oxígeno del 21%, que corresponde con la del aire inhalado. Sin embargo, esta concentración es significativamente superior a la de los nichos naturales de MSC, donde, a pesar de ser, en su mayoría, adyacentes a regiones perivasculares, las concentraciones de oxígeno son bajas. En tejidos humanos adultos, la concentración de oxígeno varía dependiendo de la vascularización del órgano y el tipo de microambiente, desde regiones profusamente irrigadas como riñones (4%-14%) o zonas de limitada vascularización como la retina o cerebro (1%-5%). La media de la concentración de oxígeno en tejidos humanos es del 3% (Mohyeldin et al., 2010; Haque et al., 2013).

Así pues, desde el punto de vista molecular, las condiciones fisiológicas normales, con concentraciones de oxígeno del orden del 2-9%, son en realidad condiciones de hipoxia, ya que desencadenan una respuesta molecular conservada. Esta respuesta molecular incluye factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF, del inglés, *hypoxia-inducible factor*), canales iónicos sensibles al oxígeno, prolil-hidroxilasas (PHD, del inglés, *prolyl-hydroxylases*), la diana de rapamicina de mamíferos (mTOR) de detección ambiental y la respuesta al estrés del retículo endoplásmico. De entre ellos, los HIF son los reguladores principales de la adaptación celular a la hipoxia (Haque et al., 2013; Samal et al., 2021).

Los HIF son heterodímeros, formados por una subunidad alfa sensible a oxígeno (HIF- α , HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α ,) y una subunidad beta (HIF-1 β). En condiciones de concentración alta de oxígeno, HIF-1 α es sintetizado y degradado rápidamente. Esta degradación de HIF-1 α dependiente de oxígeno es realizada por el proteasoma. En condiciones de hipoxia, la ausencia de oxígeno permite la estabilización y acumulación de HIF- α , que se transloca al núcleo, donde dimeriza con HIF- β . El heterodímero se une a los elementos de respuesta a hipoxia (HRE, del inglés, *hypoxia-response elements*) y regula la transcripción de al menos 70 genes diana, involucrados en homeostasis de oxígeno, metabolismo (de la glucosa, del hierro), angiogénesis, invasión y metástasis (**figura 3**) (Mohyeldin et al., 2010; Haque et al., 2013; Park et al., 2013).

Respecto a las MSC, la gran variabilidad existente en las condiciones de los estudios realizados hace difícil elaborar conclusiones generales del efecto de la hipoxia sobre su biología y el impacto que ejerce para su aplicación en la clínica. Existen marcadas diferencias respecto a los protocolos de aislamiento y cultivo de MSC (especie, donante) y las diferentes condiciones experimentales empleadas, como el método de generación de hipoxia, el tiempo de exposición a ésta y la concentración de oxígeno (Fehrer et al., 2007; Holzwarth et al., 2010; Kwon et al., 2017; Martinez et al., 2017; Ren et al., 2006; Samal et al., 2021).

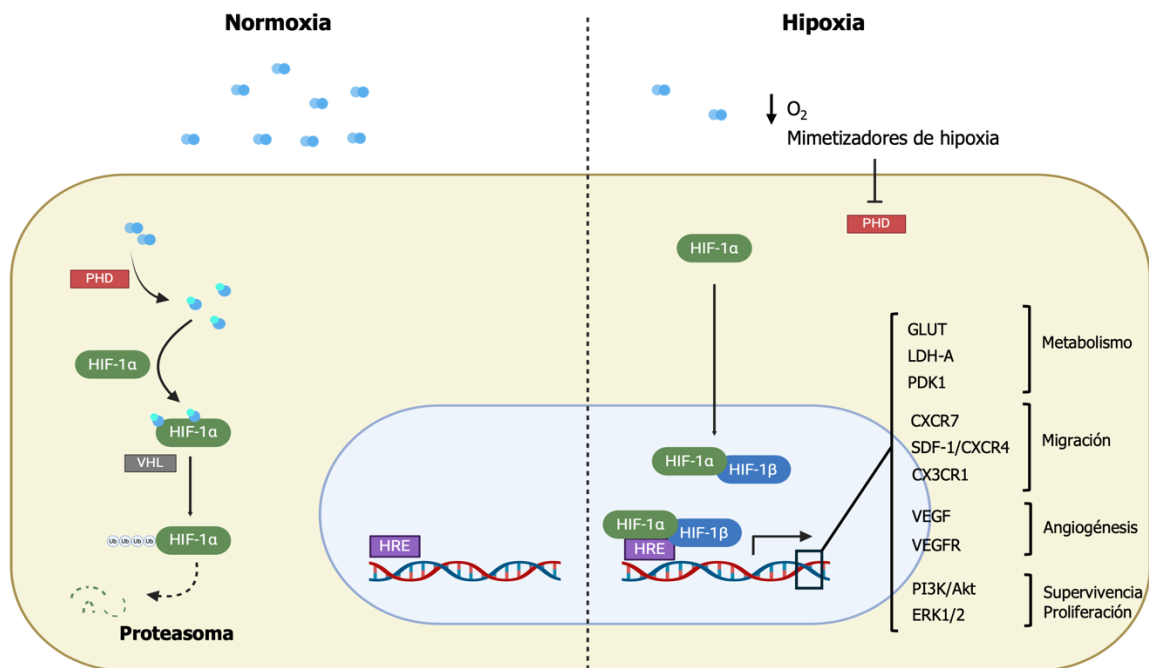


Figura 3: Regulación de la transcripción por HIF en normoxia e hipoxia.

Representación esquemática de la estabilización y activación del factor inducible por hipoxia (HIF) en condiciones de normoxia (izquierda) e hipoxia (derecha). En condiciones normóxicas (21% O₂), HIF- α es hidroxilado por las prolil-hidroxilasas (PHD), lo que permite su reconocimiento por el complejo von Hippel-Lindau (VHL) y su subsecuente degradación en el proteasoma. Bajo condiciones hipóxicas (<5% O₂ o mediante el empleo de moléculas mimetizadoras de hipoxia), la hidroxilación de HIF- α se inhibe, permitiendo su acumulación y translocación al núcleo, donde dimeriza con HIF- β y se une a los elementos de respuesta a hipoxia (HRE), activando la transcripción de genes diana y diferentes vías celulares. Elaboración propia mediante BioRender.

Los resultados revisados en la literatura muestran que las MSC son capaces de adaptarse a entornos hipóxicos. La concentración baja de oxígeno juega un papel regulador en la biología de las MSC que, de alguna manera, influye en la proliferación, mantenimiento de la autorrenovación, diferenciación celular, secretoma y capacidad de migración a lugares de lesión (Ren et al., 2006; Fehrer et al., 2007; Hass et al., 2011; Zeng et al., 2011; Martinez et al., 2017; Zhang et al., 2019).

1.3.6 Características de MSC para su empleo en terapia celular

1.3.6.1 Diferenciación

La medicina regenerativa tiene como objeto la reparación y regeneración de un tejido u órgano, evitando su reemplazo, mediante la sustitución de células dañadas por otras

completamente funcionales. La capacidad de diferenciación de las MSC a los tres linajes mesodérmicos se confirma de manera rutinaria *in vitro* mediante procedimientos estandarizados y optimizados, lo que las hace ser candidatas ideales para estas aproximaciones terapéuticas.

Además, bajo condiciones controladas de cultivo, en presencia de factores de crecimiento y suplementos específicos, las MSC pueden ser diferenciadas a tipos celulares de las tres líneas germinales. De hecho, se han descrito diferenciaciones a tejido muscular (cardiomiocitos, mioblastos, tenocitos), tejidos endodérmicos (hepatocitos y células β pancreáticas) y tejidos ectodérmicos (neuronas y células gliales). Sin embargo, la comunidad científica expresa cierto escepticismo sobre la transdiferenciación de MSC, por la baja frecuencia que se alcanza y la escasa funcionalidad de las células obtenidas (Fitzsimmons et al., 2018; Andrzejewska et al., 2019; Naji et al., 2019).

El potencial de diferenciación de las MSC *in vivo* aún se desconoce y los trabajos publicados, en general, no lo incluyen en la caracterización. Sería recomendable su estudio, ya que proporcionaría una mejor visión del potencial y de su comportamiento en un contexto clínico (Phinney & Prockop, 2007; Nombela-Arrieta et al., 2011; Brown et al., 2019).

1.3.6.2 Migración

El efecto terapéutico de las MSC, como agentes medicinales o como vehículos de moléculas terapéuticas, depende de su habilidad para migrar a la zona de lesión, adherirse e injertarse en un tejido concreto (Musiał-Wysocka, Kot, & Majka, 2019).

Numerosos estudios ponen de manifiesto las propiedades quimiotácticas mostradas por las MSC (Belmar-Lopez et al., 2013). Sin embargo, existe evidencia de que muchas MSC se quedan atrapadas en pulmón tras ser administradas por infusión intravenosa sistémica, lo que puede disminuir su efecto terapéutico y originar efectos secundarios como embolias pulmonares (Hoang et al., 2022).

Los resultados publicados parecen apuntar a que el mecanismo por el cual las MSC se dirigen e insertan en lugares de lesión es similar al exhibido por leucocitos. El mecanismo de acción propuesto incluye quimiotaxis, adhesión, rodamiento, diapédesis y migración

INTRODUCCIÓN

intersticial, aunque debe ser descrito más en detalle (Musiał-Wysocka, Kot, & Majka, 2019; Naji et al., 2019).

El tropismo de las MSC viene determinado por la expresión de factores de crecimiento y sus receptores (EGF, VEGF, FGF, PDGF, HGF, TGF- β 1, TNF α , SDF-1 α , IL-6, IL-8; IGF-1), moléculas de adhesión, receptores de quimioquinas (CCR2, 3, 4, 7 y 10 y CXCR4, 5 y 6) y metaloproteinasas como MMP1, 3 y 9 (Musiał-Wysocka, Kot, & Majka, 2019; Naji et al., 2019; Hoang et al., 2022). Además, los tejidos lesionados, con frecuencia isquémicos o hipóxicos, expresan factores humorales específicos, como citoquinas y quimioquinas, que actúan como quimioatrayentes facilitando la migración, adhesión e infiltración de las MSC. Las MSC expuestas a condiciones de cultivo hipóxicas muestran un fenotipo más migratorio que las células mantenidas en normoxia (Mohyeldin et al., 2010).

La llegada de las MSC al sitio de lesión no tiene por qué conllevar el injerto de éstas en la zona dañada. En general, los resultados de los que se dispone hasta el momento parecen indicar una baja supervivencia a largo plazo de las MSC en sitios de lesión. Algunos autores apuntan la fusión de MSC con células endógenas *in situ* como explicación a este hecho (Delorme et al., 2006).

La capacidad de migración e inserción de las MSC se ve influenciada por varios factores, entre los que se encuentran la fuente de origen de las MSC, la edad del donante, las condiciones de cultivo *in vitro*, número de pases, método de administración y receptibilidad del donante (Musiał-Wysocka, Kot, & Majka, 2019; Belmar-López et al., 2022).

1.3.6.3 Efectos paracrinosis y yuxtacrinosis. Vesículas extracelulares y exosomas

Experimentos de trasplante de MSC en animales han concluido que, al contrario de lo que se había asumido inicialmente, los efectos terapéuticos observados no pueden ser explicados únicamente por el potencial de diferenciación a tipos celulares concretos por parte de las células administradas. Las MSC ejercen sus efectos, una vez trasplantadas, a través de su secretoma, más allá de la inmunomodulación, y de interacciones célula-célula (yuxtacrino). En la **figura 4** se muestra una ilustración con los principales efectos paracrinosis de las MSC.

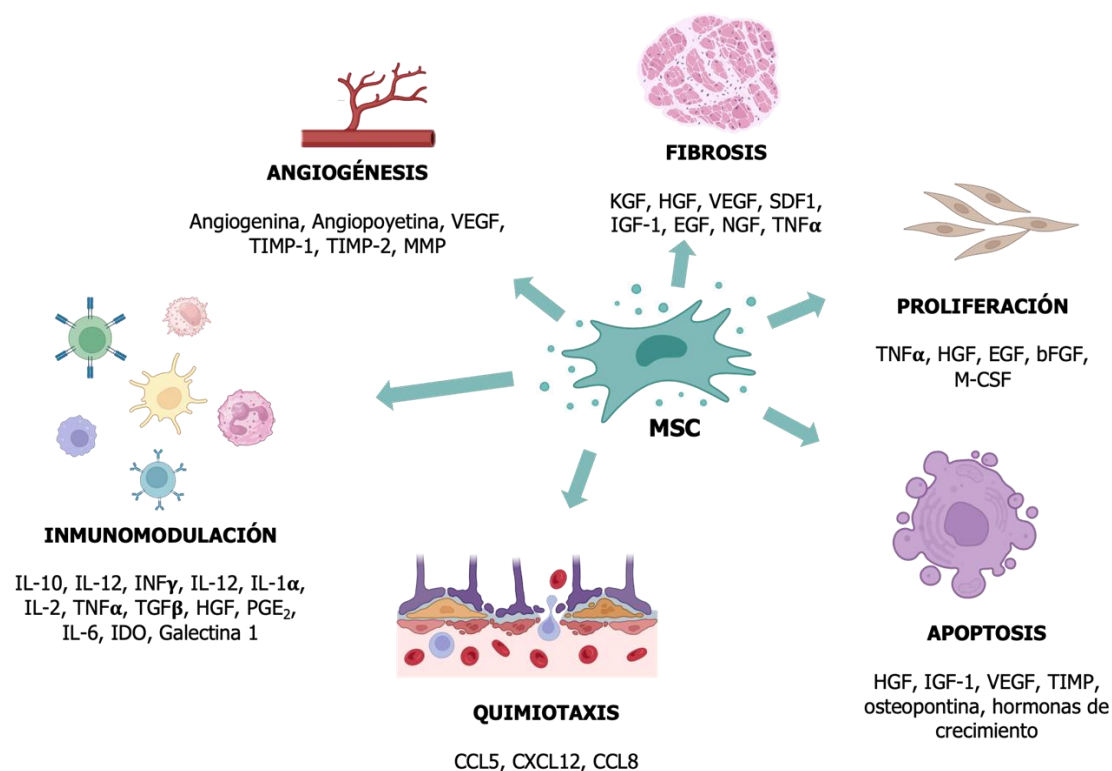


Figura 4: Efectos paracrinos de las MSC y sus vesículas extracelulares. Principales moléculas y factores bioactivos secretados directamente por las MSC o a través de vesículas extracelulares y exosomas que desencadenan efectos en diversas vías paracrinas. Adaptado de (Andrzejewska et al., 2019). VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; TIMP, inhibidores tisulares de metaloproteinasas; MMP, metaloproteinasas de la matriz; KGF, factor de crecimiento queratinocítico; HGF, factor de crecimiento de hepatocitos; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; SDF1, factor 1 derivado de células estromales; IGF-1, factor de crecimiento similar a la insulina 1; EGF, factor de crecimiento endotelial; NGF, factor de crecimiento nervioso; TNF α , factor de necrosis tumoral α ; EGF, factor de crecimiento endotelial; bFGF, factor básico de crecimiento de fibroblastos; M-CSF, factor estimulante de colonias macrófagos; IL, interleucina; TGF- β , factor de crecimiento transformante beta; PGE $_2$, Prostaglandina E $_2$; IDO, Indolamina 2,3-dioxigenasa; CCL, ligando de quimiocina (motivo CC); CXCL, ligando de quimiocina (motivo CXC).

Este cambio de paradigma respecto a la noción del método de realización de sus efectos ha desembocado, entre otras cosas, en que el propio autor que acuñó el término MSC, el Dr. Caplan, propusiera en 2017 una nueva denominación para ellas: “células medicinales” (Caplan, 2017).

Los factores bioactivos secretados por las MSC tienen efectos angiogénicos y antiapoptóticos, que limitan la progresión del tejido dañado, restablecen el riego sanguíneo, promueven supervivencia, proliferación y migración de células endoteliales, reclutan células progenitoras y muestran efectos antibacterianos (Murray et al., 2014; Fitzsimmons et al., 2018; Andrzejewska et al., 2019).

INTRODUCCIÓN

Unido a la plétora de factores secretados por las MSC, la función paracrina de éstas se realiza a través de la secreción de vesículas extracelulares (VE) y exosomas, cuyo contenido no difiere en gran medida de los componentes celulares de las que se originan (Phinney & Prockop, 2007; Coronado, 2018) (**figura 4**). Los experimentos realizados utilizando sobrenadante derivado del cultivo *in vitro* de MSC han mostrado que los factores contenidos en su secretoma son responsables de gran parte de los efectos ejercidos por las MSC durante la regeneración del área dañada, tanto *in vitro* como *in vivo* (Kordelas et al., 2014; Han et al., 2017; Komaki et al., 2017; Kumar et al., 2019; Mendt et al., 2019; Lin et al., 2020; Clark et al., 2022; Tan et al., 2024).

1.3.6.4 Inmunomodulación

Las MSC, desde el punto de vista inmunológico, presentan unas características únicas derivadas de su inmunofenotipo. No expresan o expresan bajos niveles en superficie de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad I (HLA-I o HLA-ABC, del inglés, *Human Leukocyte Antigen*). Además, tienen un carácter poco inmunogénico, dado que no expresan complejo mayor de histocompatibilidad II (HLA-II o HLA-DR) ni moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80, CD86 y CD154, lo que es crítico para activar linfocitos T (Musiał-Wysocka, Kot, & Majka, 2019; Naji et al., 2019).

Sin embargo, las MSC presentan propiedades inmunomoduladoras, realizando esta actividad por contacto célula-célula y, sobre todo, por la secreción de factores solubles como IL-6, TGF- β , IDO, NOS, PGE₂ y galectina 1 (Eleuteri & Fierabracci, 2019; El-Kadiy et al., 2021; Gomez-Salazar et al., 2020; Shammaa et al., 2020). Las MSC actúan tanto en el sistema inmunológico adaptativo como en el innato al suprimir las células T, inhibir la maduración de las células dendríticas, reducir la activación y proliferación de las células B, inhibir la proliferación y la citotoxicidad de las células NK y promover la generación de células T reguladoras (Fitzsimmons et al., 2018; Andrzejewska et al., 2019; Musiał-Wysocka, Kot, & Majka, 2019; Naji et al., 2019; Lin et al., 2020).

In vitro, las MSC regulan la función de la mayoría de los efectores celulares alterando su activación, proliferación, maduración, actividad citolítica y su producción de citoquinas o anticuerpos (Andrzejewska et al., 2019; Li et al., 2022) (**figura 4**). *In vivo* coordinan procesos de cicatrización y ayudan a prevenir la autoinmunidad después de una lesión (Fitzsimmons et al., 2018) y también pueden secretar factores para ejercer un efecto antimicrobiano mediante la secreción de péptidos antimicrobianos (AMP, del inglés,

antimicrobial peptides) como LL-37, β -defensina humana-2, catelicidina, hepcidina o lipocalina-2 (Krasnodembskaya et al., 2010; Andalib et al., 2023).

1.4 LA PLACENTA HUMANA COMO FUENTE DE MSC

La placenta es la primera estructura que se desarrolla durante la embriogénesis, sin la cual, el feto no podría sobrevivir. De carácter temporal y altamente especializada, realiza una función integral en el desarrollo, nutrición, respiración, excreción y protección del feto. Dado que las células que forman la placenta tienen su origen en dos organismos diferentes, la madre y el feto, desempeña el cometido crucial del mantenimiento de la inmunotolerancia materna y la defensa del feto frente al estrés materno y ambiental (Caruso et al., 2012; Kulus et al., 2021; Pipino et al., 2013; Pogozykh et al., 2018; Torre & Flores, 2020).

En los últimos años, ha aumentado el interés por la placenta como reservorio de células madre o progenitoras y sus aplicaciones terapéuticas. El hecho de ser un tejido que se desecha tras el parto, que permite la obtención de células por métodos no invasivos, con atractivas propiedades inmunológicas para trasplante autólogo y alogénico y un uso en clínica que no suscita debate ético, hace de ella una fuente celular excepcional para la medicina regenerativa (Caruso et al., 2012; Ventura Ferreira et al., 2018).

1.4.1 Estructura de la placenta humana

La placenta tiene forma de disco, de entre 15 y 20 centímetros de diámetro y 2 a 3 centímetros de grosor y 500 gramos de peso. Está compuesta por tejido fetal y tejido materno. Los tejidos fetales se originan a partir de la masa interna del blastocito y son el disco placentario, las membranas fetales amnios y corion y el cordón umbilical. Por su parte, el tejido materno se denomina decidua (basalis y parietalis) y proviene del endometrio.

El comienzo de la formación de la placenta humana se sitúa en los primeros días posteriores a la fecundación. Entre los días 6-7 post-fecundación, el blastocito se implanta en la pared de útero materno y la pared del blastocito, denominada trofoblasto, invade el endometrio. En los días 8-9, la masa celular interna del blastocito se diferencia en dos capas: epiblasto o ectodermo primitivo e hipoblasto o endodermo primitivo. Del epiblasto se originarán el embrión, el cordón umbilical y epitelio amniótico. El hipoblasto

INTRODUCCIÓN

generará los mesodermos amniótico y coriónico (Pipino et al., 2013; Pogozykh et al., 2018).

El amnios es la capa más interna de la placenta, en contacto directo con el líquido amniótico (**figura 5**). Se trata de una membrana delgada y avascular, que se extiende desde los márgenes del disco coriónico hasta el cordón umbilical. El corion, al igual que el amnios, muestra una estructura multilaminar, con una región mesodérmica y una región trofoblástica. En contacto con el amnios encontramos la región mesodérmica coriónica, cuya composición es similar al mesodermo amniótico. Por su parte, el trofoblasto, derivado del trofoectodermo del blastocito, está compuesto por células denominadas citotrofoblasto o capa fibrinoide de Langhans y por el sincitiotrofoblasto. Las vellosidades coriónicas permiten un contacto estrecho entre las sangres fetal y materna (Pipino et al., 2013).

El cordón umbilical se extiende desde el amnios al feto, conectándolo con la placenta. Normalmente, contiene dos arterias y una vena. Permite el transporte de la sangre fetal a las vellosidades coriónicas donde absorbe nutrientes y oxígeno, transfiriendo productos de desecho a la sangre materna antes de ser devuelta al feto por la vena umbilical. Las arterias y vena umbilical están embebidas en una matriz rica en glicosaminoglicanos (mayoritariamente ácido hialurónico y condroitín sulfato) unidos a colágeno, fibras reticulares y elásticas y fibroblastos, denominada Gelatina de Wharton, que protege a los vasos de ser comprimidos, torsionados y doblados. Externamente, el cordón umbilical está rodeado por una capa epidérmica fina, de origen ectodérmico (Kulus et al., 2021) (**figura 5**).

1.4.2 Células mesenquimales estromales de placenta humana

El hecho de que la placenta se desarrolle a partir de la masa interna del blastocito durante las primeras etapas del desarrollo embrionario sugiere la posibilidad de que albergue poblaciones celulares que mantengan o conserven las características de células madre propias de las ESC de las que derivan.

Se han descrito hasta 5 localizaciones diferentes dentro de la placenta humana con poblaciones MSC, que pueden ser observadas en la **figura 5**:

- Líquido amniótico: células del epitelio amniótico humano (hAEC, del inglés *human amniotic epithelium cells*).

- Mesodermo de las membranas fetales: células mesenquimales estromales de membrana amniótica (hAMSC, *human amniotic mesenchymal stromal cells*) y de membrana coriónica (hCMSC, del inglés *human chorionic mesenchymal stromal cells*).
- Vellosidades coriónicas de placentas de primer semestre y de placentas a término (hCV-MS, del inglés *human chorionic villi mesenchymal stromal cells*).
- Cordón umbilical: sangre del cordón umbilical (hUCB-MS, del inglés *human umbilical cord blood mesenchymal stroma*), la gelatina de Wharton (hWJ-MS, del inglés *human Wharton's jelly mesenchymal stroma*) y células del subendotelio de la vena y arterias de cordón umbilical (hUCVEC, del inglés, *human umbilical cord vein endothelial cells mesenchymal stromal cells*).
- Decidua: células de la decidua basal (hDB-MS, del inglés *human basal decidua mesenchymal stromal cells*) y parietal (hDP-MS, del inglés *human parietal decidua mesenchymal stromal cells*).

La descripción de las principales características de las MSC aisladas de placenta se muestran en el **anexo I**.

Las células mesenquimales estromales de la placenta, al contrario que las ESC, no son tumorogénicas y su empleo no presenta dilemas éticos y morales. Desde el punto de vista clínico, son células jóvenes, con una exposición a factores químicos y ambientales limitada en el tiempo. Además, exhiben una mayor capacidad de proliferación y diferenciación que sus homólogas BM-MS. Asimismo, presentan una cinética de proliferación mayor y mejores habilidades para el injerto en tejidos, y algunos autores apuntan que desarrollan mayores propiedades inmunomoduladoras e inmunosupresivas (Moonshi et al., 2022).

INTRODUCCIÓN

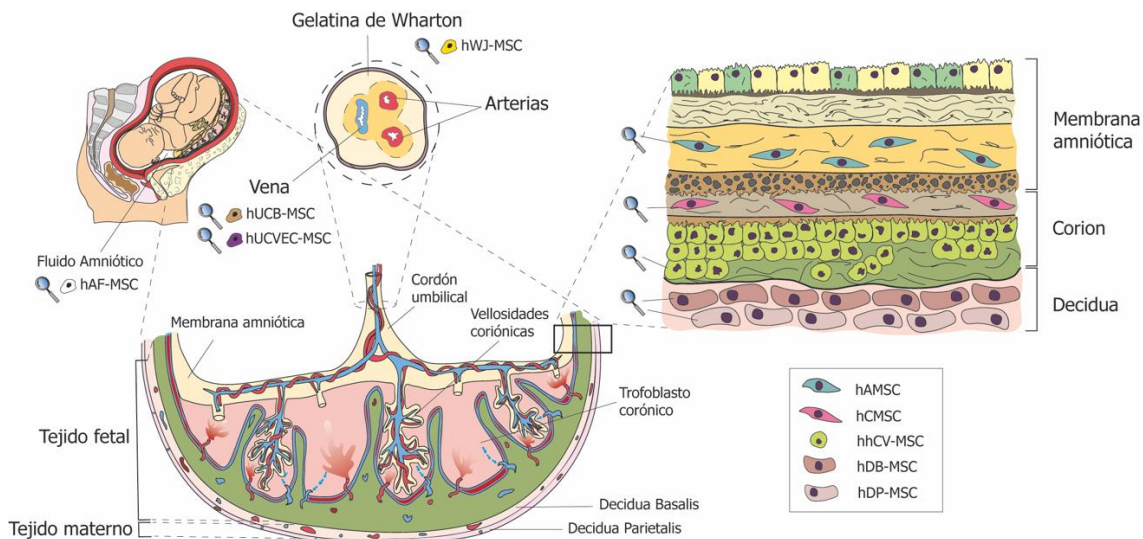


Figura 5: Estructura de la placenta humana a término y localizaciones de las MSC perinatales. Visión general de la arquitectura de los anexos fetales y las diferentes MSC que albergan. La placenta es una estructura con forma de disco que envuelve al feto en la cavidad amniótica y contiene el líquido amniótico (hAF-MSC, *human amniotic fluid mesenchymal stromal cells*). La placenta se conecta al feto a través del cordón umbilical, que contiene dos arterias y una vena (hUCVEC-MSC, *human umbilical cord vein endothelial cells mesenchymal stromal cells*), que transportan la sangre fetal (hUCB-MSC, *human umbilical cord blood mesenchymal stromal cells*). Las arterias y venas están embebidas en la Gelatina de Wharton (hWJ-MSC, *human Wharton's jelly mesenchymal stromal cells*). El cordón umbilical se continúa con el amnios (hAMSC, *human amniotic mesenchymal stromal cells*) y el corion (hCMSC, *human chorionic mesenchymal stromal cells*; hhCV-MSC, *human chorionic villi mesenchymal stromal cells*). El componente materno de la placenta está formado por la decidua basalis (hDB-MSC, *human decidua basalis mesenchymal stromal cells*) y la decidua parietalis (hDP-MSC, *human decidua parietalis mesenchymal stromal cells*). Diseño realizado por la Dra. Inmaculada Pereda.

1.5 CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES DE MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA (hAMSC)

La membrana amniótica o amnios es una capa delgada (100µm) que recubre al feto, alberga el líquido amniótico y que se continúa con el trofoblasto coriónico, al que no se llega a unir realmente a nivel celular. Se trata de una membrana estratificada que no se encuentra vascularizada, ni presenta terminaciones nerviosas, músculos ni células linfáticas. Su función principal es la protección del feto frente a la desecación y la presión de estructuras adyacentes, manteniéndolo en suspensión en el líquido amniótico. Además, durante el parto, juega un papel fundamental en la secreción de prostaglandinas, especialmente PGE₂ (Toda et al., 2007).

La membrana amniótica está formada por 5 estratos, que incluyen epitelio, lámina basal, lámina compacta, mesodermo amniótico y capa esponjosa. El epitelio amniótico, la capa más externa del amnios, abierta a la cavidad o saco amniótico, está formado por células cuboidales y columnares, con microvellosidades superficiales. El epitelio amniótico descansa sobre una membrana basal, que se continúa con una lámina compacta, acelular, compuesta por proteoglicanos, colágeno tipo I, III y VI, fibronectina y laminina. La lámina compacta se une al mesodermo amniótico (MA), en el que aparecen células mesenquimales con forma fibroblástica y, excepcionalmente, macrófagos. Finalmente, una capa esponjosa de fibras de colágeno dispuestas de forma laxa separa el amnios del corion (Toda et al., 2007; Pipino et al., 2013) (**figura 6**).

Existen dos tipos de células madre en la membrana amniótica: las células madre del epitelio amniótico (hAEC, del inglés, *human amniotic epithelial cells*), en la capa más externa del amnios, en contacto con el fluido amniótico y derivadas del epiblasto; y las células mesenquimales estromales amnióticas (hAMSC, del inglés, *human amniotic mesenchymal stromal cells*), situadas en el mesénquima amniótico y derivadas del hipoblasto embrionario (**figura 6**).

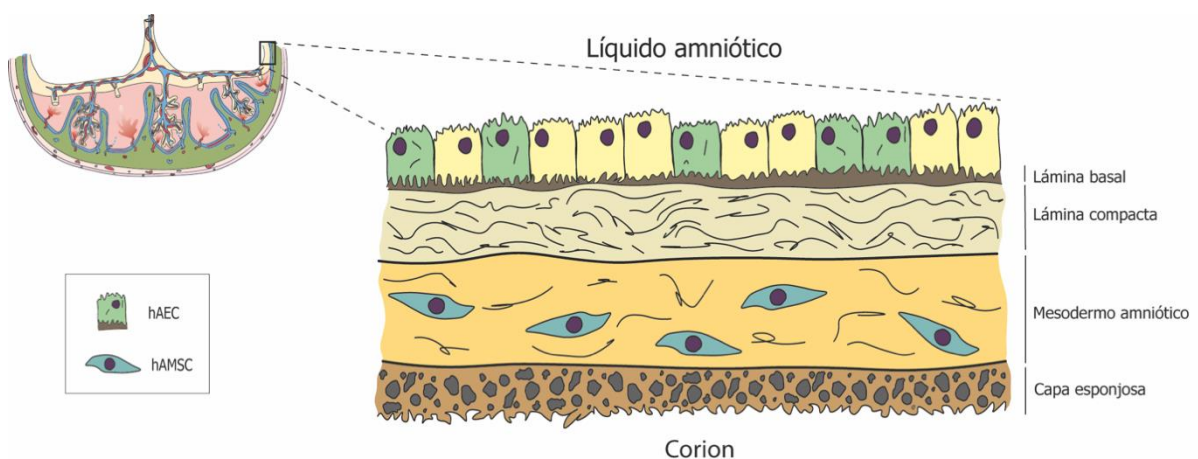


Figura 6: Estructura de la membrana amniótica. El amnios se compone de cinco capas histológicas: una capa epitelial de células cuboidales (hAEC), en contacto directo con el fluido amniótico, que descansa sobre una lámina basal. A continuación, la capa compacta acelular se conecta con el mesodermo amniótico, en el que se encuentran las hAMSC. La capa esponjosa separa el amnios del corion. Diseño realizado por la Dra. Inmaculada Pereda.

INTRODUCCIÓN

Las hAEC son una población celular heterogénea, que muestra variabilidad en su perfil de marcadores de superficie y capacidad de diferenciación (Miki et al., 2005; Ilancheran et al., 2007; Chen et al., 2009; Centurione et al., 2018; Miki, 2018). Presentan morfología epitelial cuboidal típica, aunque han sido reportados cambios morfológicos epitelio-mesénquima en cultivo (Pratama et al., 2011). Sin embargo, algunos autores sugieren que los cambios morfológicos pueden deberse a la presencia de hAMSC durante el aislamiento de hAEC (Díaz-Prado et al., 2010). El número de células obtenidas por placenta es relativamente alto (media 2×10^8 hAEC por placenta) (Kim et al., 2007). Proliferan activamente hasta pase 6, cuando entran en senescencia. Además, las hAEC expresan marcadores de células embrionarias, pero, al contrario que éstas, no expresan actividad telomerasa y no son tumorigénicas (Miki et al., 2005). Esto puede indicar que las hAEC se sitúan en un estado de diferenciación intermedio entre hESC y hAMSC (Díaz-Prado et al., 2011). Respecto a marcadores mesenquimales, las hAEC expresan niveles muy bajos o no expresan CD90, CD105, CD146 y CD49a (Silini et al., 2020). Las principales características de las hAEC se detallan en el **anexo II**.

Las hAMSC, por su parte, fueron descritas por primera vez en 2004 y se aíslan de la capa mesodérmica del amnios. Se obtienen unas eficiencias altas de aislamiento, entorno a 5×10^8 hAMSC por placenta (2×10^6 células/gr. de tejido). *In vitro*, son células adherentes, presentan morfología fibroblástica y son expandidas una media de 14 pases, no observándose cambios morfológicos durante su cultivo. El diámetro medio de las células es 15 μm (rango entre 9 y 24 μm). A diferencia de las hCMSC, las hAMSC muestran propiedades híbridas epitelio-mesenquimales a nivel morfológico ultraestructural en imágenes de microscopía electrónica de transmisión (In 't Anker et al., 2004; Pasquinelli et al., 2007; Parolini et al., 2008; Lindenmair et al., 2012; Pipino et al., 2013).

La comparación de resultados y bibliografía relativos a las hAMSC presenta una gran dificultad debido a la falta de claridad en los protocolos de aislamiento utilizados en diferentes estudios. La ausencia de detalles precisos sobre el procedimiento de aislamiento impide determinar con exactitud la región de la placenta de la que se extraen las hAMSC. Esta variabilidad en los métodos de obtención puede influir significativamente en las características biológicas y funcionales de las células aisladas, lo que dificulta la interpretación comparativa de los datos obtenidos en diferentes investigaciones.

1.5.1 Marcadores de expresión de hAMSC

El perfil fenotípico de hAMSC es el mesenquimal clásico, cumpliendo los criterios mínimos establecidos en el primer *workshop* dedicado exclusivamente a las células derivadas de placenta, que tuvo lugar en Brescia en 2008 (Parolini et al., 2008). La **tabla 1** recoge el resumen del panel de expresión de antígenos de superficie de las hAMSC.

Tabla 1: Fenotipo de las hAMSC indiferenciadas

GRUPO DE MARCADORES	MARCADORES	REFERENCIA
Marcadores de células madre y pluripotentes	SSEA-3+, SSEA-4+ OCT3, OCT4*, Nanog*, SOX2*, KLF4*, Rex-1	(Alviano et al., 2007; Kim et al., 2007; Bilic et al., 2008; Mihu et al., 2009; Chang et al., 2010; Tsuji et al., 2010; Nogami et al., 2012; Koike et al., 2014; Umezawa et al., 2019)
Mesenquimales y hematopoyéticos	CD3-, CD13+, CD14-, CD29+, CD34-, CD44+, CD45-, CD49d+, CD49e+, CD54+, CD73+, CD90+, CD105+, CD117+, CD166+, CD271+*, STRO-1+, HLA-ABC+, HLA-DR-	(Portmann-Lanz et al., 2006; Alviano et al., 2007; Soncini et al., 2007; Bilic et al., 2008; Chang et al., 2010; Díaz-Prado et al., 2010; Tsuji et al., 2010; Wolbank et al., 2010; Kang et al., 2012; Nogami et al., 2012; Koike et al., 2014; Umezawa et al., 2019)
Marcadores endoteliales	CD31- (PECAM1), receptor de VEGF 1 y 2: FLT-1+ y KDR+, vWF*, FGF, angiopoyetina	(Kim et al., 2007)
Marcadores asociados a linaje hepático	Albúmina, CK18, α -FP, α 1-AT, HNF4 α	(Kim et al., 2007)
Marcadores asociados a linaje pancreático	PDX-1	(Manuelpillai et al., 2011)
Marcadores asociados a linaje cardiomiogénico	GATA-4, MLC-2A, MLC-2V, MLC-2v, cTnI y cTnT, subunidad α del canal de sodio específico de cardiomiocitos tipo L, Kv4.3	(Kim et al., 2007)
Marcadores asociados a linaje neural	Nestina, Musashi 1, Tuj-1, NF-M, GFAP, MAP2, MAP2 kinasa, proteína básica de la mielina	(Sakuragawa et al., 2004; Kim et al., 2007; Chang et al., 2010),
Otros	CD9, CD27, CD31, CD140b+, CD324 (E-cadherina)*, CD349+, vimentina+, osteocalcina+, osteopontina+, BMP-2+, BMP-4+, colágeno tipo I y II	(Kim et al., 2007; Wei et al., 2009; Nogami et al., 2012)

*controversia en bibliografía

El análisis de marcadores de superficie revela un relativo consenso sobre la expresión tanto de marcadores mesenquimales como epiteliales (CD90, CD73, CD105), así como

INTRODUCCIÓN

otros asociados a tejido/linaje y la ausencia de antígenos de superficie de linaje hematopoyético (CD14, CD34, CD45). Desde el punto de vista de marcadores de superficie, las hAMSC son una población heterogénea en los primeros países, mientras que el perfil se homogeniza en países más avanzados (Umezawa et al., 2019). Por otra parte, no se observan diferencias entre poblaciones aisladas en diferentes trimestres de gestación (Portmann-Lanz et al., 2006).

1.5.2 Aplicaciones terapéuticas de las hAMSC (Características de las hAMSC para su empleo en terapia celular)

1.5.2.1 Potencial de diferenciación de hAMSC

Las hAMSC son diferenciadas de manera rutinaria *in vitro* a las tres líneas celulares del linaje mesodérmico, es decir, presentan capacidad de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica (Portmann-Lanz et al., 2006; Alviano et al., 2007; Kim et al., 2007; Díaz-Prado et al., 2010; Wolbank et al., 2010; Leyva-Leyva et al., 2013). No obstante, las hAMSC expresan marcadores de pluripotencia como *OCT4* (Zhao et al., 2005), *SSEA-3* y *SSEA-4* (Kim et al., 2011) lo que sugiere que pueden ser una forma primitiva de célula madre, con potencial de diferenciación a las tres líneas germinales. Sin embargo, no hay evidencia de tumorigenicidad en humanos y la expresión de la telomerasa transcriptasa inversa (TERT, del inglés *telomerase reverse transcriptase*) es nula o muy baja (Mihu et al., 2009).

En este sentido, además de la diferenciación mesodérmica, bajo condiciones de cultivo adecuadas con factores de crecimiento, hormonas, etc. las hAMSC sufren cambios morfológicos, expresan genes tejido-específicos y adquieren habilidades para ejercer funciones propias de tejidos adultos (**figura 7**). Sin embargo, el nivel de maduración adquirido *in vitro* es variable. Esto puede ser debido a diferentes factores, tales como la falta de expresión de genes de células maduras/diferenciadas, las condiciones de cultivo empleadas, el empleo o no de matrices extracelulares, concentraciones de oxígeno, etc. (Manuelpillai et al., 2011).

Se han descrito diferenciaciones de las hAMSC *in vitro* a células neurogliales (Sakuragawa et al., 2004; Portmann-Lanz et al., 2006; Kim et al., 2007; Chang et al., 2010; Leyva-Leyva et al., 2013), hepatocitos (Tamagawa et al., 2007), células pancreáticas (Tamagawa et al., 2009), células del núcleo pulposo (Ni et al., 2014), células con fenotipo similar a cardiomiocitos *in vitro* e *in vivo* (Zhao et al., 2005; Tsuji

et al., 2010), a condrocitos *in vivo* (Wei et al., 2009), células del músculo liso *in vivo* (Minagawa et al., 2010) y despliegan potencial miogénico y angiogénico (Portmann-Lanz et al., 2006; Alviano et al., 2007; Kawamichi et al., 2010; Jiang et al., 2015; Zhang et al., 2019).

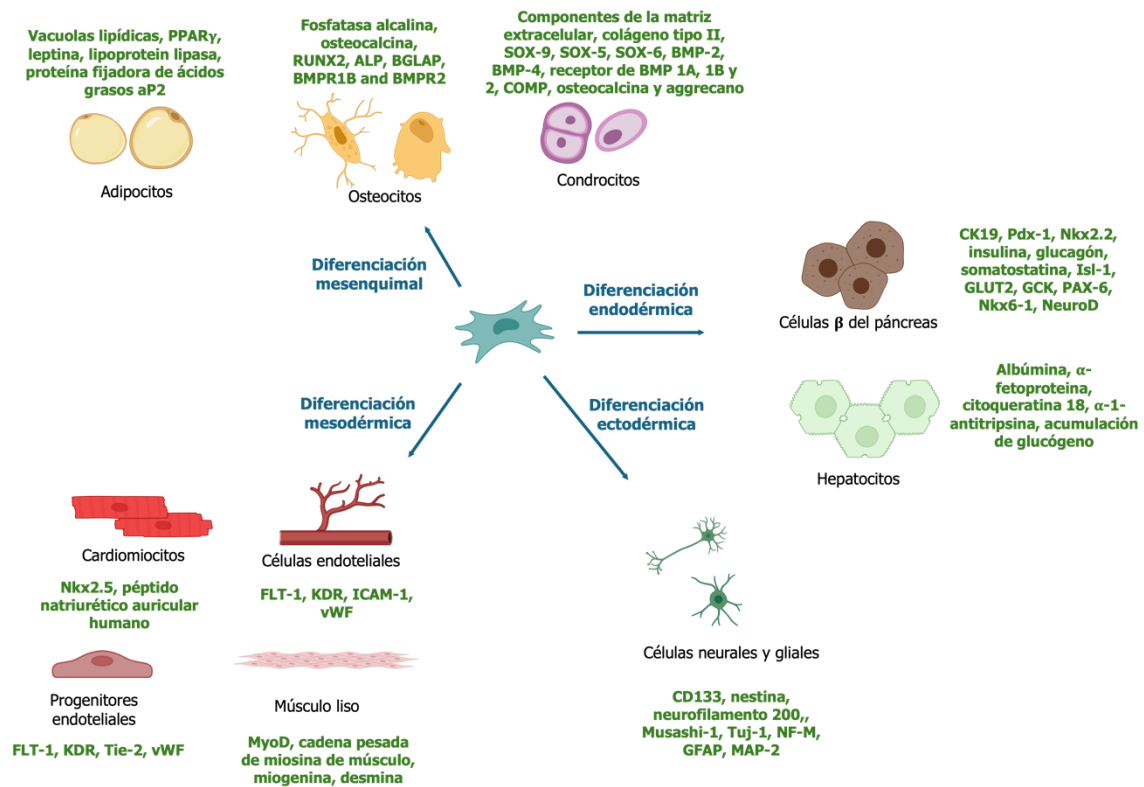


Figura 7: Potencial de diferenciación de las hAMSC. Linajes y tipos celulares a los que se han diferenciado hAMSC, indicando los principales marcadores utilizados para la caracterización de la diferenciación (verde). Elaboración propia mediante BioRender.

Con respecto a otras fuentes de células madre, las hAMSC poseen mayor capacidad de diferenciación osteogénica que hCMSC (Biswas et al., 2023). Además, presentan mayor potencial adipogénico y condrogénico que hAEC, mientras que éstas tienen mayor capacidad de diferenciación osteogénica (Díaz-Prado et al., 2010).

Algunos estudios preclínicos y modelos animales utilizan el potencial de diferenciación de hAMSC para su trasplante con el objetivo de reemplazar el tejido dañado y recuperar la función perdida. Por ejemplo, en modelos de infarto de miocardio en rata, en los que las células trasplantadas fueron capaces de diferenciarse a fenotipos similares a cardiomiocito, se observa una disminución del tamaño de la zona infartada y mejora de la función cardíaca *in vivo* (Tsuji et al., 2010; Liu et al., 2021). Zhang *et al.* trasplantaron

INTRODUCCIÓN

miocitos derivados de hAMSC en una matriz gelatinosa en un modelo de rata de pérdida de volumen muscular y confirmaron mejora a nivel tisular y aumento de la neovascularización/angiogénesis en la zona dañada (Zhang et al., 2019). Las hAMSC implantadas en paredes de vejigas lesionadas por congelación de ratones se diferenciaron *in vivo* a células musculares lisas y facilitaron la recuperación más rápida de las estructuras musculares lisas estratificadas de las vejigas dañadas (Minagawa et al., 2010).

Los resultados obtenidos en estos modelos, en general, son discretos respecto al reemplazamiento celular, asociándose su efecto terapéutico mayoritariamente a la secreción de factores solubles (Minagawa et al., 2010).

1.5.2.2 Actividad pro-angiogénica y antifibrótica de hAMSC

Las hAMSC presentan propiedades neovascularizantes y angiogénicas similares a BM-MSC y mejoradas respecto a células mesenquimales estromales derivadas de tejido adiposo (AT-MSC, del inglés, *adipose tissue derived mesenchymal stromal cells*). Las hAMSC expresan niveles altos de factores pro-angiogénicos, como VEGF-A, angiopoyetina-1, HGF y FGF-2, y factores antiapoptóticos como AKT-1 (Alviano et al., 2007; Kim et al., 2011). Algunos autores relacionan esta capacidad con su origen como pericitos. En experimentos de diferenciación endotelial *in vitro*, sufren cambios morfológicos y fenotípicos, pero la expresión de marcadores endoteliales de células maduras es limitada. Estos trabajos muestran, asimismo, que en los cultivos se regula al alza la expresión de genes antiangiogénicos, mientras que los genes proangiogénicos se regulan a la baja. Esto sugiere un mecanismo de autoprotección contra la diferenciación endotelial madura y que el efecto angiogénico desplegado por las hAMSC puede ser indirecto (König et al., 2012; Jiang et al., 2015).

Tras el trasplante directo de hAMSC en extremidades posteriores isquémicas de ratones se observó un aumento en la perfusión sanguínea y densidad de capilares, lo que indicaba la posible neovascularización promovida por hAMSC (Kim et al., 2012). En otro modelo animal, se detectó aumento del flujo sanguíneo cutáneo tras la administración celular (Kim & Choi, 2011). Por otra parte, se ha observado beneficio del medio condicionado de hAMSC en corazones infartados de ratas a través de la cardioprotección y angiogénesis, disminuyendo el área de fibrosis del miocardio (Danieli et al., 2015). También se ha descrito que este medio condicionado tiene la capacidad de regular positivamente la expresión de genes relacionados con la degradación de la matriz

extracelular como MMP-2, MMP-9, MMP-13 y TIMP-1, lo que podría explicar parcialmente el efecto protector (y beneficioso) de las hAMSC en fibrosis pulmonar, hepática y renal (Jiang et al., 2015; Liu et al., 2021).

Sin embargo, las hAMSC pueden ejercer también efectos anti angiogénicos. Navas *et al.* evaluaron el efecto de la inyección intracameral de hAMSC en un modelo de daño corneal (quemadura alcalina de córnea) y detectaron la reducción de la neovascularización, opacidad, infiltración inflamatoria y disminución de células α -SMA⁺ (α actina de músculo liso) (Navas et al., 2018).

1.5.2.3 Efectos proliferativos y antiapoptóticos de hAMSC

A través de su secretoma, las hAMSC pueden participar en regeneración de lesiones cutáneas y cicatrización a través de la activación de vías como PI3K/Akt, además de promover la proliferación de células epidérmicas, inhibir apoptosis y activar la migración de fibroblastos (Li et al., 2019). Además de los efectos paracrinos mencionados, las hAMSC han sido empleadas para la generación de organoides de piel (Liu et al., 2021).

En el ámbito del secretoma, se han publicado varios trabajos sobre los efectos proliferativos y antiapoptóticos de las hAMSC en cáncer de ovario y modelos de rata de fallo de ovario prematuro gracias a la secreción de citoquinas como FGF-2, IGF-1, HGF, VEGF y EGF (Liu et al., 2021).

1.5.2.4 Inmunomodulación e inmunosupresión de hAMSC

Las hAMSC ostentan un estatus inmunológico privilegiado, lo que no es sorprendente, ya que la función primigenia de la placenta es la de mantener la tolerancia inmunológica alogénica maternofilial. Las hAMSC expresan niveles bajos de moléculas MHC tipo I y no expresan moléculas MHC tipo II ni moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 y CD86, eludiendo así el reconocimiento de las células inmunes y escapando a su vigilancia (Insausti et al., 2014). No han sido reportados casos de rechazo agudo de injertos de hAMSC y hAEC en humanos ni tampoco en cerdos, ovejas, ratas ni monos bonnet (Pipino et al., 2013). De hecho, las hAMSC se han injertado de manera satisfactoria y persistente en múltiples órganos y tejidos animales. Las hAMSC sobrevivieron durante al menos dos meses en infartos de miocardio xenotrasplantados en corazones de rata (Zhao et al., 2005; Tsuji et al., 2010). Del mismo modo, la administración de hAMSC en el espacio subfascial del músculo abdominal en ratones y la inyección intraperitoneal o intravenosa

INTRODUCCIÓN

en cerdos neonatos no provocó rechazo del trasplante durante el periodo experimental observado de 35 y 61 días, respectivamente (Bailo et al., 2004; Wei et al., 2009).

Los efectos de las MSC en las respuestas tanto innata como específica se deben a su interacción con casi todas las células del sistema inmunitario, como linfocitos T y B, células NK, células dendríticas, monocitos/macrófagos y neutrófilos. De manera general, las hAMSC modulan el sistema inmunitario *in vitro* e *in vivo* mediante contacto célula-célula y a través de factores solubles, como IL-6, PGE₂, TGFβ, NO,IDO, HGF, LIF, IGF-1, galectina 1 y moléculas de adhesión (**figura 8**). No obstante, las propiedades inmunosupresoras de las hAMSC no son constitutivas *per se*. Cuando son administradas al receptor, existe un mecanismo de retroalimentación mutua entre las hAMSC y las células del sistema inmunitario. Las citoquinas proinflamatorias secretadas por linfocitos T y células presentadoras de antígeno articulan la actividad de las hAMSC, que disparan reacciones inmunológicas encaminadas a la secreción de citoquinas, factores de crecimiento y quimioquinas para regular y reclutar células del sistema inmunitario y reparar el tejido dañado inhibiendo la respuesta inmune (Insausti et al., 2014; Pogozhykh et al., 2018; Bulati et al., 2020; Torre & Flores, 2020; Liu et al., 2021; Nitahara-Kasahara et al., 2023).

Las hAMSC bloquean la diferenciación y maduración de monocitos de sangre periférica a células dendríticas (DC, del inglés, *dendritic cell*) (Insausti et al., 2014). Por otro lado, hAMSC inducen la diferenciación de macrófagos M2, lo que sugiere que pueden ejercer una mayor reducción de la inflamación (un papel antiinflamatorio) asociada a diversas patologías (Bulati et al., 2020; Nitahara-Kasahara et al., 2023).

Además, las hAMSC suprimen la proliferación de linfocitos T alogénicos de manera dependiente de célula y de factores como PGE₂, IL-10, TGFβ, NO e IDO. Los grupos de Kang *et al.* y Wolbank *et al.*, entre otros, demostraron que la proliferación de células mononucleares de sangre periférica alogénicas (PBMC, del inglés, *peripheral blood mononuclear cells*) activadas mediante mitógenos era inhibida en presencia de hAMSC de forma dependiente de dosis. Los resultados obtenidos por ambos grupos sugieren que la presencia de factores solubles en el sobrenadante juega un papel importante en la inmunomodulación ejercida por hAMSC, pero el contacto célula-célula es necesario para dicha inmunomodulación (Vellasamy et al., 2012; Bulati et al., 2020).

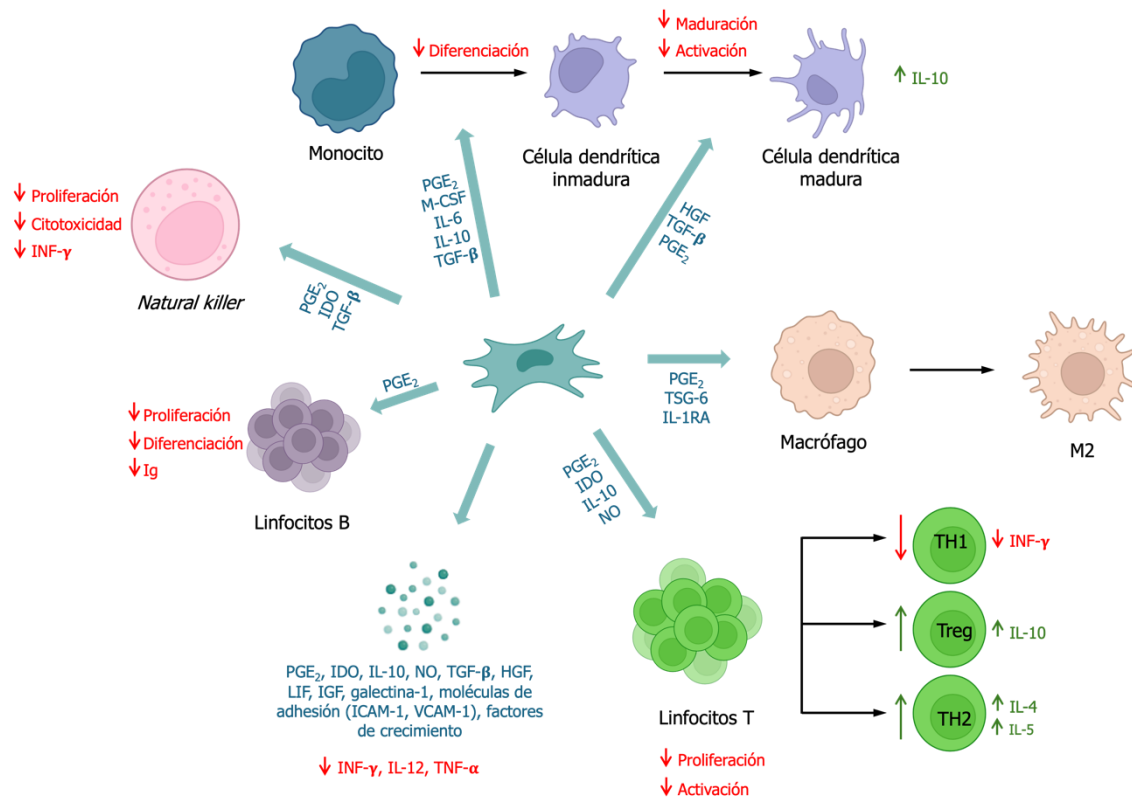


Figura 8: Efectos inmunomoduladores de las hAMSC. Diagrama esquemático que ilustra las interacciones entre las hAMSC y las células inmunitarias, incluyendo linfocitos T, linfocitos B, monocitos, células dendríticas y células *natural killer*. Las hAMSC secretan diversas citocinas y factores solubles que modulan la respuesta inmunitaria. Elaboración propia mediante BioRender.

Respecto a células B, tanto las hAMSC como su medio condicionado suprimen fuertemente la proliferación de linfocitos B activados. Además, el medio condicionado bloquea su diferenciación, lo que provoca un aumento de la proporción de linfocitos B *naïve* maduros y una reducción de las células plasmáticas secretoras de anticuerpos (Magatti et al., 2020).

En definitiva, las características inmunomoduladoras de las hAMSC las convierte en candidatas ideales para el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped y patologías autoinmunes como la artritis, fibrosis pulmonar, distrofia muscular o esclerosis múltiple, entre otras.

Por todo ello, las hAMSC constituyen una fuente de MSC especialmente atractiva para su empleo en terapia celular y medicina regenerativa. Comparten el perfil mesenquimal con BM-MSC y AT-MSC, las fuentes celulares de MSC más estudiadas, pero, al contrario

INTRODUCCIÓN

que ellas, expresan marcadores de pluripotencia que las sitúa en un estadio superior en cuanto al potencial de diferenciación. Además, no muestran riesgo tumorigénico, como las hESC e iPSC. Por otro lado, su obtención está exenta de debate ético y no implica procedimientos invasivos ni dolorosos para el donante, ya que la placenta es considerada como material de desecho médico tras el parto. Por último, las hAMSC no están sujetas a variabilidad dependiente de la edad ni han estado expuestas a estrés ambiental. En resumen, las hAMSC se erigen como candidatas prometedoras para el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas basadas en MSC.

1.6 REPARACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE MAMÍFEROS

El daño en el Sistema Nervioso Central (SNC) de mamíferos adultos desemboca en pérdidas significativas e irreversibles de función. A diferencia de anfibios y peces, así como de las neuronas del Sistema Nervioso Periférico (SNP) y neuronas de SNC en desarrollo, esta pérdida de función se debe a la baja capacidad inherente de las neuronas del SNC adulto para regenerar ([Horner & Gage, 2000](#)).

Los estudios del Premio Nobel español Santiago Ramón y Cajal en 1928 sugerían que la baja habilidad de las neuronas del SNC para regenerar no se debe (únicamente) a un déficit intrínseco de éstas, sino (también) a las características ambientales circundantes que no promueven o sostienen dicha regeneración ([Gómez et al., 2018](#); [Horner & Gage, 2000](#)).

Las patologías del SNC a menudo cursan con la pérdida de uno o varios tipos de neuronas, su función y/o daño axonal provocados por lesión/accidente/trauma (lesión de médula espinal, ictus o infarto cerebral, traumatismo craneoencefálico), por alteraciones genéticas (degeneración macular o retinitis pigmentosa, Huntington), por procesos neurodegenerativos, como Parkinson, Alzheimer o Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) o una combinación de ellas ([Lindvall et al., 2004](#)).

Existen varias estrategias terapéuticas para la regeneración de SNC, que pueden ser abordadas tanto de manera individual como combinada. Estas estrategias pueden focalizarse en los diferentes tipos celulares implicados en la patología, como el reemplazamiento celular, la movilización de células madre endógenas o la manipulación de la señalización intracelular neuronal. Otras aproximaciones se centran en la eliminación de la inhibición del crecimiento axonal, el recrecimiento y guía de axones. Por último, también se ha trabajado sobre la liberación de factores tróficos y la

modulación de la respuesta inmune (Horner & Gage, 2000; Thuret et al., 2006; Gómez et al., 2018; Kulubya et al., 2021).

1.6.1 Factores neurotróficos potenciales para la neuroprotección y regeneración de SNC

Los factores neurotróficos son factores de crecimiento solubles que regulan la supervivencia y la función neuronal. Incluyen las neurotrofinas (NT), la familia del factor neurotrófico derivado de glía (GDNF, del inglés, *glial cell-line derived neurotrophic factor*) (GDNF, neurturina, artemina y persefina), el factor neurotrófico ciliar (CNTF, del inglés, *ciliary neurotrophic factor*) y familias de factores como TGF- β , IGF, EGF, FGF, IL-6, BMP (proteína morfogenética de hueso, del inglés, *bone morphogenetic protein*) y PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas, del inglés, *Platelet-derived growth factor*) (Boia et al., 2020).

De entre estos factores neurotróficos destacan las neurotrofinas (NT) por su expresión generalizada en la mayoría de los tipos neuronales de SNC y SNP, y por el rol que desempeñan en la fisiología neural. Las NT son proteínas solubles de la familia de los factores de crecimiento neuronales cuya acción es mediada por receptores tirosina quinasa relacionadas con tropomiosina (Trk, del inglés, *tropomyosin receptor kinase*) y el receptor p75 (p75NTR), miembro de la familia de TNF (TNF, del inglés, *tumor necrosis factor*). Las NT regulan la proliferación y diferenciación celular, crecimiento axonal y dendrítico, apoptosis, mielinación, sinaptogénesis y plasticidad sináptica, tanto en sistema nervioso adulto como en desarrollo (Pramanik et al., 2017; Boia et al., 2020).

Niveles alterados de las NT se observan no solamente en diferentes patologías del SNC, como Alzheimer, Parkinson, Huntington, esquizofrenia, sino también en distintos tipos de cánceres, asma, sinusitis y procesos inflamatorios y alérgicos (Pramanik et al., 2017).

Existen seis NT, cuatro de ellas descritas en mamíferos: factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés, *nerve growth factor*), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, del inglés, *brain derived neurotrophic factor*), NT-3 y NT-4/5. Las NT-6 y 7 sólo han sido identificadas en peces (Lessmann et al., 2003; Pramanik et al., 2017).

El mecanismo de síntesis, procesamiento y secreción es análogo para todas las NT. Los factores son sintetizados inicialmente en el retículo endoplasmático como pre-neurotrofinas (con un tamaño comprendido entre 30 y 35KDa). A continuación, tras la

INTRODUCCIÓN

eliminación proteolítica del péptido señal, los pro-factores resultantes son dirigidos a la red de *trans*-Golgi para su posterior procesamiento por enzimas pro-convertasas (*pro-protein convertasas*) y/o furinas, dando lugar a los péptidos maduros (13-15KDa), que serán secretados al exterior de manera constitutiva o regulada por niveles de Ca^{2+} . Alternativamente, el procesamiento de los pro-factores puede realizarse extracelularmente. La forma madura de las NT es igualmente común a todas ellas: son homodímeros simétricos formados por dos subunidades unidas no covalentemente, aunque pueden formar heterodímeros BDNF/NT-3 y BDNF/NT-4 (Lessmann et al., 2003) (figura 9).

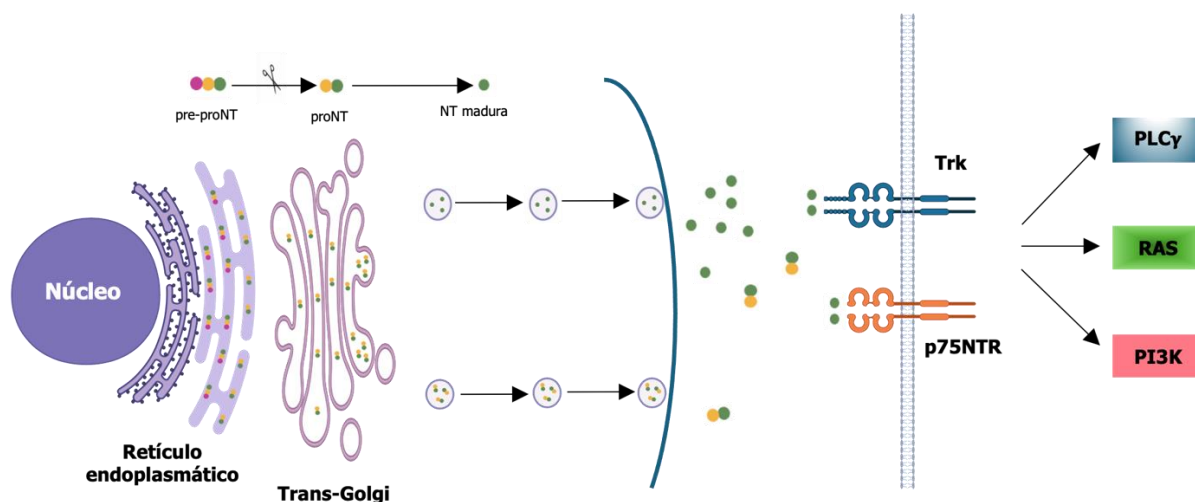


Figura 9. Síntesis, procesamiento y secreción de precursores y neurotrofinas e interacción con sus receptores Trk y vías de señalización activadas. Las NT se sintetizan como precursores (pre-pro-) en el retículo endoplasmático y son transportadas al aparato de Golgi, donde se procesan en su forma madura mediante la acción de convertasas de pro-proteínas. Las neurotrofinas maduras son empaquetadas en vesículas de secreción y transportadas hacia la membrana plasmática para su liberación. Las NT se unen a los receptores Trk (TrkA, TrkB y TrkC) y al receptor p75NTR, dimerizándolos. Los receptores fosforilados activan las vías de señalización celular PLC- γ (fosfolipasa C gamma), PI3K/Akt (fosfatidilinositol-3-quinasa/proteína quinasa B) y RAS. Elaboración propia mediante BioRender.

Las funciones biológicas (señalización) de las NT y sus precursores están mediadas por dos tipos de receptores: receptores de alta afinidad Trk y el receptor común p75NTR. Se han descrito tres miembros de receptores Trk (A, B y C) en función de la NT a la que se unan. Así, NGF es específico de TrkA, BDNF y NT-4 se unen a TrkB y NT-3 activa a TrkC. En general, los receptores TrkA, B y C presentan una estructura muy similar. Constan de un dominio extracelular, compuesto por regiones ricas en cisteína, regiones con repeticiones ricas en leucina y dominios similares a inmunoglobulinas. El dominio

citoplasmático es un dominio tirosina kinasa. Los pro-factores también pueden unirse a los receptores y disparar las señales de activación (Huang & Reichardt, 2001).

Las NT y sus precursores se unen directamente a sus receptores, dimerizándolos y activando el dominio tirosina kinasa intracelular. La autofosforilación del receptor dispara las cascadas de señales PI3K/Akt, Ras/MEK/ERK y PLC- γ , implicadas en organización del citoesqueleto y crecimiento de neuritas, diferenciación neuronal y crecimiento axonal (Huang & Reichardt, 2001; Akram et al., 2022) (**figura 9**).

Los precursores de las NT se unen con alta afinidad al receptor p75NTR. Éste regula una amplia variedad de funciones celulares dependiendo de co-receptores, proteínas adaptadoras y ligandos específicos. Además de apoyar la señalización de supervivencia y crecimiento neuronal, p75NTR modula la muerte celular a través de las vías de JNK (c-Jun N-terminal kinasa) y NF- κ B (Factor nuclear *kappa* B) (Huang & Reichardt, 2001).

El receptor p75NTR es común a las cuatro NT y sus precursores. De forma semejante a Trk, presenta un dominio extracelular con regiones ricas en cisteína y un dominio de muerte intracelular. Regula un amplio rango de funciones celulares, entre las que destaca la modulación de la muerte o supervivencia neuronal. La cantidad relativa del tipo de ligando (proneurotrofina y neurotrofina) y tipo de receptor (Trk y p75NTR) puede determinar si una neurona vive o muere (Pramanik et al., 2017).

Aunque las NT fueron descubiertas inicialmente en neuronas, estudios recientes han confirmado su expresión y la de sus receptores en varios tipos celulares, entre los que cabe mencionar las células madre, ejerciendo en ellas funciones esenciales en su biología. En concreto, las MSC producen un amplio repertorio de factores neurotróficos, incluidas NT (Paradisi et al., 2014; Pramanik et al., 2017; Volkman & Offen, 2017; Li et al., 2022).

Las células ganglionares de retina (CGR) también expresan y secretan NT, desplegando funciones de neuroprotección. De hecho, los niveles de BDNF se reducen en la lágrima y suero de pacientes con glaucoma y se han reportado mejorías en la funcionalidad de la capa interna retiniana en esta patología tras la administración de NGF por gotas oculares. Además, se ha especulado que las propiedades terapéuticas de diferentes agentes neuroprotectores para promover supervivencia de las CGR están relacionados con la inducción de la expresión retiniana de BDNF (Boia et al., 2020).

1.6.2 Terapia celular en patologías del Sistema Nervioso Central

Una de las aproximaciones más prometedoras en el campo de la medicina regenerativa y de reparación de SNC es la terapia celular basada en células madre. La aproximación conceptual se basa en el trasplante de células madre o sus derivados y/o la movilización de células madre endógenas de SNC adulto.

Las MSC humanas más empleadas hasta la fecha son hBM-MS (del inglés, *human bone marrow mesenchymal stromal cells*), hAT-MS (del inglés, *human adipose tissue derived mesenchymal stromal cells*), hUC-MS y hWJ-MS. Se ha observado recuperación funcional en experimentos *in vivo* en diferentes modelos animales de lesión de médula espinal e isquemia cerebral tras la inyección de MS de varios orígenes por diferentes vías de administración (Li et al., 2022).

Aunque hay estudios que reportan mejoría funcional tras trasplante de neuronas derivadas de MS en modelos murinos de Parkinson, no está claro si la recuperación observada se debe realmente a la integración funcional de estas neuronas derivadas de MS en las redes neuronales. Además, la capacidad de las MS para diferenciarse a neuronas completamente funcionales no está probada, ya que su transdiferenciación y funcionalidad electrofisiológica están aún en debate (Volkman & Offen, 2017).

El mecanismo por el cual las MS ejercen un efecto beneficioso en patologías neurológicas, por tanto, está aún siendo dilucidado, aunque parece que es mediado a través de su secretoma, dada su capacidad de liberación de factores neurotróficos y los efectos inmunomoduladores producidos por éstos. Las MS tienen el potencial de generar un ambiente reparador adecuado a través de los efectos de los factores secretados, tanto solubles como a través de VE y exosomas, ya que tienen un impacto en diferentes funciones neuronales, como la neurogénesis endógena, la neuroprotección y regeneración e inmunomodulación. La inducción de neurogénesis mediada por la administración de hBM-MS ha sido probada en diferentes modelos animales de enfermedades neurológicas, como desórdenes del espectro autista, Parkinson e isquemia cerebral. En todos se sugiere el incremento de niveles de factores tróficos que correlaciona con un aumento de neurogénesis y una mejora subsecuente de la función neuronal (Volkman & Offen, 2017; Kulubya et al., 2021).

No obstante, el efecto directo de los factores tróficos liberados por las MS no se circunscribe a la neurogénesis, activación y movilización de las células madre neurales

(NSC, del inglés, *neural stem cells*) endógenas, sino que éstos realizan efectos paracrinos también respecto a la neuroprotección, supervivencia neuronal y modulación del sistema inmunitario.

Se ha comprobado que el trasplante de MSC, con o sin diferenciación previa, modificadas *ex vivo* o no para sobre-expresar factores tróficos aumenta la supervivencia neuronal en modelos preclínicos de ELA, Alzheimer, AMS (atrofia multisistémica), Parkinson, Huntington, lesión de médula espinal y lesión de nervio óptico (Volkman & Offen, 2017; Kulubya et al., 2021).

1.6.3 Aplicación de las hAMSC en neuroregeneración

Varios estudios han demostrado que las hAMSC pueden facilitar la reparación del SNC, evidenciando neuroprotección, regeneración axonal, angiogénesis e inhibición de la apoptosis en la zona lesionada de daño de médula espinal y próxima al sitio de trasplante de las células mesenquimales estromales (Zhou et al., 2020; Liu et al., 2021). También en lesiones de nervios periféricos se han obtenido resultados de reparación propiciados por factores neurotróficos secretados por hAMSC (Liu et al., 2021).

Además, las hAMSC favorecen la regeneración de mielina y la angiogénesis (Kulubya et al., 2021). También se han reportado efectos antiapoptóticos, de reducción del estrés oxidativo en modelos de ELA y traumatismo craneoencefálico, y promoción de la re- extensión axonal, generando un ambiente favorable para el restablecimiento de circuitos funcionales en modelos de lesión de médula espinal. Asimismo, se ha descrito el efecto de disminución de agregados proteicos característicos de patologías neurodegenerativas (Li et al., 2022; Hirota et al., 2023; Zhang et al., 2024).

En modelos de rata de daño cerebral por isquemia y hemorragia, las hAMSC ejercen funciones de neuroprotección a través de la activación de mTOR, la inhibición de autofagia o la activación de la vía de señalización de BDNF-TrkB-MEK-ERK1/ERK2. De hecho, se ha observado que el efecto beneficioso sobre la disfunción cerebral es mayor cuando se emplean hAMSC transfectadas con el gen de BDNF (Liu et al., 2021). El trasplante de hAMSC directamente en la penumbra isquémica en el día 1 o 2 tras el ictus mejoró la disfunción conductual, atenuó los déficits motores y neurológicos y redujo el tamaño del infarto asociado a la oclusión de la arteria cerebral media en comparación con el grupo de ictus infundido con vehículo (Yu et al., 2015).

INTRODUCCIÓN

Asimismo, se ha estudiado el efecto de las hAMSC en enfermedades neurodegenerativas, como la demencia. Cho *et al.* (2018) mostraron que la administración de hAMSC en un modelo de demencia en rata permitía una significativa recuperación cognitiva. Los autores sugerían que este efecto no se debía a la transdiferenciación de las hAMSC administradas a neuronas colinérgicas y apuntaban hacia la vía paracrina como explicación más plausible (Cho *et al.*, 2018).

En el trabajo de Kim *et al.* de 2013, seis semanas después de la administración intravenosa de hAMSC en un modelo de ratón transgénico de Alzheimer, se observó una progresión más lenta de la enfermedad, funciones de memoria y aprendizaje espacial mejoradas y una significativa reducción de placas β -amiloide en el cerebro. Los autores correlacionaban estos resultados con un incremento significativo de células microgliales fagocíticas asociadas a placas β -amiloide y de enzimas que degradan placas β -amiloide (como la MMP-9) en cerebros de ratones inyectados con hAMSC respecto a los controles. Asimismo, los niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-1 y $\text{TNF}\alpha$) se redujeron y aumentaron los de antiinflamatorias (TGF β e IL-10) (Kim *et al.*, 2013). Además, se ha obtenido restauración de funciones de memoria en modelos murinos de Alzheimer tras la infusión de hAMSC a través de una reducción del estrés oxidativo (Jiao *et al.*, 2016).

Por otra parte, un estudio en el que se inyectaba peritonealmente medio condicionado de hAMSC en un modelo de ratón de enfermedad de Huntington demostró que disminuía significativamente la activación de microglía (Giampà *et al.*, 2019).

A pesar del incremento del número de las aplicaciones terapéuticas de las hMSC derivadas de placenta, el empleo en clínica se encuentra aún en estadios tempranos, debiéndose de abordar aún algunos aspectos importantes. Primero, sería recomendable la sistematización de los métodos de aislamiento y cultivo a gran escala. En segundo lugar, deben llevarse a cabo estudios de riesgo y seguridad de la administración de estos tipos celulares. Pacientes con problemas renales previos han desarrollado tromboembolismo tras ser administradas células mesenquimales estromales multipotentes de placenta. Por eso, es necesario el desarrollo de estudios a largo plazo para evaluar efectos adversos asociados a las terapias con hAMSC (Moonshi *et al.*, 2022).

1.6.4 Sistema visual como modelo de estudio de regeneración de SCN

Los dos principales modelos para el estudio de regeneración de SNC en mamíferos son la médula espinal y el sistema visual (Harvey *et al.*, 2006; Varadarajan *et al.*, 2022).

En comparación con otros órganos del SNC, el ojo está relativamente aislado de otros sistemas, tiene una respuesta inmunitaria más limitada y las aplicaciones intravítreas de agentes terapéuticos son de bajo volumen y dosis conocida (Varadarajan et al., 2022).

Por otra parte, la retina tiene una anatomía bien definida y un circuito muy bien caracterizado. Las CGR, a pesar de localizarse fuera de la bóveda craneal, son neuronas de proyección *bona fide* del SNC. Además, los aspectos de la función retiniana pueden ser evaluados mediante técnicas cuantitativas y no invasivas y se puede medir fácilmente el grado de supervivencia de las CGR y la cantidad de crecimiento axonal tras la lesión (Harvey et al., 2006). Todas estas características hacen de la retina un modelo idóneo para los estudios de regeneración del SNC.

1.6.5 La retina

La retina es un tejido del SNC, de unos 0,2 mm de espesor que, además de actuar como primera estación en la recepción de la luz, lleva a cabo un importante procesamiento de imágenes. Consta de 7 tipos celulares diferentes: células del epitelio pigmentario, fotorreceptores, células bipolares, células horizontales, células amacrinas, células de Müller y células ganglionares (cinco de todos estos tipos celulares son neuronas). La retina amplifica, extrae y comprime la información lumínica recibida y la transmite al cerebro medio y tálamo a través del nervio óptico, formado por los axones de las CGR. Desde el tálamo, la información retiniana se procesa y se envía al córtex visual, donde se combinan las informaciones sobre la contraste, el color, el movimiento relativo y la profundidad para dar lugar a la experiencia visual (Sung & Chuang, 2010; Kim et al., 2021).

La retina de los vertebrados presenta una estructura laminar muy ordenada (**figura 10**). En su parte externa, la región más alejada de la luz entrante, se encuentran las células del epitelio pigmentario (EPR). Sobre ellas, se disponen los dos tipos de fotorreceptores retinianos, los conos y bastones, responsables de la captación de los fotones procedentes de la luz. En ambos casos, la fotoexcitación del pigmento visual contenido en los segmentos externos de los fotorreceptores inicia una cascada de señales que amplifica la señal e hiperpolariza la membrana celular. El cambio en el potencial de membrana se propaga a las sinapsis con las neuronas de segundo orden, que reaccionan liberando neurotransmisores. La información es transmitida a las células bipolares y de éstas a las células ganglionares, situadas en la capa más interna de la retina, a través de una vía

INTRODUCCIÓN

directa. La información se ve modificada por las células amacrinas y horizontales (Sung & Chuang, 2010).

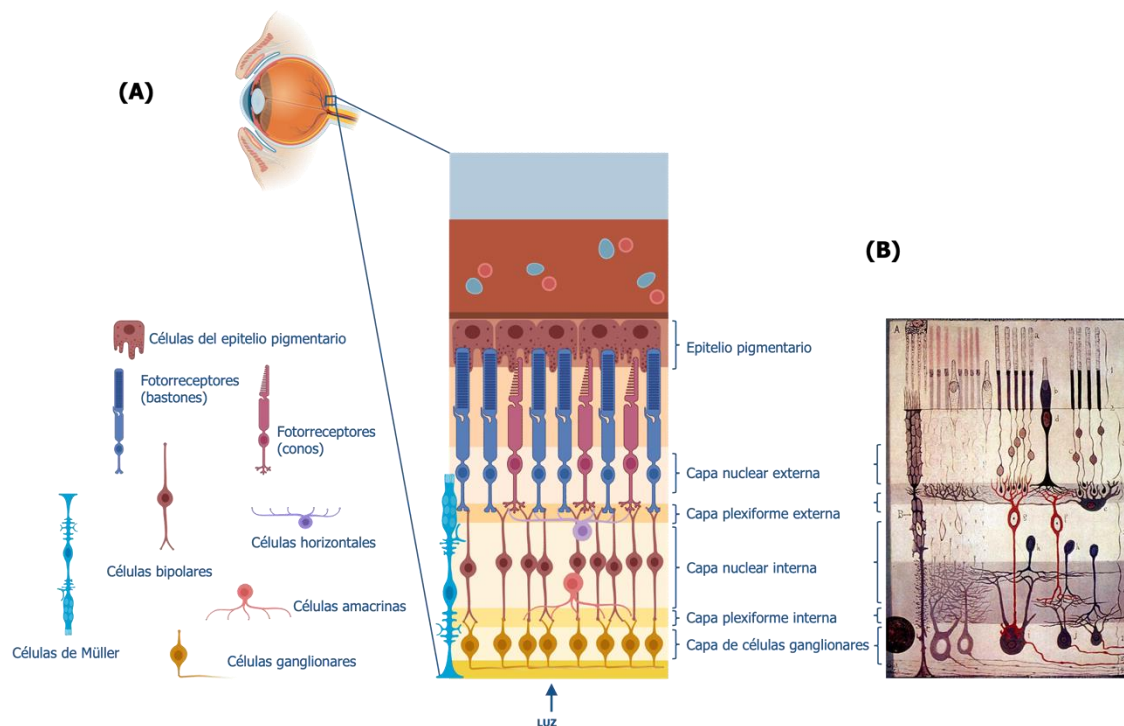


Figura 10. Estructura de la retina de vertebrados. Esquema moderno de la estructura de la retina (A), mostrando sus diferentes capas y tipos celulares. Desde el exterior (entrada de la luz) al interior, se observa la capa de células ganglionares (con las células ganglionares), capa plexiforme interna (zona de sinapsis entre células bipolares, ganglionares y amacrinas), capa nuclear interna (contiene los cuerpos celulares de las células bipolares, horizontales y amacrinas), capa plexiforme externa (zona de sinapsis entre fotorreceptores, células bipolares y horizontales), capa nuclear externa (cuerpos celulares de los fotorreceptores conos y bastones) y la capa del epitelio pigmentario. Por su parte, el núcleo de las células de Müller está situado junto a la capa nuclear interna y su porción apical conecta con los fotorreceptores. Elaboración propia mediante BioRender. (B) Ilustración histórica de la retina realizada por Santiago Ramón y Cajal (Ramon y Cajal, S., 1928).

1.6.6 Las células ganglionares de la retina

Las CGR son las células de salida de la información de la retina y sus axones conforman el nervio óptico. Inicialmente, los axones discurren por la capa de fibras nerviosas, convergen en el disco óptico y atraviesan la lámina cribosa en la cabeza del nervio óptico.

A pesar de que las CGR cumplen una función similar entre ellas, constituyen una población muy diversa. El número y subtipos diferentes de CGR varía entre especies, así como también su distribución y frecuencia. Hasta la fecha, se han identificado más de

40 subtipos diferentes de CGR en la retina de ratones (Kerschensteiner, 2022), mientras que en humano y macacos se han descrito 28 subtipos diferentes. La clasificación se basa en diferencias de tamaño, morfología, arborización dendrítica, funciones electrofisiológicas, susceptibilidad a la degeneración, capacidad de regeneración y expresión de firmas moleculares específicas. Se han descrito marcadores moleculares de diversos subtipos de CGR, pero en la mayoría de los casos, éstos señalan más de un único subtipo (Sanes & Masland, 2015; Vidal-Sanz et al., 2017; Boia et al., 2020). Aún falta por entender cómo las diferencias moleculares entre subtipos de CGR determinan sus funciones electrofisiológicas y la susceptibilidad/respuesta mostrada frente a diferentes patologías.

En humanos, las CGR más numerosas son las CGR enanas, que representan el 80% de la población total y proyectan a las capas parvocelulares del núcleo geniculado lateral; las CGR parasol constituyen aproximadamente el 10% de la población total y poseen grandes somas que proyectan a las capas magnocelulares del núcleo geniculado lateral y las CGR biestratificadas, el 5-10% de todas las CGR, que proyectan a las capas koniocelulares del núcleo geniculado lateral y están implicadas principalmente en la visión del color (Kim et al., 2021).

En la retina de rata se han descrito tres tipos principales de CGR en base a su morfología y el tamaño del soma y arborización dendrítica: grandes (A), pequeñas (B) y medianas (C), aunque algún grupo añade un cuarto tipo D (Peichl, 1989; Huxlin & Goodchild, 1997; Sun et al., 2002). Las más estudiadas son las tipo A, entre las que se incluyen las denominadas CGR alfa, descritas por primera vez en retina de gatos. Se trata de neuronas de somas grandes, con dendritas y axones robustos y arborización monoestratificada con diferentes estratos en la capa plexiforme interna, altos niveles de proteínas neurofilamentosas y grandes campos receptivos. Las CGR alfa, que suponen menos del 5% de las CGR de la retina de rata, tienen propiedades fisiológicas tales como latencia de respuesta corta y axones de conducción rápida, que les permite ser las primeras en responder a un nuevo estímulo. Respecto a su papel en la visión, parece que desempeñan tareas fundamentales y no especializadas en el procesamiento visual (Peichl, 1989, 1991; Tan et al., 2022).

1.6.7 Modelo de reparación de nervio óptico

El modelo de lesión de nervio óptico es de gran utilidad para el estudio de reparación de axones de neuronas de SNC. El nervio óptico es una vía de transmisión única, que

INTRODUCCIÓN

presenta distribuciones centrales claramente circunscritas a regiones que sirven a una serie de funciones visuales individuales. Además, las señales de entrada visuales que transmite al SNC pueden definirse claramente (Vidal-Sanz et al., 2002).

La regeneración de SNC adulto, en relación con patologías derivadas de la pérdida de función axonal, requiere de varios pasos. Primero, las neuronas deben sobrevivir al daño o lesión y, entonces, extender de nuevo su axón hacia sus dianas. Una vez que el contacto se ha establecido, el axón debe ser remielinado y deben formarse sinapsis funcionales en las células diana. En las últimas décadas, se ha demostrado mediante estudios *in vitro* e *in vivo* que el nervio óptico es capaz de regenerarse tras una lesión en respuesta a un tratamiento extrínseco (Vidal-Sanz et al., 2002).

Las aproximaciones de terapia celular en este campo se basan en la potenciación de la respuesta endógena a daño neural o el empleo de células que reemplacen células muertas y/o creen el ambiente favorable para regeneración axonal. Entre estas últimas, las más utilizadas como sustratos biológicos más permisivos para el recrecimiento axonal son las células de Schwann, injertos de nervios periféricos, ESC y progenitores derivados de ESC, células madre adultas y progenitores derivados (Wigley & Berry, 1988; Thuret et al., 2006; Gómez et al., 2018; Norte-Muñoz et al., 2021, 2024). Especial impacto en el área en las últimas décadas ha tenido el empleo de células de la glía envolvente olfativa, que posee características únicas para guiar a los axones lesionados a SNC intacto (Sonigra et al., 1999; Vidal-Sanz et al., 2002; Moreno-Flores et al., 2002, 2003).

La información proporcionada por el modelo de retina permite entender cómo responden las neuronas del SNC y sus axones a una lesión y cuáles son los mecanismos subyacentes más eficaces para promover la recuperación funcional. El conocimiento generado por el modelo también puede ser aplicado para el desarrollo de terapias específicas para el tratamiento de una serie de enfermedades que afectan a las neuronas de la retina interna y sus axones, que engloban lesiones agudas de nervio óptico, glaucoma, diabetes, isquemia o retinitis pigmentaria (Harvey et al., 2006).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

El **objetivo general** de la presente tesis doctoral es la caracterización de células madre mesenquimales de placenta humana para su empleo en terapias avanzadas. Para ello, se establecieron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Caracterizar las hAMSC como células mesenquimales estromales.
2. Analizar las propiedades de las hAMSC para su potencial aplicación en aproximaciones terapéuticas de medicina regenerativa.
3. Estudiar del efecto de la hipoxia *in vitro* en las características funcionales y biológicas de las hAMSC.
4. Evaluar la capacidad para promover regeneración axonal de las hAMSC *in vitro* en condiciones de normoxia e hipoxia.
5. Identificar los mecanismos moleculares que subyacen al potencial regenerador de las hAMSC.
6. Evaluar la maduración funcional de las neuronas regeneradas en las diferentes condiciones de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CULTIVOS CELULARES

3.1.1 Mantenimiento de células en cultivo

Los cultivos celulares fueron incubados a 37°C en condiciones de normoxia (5% de CO₂ y 20% de O₂) en un incubador Thermo Scientific, Series II Water Jacketed y en condiciones de hipoxia (5% de CO₂ y 1% de O₂) en un incubador GALAXY 48 R de New Brunswick (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El mantenimiento de las condiciones de hipoxia en los cultivos fue monitorizado mediante inmunodetección del factor inducible por hipoxia (HIF, *Hypoxia Inducible Factor*) (ver apartado 3.7.5).

3.1.2 Líneas celulares

3.1.2.1 hAMSC

Las células mesenquimales estromales multipotentes de membrana amniótica humana (hAMSC) (Cellular Engineering Technologies, Coralville, EE.UU., número de catálogo HMSC.AM-100) fueron crecidas en medio Eagle modificado por Dulbecco de alto contenido en glucosa (4,5 g/L) (Gibco, Grand Island, Nueva York, EE.UU) suplementado con suero fetal bovino (FBS, *fetal bovine serum*) al 10% (Gibco, Grand Island, Nueva York, EE.UU., referencia 10270106), una solución de antibióticos y antimicóticos (Pen/Strep/Fung 10k/10k/25µg, Lonza, Basilea, Suiza), L-glutamina 2mM (Lonza, Basilea, Suiza) y factor de crecimiento fetal básico humano (hFGF basic) (Gibco, Grand Island, Nueva York, EE.UU.). De manera rutinaria, en ambas condiciones de concentración de oxígeno, las hAMSC se sembraron a una densidad de 10⁴ células/cm² en superficies de cultivo NUNC de diversos tamaños y se mantuvieron hasta alcanzar confluencia. El medio de cultivo fue reemplazado cada 2-3 días.

3.1.2.2 Glía envolvente olfativa

La línea celular humana de glía envolvente olfativa (GEO) inmortalizada TS12 ([Plaza et al., 2016](#)) fue mantenida en medio ME, compuesto por DMEM/F12 (Gibco, Invitrogen, Grand Island, Nueva York, EE.UU.) suplementado con FBS al 10%, glutamina 2 mM (Lonza, Basilea, Suiza), extracto de pituitaria 20 µg/mL (Gibco, Grand Island, Nueva York, EE.UU.), forskolina 2 µM (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.) y una solución de antibióticos y antimicóticos (Pen/Strep/Fung 10k/10k/25µg, Lonza, Basilea, Suiza).

3.1.2.3 Línea HEK293T

La línea celular HEK293T (células de riñón embrionario de ratón inmortalizadas) se mantuvo en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con FBS al 10%, glutamina 2 mM (Lonza, Basilea, Suiza) y una solución de antibióticos (Pen/Strep 100 U/mL, Lonza, Basilea, Suiza).

3.2 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA *IN VITRO* DE CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES DE MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA

3.2.1 Caracterización fenotípica

Las hAMSC fueron sembradas a una densidad de 10^4 células/cm² y se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar semi-confluencia, tanto en normoxia como en hipoxia. Las células fueron visualizadas mediante el uso de un microscopio óptico (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Oberkochen, Alemania). Las imágenes en campo claro de los cultivos se adquirieron utilizando una cámara acoplada al microscopio. El software para la adquisición de imágenes utilizado fue ZEN2011.

3.2.2 Expresión de marcadores de superficie mediante citometría de flujo

Se plaquearon hAMSC a una densidad de 10^4 células/cm² y se mantuvieron en cultivo, tanto en normoxia como hipoxia, hasta alcanzar una confluencia del 80%–90%. A continuación, las células fueron tripsinizadas y marcadas mediante anticuerpos, lavadas para eliminar el exceso de marcaje y analizadas mediante citómetro de flujo (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Los anticuerpos utilizados contra antígenos humanos fueron los siguientes: CD105-FITC (Miltenyi Biotect, cat# 130-112-327, 1:50), CD90-FITC (Miltenyi Biotec, cat# 130-114-901, 1:50), CD44-VioBlue (Miltenyi Biotec, cat# 130-113-906, 1:50), CD73-APC (Miltenyi Biotec, cat# 130-111-909, 1:50), CD133-PE (Bio-Techne R&D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU., cat# FAB11331P), MSC Phenotyping Cocktail-PE (CD34, CD14, CD19, CD45, Miltenyi Biotec cat# 130-125-285). Se realizaron las diluciones de los anticuerpos recomendadas por la casa comercial. Los datos fueron analizados mediante MACSQuantify™ Software.

3.2.3 Diferenciación celular

3.2.3.1 Osteogénesis

Las hAMSC en pase 4 fueron sembradas en placas multipocillo M6, a una densidad de 3×10^3 células/cm² (3×10^4 células totales) en 2 mL de medio de cultivo basal a 37°C, en condiciones de normoxia e hipoxia. Tras 24 horas de incubación, se retiró el medio sustituyéndolo por medio de osteogénesis (*Differentiation media BulletKit™ - osteogenic*, Lonza, Basilea, Suiza). Los cultivos fueron mantenidos durante 21 días, reemplazando el medio cada 3 días. Células control no inducidas fueron cultivadas en medio basal de hAMSC en ambas condiciones de concentración de oxígeno.

Tras 21 días, los cultivos fueron lavados con PBS (Lonza, Basilea, Suiza) y fijados con formalina al 10% durante 5 minutos. Tras la fijación, la formalina fue eliminada y los cultivos lavados con H₂O destilada antes de teñirlos con *alizarin red* al 2% (500 mg de *alizarin red* (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.) en 25 mL de H₂O destilada) durante 15 minutos. A continuación, los cultivos fueron lavados con agua y secados a temperatura ambiente. Al microscopio óptico, los depósitos de calcio, consecuencia de la diferenciación osteogénica, se tiñen de rojo. Se tomaron imágenes al microscopio de campo claro (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Oberkochen, Alemania).

3.2.3.2 Adipogénesis

Se sembraron hAMSC en pase 4 en placas multipocillo M6, a una densidad de 2.4×10^4 células/cm² (2.4×10^5 células totales) en medio basal de hAMSC a 37°C, en condiciones de normoxia e hipoxia. El medio fue reemplazado cada 2 días hasta alcanzar un 80% de confluencia. En ambas condiciones, fueron efectuados tres ciclos de inducción-mantenimiento de adipogénesis: cada ciclo consistió en la incubación de las células en medio de inducción de adipogénesis (*Differentiation media BulletKits – adipogenic*, Lonza, Basilea, Suiza) durante 3 días, seguido de 3 días en medio de mantenimiento de adipogénesis (*Differentiation media BulletKits – adipogenic*, Lonza, Basilea, Suiza). Células control no inducidas fueron cultivadas en medio de mantenimiento de adipogénesis conservando los ciclos en las dos condiciones de concentración de oxígeno. Después de estos 3 ciclos, los cultivos fueron mantenidos 7 días más en medio de mantenimiento de adipogénesis, cambiando el medio cada 3 días.

MATERIALES Y MÉTODOS

Al finalizar el proceso de diferenciación, las células fueron lavadas con PBS (Lonza, Basilea, Suiza) y fijadas con formalina al 10% durante 60 minutos. Retirada la formalina, los pocillos fueron lavados con H₂O destilada. Se añadieron 2 mL de isopropanol al 60% durante 5 minutos. Después de eliminar el isopropanol, los cultivos fueron teñidos con 2 mL de *Oil Red* (solución stock: 300 mg *Oil Red* (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.) en 100 mL de isopropanol 99%) durante 10 minutos. Después, se eliminó el colorante, se lavó con agua y se dejó secar a temperatura ambiente. Al microscopio óptico, los acúmulos lipídicos se tiñen en rojo. Se tomaron imágenes al microscopio de campo claro (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Oberkochen, Alemania).

3.2.3.3 Condrogénesis

Cultivos de hAMSC en pase 4 mantenidos en condiciones de normoxia e hipoxia fueron tripsinizados y centrifugados a 100xg durante 5 minutos. El sobrenadante fue eliminado y las células se resuspendieron en el volumen correspondiente de *StemPro® Chondrogenesis differentiation kit* (Gibco, Grand Island, Nueva York, EE.UU.) para obtener una concentración final de $1,6 \times 10^7$ células/mL. Se pipetearon 5 μ L (una gota) de la suspensión anterior generando micromasas en diferentes pocillos de placas multipocillo M24 y se incubaron en condiciones de normoxia e hipoxia durante 18 horas, pasadas las cuales se añadió medio *StemPro® Chondrogenesis differentiation kit* fresco. Micromasas de células control no inducidas generadas siguiendo el mismo procedimiento fueron cultivadas en medio basal en ambas condiciones de concentración de oxígeno. El medio fue cambiado cada 3 días.

Tras 14 días, los cultivos fueron lavados con PBS (Lonza, Basilea, Suiza) y fijados con formaldehído al 4% durante 30 minutos. A continuación, se eliminó el formaldehído, los cultivos lavados con PBS y teñidos con azul alcian (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en HCl 0,1N 30 minutos. La tinción azul indica la síntesis de proteoglicanos por condrocitos. Se tomaron imágenes al microscopio de campo claro (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Oberkochen, Alemania).

3.3 EXPRESIÓN DE MARCADORES DE PLURIPOTENCIA MEDIANTE RT-PCR

Con el objetivo de analizar la expresión de genes relacionados con pluripotencia, se sembraron hAMSC y se mantuvieron en cultivo en normoxia e hipoxia hasta alcanzar confluencia. En paralelo, se cultivó la línea HEK293T en normoxia en el medio adecuado. Para la extracción de ARN se utilizó el kit *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Alemania).

El proceso se realizó de forma automática en el equipo QIACUBE (QIAGEN, Hilden, Alemania). La cuantificación de la concentración de ARN se realizó mediante espectrofotómetro NanoDrop® ND 1000, mientras que la determinación de la integridad del ARN y la obtención de número de integridad de ARN (RIN, del inglés, *RNA integrity number*) se realizó mediante electroforesis utilizando RNA Nano Chips en el equipo 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU.). Para la retrotranscripción de ARN se utilizó el "*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*" (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EE.UU.). Se retrotranscribieron 250 ng de ARN en un volumen final de 20 μ L. Posteriormente las muestras se diluyeron con H₂O destilada a una concentración final de ADNc de 2,5 ng/ μ L. Las condiciones de la RT-PCR fueron las siguientes: 10 minutos 25°C, 2 minutos 37°C, 5 segundos 85°C, ∞ 4°C.

Las reacciones de PCR a tiempo real (RT-PCR) se llevaron a cabo por triplicado para cada ADNc, empleando sondas TaqMan comerciales para los genes *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* y TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG 1X (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) en un volumen final de 10 μ L. El software empleado para el análisis de los datos fue SDS Software (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EE.UU.).

Como control se utilizó ARN extraído de iPSC. Le agradezco sinceramente a la Dra. Eva Richard (Universidad Autónoma de Madrid) la cesión de una muestra de ARN de una línea iPSC control (FiPS Ctrl2-SV4F-1) obtenida del "Banco Nacional de Líneas Celulares" del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, Madrid, España). Para el uso de esta línea iPSC, la Dra. Richard cuenta con la aprobación ética otorgada por el Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Madrid y con la autorización de la Dirección General de Investigación, Formación e Infraestructuras Sanitarias, Comunidad de Madrid, España.

3.4 ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Las hAMSC fueron sembradas por triplicado, a una concentración inicial de 10⁴ células por cm² (tiempo 0) en placas multipocillo M6 (10 cm²) e incubadas a 37°C en condiciones de normoxia e hipoxia. Los cultivos fueron recogidos a los 5 días, cuantificados mediante hemocitómetro y resembrados de nuevo a la densidad inicial de 10⁴ células/cm². Se repitió este protocolo durante 25 días. El número de duplicaciones del cultivo en cada pase se calculó según la ecuación: \log_2 (número de células recogidas/número de células sembradas). La fórmula de Patterson fue utilizada para la determinación del tiempo de duplicación (T_d): $T_d = T_x \log_2 / \log(N_t / N_0)$, donde T es el tiempo en horas que tarda el

MATERIALES Y MÉTODOS

cultivo para proliferar desde un N_0 a N_t , siendo N el conteo celular. La curva de proliferación se determinó mediante la suma acumulativa de los tiempos de duplicación correspondientes a cada pase celular.

3.5 ENSAYOS DE MOVILIDAD CELULAR *IN VITRO* – “HERIDA EN PLACA”

Un total de 4×10^5 hAMSC en pases 4 y 8 fueron sembradas en placas multipocillo M6 e incubadas en normoxia e hipoxia. Cuando los cultivos alcanzaron confluencia se realizó una “herida” utilizando una punta estéril (con este método se obtiene un “camino” libre de células). El seguimiento de la movilidad celular se efectuó a las 2, 5, 8, 10 y 24 horas, midiendo el ancho de la “herida” generada en centímetros. La anchura de la “herida” a tiempo 0 se tomó como referencia para los cálculos posteriores. La capacidad migratoria de las hAMSC *in vitro* se expresa como el porcentaje de cierre de la herida mediante la fórmula: anchura inicial de la herida menos la anchura de la herida en el tiempo indicado/la anchura inicial de la herida (en porcentaje). Las imágenes en campo claro de los cultivos se adquirieron utilizando una cámara acoplada al microscopio (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Oberkochen, Alemania). El software para la adquisición de imágenes utilizado fue ZEN2011.

3.6 INMUNOFLOURESCENCIA DE MARCADORES MESENQUIMALES, EPITELIALES Y NEURALES

Con el objetivo de evaluar la expresión de marcadores mesenquimales, epiteliales y neurales, se mantuvieron cultivos de hAMSC (pases 3 ó 4) en normoxia e hipoxia en medio basal DMEM alto en glucosa. Al alcanzar el 90% de confluencia, fueron fijados con paraformaldehído (PFA) al 4%. Para la realización de las inmunofluorescencias, las muestras fueron permeabilizadas y bloqueadas con solución de bloqueo (PBS, Tritón X-100 0,1%, FBS 5%) durante 30 minutos a temperatura ambiente y, a continuación, fueron incubadas con el correspondiente anticuerpo primario (**tabla 2**) diluido en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente, las muestras se lavaron 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente correspondiente (**tabla 2**), diluido en solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo indicado, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X. A continuación, las muestras se incubaron durante 5 minutos con DAPI (4’6-diamidino-2-fenilindol; 1 μ g/mL, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Se realizaron 3 nuevos lavados

de 5 minutos con PBS 1X y se montaron con Fluoromount (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, EE.UU.). Las muestras fueron observadas en un microscopio fluorescente invertido con un objetivo de inmersión de 40X (DMi8, Leica, Wetzlar, Alemania).

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la detección de marcadores mesenquimales, epiteliales y neurales

ANTICUERPO	REACTIVIDAD	ORIGEN	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	DILUCIÓN
Vimentina	Proteína de los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular	Pollo policlonal	Abcam	ab24525	1:1000
E-cadherina	Glicoproteína de transmembrana de adhesión celular	Ratón monoclonal	Becton Dickinson	ab397581	1:50
NeuN	Antígeno nuclear neuronal	Conejo monoclonal	Abcam	ab177487	1:300
Tuj-1	β -3 tubulina específica de neuronas	Ratón monoclonal	Convance	MMS-435P	1:500
Nestina	Proteína del filamento intermedio de progenitores neurales y neuronas	Ratón monoclonal	Merck	MAB5326	1:300
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial miembro específico glial de la familia de las proteínas de filamentos intermedios	Cobaya policlonal	Synaptic Systems	173_004	1:500
Anticuerpos secundarios	IgG pollo	Cabra	Thermo Fisher	A-11039	1:500
	IgG ratón	Cabra	Thermo Fisher	A-11029	1:500
	IgG cobaya	Cabra	Thermo Fisher	A-21435	1:500
	IgG conejo	Burro	Thermo Fisher	A-21207	1:500

3.7 EVALUACIÓN DE LA REGENERACIÓN AXONAL

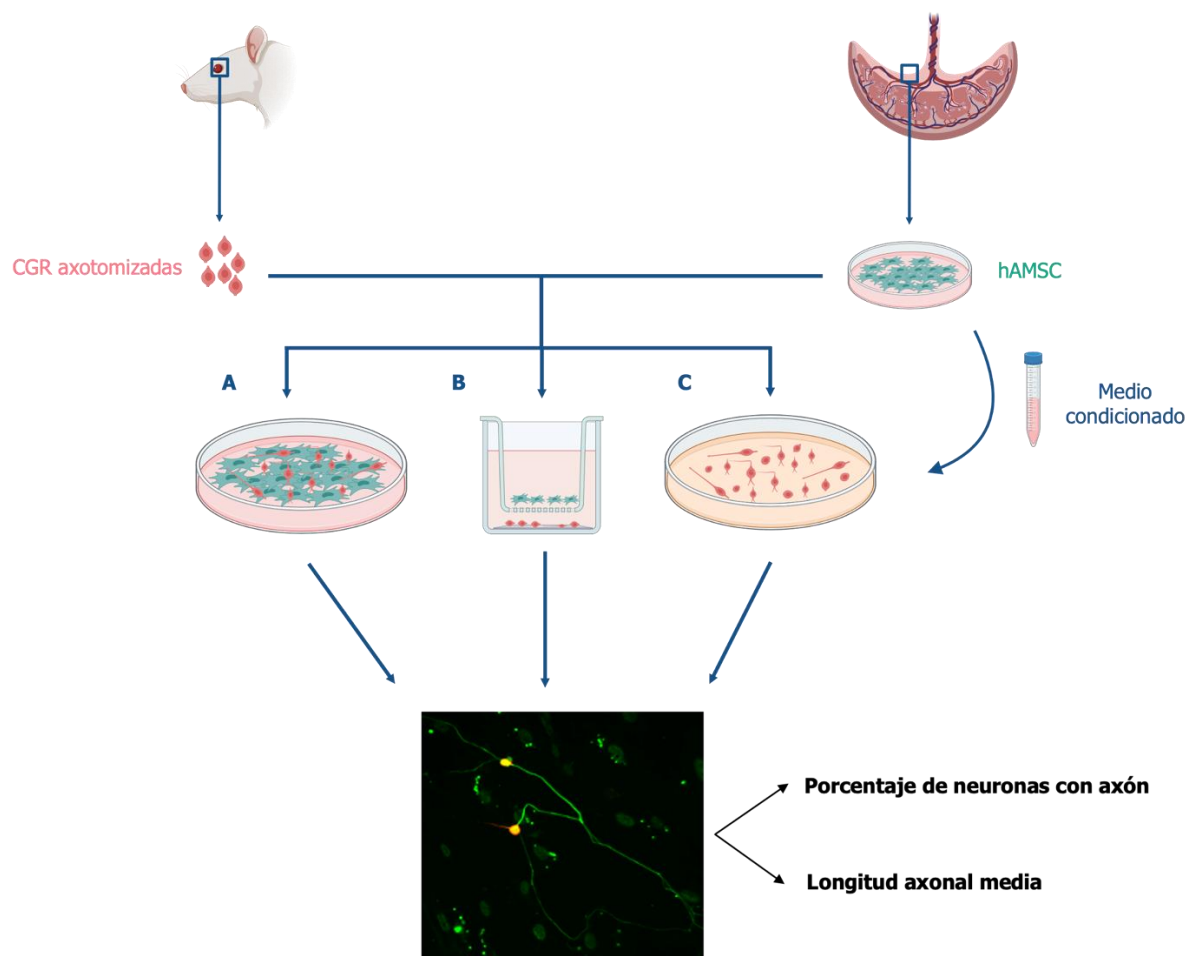


Figura 11: Modelo de estudio de regeneración axonal mediada por las hAMSC. Ilustración representativa del esquema de trabajo de los ensayos de regeneración. Se extrajeron las retinas de ratas adultas Wistar, tras cortar el nervio óptico. Después se llevó a cabo su disociación y digestión con papaína, tras lo cual la suspensión neuronal obtenida, con las células ganglionares de retina (CGR), se sembró (A) sobre una monocapa de hAMSC (co-cultivo directo), (B) en la parte inferior del pocillo con inserto Transwell (co-cultivo indirecto) y (C) con medios condicionados por hAMSC. Tras 96 horas, las neuronas son fijadas y se analiza mediante inmunofluorescencia el porcentaje de neuronas con axón y longitud axonal media ($\mu\text{m}/\text{neurona}$). Elaboración propia mediante BioRender.

3.7.1 Co-cultivos directos de hAMSC y GEO con neuronas ganglionares de retina de rata adulta

Se sembraron diferentes densidades de hAMSC (5×10^4 , 8×10^4 y 1×10^5 células totales) y como control de baja regeneración, células de GEO TS12 ($1,1 \times 10^5$ células totales) en cubreobjetos redondos de 12 milímetros en placas M24 y se dejaron crecer 24 horas

para que formasen un monocapa celular. Las células ganglionares de retina de rata adulta (ratas Wistar macho de 2 meses de edad; Envigo RMS Spain, SL) fueron extraídas utilizando el kit de papaína (20 unidades/mL; Worthington Biochemical Corporation, New Jersey, EE.UU.) siguiendo el protocolo previamente establecido por Wigley *et al.* y modificado por la Dra. Moreno-Flores *et al.* (Wigley & Berry, 1988; Sonigra *et al.*, 1999; Portela-Lomba *et al.*, 2020).

Brevemente, las retinas extraídas de rata adulta se colocaron sobre papaína y se trocearon con ayuda de un bisturí para obtener fragmentos de tamaño menor a 1 milímetro. Posteriormente, se incubaron a 37°C durante 30 minutos, agitándolas cada 10 minutos. El tejido fragmentado se disgregó mecánicamente pipeteando la solución con una pipeta Pasteur de vidrio 10-15 veces hasta obtener una suspensión homogénea. A continuación, se paró la digestión de la papaína y se centrifugaron las células durante 5 minutos a 200xg.

El pellet fue resuspendido en medio neurobasal (medio NB, Gibco, Grand Island, Nueva York, EE.UU.) suplementado con B-27 (B-27, Gibco, Grand Island, Nueva York, EE.UU.), con glutamina 2 mM (Lonza, Basilea, Suiza) y una solución de antibióticos y antimicóticos (Pen/Strep/Fung 10k/10k/25µg, Lonza, Basilea, Suiza) (NB-B27).

El medio de cultivo de las hAMSC y TS12 fue reemplazado por medio NB-B27 fresco. La suspensión con las neuronas disociadas resuspendidas finalmente en medio NB-B27 fue pipeteada sobre las monocapas celulares correspondientes (proporción 2 retinas/20 pocillos M24). Asimismo, se sembraron cultivos control de neuronas sobre cubreobjetos pre-tratados con Poli-L-Lisina (PLL, 10 µg/mL; Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.). Los co-cultivos fueron mantenidos 96 horas a 37°C tanto en normoxia como en hipoxia (**figura 11A**).

Pasado el tiempo de incubación, los co-cultivos fueron fijados con PFA al 4% para su posterior análisis mediante inmunofluorescencia.

3.7.2 Co-cultivos indirectos de hAMSC y GEO con neuronas ganglionares de retina de rata adulta (sistema Transwell)

La suspensión neuronal obtenida a partir de retinas disociadas por el procedimiento descrito anteriormente fue sembrada sobre cubreobjetos pre-tratados con PLL 10 µg/mL y colocados en la parte inferior de los pocillos de placas M24. Las hAMSC se sembraron

directamente en insertos Transwell de 0,4 μm de tamaño de poro a una densidad de 10^4 células/ cm^2 . Los insertos se colocaron en los pocillos sobre los cultivos de CGR, evitando el contacto con ellas. Este sistema se incubó en medio NB-B27 y se mantuvo en normoxia e hipoxia durante 96 horas. Cultivos control de neuronas ganglionares fueron sembrados sobre PLL 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los cultivos con las neuronas de retina fueron fijados con PFA al 4% (**figura 11B**) para su posterior análisis por inmunofluorescencia y cuantificación de la regeneración axonal.

Para comprobar la adherencia de las hAMSC a la parte superior de las membranas Transwell, éstas fueron fijadas con metanol durante 5 minutos, lavadas con H_2O destilada y teñidas con azul de metileno durante 10 minutos. Tras la tinción, las membranas fueron lavadas con H_2O destilada para eliminar los restos de colorante y observadas al microscopio óptico (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Oberkochen, Alemania).

3.7.3 Evaluación de la regeneración axonal producida por medios condicionados

Las hAMSC se sembraron a una densidad de 10^4 células/ cm^2 en medio basal DMEM alto en glucosa. Cuando los cultivos alcanzaron aproximadamente el 90% de confluencia, las hAMSC se lavaron con PBS (PBS EDTA pH 7,5; Lonza, Basilea, Suiza) y se mantuvieron en medio NB-B27 durante 96 horas. Se recogió el medio condicionado y se centrifugó a 400xg durante 5 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se añadieron inmediatamente a las superficies de cultivo (pocillos M24 con cubreobjetos circulares de 12 mm) sobre las que se realizaron los ensayos de regeneración axonal.

Las neuronas axotomizadas se sembraron como se ha descrito anteriormente y se cultivaron en medio condicionado o un volumen equivalente de medio NB-B27 (control). Las células se incubaron durante 96 horas, pasadas las cuales se fijaron con PFA al 4% para su posterior análisis por inmunofluorescencia y cuantificación de la regeneración axonal (**figura 11C**).

3.7.4 Anticuerpos bloqueantes de factores neurotróficos

Con el objetivo de determinar el papel que juegan las neurotrofinas BDNF y NGF en neurorregeneración mediada por hAMSC, se realizaron co-cultivos de CGR y hAMSC como se ha descrito previamente, y tras sembrar las CGR se administraron inmediatamente los siguientes anticuerpos bloqueantes/neutralizantes: anti-BDNF

(isotipo IgG, oveja, Invitrogen, cat# PA1-18363) y anti-NGF (isotipo IgG, conejo, Invitrogen, cat# PA1-18377). Como controles, algunos co-cultivos se trataron en paralelo con anticuerpos IgG de oveja (Invitrogen, cat# 31243) e IgG de conejo (Proteintech, cat# 14678-1-AP). Todos los anticuerpos neutralizantes se utilizaron a una concentración final de 20 µg/ml. Cultivos control de neuronas ganglionares fueron sembrados sobre PLL y sobre 8×10^4 hAMSC. Finalmente, todos los cultivos se incubaron durante 96 horas y posteriormente se fijaron con PFA al 4% para su posterior análisis por inmunofluorescencia y cuantificación de la regeneración axonal.

3.7.5 Inmunodetección de factores neurotróficos y factor inducido por hipoxia

Las hAMSC fueron sembradas a una densidad inicial de 10^4 células/cm² e incubadas en normoxia e hipoxia hasta alcanzar confluencia. Tras lavar con PBS, las células fueron recuperadas utilizando un rascador y homogeneizadas en tampón de extracción de proteínas (*RIPA buffer* compuesto por NaCl 150 mM, IGEPAL® 1%, DOC 0,5%, SDS 0,1%, Tris pH 8 50 mM) suplementado con inhibidores de proteasas 50X (Roche, Mannheim, Alemania) a 4°C. La solución fue centrifugada a 15.700xg durante 20 minutos a 4°C y los sobrenadantes guardados a -80°C. La concentración total de proteína fue cuantificada mediante la técnica basada en el ácido bicinconínico (BCA del inglés, *bicinchoninic acid assay*) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.).

Las muestras de proteínas (30 µg) fueron resueltas en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes y reductoras. Posteriormente, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF. La transferencia se realizó a 20 voltios a temperatura ambiente durante toda la noche en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 0,192 M, metanol 20%). Una vez comprobada la transferencia mediante tinción con *rojo Ponceau*, la membrana fue bloqueada durante una hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo T-TBS, 5% leche desnatada en T-TBS (T-TBS: Tris-HCl pH 7,1 20 mM, NaCl 137 mM, Tween 0,05%). A continuación, la membrana se incubó toda la noche a 4°C con diferentes anticuerpos primarios empleando la dilución óptima para cada uno de ellos en T-TBS-solución de bloqueo (1:1). Los anticuerpos empleados se detallan en la **tabla 3**. A continuación, la membrana fue lavada 4 veces durante 5 minutos con T-TBS e incubada a temperatura ambiente durante una hora con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en T-TBS. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con T-TBS y un lavado final de 5 minutos con TBS (Tris-HCL pH

MATERIALES Y MÉTODOS

7,1 20 mM, NaCl 137 mM). Los resultados fueron revelados utilizando el sistema de detección de quimioluminiscencia con ECL (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) y se tomaron imágenes con el equipo ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, Hercules, California, EE.UU.). La cuantificación relativa de las bandas obtenidas se realizó mediante el software ImageJ (ImageJ, NIH).

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas intracelulares

ANTICUERPO	REACTIVIDAD	ORIGEN	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	DILUCIÓN
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro	Conejo monoclonal	Abcam	ab108319	1:1000
NGF	Factor neurotrófico nervioso	Conejo monoclonal	Abcam	ab52918	1:1000
NT-3	Neurotrofina 3	Conejo policlonal	Abcam	ab75960	1:1000
HIF	Factor inducible por hipoxia	Conejo monoclonal	Abcam	ab51608	1:1000
β-actina	Péptido N-terminal de la actina β citoplasmática	Ratón monoclonal	Merck	A5441	1:5000

3.7.6 Cuantificación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento nervioso (NGF) y neurotrofina 3 (NT-3)

Se analizaron los niveles de BDNF, NGF y NT-3 en los medios obtenidos de los co-cultivos directos e indirectos y en medio NB-B27 condicionado por hAMSC. Para ello, se emplearon los kits ELISA de BDNF humano (Abcam, cat# ab1212166), de factor de crecimiento nervioso beta humano (Abcam, cat# ab193760) y de factor de neurotrofina 3 humana (Invitrogen, cat# EHNTF3) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Las muestras fueron analizadas por el lector de absorbancia de microplacas Sunrise™ (Tecan Trading AG, Suiza).

Tras las 96 horas de incubación de los ensayos de regeneración (co-cultivos directos e indirectos, ver apartados 3.7.1 y 3.7.2), el medio condicionado fue recogido y centrifugado a 1.200xg durante 5 minutos para eliminar restos celulares. El sobrenadante fue guardado a -80°C hasta su uso.

En paralelo, se sembraron 8×10^4 hAMSC en medio NB-B27 y se mantuvieron en condiciones de normoxia e hipoxia durante 96 horas, tras las cuales, se recogió el medio condicionado y se centrifugó a $1.200 \times g$ durante 5 minutos. Los sobrenadantes obtenidos fueron guardados a -80°C hasta su análisis.

3.7.7 Cuantificación de la capacidad neuroregenerativa de hAMSC

La evaluación de la capacidad neuroregenerativa de las hAMSC mediante los co-cultivos de hAMSC y TS12 con CGR axotomizadas, co-cultivos indirectos y medios condicionados se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia. Una vez fijadas, las muestras fueron permeabilizadas y bloqueadas en solución de bloqueo (PBS 1X, tritón 0,1%, FBS 1%) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente en solución de bloqueo a la dilución óptima para cada uno de ellos (**tabla 4**). La incubación se realizó a 4°C durante toda la noche. A continuación, las muestras fueron lavadas tres veces durante 5 minutos con PBS 1X e incubadas con el anticuerpo secundario fluorescente adecuado, en su dilución óptima. La incubación se realizó en solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente y oscuridad. Posteriormente, las muestras fueron lavadas tres veces durante 5 minutos con PBS 1X y se montaron con Fluoromount (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, EE.UU.). Las muestras fueron observadas en un microscopio fluorescente invertido con un objetivo de inmersión de 40X (DMi8, Leica, Wetzlar, Alemania) y se tomaron un mínimo de 30 campos (que contuvieran un mínimo de 200 neuronas) de manera aleatoria.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para la evaluación de la neuroregeneración mediante inmunofluorescencia

ANTICUERPO	REACTIVIDAD	ORIGEN	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	DILUCIÓN
514	MAP2A,B, marcador del compartimento somato-dendrítico	Conejo Policlonal	Laboratorio Dr. Ávila (CBM-UAM)	-	1:400
SMI31	Marcador axonal, neurofilamento H fosforilado	Ratón Monoclonal	BioLegend	801601	1:500
Anticuerpos secundarios	IgG ratón	Cabra	Thermo Fisher	A-11029	1:500
	IgG conejo	Burro	Thermo Fisher	A-21207	1:500

La capacidad neurorregenerativa de las hAMSC se valoró mediante la determinación de 2 parámetros: porcentaje de neuronas que han regenerado axón, calculado como (número de neuronas con axón/número total de neuronas) x 100 y la longitud media de los axones regenerados, calculado como longitud total de los axones regenerados en las neuronas contadas/número total de neuronas contadas (expresado como μm /neurona). Se empleó el software ImageJ (ImageJ, NIH) para la cuantificación de las señales de fluorescencia y la longitud de los axones se determinó mediante el *plugin* NeuronJ.

3.8 ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE LOS AXONES REGENERADOS

3.8.1 Detección de la expresión de vesículas sinápticas maduras y canales de sodio activados por voltaje

Para detectar la expresión de vesículas sinápticas maduras y canales de sodio activados por voltaje (VGSC, del inglés, *voltage-gated sodium channels*) en axones regenerados, se fijaron, permeabilizaron y bloquearon co-cultivos directos e indirectos como se ha descrito previamente. A continuación, se presenta una tabla con la información de los anticuerpos empleados (**tabla 5**).

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para la evaluación de la maduración axonal mediante inmunofluorescencia

ANTICUERPO	REACTIVIDAD	ORIGEN	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	DILUCIÓN
514	MAP2A,B, marcador del compartimento somato-dendrítico	Conejo Policlonal	Laboratorio Dr. Ávila (CBM-UAM)	-	1:400
SV2A	Glicoproteína de la membrana de vesículas sinápticas	Ratón	Laboratorio Dr. Morcillo (Universidad Extremadura)	-	1:200
SCN1A	Subunidad α del canal de sodio Nav1.1	Ratón monoclonal	Merck	S8809	1:100
Sinapsina I	Fosfoproteína neuronal que recubre las vesículas sinápticas	Conejo Policlonal	Abcam	ab254349	1:1000
Anticuerpos secundarios	IgG ratón	Cabra	Thermo Fisher	A-11029	1:500
	IgG conejo	Burro	Thermo Fisher	A-21207	1:500
	IgG conejo	Burro	Thermo Fisher	A-31573	1:500

3.8.2 Electrofisiología

Neuronas con axón regenerado fueron registradas utilizando la técnica *Patch-clamp* en su configuración de célula completa (del inglés, *whole-cell*) en los modos de fijación de voltaje y de corriente (del inglés, *voltage-clamp* y *current-clamp*) (Hamill et al., 1981) utilizando un amplificador Axopatch 200A (Axoninstruments, FosterCity, CA, Estados Unidos). Se fabricaron pipetas de borosilicato (1,2 mm de diámetro exterior) con un filamento interno de tungsteno utilizando un extractor de pipetas vertical (Narishige mod. P88, Narishige, Tokio, Japón). El diámetro interior de la pipeta fue de aproximadamente 0,5 a 1 μm . El llenado de la pipeta se realizó con una solución intracelular que contiene (en mM): NaCl 10, KCl 110, EGTA 5, CaCl₂ 0,5, MgCl₂ 1 y glucosa 10 (pH 7,4). La resistencia eléctrica de las pipetas se mantuvo en el rango de 8–12 M Ω (Mega Ohmios). La resistencia del sello fue de aproximadamente 1 a 3 G Ω (Giga Ohmios). El potencial de unión líquida se corrigió de forma rutinaria. El electrodo (de Ag o AgCl) se conectó a la perfusión a través de un puente de agarosa. El voltaje celular se mantuvo a -80 mV y se aplicaron pulsos despolarizantes de 30 milisegundos de duración en pasos de 5 mV. Tanto para el mantenimiento del potencial de membrana como la generación de pulsos se empleó un ordenador personal conectado a CED plus (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, Inglaterra). Las señales fueron filtradas con un corte apropiado para cada frecuencia y los datos se muestrearon entre 0,2 y 10 kHz (kilohercio). El análisis de datos se realizó fuera de línea utilizando un ordenador personal.

3.9 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism (versión 9.0; San Diego, California, EE.UU.). Los resultados mostrados a lo largo de este trabajo de investigación corresponden con la media estadística más menos la desviación estándar.

Para evaluar las diferencias en la capacidad de migración *in vitro* de las hAMSC se aplicó la prueba t para muestras independientes. La significación estadística se estableció con un valor de $p \leq 0,05$.

Para evaluar las diferencias en la capacidad de proliferación de las hAMSC y su expresión de factores neurotróficos se aplicó el test Two-way ANOVA seguido del post-test Šidák. La significación estadística se estableció con un valor de $p \leq 0,05$.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para las comparaciones estadísticas del estudio de la capacidad regenerativa, se aplicó el test One-way ANOVA, seguido del post-test de Dunnet, para la comparación múltiple entre las medias. La significación estadística se estableció con un valor de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES DE LA MEMBRANA AMNIÓTICA

La placenta humana representa un significativo reservorio de MSC, las cuales, gracias a sus propiedades únicas, se perfilan como candidatas ideales para la aplicación en terapia celular. El primer objetivo de esta tesis doctoral consistió en la caracterización de la línea de hAMSC de placenta humana utilizada por nuestro grupo. Además, se quiso comprobar su adecuación a la definición establecida para las MSC por la ISCT.

La caracterización de las hAMSC se realizó al 21% de concentración de oxígeno (normoxia) y al 1% de concentración de oxígeno, que corresponde a condiciones de hipoxia. De manera rutinaria los cultivos de MSC se mantienen en condiciones consideradas como normóxicas, con una concentración de oxígeno del 21%, que corresponde con la del aire inhalado. Sin embargo, esta concentración es significativamente superior a las de los nichos naturales de MSC, donde, a pesar de ser adyacentes a regiones perivasculares, las concentraciones de oxígeno son bajas. Por esta razón, evaluamos el papel que juega la concentración de oxígeno en el mantenimiento de las características y propiedades de las hAMSC.

4.1.1 Caracterización de hAMSC como MSC

En primer lugar, valoramos la adecuación de las hAMSC a los criterios establecidos por la ISCT publicados en 2006 para la definición de células mesenquimales estromales. Según éstos, las hAMSC deben ser adherentes en condiciones de cultivo estándar, expresar un panel específico de antígenos de superficie y diferenciarse a las tres líneas mesodérmicas *in vitro* (Dominici et al., 2006).

4.1.1.1 Caracterización morfológica

Las hAMSC fueron sembradas en medio DMEM alto en glucosa y mantenidas en condiciones de normoxia (21% de O₂) e hipoxia (1% de O₂). Como puede observarse en la **figura 12**, en ambas condiciones de cultivo, las células crecen adheridas a las placas y muestran la característica forma fibroblástica de las MSC, manteniéndose ésta a lo largo del tiempo en cultivo (pases 3 a 8).

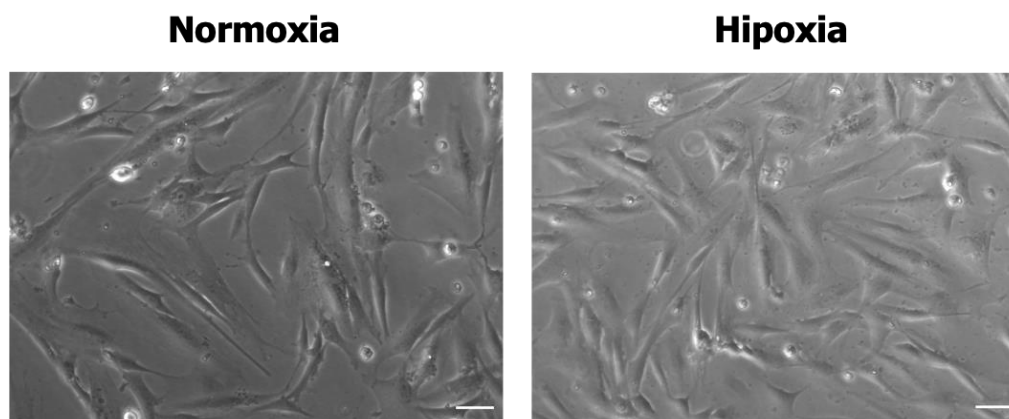


Figura 12. Caracterización morfológica de las hAMSC. Imágenes representativas en campo claro del cultivo de hAMSC en normoxia (izquierda) e hipoxia (derecha). La barra de escala equivale a 500 μm .

4.1.1.2 Inmunofenotipo

Con el objetivo de determinar la expresión en superficie de un panel consenso de antígenos asociados al linaje mesenquimal, epitelial y hematopoyético, se sometieron a las células a un análisis por citometría de flujo. Se incluyó en este estudio ecto-5'-nucleotidasa (CD73), Thy-1 (CD90), endoglina (CD105), marcadores de linaje hematopoyético (CD34 y CD45), marcador de monocitos (CD14) y marcador de células B (CD19). Además, el inmunofenotipo se completó con la evaluación de la expresión de las moléculas tipo II del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC-II), HLA-DR, como aproximación del estudio del estatus inmunológico de las hAMSC.

Los resultados obtenidos (**figura 13**) permiten determinar que nuestras células, de manera independiente a la condición de cultivo, son positivas para marcadores de células mesenquimales (CD73, CD90 y CD105) y negativas para los de células hematopoyéticas (CD34, CD45, CD14, CD19). Además, en estas mismas condiciones, las células son negativas respecto a la expresión del determinante HLA-DR de las moléculas tipo II del sistema HLA humano en normoxia y presentan una baja expresión en hipoxia. Estos resultados son consistentes con lo encontrado en bibliografía y confirman el patrón de expresión de antígenos de superficie de las MSC propuesto por la ISCT ([Portmann-Lanz et al., 2006](#); [Kim et al., 2007](#); [Soncini et al., 2007](#); [Díaz-Prado et al., 2011](#)).

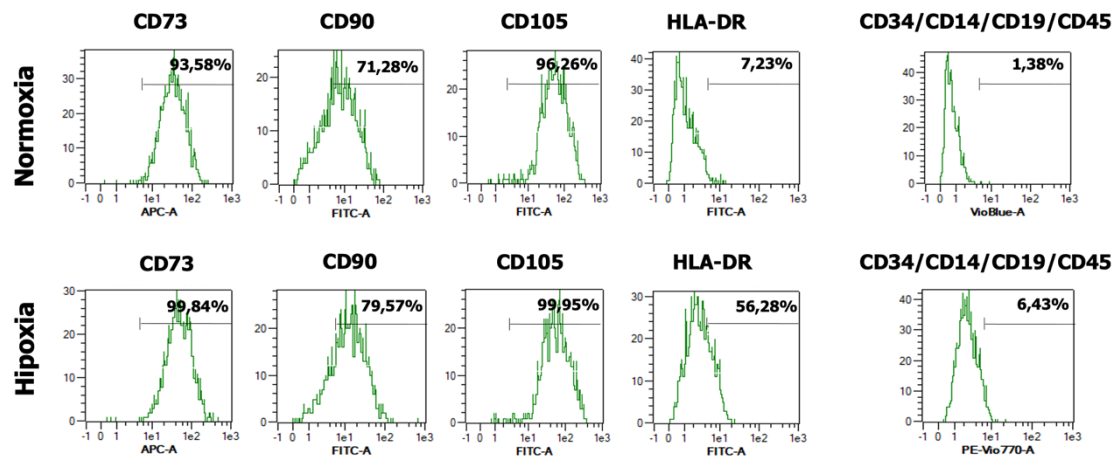


Figura 13. Inmunofenotipo de las hAMSC. Expresión de marcadores de superficie de las hAMSC analizada mediante citometría de flujo: las hAMSC son positivas para CD73, CD90, CD105, y negativas para CD34, CD14, CD19, CD45 y HLA-DR en normoxia e hipoxia.

4.1.1.3 Capacidad de diferenciación *in vitro*

Las células mesenquimales estromales son células multipotentes, es decir, su potencial de diferenciación está restringido a una capa germinal, diferenciándose a los tres linajes mesodérmicos: osteogénico, adipogénico y condrogénico. Para comprobar la capacidad de diferenciación de nuestras células hAMSC, se mantuvieron cultivos de estas células en los medios de inducción correspondientes en paralelo con cultivos en medios estándar utilizados como controles. La evaluación histoquímica de las hAMSC inducidas en diferentes concentraciones de oxígeno mostró su capacidad para diferenciarse en adipocitos, osteocitos y condrocitos (**figura 14**).

Para la detección de la diferenciación osteogénica *in vitro*, se empleó el método de tinción con *alizarin red*, lo que permite detectar depósitos de calcio teñidos de rojo tras la observación bajo el microscopio óptico. El número de focos de calcificación se incrementa en condiciones de baja concentración de oxígeno (**figura 14A**), indicando que las células hAMSC mejoran su potencial de diferenciación en hipoxia.

La diferenciación adipogénica *in vitro* dio lugar a la presencia de vacuolas lipídicas que se tiñeron de rojo con el colorante *oil red* (**figura 14B**). La formación de estas vacuolas lipídicas tras la inducción está condicionada por las condiciones de oxígeno en el cultivo, viéndose incrementado su número cuando las células son diferenciadas en hipoxia.

RESULTADOS

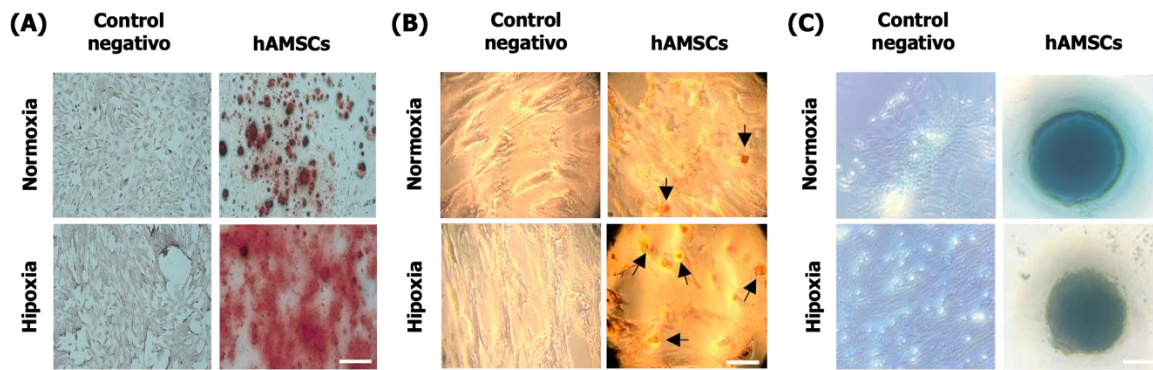


Figura 14. Estudio de la capacidad de diferenciación de las hAMSC a los tres linajes mesodérmicos. (A) la diferenciación osteogénica fue confirmada mediante la tinción de depósitos de calcio por *alizarin red*; (B) la tinción de mediante *oil red* de vacuolas lipídicas demostró la capacidad de diferenciación adipogénica; (C) la diferenciación condrogénica se evaluó mediante la tinción de proteoglicanos por azul alción. Las flechas oscuras indican la presencia de vacuolas lipídicas. La barra de escala equivale a 100 μm .

Por último, el potencial de diferenciación condrogénica *in vitro* fue confirmado mediante la tinción de proteoglicanos carboxilados y sulfatados en la matriz extracelular cartilaginosa por el colorante azul alción. En la **figura 14C** se muestran los resultados de la tinción tanto en normoxia como en hipoxia.

Las hAMSC, por tanto, son capaces de diferenciarse *in vitro* a los tres linajes mesodérmicos. Los resultados obtenidos, además, indican que las hAMSC mejoran su potencial de diferenciación osteogénica y adipogénica en condiciones de hipoxia.

Como conclusión, podemos afirmar que las hAMSC se ajustan a los criterios marcados por la ISCT para la definición de células mesenquimales estromales humanas.

4.1.2 Expresión de otros marcadores epiteliales, mesenquimales, neuronales y moléculas de adhesión

Para profundizar en la caracterización de las hAMSC, analizamos, mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo, la expresión de un panel de marcadores mesenquimales y de moléculas de adhesión (vimentina, CD44 y CD133), y marcadores epiteliales, como CD324 (E-cadherina). La vimentina es una proteína clave del citoesqueleto, correspondiente a los filamentos intermedios tipo III que se encuentra en las células de origen mesenquimal. CD44 es una glicoproteína transmembrana que ejerce

diversas funciones, se expresa en la superficie de las MSC, entre otras células, y que está implicada en autorrenovación y diferenciación celular. Por su parte, CD133, también conocida como prominina-1, es una glicoproteína de membrana que se utiliza a menudo como marcador de diversas poblaciones de células madre y progenitoras (Barzegar Behrooz et al., 2019).

Como se muestra en la **figura 15A**, confirmamos que las hAMSC en cultivo *in vitro* expresan el marcador de células mesenquimales vimentina, tanto en normoxia como en hipoxia. El análisis y cuantificación de la expresión en superficie de CD44 por citometría de flujo confirmó que el 99,92% y el 100% de las hAMSC cultivadas en normoxia e hipoxia, respectivamente, eran positivas para este marcador (**figura 15B**). Las células son negativas para CD133 en ambas concentraciones de oxígeno (**figura 15C**).

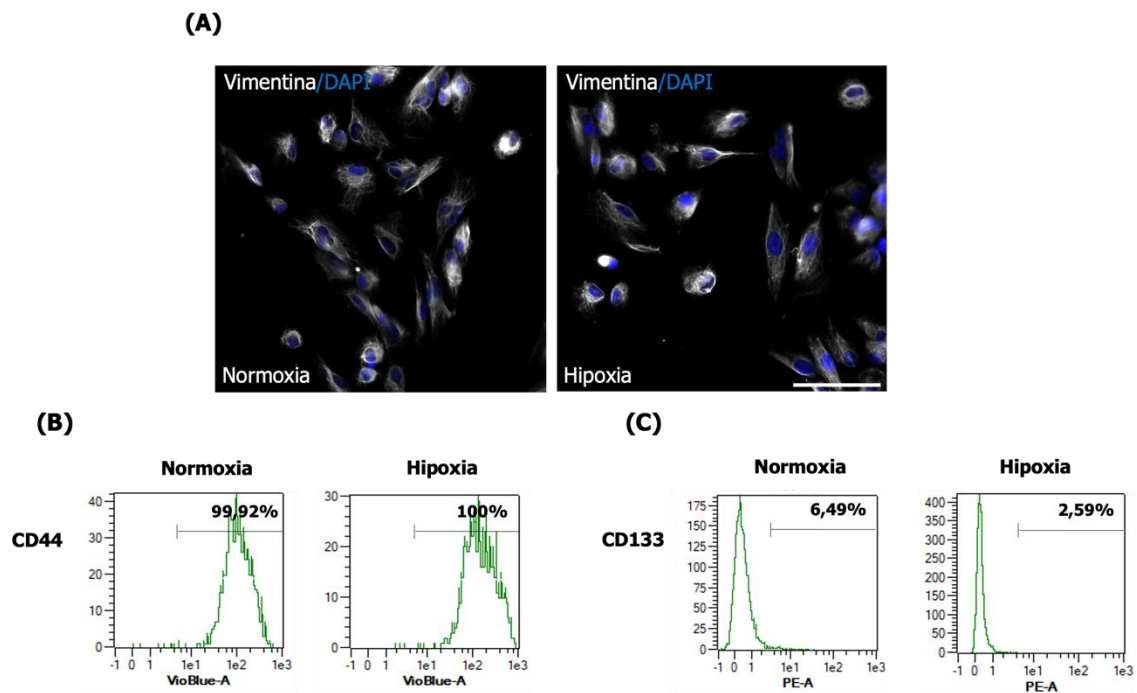


Figura 15. Análisis de expresión de marcadores mesenquimales y moléculas de adhesión. (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia del marcador mesenquimal vimentina en hAMSC en normoxia e hipoxia. La barra de escala equivale a 100 μm . Histogramas obtenidos por citometría de flujo de la expresión de marcadores CD44 (B) y CD133 (C) por hAMSC en diferentes concentraciones de oxígeno.

Por otra parte, analizamos la expresión de E-cadherina, proteína de unión intercelular del epitelio que forma parte de las uniones adherentes célula-célula y ampliamente usado como marcador epitelial. En el contexto de las MSC, la expresión de E-cadherina suele

RESULTADOS

ser baja o ausente, dado su origen mesenquimal. A diferencia de las células epiteliales, que expresan E-cadherina, las MSC muestran un patrón diferente de moléculas de adhesión celular, expresando preferentemente N-cadherina y cadherina-11. En nuestras condiciones de cultivo, tanto en normoxia como en hipoxia, las hAMSC son negativas para E-cadherina, como muestran las imágenes de la **figura 16**.

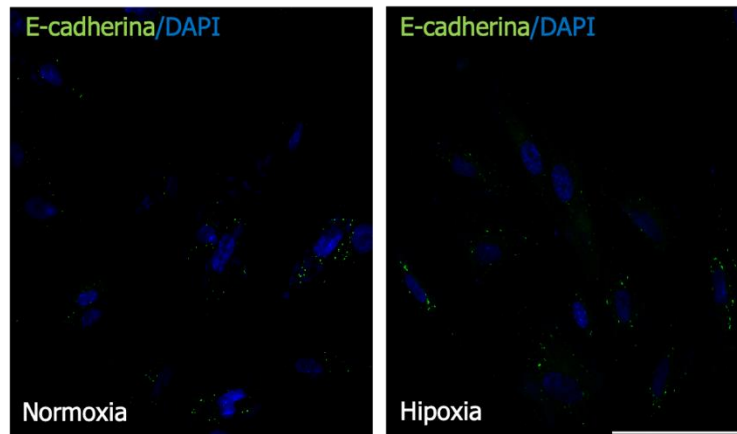


Figura 16. Expresión del marcador epitelial E-cadherina en las hAMSC. Imágenes representativas de inmunofluorescencia del marcador epitelial E-cadherina en cultivos hAMSC mantenidos en normoxia (izquierda) e hipoxia (derecha). La barra de escala equivale a 100 μm .

Para completar el panel de marcadores moleculares expresados por hAMSC y con el propósito de valorar su eventual aplicación en neuroregeneración, analizamos, mediante inmunofluorescencia, la expresión de marcadores neuronales y de progenitores neurogliales. Como marcadores neuronales generales escogimos β 3-tubulina (Tuj-1) y el antígeno nuclear neuronal NeuN/Fox3 (NeuN), mientras que se estudiaron nestina y GFAP como marcadores de precursores y células gliales. Los resultados se muestran en la **figura 17**.

El análisis de las imágenes obtenidas nos permite concluir que las hAMSC expresan marcadores neurales. Los cultivos mantenidos en ambas concentraciones de oxígeno mostraron inmunorreactividad positiva tanto para NeuN y Tuj-1 como para nestina, mientras que son negativas para el marcador de astrocitos GFAP.

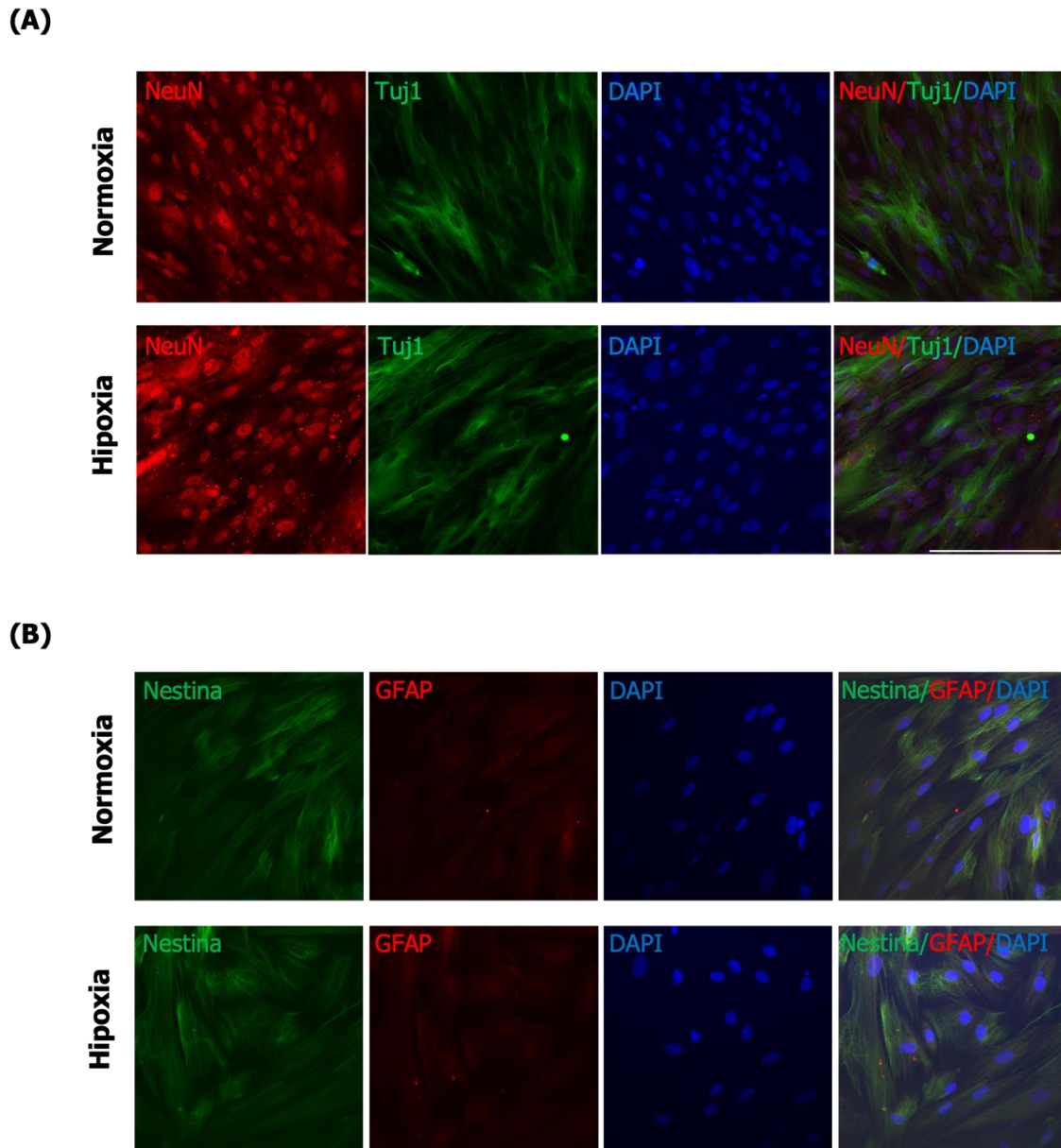


Figura 17. Expresión de marcadores neuronales y de células gliales en las hAMSC. Imágenes representativas del análisis por inmunotinción de la expresión de los marcadores neuronales NeuN y Tuj-1 (A) y de nestina (precursores gliales) y GFAP (B) (marcador de astrocitos) en hAMSC. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. La barra de escala corresponde a 100 μ m.

4.1.3 Expresión de marcadores de pluripotencia

Basándose en su potencial de diferenciación, algunos autores proponen la hipótesis de que las células mesenquimales estromales de placenta se sitúan en un estadio intermedio entre ESC (células pluripotentes) y MSC (células multipotentes). Sin embargo, trabajos previos publicados por los grupos de Chan *et al.* y Mihiu *et al.* (Mihiu *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2010), muestran resultados contradictorios respecto a la expresión por

RESULTADOS

parte de hAMSC de genes relacionados con pluripotencia. Por ello, nos propusimos valorar la expresión de *NANOG*, *OCT4* y *SOX2* en hAMSC mediante RT-PCR. Como controles empleamos la línea HEK293T (células de riñón embrionario de ratón inmortalizadas) y ARN extraído de la línea iPSC control (FiPS Ctrl2-SV4F-1) generosamente proporcionado por la Dra. Eva Richard.

Los resultados muestran una mayor expresión de los tres genes analizados en las hAMSC respecto a células diferenciadas como fibroblastos. Sin embargo, esta expresión es considerablemente menor cuando se compara con iPSC control (FiPS Ctrl2-SV4F-1). La expresión de *NANOG* y *OCT4* no depende de las condiciones de cultivo, mientras que la de *SOX2* es mayor en normoxia que en hipoxia (**figura 18**).

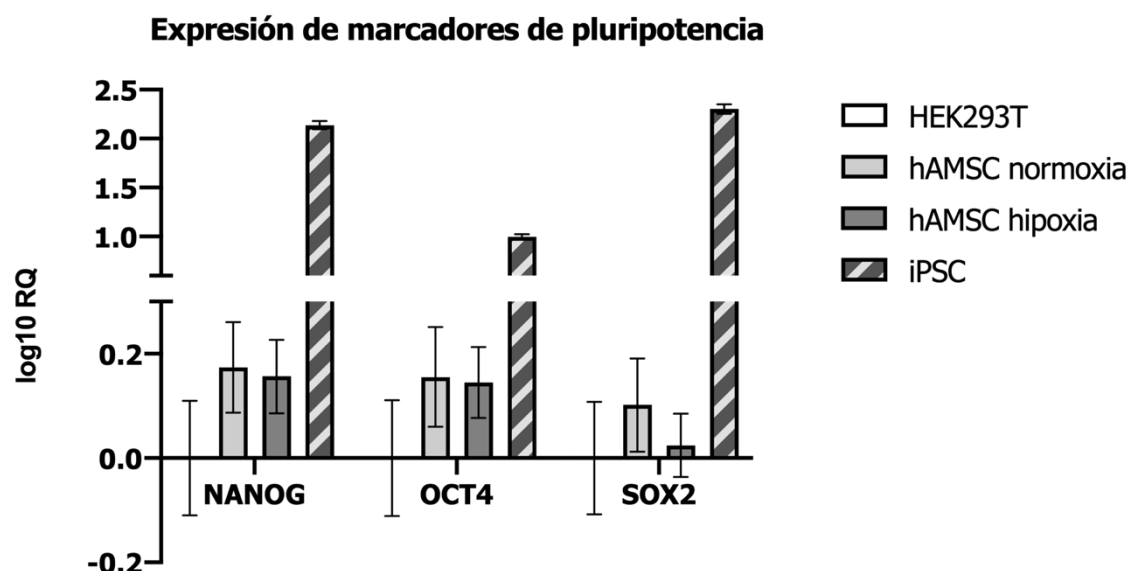


Figura 18. Expresión de marcadores de pluripotencia. Análisis por RT-PCR de la expresión de los genes relacionados con pluripotencia *NANOG*, *OCT4* y *SOX2* en normoxia e hipoxia, en hAMSC y en las líneas celulares HEK293T e FiPS Ctrl2-SV4F-1.

Teniendo en cuenta estos resultados, si bien las hAMSC expresan marcadores relacionados con pluripotencia en normoxia e hipoxia, los expresan a bajo nivel y no pueden considerarse células pluripotentes.

4.1.4 Proliferación celular y tiempo de duplicación

Con el objetivo de valorar la capacidad proliferativa de las hAMSC, se calculó la duplicación acumulada y el tiempo de duplicación de la población a lo largo de 25 días, abarcando desde el pase 3 a pase 8. En este experimento se valoró el efecto de la

concentración de oxígeno sobre la proliferación celular. El número de duplicaciones del cultivo en cada pase se determinó utilizando la ecuación:

$$\log_2 (\text{número de células recogidas/número de células sembradas})$$

La **figura 19A** muestra la cinética de crecimiento *in vitro* de la expansión de las hAMSC en normoxia e hipoxia mediante la representación gráfica de la duplicación celular acumulada de las poblaciones celulares en función del tiempo de cultivo.

En los pases iniciales estudiados (pases 4 a 6), la proliferación celular es significativamente mayor cuando los cultivos de hAMSC son mantenidos en hipoxia. La población de hAMSC en normoxia presenta una media de duplicaciones de 2,42, mientras que, en hipoxia, la media de duplicaciones en estos pases alcanza de media 3,29. Esto explica el hecho de que en pase 6, los cultivos en normoxia hayan acumulado un menor número de duplicaciones, $7,26 \pm 0,13$, respecto a los cultivos en hipoxia, $9,87 \pm 0,89$.

En los pases tardíos 7 y 8, se observa una ralentización en la dinámica de crecimiento celular en ambas concentraciones de oxígeno, lo que sugiere que son pases previos a la entrada en senescencia. Las duplicaciones celulares en ambos casos son inferiores a 2 (1,92 en normoxia y 1,82 en hipoxia). No obstante, las duplicaciones totales acumuladas en el último pase analizado (P8) son mayores en hipoxia. En condiciones de baja concentración de oxígeno, los cultivos de hAMSC han doblado la población celular un número veces $13,51 \pm 1,16$ duplicaciones respecto a sus equivalentes mantenidas en normoxia ($11,25 \pm 0,72$ duplicaciones).

Por otra parte, se entiende por tiempo de duplicación celular (T_d) el número de horas en las que un cultivo se duplica. Este parámetro fue calculado aplicando la fórmula de Patterson (ver materiales y métodos). Si bien el tiempo necesario para que la población se duplique en pases tardíos (pase 8) es similar en ambas condiciones de cultivo ($66 \pm 1,6$ horas en normoxia y $67 \pm 2,7$ horas en hipoxia), en pases tempranos de los cultivos (4 a 6) el tiempo de duplicación en hipoxia es significativamente menor que en normoxia (**figura 19B**). En estos pases, las hAMSC emplean una media de 50,14 horas en duplicar la población celular en cultivos mantenidos en normoxia, mientras que en hipoxia este tiempo es de 37,05 horas.

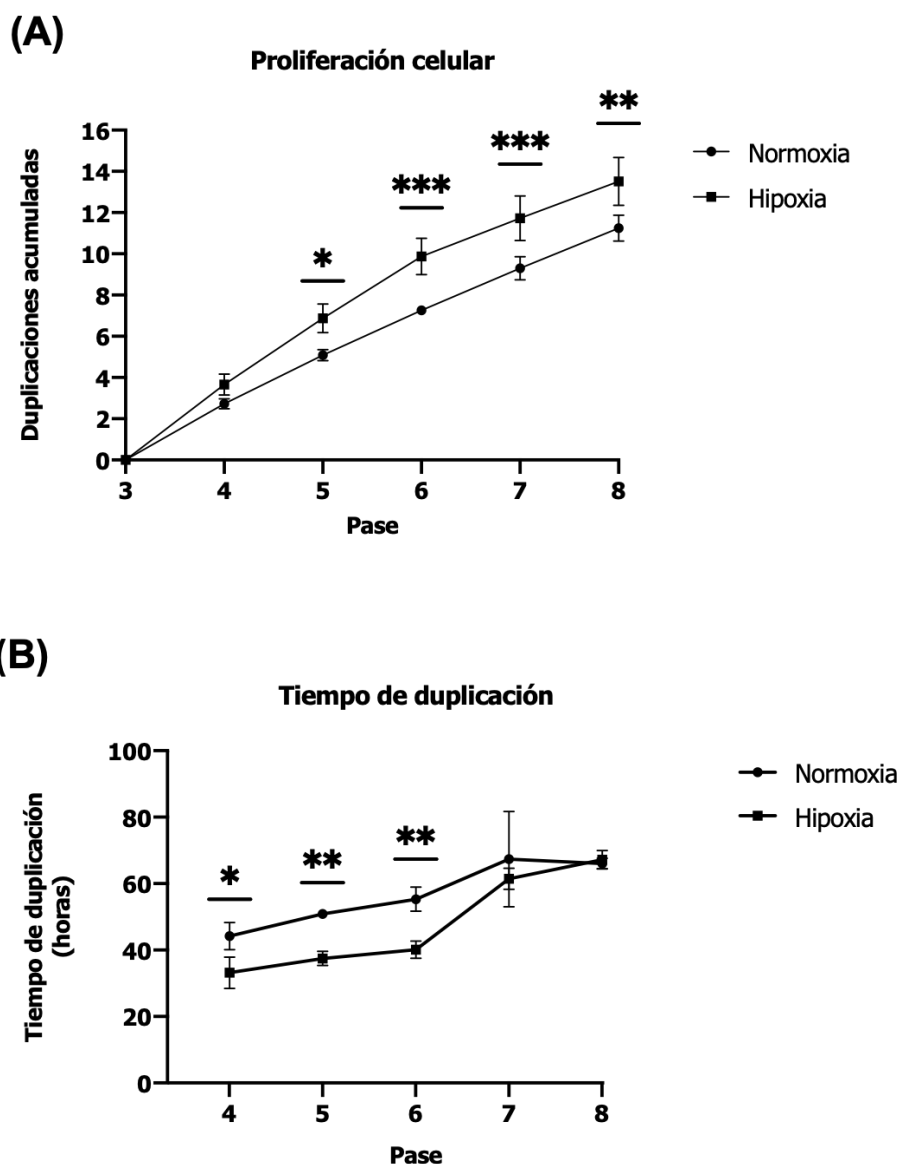


Figura 19. Dinámica de proliferación de las hAMSC *in vitro*. (A) Análisis de la capacidad de proliferación celular de hAMSC en normoxia e hipoxia expresada como duplicaciones acumuladas en función del pase celular. (B) Tiempo de duplicación de cultivos en normoxia e hipoxia calculados mediante la fórmula de Patterson en función del tiempo en cultivo. En ambos casos, se aplicó el test Two-way ANOVA seguido del post-test Šidák (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ y *** $p < 0,001$).

En su conjunto, estos resultados muestran que las hAMSC proliferan activamente *in vitro*, manteniendo duplicaciones celulares sostenidas durante los primeros pases en cultivo (pases 3 a 6). La proliferación decrece en pases tardíos (7 y 8) probablemente por la entrada en senescencia de las células. Las condiciones de baja concentración de oxígeno promueven un aumento estadísticamente significativo del potencial de crecimiento de hAMSC en los pases iniciales, lo que permite una expansión celular más rápida y un aumento del número total de células en los cultivos mantenidos en hipoxia.

4.1.5 Análisis de la capacidad migratoria *in vitro*

El potencial de migración (la capacidad para migrar de forma específica a regiones lesionadas) es una de las características más importantes de las MSC para su empleo como agentes terapéuticos y su administración sistémica. Por ello, evaluamos a continuación la capacidad migratoria *in vitro* de las hAMSC mediante la técnica de "herida en placa" en monocapas de células mantenidas en medio basal en diferentes concentraciones de oxígeno. La migración celular en pases iniciales (pase 4) y tardíos (pase 8) se expresa como el porcentaje de cierre de la herida realizada (ver materiales y métodos). Los resultados se muestran en la **figura 20**.

Como puede observarse en ambas concentraciones de oxígeno, tanto en pases iniciales como tardíos, las hAMSC son capaces de cerrar la herida a las 24 horas. En el pase 4, la hipoxia parece promover una capacidad de migración significativamente mayor de las células en las primeras horas del ensayo. Así, el porcentaje de cierre a las dos horas es del $7\% \pm 0,83$, alcanzando el $44,7\% \pm 1,39$ en la hora 10 tras la realización de la herida. Sin embargo, en condiciones de normoxia, no se observa migración en las dos primeras horas, obteniéndose un cierre del $30\% \pm 8,07$ en la hora 10 tras la realización de la herida.

Respecto a pase 8, las células mantienen la habilidad para migrar, aunque ésta es ligeramente inferior respecto al pase 4 en las dos condiciones de oxígeno ensayadas. Aunque el porcentaje de cierre de la herida a las dos horas de realizarla es similar en normoxia e hipoxia ($8\% \pm 2,63$ y $10\% \pm 4,98$, respectivamente), la migración de las hAMSC mantenidas en hipoxia en las horas posteriores es significativamente mayor que sus homólogas en normoxia. A las 10 horas de realizarse la herida, el porcentaje de cierre en normoxia es del $26\% \pm 5,26$, mientras que en hipoxia es del $38\% \pm 2,43$.

Confirmamos, por tanto, la capacidad de migración *in vitro* de hAMSC. Este potencial es conservado por las células a lo largo del tiempo en cultivo, ya que no se aprecian diferencias en el porcentaje de cierre de la herida entre pases iniciales (pase 4) y pases tardíos (pase 8). Sin embargo, los resultados indican que una baja concentración de oxígeno aumenta significativamente la capacidad migratoria *in vitro* de las hAMSC.

RESULTADOS

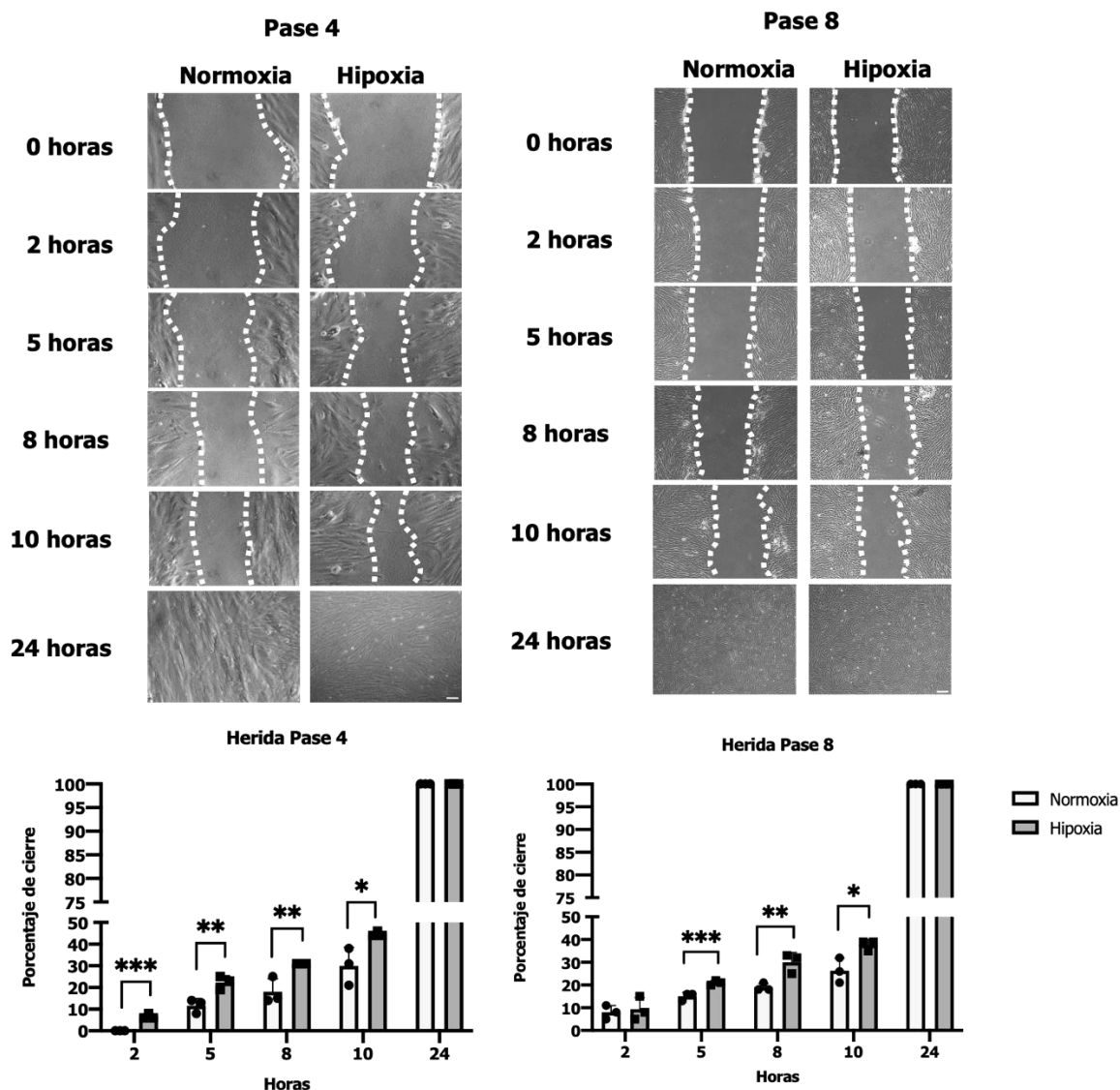


Figura 20. Evaluación de la capacidad de migración *in vitro* de las hAMSC. Imágenes representativas del ensayo de herida en placa realizado en normoxia e hipoxia (parte superior de la imagen) en pase 4 (izquierda) y pase 8 (derecha). La barra de escala corresponde a 500 μm . La capacidad migratoria *in vitro* se expresa como porcentaje de cierre de la herida (parte inferior de la imagen). Los resultados se compararon estadísticamente mediante una prueba t para muestras independientes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$).

4.2 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD NEURORREGENERATIVA DE hAMSC

Tras caracterizar nuestra línea de hAMSC, abordamos los experimentos para investigar el potencial de estas células en el proceso de regeneración axonal y restauración de la actividad neuronal de neuronas adultas axotomizadas del SNC. Utilizamos un modelo de regeneración *in vitro* mediante el co-cultivo directo de hAMSC con CGR de rata adulta

axotomizadas, previamente establecido por Wigley *et al.* y modificado por la Dra. Moreno-Flores *et al.* (Wigley & Berry, 1988; Sonigra *et al.*, 1999; Portela-Lomba *et al.*, 2020).

4.2.1 Evaluación del potencial neuroregenerador de hAMSC mediante cultivos directos

Como se ha mencionado, se realizó un ensayo de regeneración *in vitro* mediante el cultivo de hAMSC con CGR de rata adulta axotomizadas (ver **figura 11**). El sustrato Poli-L-Lisina (PLL) se empleó como control negativo de regeneración axonal, mostrando la habilidad intrínseca de las CGR para recrecer su axón. Además, como control de regeneración se usó la línea inmortalizada de GEO TS12, descrita en la literatura como una línea celular con baja capacidad regenerativa (Plaza *et al.*, 2016). La regeneración axonal se cuantificó mediante dos parámetros: por un lado, el porcentaje de neuronas con axón y, por otro, la longitud axonal media por neurona (**figura 21**).

En nuestro modelo experimental, la capacidad intrínseca de las CGR de rata adulta axotomizadas para regenerar su axón es muy limitada cuando son cultivadas sobre un sustrato no celular (PLL). Como puede observarse en las imágenes representativas de la **figura 21A**, sobre una base no biológica un reducido número de las CGR extienden un pequeño axón o dendrita. En condiciones de normoxia, apenas un $2,5\% \pm 0,5$ de las neuronas axotomizadas fueron capaces de recrecer su axón. La longitud media de estos axones regenerados fue de $4,43 \pm 1,8 \mu\text{m/neurona}$. En condiciones de baja concentración de oxígeno, la cuantificación de estos parámetros muestra valores inferiores a los mostrados por los cultivos en normoxia, lo que parece indicar que la ya de por sí baja capacidad intrínseca de regeneración axonal de las CGR disminuye en condiciones de hipoxia. Un porcentaje de $1,04\% \pm 1,1$ de las neuronas mostraban axón, siendo la longitud media de éstos de $1 \pm 0,7 \mu\text{m/neurona}$ (**figura 21B**).

Al emplear un sustrato celular, la capacidad de las neuronas axotomizadas para recrecer su axón se ve potenciada. Así, en condiciones de normoxia, al sembrar las neuronas sobre la línea celular TS12, tanto el porcentaje de neuronas con axón como la longitud media axonal se triplica, alcanzando el $7,6\% \pm 2,9$ y $13 \pm 5,7 \mu\text{m/neurona}$, respectivamente (**figura 21B**). Sin embargo, este aumento, comparando los resultados con los obtenidos en PLL, no es estadísticamente significativo, lo que concuerda con estudios previos del grupo de la Dra. Moreno-Flores (Plaza *et al.*, 2016; Portela-Lomba *et al.*, 2020) en los que se describe esta línea celular TS12 como de baja capacidad

RESULTADOS

regenerativa. La escasa supervivencia de TS12 en condiciones de hipoxia no permitió evaluar su potencial neuroregenerador en condiciones de baja concentración de oxígeno (**figura 21A**).

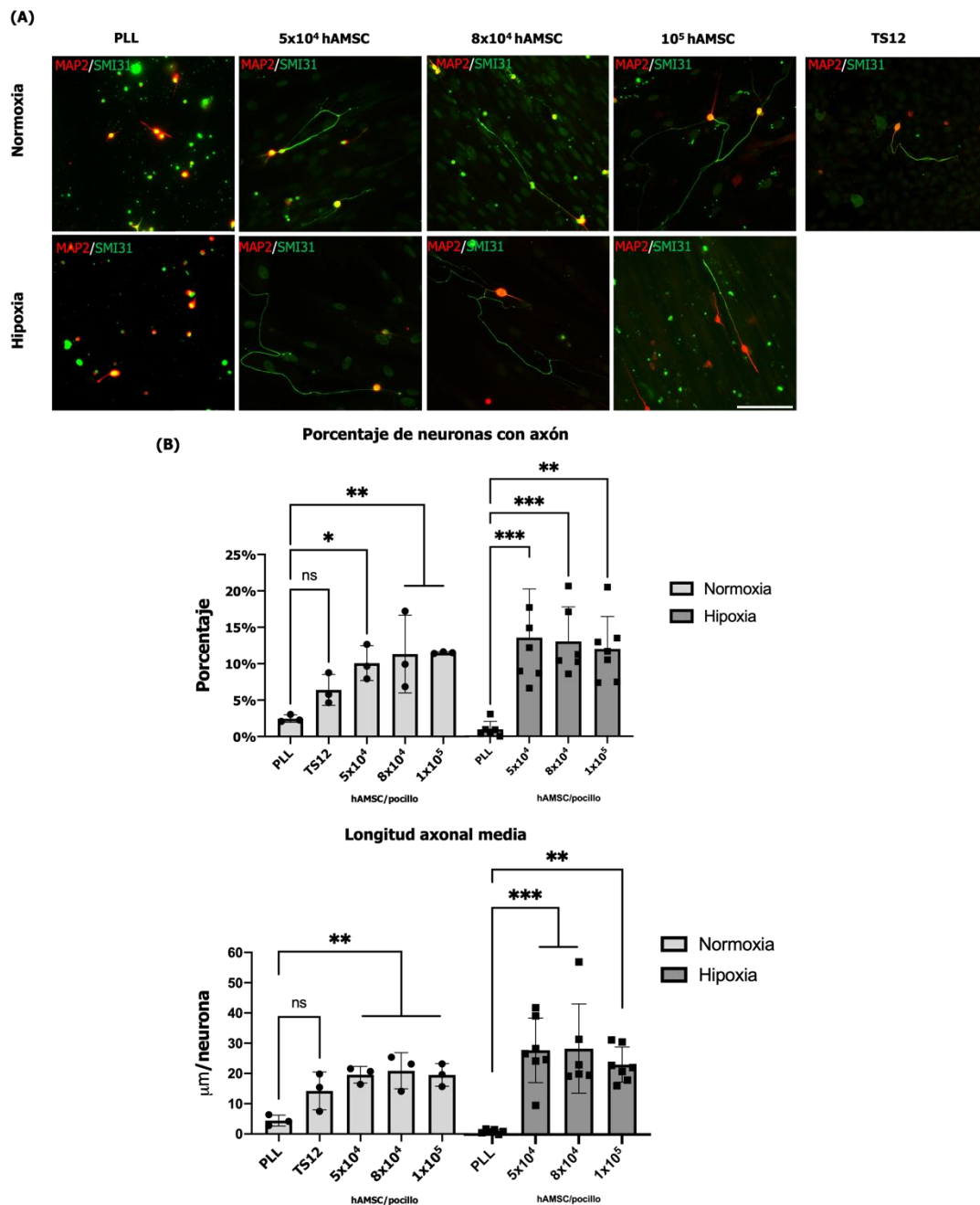


Figura 21. Evaluación de la capacidad neuroregenerativa de las hAMSC mediante co-cultivos con CGR axotomizadas de rata adulta. (A) Inmunotinción con marcador axonal (SMI31, verde) y marcador del compartimento somatodendrítico (MAP2A, rojo). La barra de escala corresponde a 100 μm . (B) Cuantificación de la regeneración axonal: porcentaje de neuronas de retina que regeneran axón (arriba) y longitud media de axón regenerado expresado como micras/neurona (abajo). Los test estadísticos aplicados fueron ANOVA y *post-hoc* Dunnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ y *** $p < 0,001$).

Nuestros resultados muestran un claro potencial neurorregenerativo de las hAMSC, tanto en normoxia como en hipoxia. Las imágenes obtenidas de las CGR sobre la monocapa celular formada por las hAMSC (**figura 21A**), ponen de manifiesto que, en estas condiciones, las neuronas son capaces de extender axones largos, en muchos casos ramificados.

El incremento de CGR con axón regenerado en presencia de hAMSC fue similar en ambas condiciones de oxígeno, siendo ligeramente más eficaz en hipoxia ($14,58\% \pm 7,8$, $14,01\% \pm 5,0$, $12,90\% \pm 4,7$ CGR con un axón cuando se co-cultivaron sobre 5×10^4 , 8×10^4 y 1×10^5 hAMSC, respectivamente) que en normoxia ($10,08\% \pm 2,3$, $11,33\% \pm 5,3$, $11,52\% \pm 0,1$ CGR con un axón) (**figura 21B**).

De manera similar, la longitud axonal media en normoxia fue de $19,57 \pm 2,74$, $20,88 \pm 5,96$, $19,52 \pm 3,75$ μm /neurona cuando las CGR se sembraron con 5×10^4 , 8×10^4 y 1×10^5 hAMSC, respectivamente y de $26,96 \pm 11,18$, $25,80 \pm 14,28$, $23,51 \pm 5,63$ μm /neurona en hipoxia (**figura 21B**).

La regeneración axonal para ambos parámetros es ligeramente mayor en hipoxia que en normoxia, y ambos parámetros analizados son significativamente mayores respecto a sus controles negativos (PLL). En condiciones de baja concentración de oxígeno, el porcentaje de neuronas con axón regenerado en presencia de hAMSC aumenta 14 veces y la longitud media alcanzada por estos axones se multiplica 25 veces con respecto a su control de CGR en PLL. En normoxia, tanto el porcentaje de CGR con axón como la longitud media de los axones aumentan solamente 4,5 veces respecto al control de PLL (**figura 21B**).

Por otro lado, el potencial neurorregenerativo, expresado por los dos parámetros cuantificados (atendiendo al porcentaje de neuronas con axón y la longitud media de los axones), no parece depender de la densidad celular de hAMSC sembradas. Por ello, se decidió emplear la densidad 8×10^4 hAMSC para subsiguientes experimentos.

En conclusión, las hAMSC promueven neurorregeneración en CGR axotomizadas en co-cultivos directo, tanto en normoxia como en hipoxia, pero lo hacen en mayor proporción en los co-cultivos mantenidos en hipoxia.

4.3 ESTUDIO DEL MECANISMO DE NEURORREGENERACIÓN MEDIADA POR hAMSC

Una vez confirmada la capacidad neuroregenerativa *in vitro* de las hAMSC, abordamos el objetivo de dilucidar el mecanismo a través del cual las hAMSC promueven regeneración.

4.3.1 Evaluación del potencial neuroregenerador de hAMSC mediante co-cultivos indirectos (sistema Transwell) y medios condicionados

El primer paso para el estudio del mecanismo subyacente al proceso de regeneración axonal mediado por las hAMSC consistió en la puesta a punto de un sistema de co-cultivo indirecto en el que los dos tipos celulares implicados (hAMSC y CGR axotomizadas) compartían las mismas condiciones de cultivo, pero estaban separadas físicamente por una membrana porosa (Transwell) (**figura 22A**).

Asimismo, para analizar el potencial efecto paracrino de factores solubles secretados por hAMSC, en paralelo, se analizó la regeneración axonal inducida por el medio NB-B27 condicionado previamente por hAMSC (MC). Estos experimentos se realizaron tanto en normoxia como en hipoxia. Las CGR sembradas sobre el sustrato no celular PLL se utilizaron como control (**figura 22A**).

En los co-cultivos indirectos (Transwell), en los que no hay contacto directo entre hAMSC y CGR, el porcentaje de neuronas con un axón regenerado en normoxia es de $7,41\% \pm 4,3$ y en hipoxia $6,19\% \pm 5,3$, mientras que el control en PLL es $4,85\% \pm 0,8$ y $4,29\% \pm 1,8$, respectivamente. En ambos casos, el porcentaje es inferior al alcanzado cuando las CGR son sembradas sobre una monocapa de 8×10^4 hAMSC, en co-cultivo directo ($12,09\% \pm 3,6$ en normoxia y $15,38\% \pm 6,5$ en hipoxia) (**figura 22B**). Estos datos están en línea con los obtenidos en los ensayos de neuroregeneración en co-cultivos directos y apuntan a que el contacto directo juega un papel relevante en la regeneración neuronal (**figura 22B**).

Sin embargo, la longitud axonal media por neurona en los co-cultivos indirectos es 2 veces superior en ambas condiciones de concentración de oxígeno respecto a los cultivos control en PLL ($19,0 \pm 2,24 \mu\text{m}/\text{neurona}$ en normoxia; $15,87 \pm 8,9 \mu\text{m}/\text{neurona}$ en hipoxia). Estos resultados parecen sugerir que existe también un efecto paracrino de los

medios condicionados de hAMSC que afecta a la elongación de los axones en regeneración (**figura 22B**).

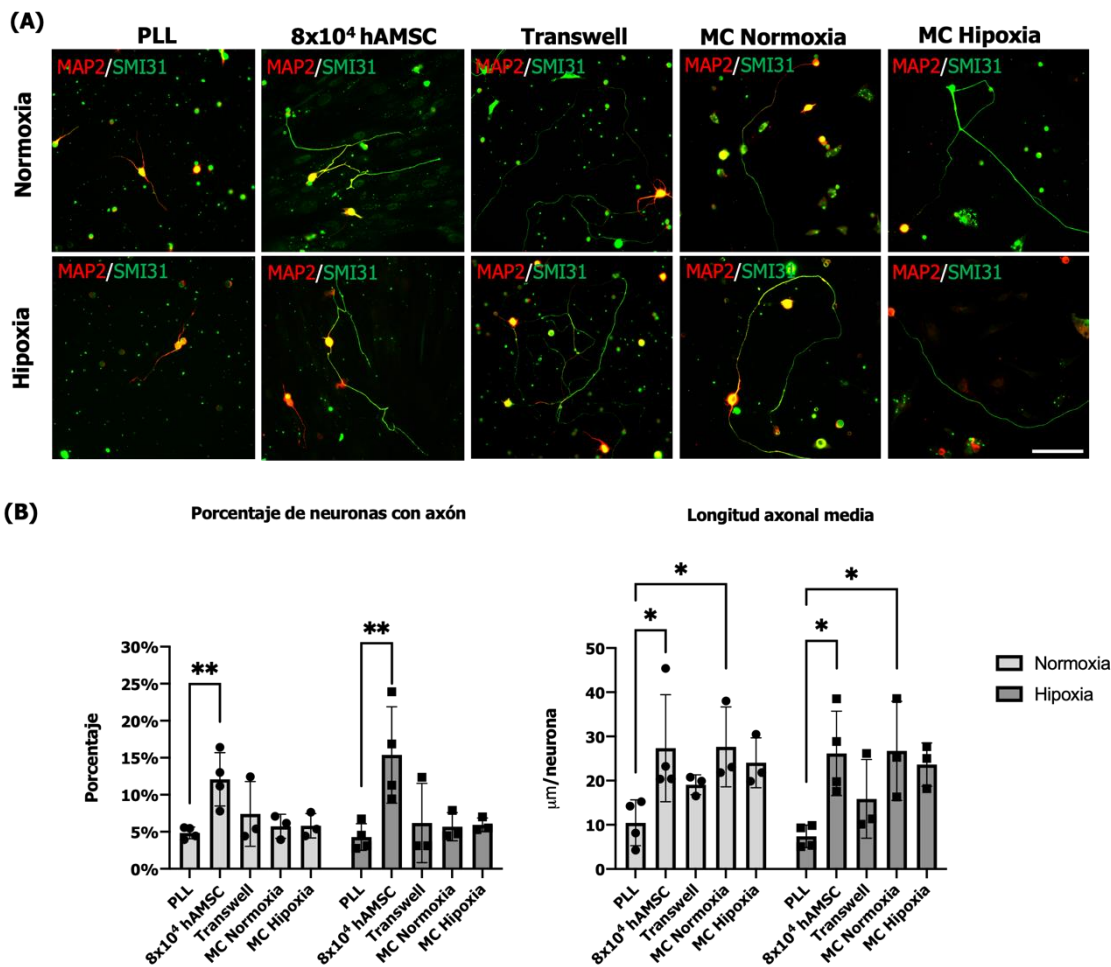


Figura 22. Evaluación del efecto de factores neurotróficos secretados por las hAMSC en neurorregeneración. (A) Imágenes representativas de la inmunotinción con el marcador axonal (SMI31) y el marcador del compartimento somatodendrítico (MAP2A). La barra de escala corresponde a 100 μm . (B) Cuantificación de la regeneración axonal: porcentaje de neuronas de retina que regeneran axón (izquierda) y longitud media de axón regenerado expresado como $\mu\text{m}/\text{neurona}$ (derecha). Los test estadísticos aplicados fueron ANOVA y *post-hoc* Dunnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ y *** $p < 0,001$).

Esta hipótesis se confirma al analizar la regeneración de CGR axotomizadas cultivadas en medio condicionado de hAMSC. En estas condiciones, el porcentaje de CGR con capacidad para recrear un axón no varía significativamente respecto al del control negativo PLL. En normoxia, cuando el medio de hAMSC se condiciona en normoxia, se alcanza un porcentaje de CGR con axón de $5,73\% \pm 1,62$, mientras que, si se condiciona en hipoxia, el porcentaje es de $5,81\% \pm 1,65$. En el contexto de hipoxia, los porcentajes

RESULTADOS

al emplear medio condicionado de hAMSC en normoxia e hipoxia son $5,69\% \pm 1,91$ y $5,94\% \pm 0,93$, respectivamente.

La longitud axonal media por neurona es entre 3 y 4 veces mayor que para las CGR cultivadas sobre PLL en medio NB-B27 fresco, tanto en normoxia como en hipoxia. En normoxia, la longitud media axonal es de $27,63 \pm 7,52 \mu\text{m}/\text{neurona}$ y de $24,04 \pm 5,66 \mu\text{m}/\text{neurona}$ al cultivar las CGR en medio condicionado de hAMSC en normoxia e hipoxia, respectivamente. En condiciones de baja concentración de oxígeno, la longitud media de los axones regenerados es de $26,72 \pm 11,2 \mu\text{m}/\text{neurona}$ en medio condicionado en normoxia y de $23,63 \pm 4,89 \mu\text{m}/\text{neurona}$ en medio condicionado en hipoxia. Esta longitud media es similar a la alcanzada cuando las CGR son sembradas sobre el sustrato biológico proporcionado por las hAMSC ($27,34 \pm 12,10 \mu\text{m}/\text{neurona}$ en normoxia y $26,16 \pm 9,57 \mu\text{m}/\text{neurona}$ en hipoxia). El potencial regenerador del medio condicionado en hipoxia sobre el crecimiento axonal en ambas concentraciones de oxígeno es menor que el de medios condicionados en normoxia y co-cultivos directos (**figura 22B**).

Los resultados obtenidos apuntan a que el potencial regenerador de las hAMSC sobre las CGR axotomizadas implica un efecto combinado entre el contacto célula-célula, hAMSC-CGR, y factores neurotróficos secretados al medio por las hAMSC.

4.3.2 Expresión intracelular de factores neurotróficos por hAMSC

Tras la observación del efecto de factores solubles en la neurorregeneración mediada por hAMSC, a continuación, nos centramos en el estudio de la síntesis de tres miembros de una familia de factores neurotróficos, las neurotrofinas. Estas neurotrofinas (BDNF, NGF y NT-3) están implicadas en la regulación de la función neuronal, regulando proliferación y diferenciación celular, crecimiento axonal y dendrítico, apoptosis, mielinación, sinaptogénesis y plasticidad sináptica (Pramanik et al., 2017). Se analizaron mediante Western blot extractos celulares de cultivos de hAMSC en los pases utilizados en los ensayos de neurorregeneración (pases 3 a 5), mantenidos en medio basal DMEM alto en glucosa, tanto en normoxia e hipoxia. El mismo procedimiento se siguió con cultivos de hAMSC en medio NB-B27, medio óptimo para neuronas y en el que se realizan los ensayos de neurorregeneración (**figura 23A,B**).

Tras la obtención de imágenes, se realizó la cuantificación relativa de las bandas obtenidas mediante el software ImageJ. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 23C,D**.

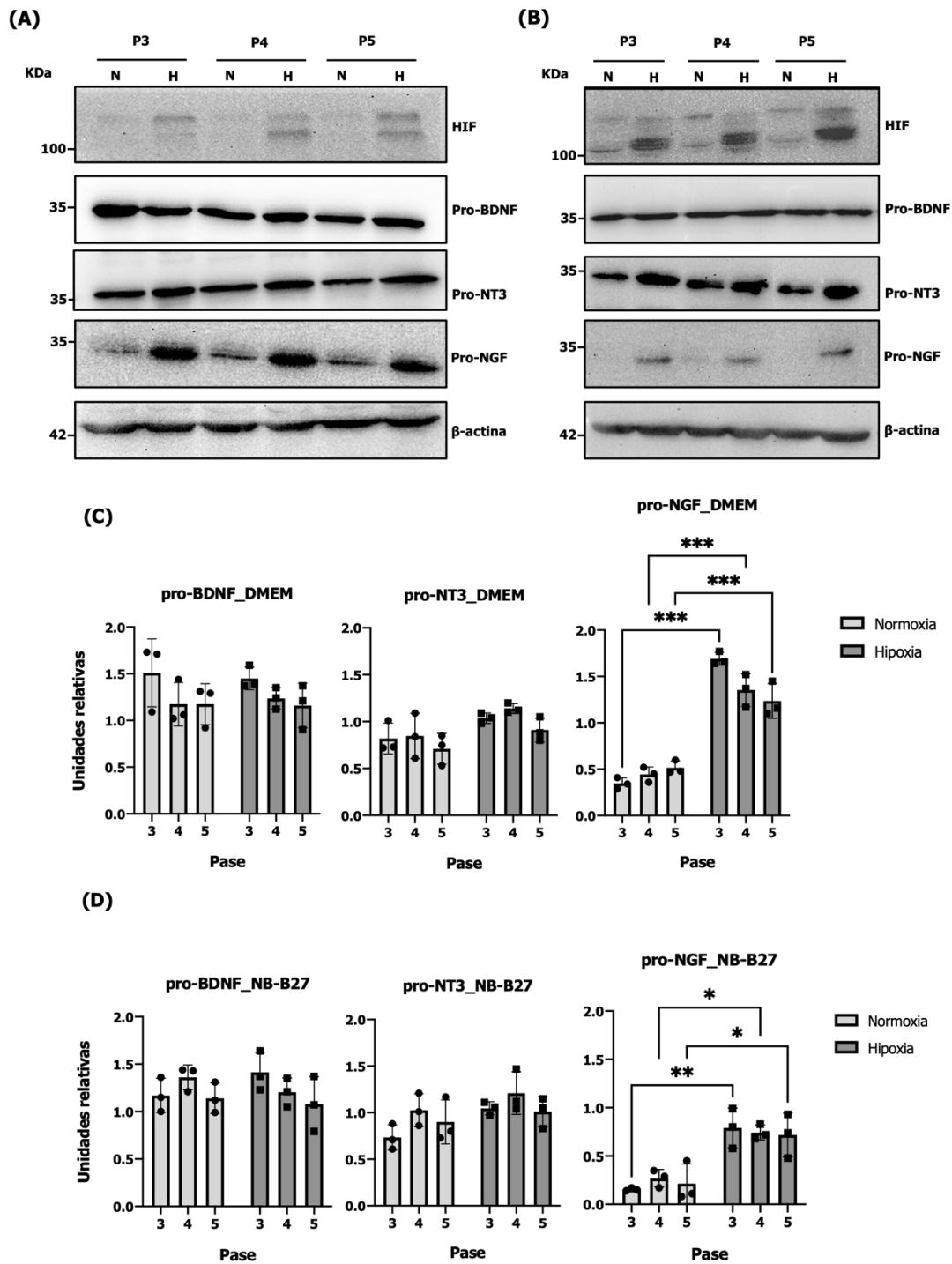


Figura 23. Síntesis de factores neurotróficos por las hAMSC. Imagen representativa de la inmunodetección de pro-BDNF (35KDa), pro-NT3 (35 y 32KDa) y pro-NGF (32KDa) en extractos de proteína de cultivos de hAMSC en pase 3 (P3), pase 4 (P4) y pase 5 (P5), mantenidos en normoxia (N) e hipoxia (H). Las hAMSC fueron cultivadas en (A) DMEM rico en glucosa (4,5 g/mL) o en medio NB-B27 (B). La expresión de proteínas se cuantificó como unidades arbitrarias utilizando el software ImageJ (C). Los valores se expresan como la relación entre la expresión del pro-factor correspondiente y la de la β -actina como control de carga en medio DMEM rico en glucosa (C) o en medio NB-B27 (D). El mantenimiento de las condiciones de hipoxia se controló mediante inmunodetección del factor inducible por hipoxia (HIF). Los test estadísticos aplicados fueron ANOVA y *post-hoc* Šidák (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ y *** $p < 0,001$).

RESULTADOS

La monitorización del mantenimiento de las condiciones de hipoxia se realizó mediante la inmunodetección del factor HIF- α en extractos celulares. En condiciones de concentración alta de oxígeno, HIF-1 α es sintetizado y degradado rápidamente por el proteasoma. La ausencia de oxígeno, por el contrario, posibilita la estabilización y la consiguiente acumulación de HIF- α en el interior celular y la activación de los genes dependientes de HIF. Las **figuras 23A y 23B** muestran, en los pases analizados, un incremento en la expresión de HIF- α en los cultivos mantenidos en hipoxia respecto a sus homólogos de normoxia.

El mecanismo de síntesis, procesamiento y secreción es análogo para las tres neurotrofinas estudiadas. Básicamente, se generan intracelularmente como precursores inmaduros (pro-factores con un tamaño comprendido entre 30 y 35KDa) que son procesados en varias etapas hasta ser secretadas como proteínas homodiméricas maduras activas (con tamaños entre 13 y 15KDa) (Lessmann et al., 2003; Pramanik et al., 2017). Tal y como se observa en las **figuras 23A y 23B**, las hAMSC sintetizan, de manera constitutiva, los precursores de las neurotrofinas analizadas. Esta expresión permanece constante durante el tiempo en cultivo.

En nuestras condiciones experimentales la síntesis intracelular de BDNF no depende de las condiciones de cultivo, lo que se deduce al no apreciarse diferencias de expresión con el tiempo en cultivo, ni en función de la composición de medio ni de la concentración de oxígeno (**figura 23C,D**).

Respecto a NT3, la síntesis de su precursor es menor que la de pro-BDNF y no depende del pase celular utilizado. A pesar de que la expresión de pro-NT3 en hipoxia es ligeramente mayor que en normoxia, la diferencia observada no es estadísticamente significativa (**figura 23C,D**).

Por último, la expresión de pro-NGF por las hAMSC en condiciones de normoxia es la menor de las tres neurotrofinas analizadas, siendo más eficiente en células mantenidas en DMEM rico en glucosa. En ambos medios de cultivo, las condiciones de hipoxia aumentan entre 3 y 4 veces la expresión del pro-factor, alcanzando valores similares a la expresión de BDNF cuando las células son mantenidas en su medio óptimo DMEM (**figura 23C,D**).

En conclusión, podemos afirmar que las hAMSC sintetizan constitutivamente los precursores de las neurotrofinas BDNF, NT3 y NGF, tanto en su medio basal (DMEM rico

en glucosa) como en el medio de cultivo utilizado en los ensayos de neuroregeneración (NB-B27). La expresión, en ningún caso, varía en los pases utilizados en dichos ensayos. Finalmente, las condiciones de hipoxia incrementan significativamente la expresión de NGF, no afectando a la expresión de BDNF y NT3.

4.3.3 Secreción de factores neurotróficos por hAMSC

Una vez confirmada la síntesis constitutiva de las neurotrofinas por las hAMSC, nos propusimos cuantificar la secreción de estos factores neurotróficos en los medios condicionados. Se analizaron medios condicionados de co-cultivos directos e indirectos, así como medios condicionados de los monocultivos de hAMSC mediante ensayos de inmunoadsorción (ELISA).

No se detectó la presencia de las neurotrofinas en los medios condicionados de las CGR sembradas sobre el sustrato PLL, lo que podría sugerir que la secreción de los factores por las neuronas axotomizadas es muy limitada o inexistente. Por ello, podemos inferir que la detección de los factores en los co-cultivos directos e indirectos se debe a la secreción de éstos por las hAMSC.

Efectivamente, como se observa en la **figura 24A,B,C**, las hAMSC, cultivadas en medio NB-B27 (8×10^4 hAMSC), secretan la forma activa de las tres neurotrofinas analizadas. Sorprendentemente, se observa una disminución en la concentración de los factores detectados en el secretoma cuando el mismo número de hAMSC (8×10^4 células) son cultivadas en presencia de CGR. Sin embargo, esta disminución únicamente es significativa en el caso de la NT-3.

En hAMSC cultivadas en medio NB-B27, la concentración de BDNF detectada en normoxia ($37,33 \pm 9,49$ pg/mL) es mayor que en hipoxia ($27,7 \pm 4,02$ pg/mL). Este resultado podría sugerir que, aunque la síntesis de pro-BDNF no se ve afectada por la concentración de oxígeno en cultivo (**figura 23D**), la secreción del factor soluble activo es más efectiva en normoxia (**figura 24A**).

En el caso de NT3, al igual que su síntesis intracelular, la concentración del factor en el medio NB-B27 condicionado por hAMSC es ligeramente (no significativamente) mayor en hipoxia ($33,35 \pm 1,13$ pg/mL) que en normoxia ($32,87 \pm 0,10$ pg/mL) (**figura 24B**).

RESULTADOS

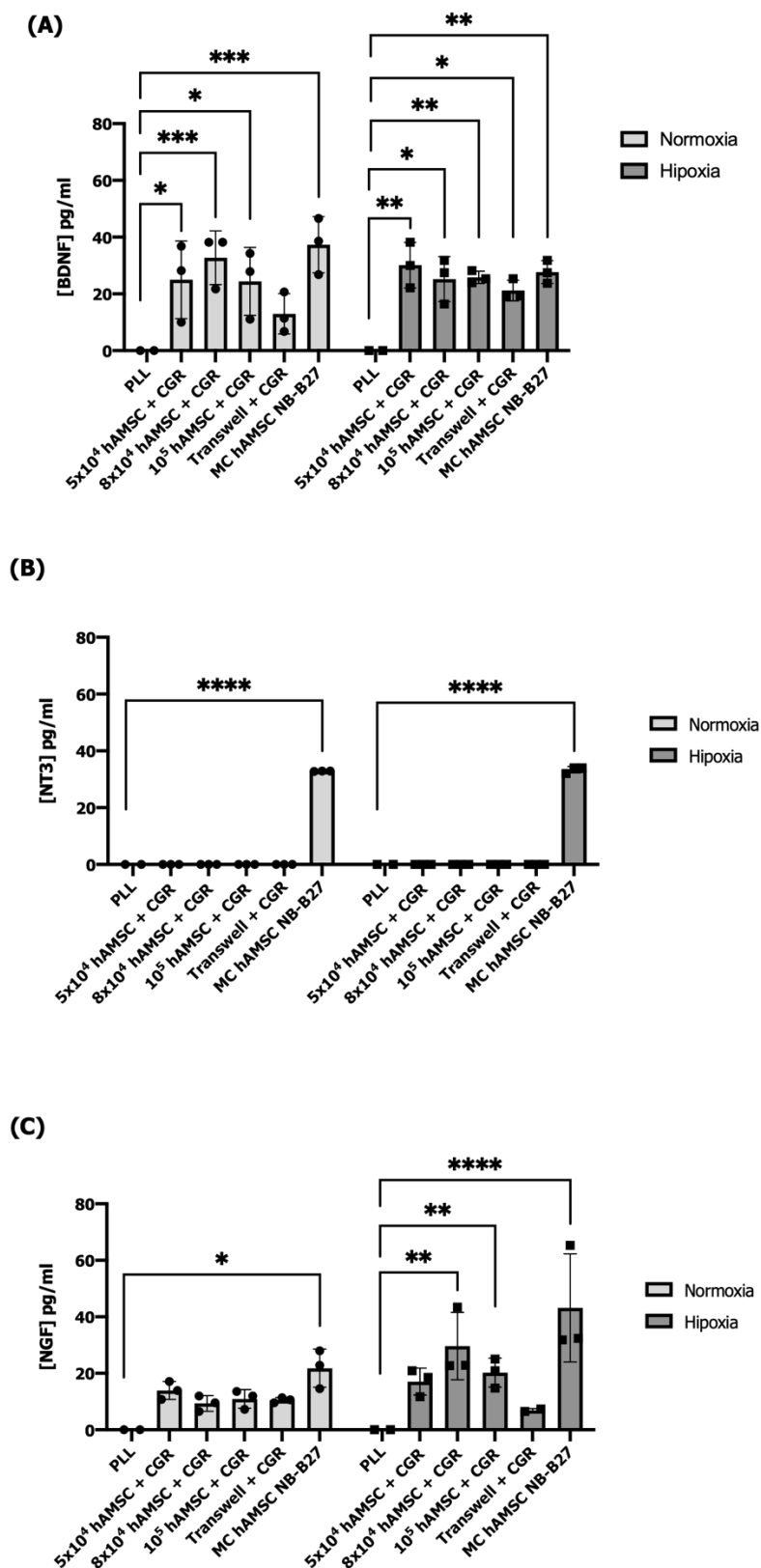


Figura 24. Secreción de factores neurotróficos por las hAMSC. La concentración de las neurotrofinas BDNF (A), NT3 (B) y NGF (C) fue analizada mediante ELISA en medios condicionados de co-cultivos, cultivos indirectos (Transwell) y de hAMSC (MC) en normoxia e hipoxia. Los test estadísticos aplicados fueron ANOVA y *post-hoc* Dunnett (**p*<0,05, ***p*<0,005, ****p*<0,001 y *****p*<0,0001).

Por último, como se ha mostrado anteriormente, la síntesis de pro-NGF es de 3 a 4 veces mayor cuando las hAMSC son cultivadas en medio NB-B27 en hipoxia respecto al cultivo en normoxia (**figura 23D**). Los resultados muestran que también la secreción de la neurotrofina activa es mayor en hipoxia, alcanzando una concentración dos veces superior ($43,15 \pm 19,15$ pg/mL) que en normoxia ($21,77 \pm 6,77$ pg/mL) (**figura 24C**).

En nuestros ensayos, no se detectó NT3 en los medios condicionados de los co-cultivos de CGR y hAMSC. Como se expuso en el apartado anterior (**figura 23D**), las hAMSC sintetizan el precursor de NT3 en ambas condiciones de oxígeno. La expresión de pro-NT3 fue intermedia respecto a la síntesis de los precursores de BDNF y NGF. Sin embargo, la secreción de la forma activa soluble de bajo peso molecular de NT3 se reduce drásticamente en presencia de CGR (co-cultivos directos y Transwell). El límite de resolución del ELISA empleado es de 4 pg/mL, por lo que no podemos descartar la presencia de la neurotrofina en concentraciones menores a este valor.

En los medios condicionados de los co-cultivos directos, la concentración de BDNF y NGF no depende del número de hAMSC que forman la monocapa sobre la que se siembran las CGR, aunque el orden del número de células no varía demasiado entre nuestras condiciones. La concentración de BDNF en los co-cultivos directos mantenidos en normoxia es de $25 \pm 13,68$, $32,74 \pm 9,49$ y $24,4 \pm 11,99$ pg/mL en las monocapas de 5×10^4 , 8×10^4 y 1×10^5 de hAMSC, respectivamente. En el caso de NGF, la concentración del factor secretado es de $13,93 \pm 3,17$, $9,33 \pm 2,75$ y $10,92 \pm 3,30$ pg/mL. En hipoxia, la concentración de BDNF es de $30,12 \pm 8,04$, $25,24 \pm 7,92$ y $25,83 \pm 2,18$ pg/mL. La secreción de NGF en condiciones de hipoxia es, de media, dos veces mayor que en normoxia ($17,06 \pm 4,76$, $29,66 \pm 11,93$ y $20,23 \pm 5,15$ pg/mL, en 5×10^4 , 8×10^4 y 1×10^5 de hAMSC, respectivamente).

Finalmente, la presencia de CGR en los co-cultivos parece modular la secreción de factores neurotróficos por parte de las hAMSC. Como ya se ha mencionado, el contacto directo entre ambas líneas celulares disminuye la concentración de factores en los medios condicionados. Es destacable la drástica reducción de la secreción de NT-3 en los co-cultivos hasta niveles indetectables de la neurotrofina. También es significativa la reducción de la secreción de NGF, en ambas condiciones de concentración de oxígeno. Por su parte, la liberación de BDNF se reduce, pero no de manera significativa, tanto en normoxia como en hipoxia.

RESULTADOS

Cuando las hAMSC y CGR están separadas físicamente por una membrana Transwell, también se detectaron los factores neurotróficos BDNF y NGF en los medios condicionados de los monocultivos de hAMSC (3×10^3 células/membrana). Así, la concentración de BDNF en los co-cultivos indirectos fue de $12,97 \pm 7,09$ pg/mL y $21,19 \pm 3,61$ pg/mL en normoxia e hipoxia respectivamente. En el caso de NGF, la concentración en normoxia es de $10,51 \pm 0,92$ pg/mL y en hipoxia $6,91 \pm 0,60$ pg/mL.

4.3.4 Análisis del papel de los factores neurotróficos secretados por hAMSC en la neuroregeneración

Para determinar el papel que juegan las neurotrofinas en la promoción de la regeneración axonal inducida por hAMSC, realizamos ensayos de neuroregeneración *in vitro* en condiciones en las que se interfería con la señalización de estos factores neurotróficos. Se llevaron a cabo co-cultivos de CGR y hAMSC en ausencia (control positivo) y en presencia de anticuerpos neutralizantes de las dos neurotrofinas detectadas en los medios de cultivo analizados previamente (BDNF y NGF). Los parámetros de regeneración axonal obtenidos en estas condiciones se compararon con los obtenidos para el control positivo (co-cultivos directos sin anticuerpos) y con los que se dieron en el tratamiento con IgG de conejo (IgG Rb) o IgG de oveja (IgG Sh), controles para los tratamientos de los co-cultivos con anti-BDNF y anti-NGF, respectivamente.

Como se muestra en la **figura 25**, los resultados para estos controles fueron similares en todas las condiciones. En condiciones de normoxia, la regeneración axonal se inhibió en presencia de los anticuerpos neutralizantes de BDNF y NGF. El porcentaje de neuronas con axón regenerado ($4,93\% \pm 1,30$ con anti-BDNF y $4,95\% \pm 1,99$ con anti-NGF) disminuyó un 30% respecto al control positivo. Además, la acción combinada de anti-BDNF y anti-NGF inhibió hasta un 44% el número de CGR capaces de recrecer su axón ($3,93\% \pm 1,98$) (**figura 25A**). Resultados similares se obtuvieron respecto a la longitud media de estos axones. Al añadir los anticuerpos neutralizantes a los co-cultivos, la longitud axonal por neurona se redujo un 27% en el caso de anti-BDNF ($11,46 \pm 1,27$ μm /neurona), un 37% con anti-NGF ($9,96 \pm 2,52$ μm /neurona) y un 49% en presencia de ambos ($7,96 \pm 2,75$ μm /neurona) (**figura 25B**).

En condiciones de baja concentración de oxígeno, la presencia de anticuerpos neutralizantes de BDNF y NGF, de manera individual o combinada, no parece afectar al porcentaje de neuronas que extienden sus axones ($5,85\% \pm 1,22$ en el control positivo,

6,03% \pm 1,70 con anti-BDNF y 6,31% \pm 1,35 con anti-NGF) (**figura 25A**). Respecto a la longitud axonal, la alcanzada en presencia de anti NGF (13,16 \pm 4,21 μ m/neurona) es similar a la obtenida en el control positivo (13,46 \pm 2,03 μ m/neurona), mientras que el bloqueo de BDNF reduce un 30% la longitud axonal (9,37 \pm 2,90 μ m/neurona) respecto al control positivo. La acción concomitante de los dos anticuerpos neutralizantes inhibe la extensión axonal un 32% (9,13 \pm 1,97 μ m/neurona) (**figura 25B**).

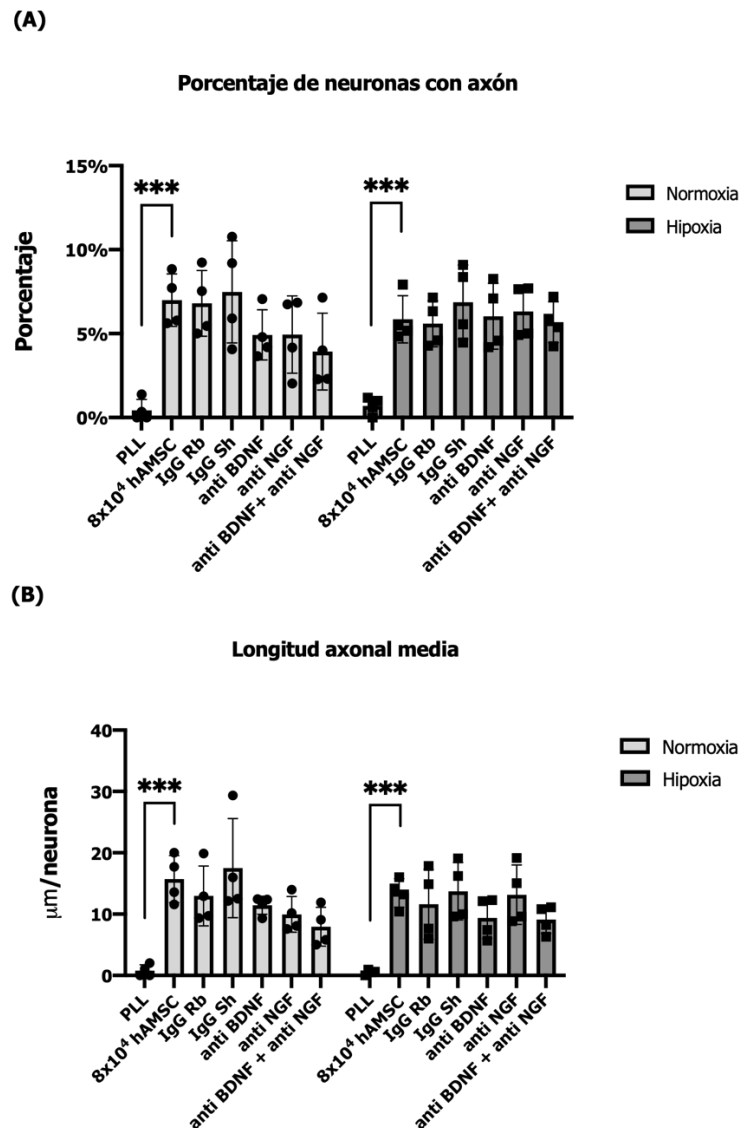


Figura 25. Efecto de la neutralización de factores neurotróficos en la neurorregeneración mediada por las hAMSC. Se realizaron co-cultivos de CGR y hAMSC (a una densidad de 8×10^4) a los que se añadieron anticuerpos neutralizantes de BDNF (anti BDNF), de NGF (anti NGF), la combinación de ambos (anti BDNF + anti NGF), anticuerpos control IgG de conejo (IgG Rb) y oveja (IgG Sh). En los histogramas se representan las cuantificaciones de (A) porcentaje de neuronas con axón y (B) la longitud media de los axones regenerados expresado con μ m/neurona. Los test estadísticos aplicados fueron ANOVA y *post-hoc* Dunnett (***) $p < 0,001$.

RESULTADOS

En resumen, la secreción de BDNF y NGF por las hAMSC parece ser necesaria pero no suficiente para aumentar la habilidad de las CGR axotomizadas para recrecer su axón. Por ello, podemos inferir que, probablemente, la regeneración mediada por hAMSC requiera de la acción combinada de estas neurotrofinas con otras moléculas y el contacto célula-célula.

4.4 ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE LOS AXONES REGENERADOS

Tras la confirmación del potencial neuroregenerador de las hAMSC, se abordó la evaluación de la funcionalidad de los axones regenerados mediante el análisis de la expresión de proteínas asociadas al mecanismo de sinapsis por un lado y el estudio de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas por otro.

4.4.1 Estudio de la maduración de axones regenerados

Con el objetivo de evaluar el estado de desarrollo (maduración) de los axones regenerados, se realizaron inmunofluorescencias empleando anticuerpos específicos contra sinapsina y la proteína de vesículas sinápticas 2A (SV2A, del inglés, *Synaptic Vesicle Protein 2A*). Tanto la sinapsina como SV2A forman parte de la membrana de las vesículas sinápticas, que son las encargadas de la concentración, almacenamiento y liberación de neurotransmisores.

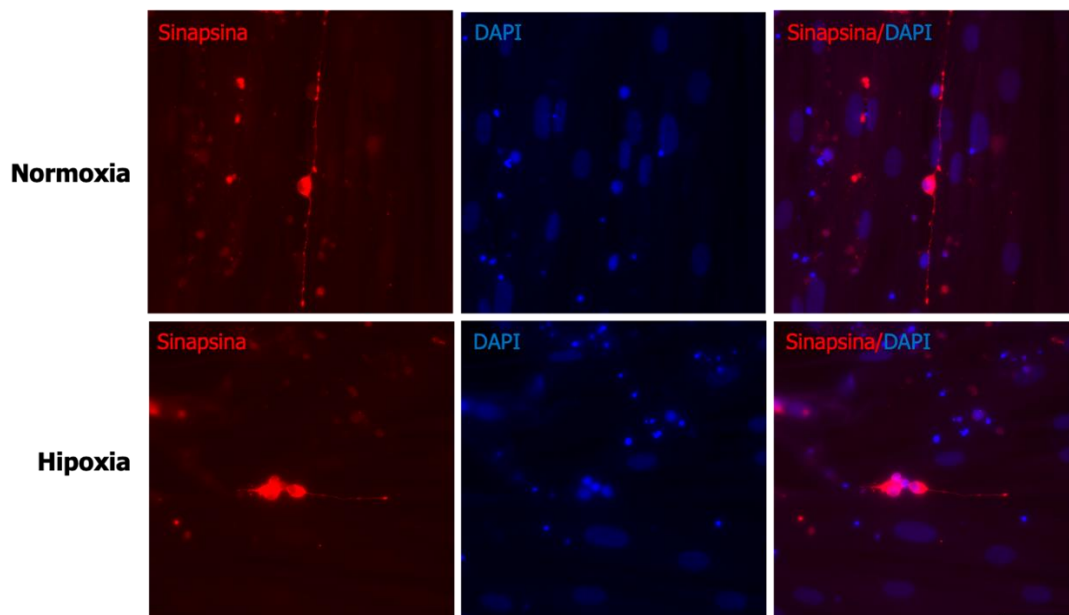


Figura 26. Estudio del estado de desarrollo de los axones regenerados. Imágenes representativas de la inmunodetección de sinapsina. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. La barra de escala corresponde a 50 μm .

La sinapsina es una proteína neuronal que desempeña un papel importante en la regulación de la liberación de neurotransmisores en las sinapsis. Se une a las vesículas sinápticas y ayuda a localizarlas cerca de la membrana presináptica. Además, regula la liberación de neurotransmisores al modular la movilización de las vesículas sinápticas y su fusión con la membrana presináptica (Zhang & Augustine, 2021).

Por su parte, la proteína SV2A es una glicoproteína de membrana de vesículas sinápticas que experimentan una secreción regulada por calcio. SV2A se expresa exclusivamente en neuronas y células endocrinas y es esencial para la liberación de neurotransmisores (Ciruelas et al., 2019).

Se detectó la expresión de sinapsina (**figura 26**) y SV2A (**figura 27**) en los axones regenerados de las CGR tras el co-cultivo con hAMSC en normoxia e hipoxia. Se pueden observar puntos de inmunotinción positiva para ambas proteínas a lo largo de los axones, con un tamaño y forma similares a los descritos previamente (Nowack et al., 2010).

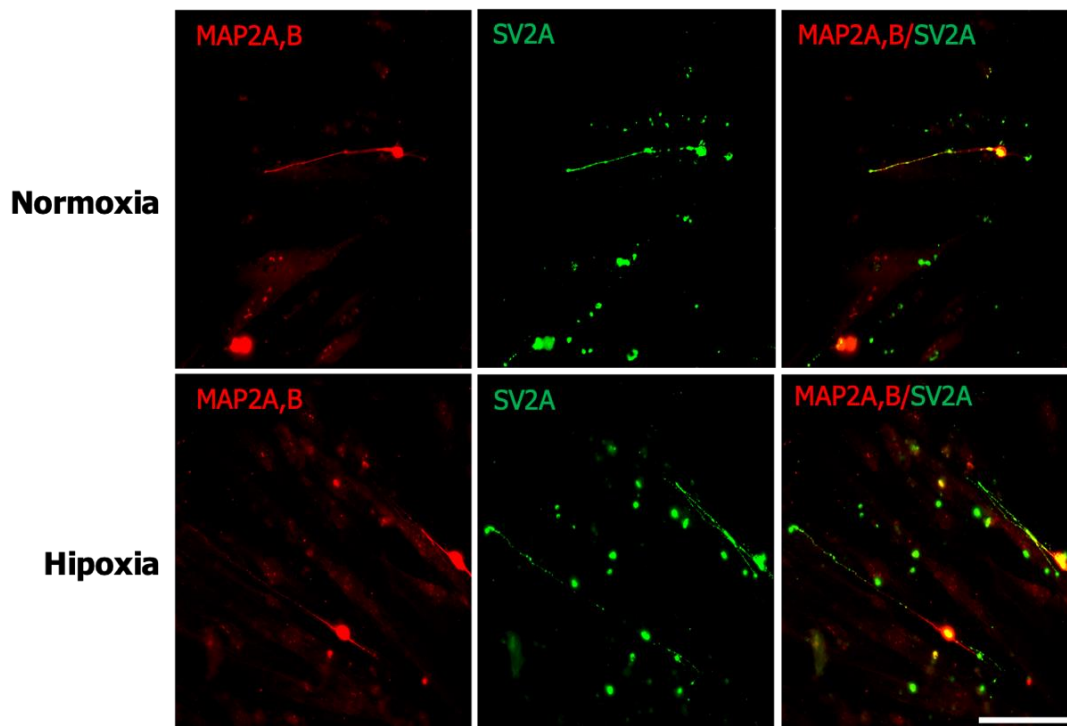


Figura 27. Estudio del estado de maduración de los axones regenerados. Imágenes representativas de la inmunotinción con el anticuerpo 514, contra MAP2A,B (marcador del compartimento somatodendrítico) y contra SV2A (glicoproteína de membrana de vesículas sinápticas 2). La barra de escala corresponde a 100 μm .

RESULTADOS

La inmunopositividad de sinapsina y SV2A en los axones regenerados señala que éstos se encuentran en una etapa avanzada de maduración. Además, sugiere que la regeneración promovida por hAMSC no sólo permite el recrecimiento axonal (confirmado por la expresión de marcadores estructurales como SMI31), sino también una posible recuperación funcional de los mismos.

4.4.2 Detección de la expresión y localización de canales de sodio dependientes de voltaje

Los canales de sodio activados por voltaje (VGSC, del inglés, *voltage-gated sodium channels*) son responsables de la iniciación y propagación de potenciales en células excitables. La subunidad Nav1.1 α de los VGSC (también conocida como SCN1A) se expresa predominantemente en los cuerpos celulares y las dendritas, y participa en la generación de potenciales de acción somatodendríticos y axonales (Catterall et al., 2010).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la inmunotinción de MAP2A,B permite la identificación del compartimento somatodendrítico neuronal. En la **figura 28**, el marcaje de SCN1A en axones regenerados de CGR reveló, en ambas condiciones de concentración de oxígeno, la presencia de VGSC. La co-expresión de SCN1A y MAP2A,B indica la localización de los canales en los cuerpos celulares, dendritas y la parte inicial de los axones de CGR.

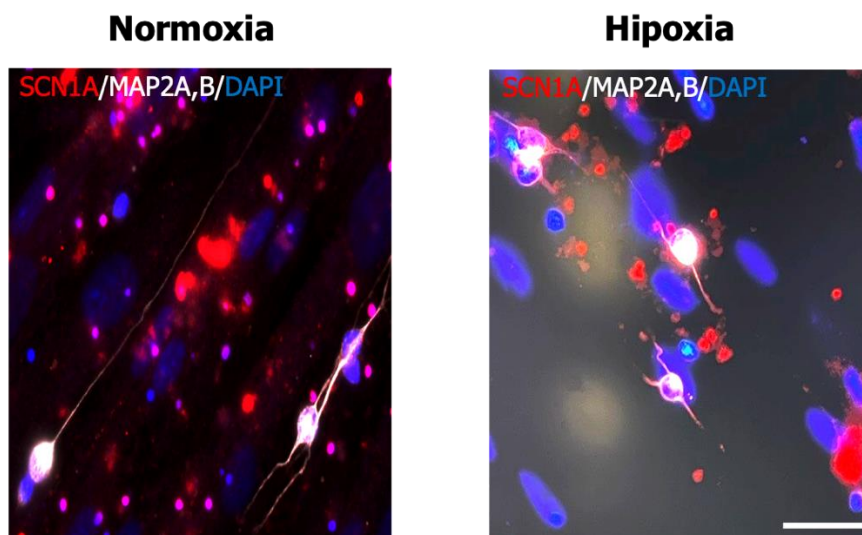


Figura 28. Expresión y localización de canales de sodio dependientes de voltaje en axones regenerados. Imágenes representativas de la inmunotinción contra la subunidad Nav1.1 α del canal de sodio activado por voltaje (SCN1A, rojo), 514 contra MAP2A,B (blanco) y tinción nuclear con DAPI. La barra de escala corresponde a 50 μ m.

Las imágenes de las **figuras 26** y **27** revelan la presencia de vesículas sinápticas maduras a lo largo de los axones regenerados en ambas condiciones de oxígeno. Este hecho sugiere que los axones regenerados han adquirido características similares a las de los axones maduros funcionalmente establecidos, incluida la capacidad de formar eventuales sinapsis y participar en la transmisión sináptica. Además, la expresión de VGSC y su localización en el segmento inicial (**figura 28**) apunta a la posibilidad de que los axones regenerados hayan desarrollado la capacidad de ser plenamente funcionales, a través de la generación y propagación adecuada de potenciales de acción.

4.4.3 Electrofisiología de los axones regenerados

Finalmente, procedimos a explorar funcionalmente la actividad eléctrica de las neuronas regeneradas. Para ello, registramos las corrientes iónicas generadas por las células mantenidas en condiciones de normoxia e hipoxia, mediante la técnica de *patch clamp*, en configuración de "célula entera".

En una serie de experimentos de fijación de voltaje (*voltage clamp*) realizados en células regeneradas, se registraron las corrientes iónicas activadas por la despolarización celular. Se aplicaron pulsos de despolarización desde un potencial de membrana de -80 mV (milivoltios) en pasos de 5 mV. La **figura 29** muestra las corrientes activadas por despolarización registradas en una muestra en condiciones de normoxia (**figura 29A**), así como en una muestra en condiciones de hipoxia (**figura 29B**).

En ambas concentraciones de oxígeno, es posible observar la corriente transitoria de sodio (I_{Na}), seguida de la corriente sostenida de potasio (I_K). Estos experimentos, realizados en un grupo de axones regenerados en normoxia ($n=8$) y axones regenerados en hipoxia ($n=7$), permitieron observar que la amplitud de las corrientes de sodio registradas a partir de células regeneradas en hipoxia era significativamente menor (468 pA) (pico amperios) que la corriente de las células regeneradas en normoxia (1627 pA) (**figura 29C**). Del mismo modo, la amplitud de las corrientes de potasio mostró menor amplitud en el grupo hipóxico (444 pA) que en el grupo normóxico (706 pA) (**figura 29D**). Estos resultados sugieren que, a pesar de que hemos confirmado la expresión y localización de los canales de sodio dependientes de voltaje, su número (densidad) o tipo concreto es menor en axones regenerados en hipoxia que en normoxia.

A pesar de las diferencias observadas, ambos tipos celulares fueron capaces de generar trenes de potenciales de acción cuando se registraron en modo de fijación de corriente

RESULTADOS

(*current clamp*) (**figura 29E,F**). Por lo tanto, nuestros experimentos demuestran que las células regeneradas son activas desde un punto de vista electrofisiológico.

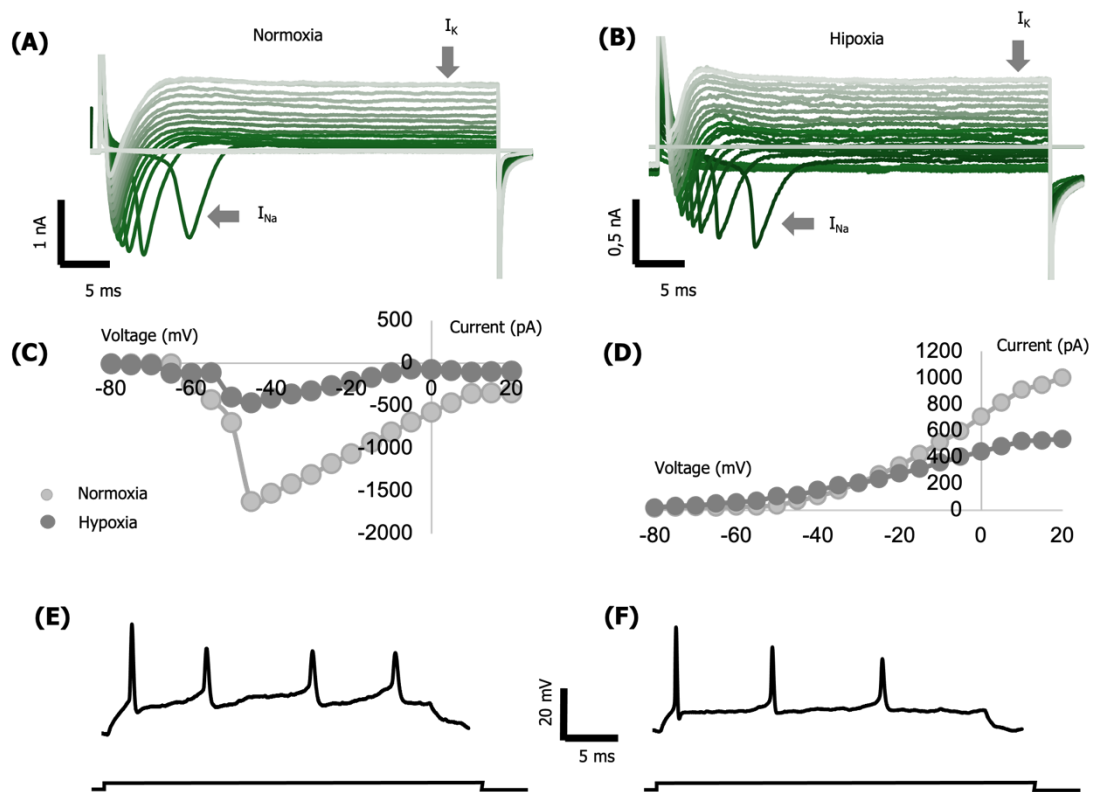


Figura 29. Estudio de las propiedades eléctricas de los axones regenerados.

Registros representativos de corrientes de sodio y potasio de célula entera en respuesta a pulsos de 5ms de paso creciente desde un voltaje de mantenimiento de -80 mV en condiciones de normoxia (A) e hipoxia (B). (C,D) Relación corriente-voltaje de las corrientes de sodio (C) y de potasio (D) promediadas a partir de un total de 8 células en condiciones de normoxia y 7 células en condiciones de hipoxia. (E,F) Registros representativos de voltaje de células enteras de las células mostradas en (A,B) en respuesta a un pulso de corriente de 0,1 nA.

En conclusión, podemos afirmar que, bajo nuestras condiciones experimentales, la actividad regenerativa de hAMSC ejercida sobre CGR habilita a éstas a recrear axones capaces de expresar suficientes canales de sodio en la localización adecuada, inducir una despolarización de la membrana y generar potenciales de acción.

DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta tesis doctoral es la caracterización de hAMSC para su empleo en terapias avanzadas y el tratamiento de lesiones de SNC.

Nuestro grupo de investigación dirigió su atención hacia una fuente de células accesible y exenta de debates éticos como es la membrana amniótica humana. La placenta constituye un importante reservorio de MSC que ofrece muchas ventajas con respecto a otras fuentes de MSC adultas. Por un lado, se trata de un material biológico postnatal de desecho del parto que generalmente se descarta. El aislamiento de las MSC, por tanto, no implica la destrucción de embriones ni el uso de métodos invasivos y es más eficiente que el obtenido de otras fuentes de MSC adultas. Además, las MSC derivadas de la placenta son células más jóvenes (presentan una homogeneidad en términos de juventud celular) y no han sido expuestas a agentes químicos y ambientales nocivos ni a otros factores de estrés (o ha sido una exposición reducida en el tiempo), lo que se traduce en una potencial mayor eficacia y seguridad clínicas frente a MSC procedentes de otros tejidos (Caruso et al., 2012).

Por todo ello, nuestro primer objetivo se centró en la caracterización de la línea celular de hAMSC como un paso previo ineludible para su empleo en terapia celular y medicina regenerativa. Entre las propiedades fundamentales que deben ser estudiadas para determinar la idoneidad de estas células en aplicaciones clínicas concretas, se incluye la capacidad de proliferación y expansión *in vitro*, ya que para cualquier tratamiento de terapia celular es necesario amplificar las células extraídas y obtener un número suficiente de células. El potencial de diferenciación también debe ser rigurosamente evaluado. Además, su perfil de expresión de antígenos de histocompatibilidad, que influye en la inmunogenicidad y el riesgo de rechazo, y su patrón de secreción de factores tróficos y citoquinas, que median efectos inmunomoduladores y regenerativos, son rasgos clave. Por otro lado, la capacidad migratoria y de *homing* es otra característica esencial, ya que las hAMSC deben ser capaces de migrar e injertarse en los sitios de lesión o inflamación para ejercer su función terapéutica *in situ*. Por último, la viabilidad y la capacidad de las hAMSC para mantener sus características fenotípicas y funcionales tras la expansión *in vitro* son, también, aspectos críticos que deben ser considerados.

El procesamiento de las MSC extraídas de su entorno natural para su cultivo, expansión y/o manipulación para su empleo en terapia celular y/o ingeniería de tejidos implica someter a las células a variaciones en las condiciones de concentración de oxígeno:

DISCUSIÓN

desde sus nichos naturales en los tejidos adultos o prenatales, donde las concentraciones de oxígeno son bajas (la media en el organismo humano es del 3%), el cultivo y expansión *in vitro* en el que la concentración de oxígeno estándar considerada como normoxia es del 21% y su trasplante de nuevo a individuos receptores, con concentraciones de oxígeno de nuevo fisiológicas. La hipoxia es una de las principales causas del fracaso de los trasplantes y de la muerte de las células injertadas (Haque et al., 2013). Se ha demostrado que el pre-acondicionamiento hipóxico de las MSC mejora la expresión de marcadores de supervivencia y agentes quimioatrayentes, la secreción de factores de crecimiento, las actividades antioxidantes, los efectos antiapoptóticos y la angiogénesis (Mohyeldin et al., 2010; Haque et al., 2013; Li et al., 2017; Zhang et al., 2019; Moeinabadi-Bidgoli et al., 2021; Wang et al., 2024).

El primer paso para caracterizar nuestra línea celular consistió en la determinación de las hAMSC como células *bona fide* mesenquimales estromales. El primer *workshop* internacional sobre células madre derivadas de placenta que tuvo lugar en Brescia (Italia) en marzo de 2007, proporcionó los criterios generales mínimos que deben cumplir las MSC derivadas de tejido placentario: adherencia a superficies de cultivo, un patrón de expresión de antígenos de superficie que incluya marcadores mesenquimales y hematopoyéticos (CD73, CD90, CD105, CD14, CD34, CD45) y capacidad de diferenciarse *in vitro* en las condiciones inductoras adecuadas a las líneas celulares del linaje mesodérmico (osteogénesis, adipogénesis y condrogénesis) (Parolini et al., 2008). Estos criterios están en línea con los detallados previamente por la ISCT para las MSC con independencia de su origen (Dominici et al., 2006).

Las células empleadas en esta tesis doctoral se adhirieron a las superficies de cultivo, mostrando la clásica forma fibroblástica de huso de las MSC, tanto en normoxia como en hipoxia, manteniéndose esta morfología uniforme con los pases (Alviano et al., 2007; Kim et al., 2007; Soncini et al., 2007; Portmann-Lanz et al., 2010; Umezawa et al., 2019).

La membrana amniótica es la fuente de MSC de la placenta cuyos cultivos presentan menor riesgo de contaminación con otras células de morfología no fibroblástica, como UCB-MSc u otras partes de la placenta (Alviano et al., 2007). Sin embargo, es la zona de la placenta que mayor heterogeneidad celular presenta, ya que son aisladas de ella las hAEC y MSC. Algunas publicaciones analizadas en este trabajo no detallan la parte del amnion de la que sus autores aíslan las células de estudio, mezclando probablemente hAEC y hAMSC. No obstante, la presencia de hAEC puede ser detectada con cierta

facilidad, ya que ambos tipos celulares son morfológicamente distinguibles. Por otra parte, los protocolos de aislamiento de hAMSC comienzan normalmente con una digestión enzimática (tripsina) que permite eliminar el epitelio amniótico, compuesto por una población de células epiteliales de morfología redondeada y aplanada que expresan citoqueratina-18 y E-cadherina (CD324), siendo negativa su expresión para vimentina (Ochsenbein-Kölble et al., 2003; Bilic et al., 2004; Alviano et al., 2007; Díaz-Prado et al., 2011; Pipino et al., 2013; Miki, 2018). A continuación, para obtener la población de células mesenquimales, la membrana amniótica se somete a una nueva digestión enzimática, con colagenasa o dispasa habitualmente. Las MSC aisladas son positivas para vimentina y negativas para citoqueratina y E-cadherina (Ochsenbein-Kölble et al., 2003). En nuestros cultivos, no se observaron células con morfología cuboidal en ninguno de los pases ni condiciones experimentales analizadas, lo que nos permitió descartar la presencia de hAEC en los mismos. Este hallazgo fue corroborado, además, mediante el análisis de marcadores mesenquimales y epiteliales, que se mencionará más adelante.

Continuando con la caracterización de las hAMSC, confirmamos mediante citometría de flujo la expresión de los marcadores mesenquimales ecto-5'-nucleotidasa (CD73), Thy-1 (CD90) y endogлина (CD105), y la ausencia de expresión de marcadores de linaje hematopoyético (CD14, CD19, CD34 y CD45) bajo nuestras condiciones experimentales. Este patrón es consistente con los datos previos publicados (Alviano et al., 2007; Chang et al., 2010; Díaz-Prado et al., 2010, 2011; Kim et al., 2007; Koike et al., 2014; Mihu et al., 2009; Portmann-Lanz et al., 2006; Roubelakis et al., 2012; Soncini et al., 2007; Tsuji et al., 2010; Umezawa et al., 2019). Existe en la bibliografía analizada un relativo consenso respecto al perfil inmunofenotípico de las hAMSC, aunque se aprecian diferencias sutiles en cuanto al nivel de expresión de estos marcadores. Algunas discrepancias pueden ser atribuibles a la edad gestacional, la región del disco placentario de la que se extraen las células, el método de aislamiento, pase analizado, heterogeneidad celular intrínseca de las poblaciones de MSC, complementos del medio de cultivo (FBS o lisado plaquetario), transición epitelio-mesénquima y contaminación celular cruzada (Portmann-Lanz et al., 2010; Wolbank et al., 2010; Ghamari et al., 2020).

Según las directrices marcadas por el *workshop* internacional sobre células madre derivadas de placenta, la expresión de los marcadores positivos debe ser, al menos, del 95% (Parolini et al., 2008). Sin embargo, se han reportado casos en los que la expresión de algunos marcadores de hAMSC, al igual que en otras fuentes de MSC, no alcanza este

DISCUSIÓN

valor recomendado. En nuestras manos, las hAMSC mostraron una expresión de CD90 por debajo del 80% en ambas concentraciones de oxígeno. Existen en la literatura estudios que muestran expresión de CD90 variable, desde niveles bajos e incluso ausencia de expresión (Hwang et al., 2009; Wolbank et al., 2010; Leyva-Leyva et al., 2013; Grzywocz et al., 2014; Koike et al., 2014) hasta porcentajes superiores al 95% (Chang et al., 2010; Díaz-Prado et al., 2010; Portmann-Lanz et al., 2010; Umezawa et al., 2019). Algunos autores vinculan una expresión limitada de CD90 con un mayor potencial de diferenciación osteogénica (Moraes et al., 2016), y con una limitación de la inmunosupresión (Leyva-Leyva et al., 2013) o puede estar relacionado con procedimientos de aislamiento y expansión. Además, no observamos diferencias en el perfil de marcadores cuando las células se mantuvieron en concentraciones bajas de oxígeno respecto a sus homólogas cultivadas en normoxia. El grupo de Zhu *et al.* mostró que las hAMSC crecidas en hipoxia se adherían a la placa de cultivo y adquirían una forma alargada y fusiforme, sin diferencias significativas en comparación con las células cultivadas en condiciones normales de oxígeno. Además, mostraban un nivel de expresión elevado de CD44, CD90 y CD105 y una expresión disminuida de CD31, CD34 y CD45. Nuestros resultados coinciden con estos hallazgos y corroboran que el pre-acondicionamiento en hipoxia no influye en la expresión de marcadores de superficie (Wang et al., 2024).

Por lo que se refiere al estatus inmunológico celular, está ampliamente aceptado que las MSC expresan niveles bajos de HLA-ABC y no expresan HLA-DR ni moléculas co-estimuladoras, con lo que no sufren rechazo al ser trasplantadas alogénicamente (Insausti et al., 2014; Naji et al., 2019). Los resultados obtenidos en nuestra línea celular mediante citometría de flujo revelan una baja expresión de HLA-DR cuando son incubadas en concentraciones normales de oxígeno. Sin embargo, observamos un aumento de su expresión en hipoxia. El grupo de Bilic *et al.* señalan que las hAMSC expresan HLA-ABC y HLA-DR en pases iniciales de cultivo, que pierden en pases tardíos (Bilic et al., 2008). En los estudios inmunohistoquímicos realizados en membranas amnióticas criopreservadas, sin cultivo *in vitro*, el grupo de Kubo *et al.* demostró inmunorreactividad positiva frente al antígeno HLA de clase II en células con morfología fibroblástica del mesénquima amniótico (Kubo et al., 2001). Dado que la membrana amniótica es un tejido considerado como hipóxico en comparación con los tejidos normóxicos del cuerpo adulto, puede hipotetizarse que una baja concentración de oxígeno incrementa la expresión de antígenos HLA-DR. Sería interesante evaluar la

expresión de estos antígenos en cultivos mantenidos en hipoxia durante tiempos más prolongados con el objetivo de determinar el efecto de la concentración de oxígeno sobre la inmunogenicidad de las hAMSC.

Finalmente, para ultimar la tipificación de la línea celular según los criterios de la ISCT, confirmamos la capacidad de diferenciación de las hAMSC a los tres linajes mesodérmicos clásicos (estirpe mesodérmica). En nuestras condiciones de estudio, una concentración del 1% de oxígeno en cultivo favorece el potencial de diferenciación osteogénica y adipogénica *in vitro* de las hAMSC. En la literatura, no hay consenso respecto al efecto de la hipoxia en el potencial de diferenciación a estos dos linajes. Esta divergencia de resultados puede ser explicada por variaciones en el diseño experimental tales como, la metodología de generación de hipoxia (incubador o mediante agentes químicos que mimetizan hipoxia como cobalto, deferoxamina o dimetiloxalilglicina), concentración de oxígeno en cultivo, tiempo de exposición, substratos sobre los que se siembran las MSC, factores de crecimiento empleados y tiempos de evaluación (Gu et al., 2016; Samal et al., 2021). En relación con la diferenciación condrogénica, la detección positiva de proteoglicanos mediante tinción con azul alcian confirmó la diferenciación bajo ambas concentraciones de oxígeno. Resultados similares sobre condrogénesis han sido obtenidos por otros grupos (Alviano et al., 2007; Soncini et al., 2007; Díaz-Prado et al., 2010). No obstante, no podemos concluir el efecto de la concentración de oxígeno sobre la diferenciación condrogénica, ya que la metodología empleada no permite la comparación entre ambas condiciones de oxígeno. La condrogénesis realizada en monocapas celulares de hAMSC posibilitaría esta comparación relativa del potencial de diferenciación al linaje condrogénico entre normoxia e hipoxia.

En resumen, los resultados expuestos confirman que nuestra línea de hAMSC cumple los criterios de la SCIT en cuanto células mesenquimales estromales multipotentes.

Con el fin de completar la caracterización molecular de la línea celular objeto de estudio, ampliamos el espectro de marcadores analizados e incluimos moléculas de adhesión y marcadores mesenquimales como vimentina, CD44 y CD133, el marcador epitelial CD324 (E-cadherina) y los marcadores neurales nestina, Tuj-1, GFAP y NeuN. En nuestros experimentos, la totalidad de las células mantenidas en cultivo marcaron positivamente vimentina, marcador mesenquimal típico, y expresan CD44 en la superficie celular. Además, fueron negativas para E-cadherina y CD133. Tanto CD44 como CD133 son proteínas de membrana vinculadas con procesos de adhesión celular, proliferación,

DISCUSIÓN

migración, autorrenovación, diferenciación, señalización e interacciones célula-célula. Aunque son utilizados como marcadores de diferentes poblaciones de células madre y mesenquimales, se expresan en una amplia variedad de tipos celulares. En concreto, CD133 es un biomarcador de células madre de cáncer, particularmente de tejidos como el cerebro, hígado, mama, pulmón, entre otros y es utilizado para el aislamiento y la caracterización de progenitores neurales (Barzegar Behrooz et al., 2019).

Este patrón/perfil de marcadores para las hAMSC está en línea con lo publicado previamente por otros grupos, confirmando que las células, con independencia de las condiciones de cultivo, expresan marcadores del linaje mesenquimal y son negativas para el marcador epitelial analizado (Portmann-Lanz et al., 2006; Kim et al., 2007; Soncini et al., 2007; Chang et al., 2010; Díaz-Prado et al., 2010; Nogami et al., 2012; Koike et al., 2014). Asimismo, el marcaje negativo de E-cadherina nos permitió confirmar la ausencia de hAEC en los cultivos. Algunos grupos, como el de Mariotti *et al.*, utilizan el marcaje de E-cadherina para, de manera simultánea, demostrar la contaminación epitelial en sus cultivos y caracterizar las hAMSC aisladas (Mariotti et al., 2008). No obstante, no sería sorprendente detectar expresión de marcadores epiteliales en hAMSC. De hecho, algunos autores definen las hAMSC como una población celular de características híbridas mesenquimales y epiteliales, tanto en cuanto a su ultraestructura (Pasquinelli et al., 2007) como a la co-expresión de marcadores de ambos linajes celulares (Sakuragawa et al., 2004). Esto sugiere que el proceso de la transición epitelio-mesénquima puede estar presente en la membrana amniótica humana.

Dado que nuestro objetivo es el empleo de hAMSC en aproximaciones de regeneración de SNC, el siguiente paso en la caracterización de las hAMSC consistió en valorar la posibilidad de que estas células puedan desplegar características de precursores neurales. Los cultivos de las hAMSC indiferenciadas revelaron inmunofluorescencia positiva para los marcadores neuronales generales β 3-tubulina (Tuj-1) y el antígeno nuclear neuronal NeuN/Fox3 (NeuN). Además, estos mismos cultivos mostraron una tinción positiva frente a los anticuerpos nestina y negativa para GFAP, marcadores de progenitores gliales y de astrocitos, respectivamente. Al comparar cultivos mantenidos en normoxia e hipoxia, observamos que la expresión de los marcadores analizados es similar en ambas concentraciones de oxígeno. Los medios de cultivo estándar que contienen FBS pueden incluir factores de crecimiento y señales que promuevan la expresión basal de ciertos marcadores neurales. Sin embargo, en nuestras manos, hAMSC conservan (muestran también) el fenotipo descrito cuando son crecidas en medio

NB-B27 (medio neurobasal carente de suero), lo que nos permite atribuir la expresión de los marcadores estudiados a la plasticidad intrínseca de estas células.

Varios grupos han descrito expresión de marcadores neurales en hAMSC y han detallado diferenciación a células con fenotipo similar a neuronas, aunque en ninguno de los casos estudiados en la bibliografía se realizan estudios de funcionalidad (Sakuragawa et al., 2004; Kim et al., 2007; Chang et al., 2010; Portmann-Lanz et al., 2010; Leyva-Leyva et al., 2013). En nuestro caso, a pesar de la ausencia de expresión de CD133, la tinción positiva de Tuj-1, NeuN y nestina en hAMSC no sometidas a diferenciación neural inducida sugiere la conservación de un carácter de células progenitoras neurales, independientemente de la concentración de oxígeno en cultivo. Además, la falta de expresión de GFAP sugiere la predisposición de hAMSC a una diferenciación específica hacia la línea neuronal frente a la glial. No obstante, para confirmarlo sería necesario realizar estudios de diferenciación neurogénica que incluyan un análisis más detallado y amplio de marcadores del fenotipo neural como Musashi-1, neurofilamento de alto peso molecular (NF-H), neurofilamento de peso molecular intermedio (NF-M) o enolasa específica de neuronas. Asimismo, estos trabajos se completarían con estudios de electrofisiología a fin de comprobar la funcionalidad de las células diferenciadas.

Sobre este punto, la caracterización de las hAMSC como progenitores neurales y su habilidad para cruzar la restricción de la línea mesodérmica, sugiere que pueden situarse en un estadio intermedio entre células pluripotentes y multipotentes. En la literatura encontramos varios ejemplos que apoyan esta hipótesis, en los que se confirma que las hAMSC son capaces de diferenciarse a diferentes tipos celulares no derivados del tejido mesodérmico embrionario, como diferenciaciones ectodérmicas (Sakuragawa et al., 2004; Kim et al., 2007; Chang et al., 2010; Portmann-Lanz et al., 2010; Leyva-Leyva et al., 2013) y endodérmicas (Tamagawa et al., 2007, 2009). Además, las hAMSC expresan marcadores vinculados a pluripotencia, aunque de manera variable (Miki et al., 2005; Alviano et al., 2007; Kim et al., 2007; Bilic et al., 2008; Mihi et al., 2009; Chang et al., 2010; Tsuji et al., 2010; Ge et al., 2012; Nogami et al., 2012; Koike et al., 2014; Umezawa et al., 2019; Belmar-López et al., 2022). De hecho, los grupos de Koike *et al.* y Alviano *et al.* afirman que esta expresión es mayor en hAMSC que en MSC derivadas de otras fuentes de MSC humanas, como BM-MSC, pero no a niveles de iPSC, lo que puede situar a las hAMSC en una posición más elevada que hBM-MSC en la jerarquía de células madre (Alviano et al., 2007; Koike et al., 2014).

DISCUSIÓN

Mediante análisis por RT-PCR en nuestra línea de hAMSC, comprobamos que la expresión de genes relacionados con pluripotencia es mayor que la detectada en células diferenciadas o unipotentes (línea HEK293T). Sin embargo, el nivel de expresión es menor al compararlo con el de células pluripotentes inducidas (iPSC control). Salvo en el caso de *SOX2*, cuya expresión es mayor en normoxia que en hipoxia, la concentración de oxígeno en cultivo no influye en la expresión de marcadores de pluripotencia en nuestra línea celular. Además, como ya se ha comentado con anterioridad, las hAMSC no expresan E-cadherina en ninguna de las concentraciones de oxígeno ensayadas. E-cadherina es empleado, de manera habitual, como marcador de células pluripotentes (Li et al., 2012). Todo ello, apunta a que la línea celular de hAMSC no presenta características de células pluripotentes. No obstante, estos resultados parecen sugerir que, si bien las hAMSC no podrían ser consideradas como células pluripotentes, sí pueden conservar un potencial de diferenciación superior al de otras células multipotentes.

Como se ha mencionado, uno de los mayores retos para el empleo de MSC en terapias de medicina regenerativa y de reemplazamiento tisular consiste en la obtención del número de células necesarias. El número de MSC aisladas de sus nichos es relativamente bajo, por lo que el paso previo de cultivo y expansión *in vitro* es necesario. Nuestra línea celular fue mantenida en cultivo hasta pase 12 sin senescencia, lo que está en consonancia con otros trabajos previos publicados (Kim et al., 2007; Chang et al., 2010). Centramos nuestro estudio de proliferación entre los pases 4 a 8 por su eventual aplicabilidad en clínica, tratando de evitar pases superiores en los que pueda generarse inestabilidad genética, disminución de la actividad telomerasa, etc. El tiempo de duplicación del cultivo de hAMSC fue significativamente menor en hipoxia que en normoxia. Esto conlleva, lógicamente, a la obtención de un número mayor de células y duplicaciones con el tiempo en cultivo en condiciones de baja concentración de oxígeno. La mayor tasa de proliferación junto con una mayor duplicación de la población en condiciones de hipoxia puede deberse a la menor generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés, *reactive oxygen species*) y a la sobreexpresión de los genes diana de las vías moduladas por HIF. En condiciones de hipoxia, HIF-1 α bloquea el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y reduce las ROS. Una menor generación de ROS reduce la tasa de acortamiento de los telómeros y, como consecuencia, podría retrasarse la senescencia replicativa. Además, un entorno hipóxico aumenta la expresión de los genes diana de Notch y se activan las vías de señalización PI3K/Akt y ERK1/2, responsables de la proliferación celular (Haque et al., 2013).

Como último paso en la caracterización de las hAMSC, analizamos su capacidad de migración. La migración eficiente de las MSC hacia los sitios de lesión o inflamación es esencial para asegurar que las células actúen directamente en las áreas que requieren reparación o regeneración, bien como agentes medicinales *per se* o bien como vehículos transportadores de moléculas terapéuticas. En nuestro trabajo, la evaluación de la capacidad de migración *in vitro* fue realizada mediante ensayos de herida en placa. Las hAMSC fueron capaces de cerrar la herida con independencia del pase o tiempo en cultivo. El cierre total de la herida se observa a las 24 horas tanto en pases iniciales como en pases tardíos. En nuestra aproximación, el ambiente hipóxico promueve en hAMSC una mayor habilidad para migrar. Se han obtenido resultados similares en ensayos de migración con membranas Transwell (Li et al., 2019; Wang et al., 2024). Además, la línea celular de hAMSC utilizada en esta tesis doctoral fue empleada por el grupo de la Dra. Pilar Martín-Duque en sus trabajos sobre la eficiencia y la eficacia en terapia antitumoral de MSC derivadas de 5 fuentes diferentes. Se confirmó la habilidad de hAMSC de migración *in vivo* y su tropismo específico hacia tumores al ser inyectadas por vía intravenosa en un modelo animal (Belmar-Lopez et al., 2013). Por otra parte, mediante técnicas de resonancia magnética nuclear y SPECT-CT (tomografía computarizada por emisión de fotón único), detectaron la presencia de las hAMSC 24 días después de la inyección.

En conjunto, los resultados de nuestro trabajo indican que las hAMSC despliegan características únicas en lo relativo a su plasticidad fenotípica, proliferación y capacidad de migración. Además, el cultivo en condiciones de hipoxia no afecta a la morfología ni a las características fenotípicas de las hAMSC, pero mejoran cualidades determinantes para su empleo en clínica, como son la proliferación y la migración *in vitro* e *in vivo* (Ni et al., 2014; Wang et al., 2024). Por ello, el mantenimiento de las hAMSC en hipoxia es una aproximación metodológica de gran valor y potencial, ya que induce un incremento de la proliferación, diferenciación y migración celular. Además, mimetiza mejor el contexto fisiológico normal y patológico en el que las MSC pueden ser utilizadas como agentes terapéuticos (Rosová et al., 2008; Li et al., 2017). Asimismo, comprobamos que las propiedades exhibidas por las hAMSC que las sitúan en un lugar aventajado para su empleo en terapia celular se mantienen con los pases, por lo que la expansión en cultivo *in vitro* no parece alterar su viabilidad y sus funciones.

DISCUSIÓN

Uno de los mejores modelos para estudiar y cuantificar *in vitro* la neuroregeneración es el co-cultivo de CGR con células potencialmente capaces de inducir regeneración axonal. Siguiendo la aproximación establecida por el grupo de la Dra. Moreno Flores, llevamos a cabo ensayos de co-cultivo directo *in vitro* de hAMSC con CGR axotomizadas de rata adulta (Portela-Lomba et al., 2020) y, además, adaptamos este modelo a la evaluación de la neuroregeneración en co-cultivos indirectos y con medios condicionados.

El recuento del número de CGR por campo (número de CGR total en los cultivos) en las cuantificaciones de (todas) las diferentes condiciones ensayadas fue similar, tanto en los controles negativos, en los que se sembraban las CGR sobre PLL, como al realizar co-cultivos directos e indirectos con hAMSC. Esto sugiere que la presencia de hAMSC o de sus medios condicionados en nuestras condiciones de cultivo no modifica significativamente la supervivencia de las CGR axotomizadas. En ratas adultas, la axotomía orbital proximal *in vivo* de CGR conduce a una ola de muerte por apoptosis que comienza 4-5 días después de la lesión y alcanza su máximo en el día 7-8 aproximadamente. A las dos semanas, el 85-90% de las CGR han muerto (Villegas-Pérez et al., 1993; Harvey et al., 2006). No obstante, existen estudios que detallan promoción de la supervivencia neuronal tras la administración de MSC en modelos de lesión de nervio óptico (Li et al., 2022; Norte-Muñoz et al., 2021). Por ello, dado que nuestros trabajos se extienden únicamente hasta 4 días después de la axotomía y siembra de las CGR, no podemos descartar la posibilidad de que las hAMSC puedan promover supervivencia neuronal a largo plazo. Además, resultados preliminares de nuestro grupo (observaciones no publicadas) indican un posible efecto inhibitorio de apoptosis mediada por las hAMSC en un modelo de desarrollo en retinas de embriones de pollo. Sería de gran interés, por tanto, poner a punto los modelos de co-cultivo empleados en este trabajo durante periodos de tiempo más prolongados, con el fin de evaluar la supervivencia de las CGR adultas tras su axotomía en presencia de hAMSC y/o sus medios condicionados.

No obstante, la supervivencia neuronal *per se* no es suficiente para el crecimiento axonal (Boia et al., 2020). El grupo de Goldberg *et al.* demostró que la sobreexpresión de Bcl-2 en neuronas ganglionares de la retina era capaz de mantener la supervivencia de estas neuronas en ausencia de señales moleculares tróficas. Sin embargo, las neuronas que expresaban Bcl-2 no extendían axones a menos que factores tróficos peptídicos, como BDNF, NGF o insulina estuvieran presentes en el medio de cultivo (Goldberg et al., 2002).

Esto demuestra que el recrecimiento de los axones no es una función por defecto de la neurona superviviente, sino que debe ser estimulada a través de una señalización específica.

En este trabajo se ha confirmado la neuroregeneración de CGR axotomizadas. Ahora bien, el recrecimiento o re-extensión axonal observado en los co-cultivos se podía deber a un efecto neuroregenerador mediado por las hAMSC o a una diferenciación de éstas hacia un fenotipo similar a neuronas. Hemos demostrado que las hAMSC expresan marcadores asociados a progenitores neurales. Sin embargo, en la literatura, las diferenciaciones de hAMSC a linaje neural *in vitro* han sido descritas en cultivos con medios de inducción durante un periodo variable de tiempo, que abarca desde los 6 a los 21 días. Además, estos medios de inducción contienen factores como el ácido trans-retinoico, forskolina, ácido valproico, bFGF, PDGF, EGF, hidroxianisola butilada, entre otros (Sakuragawa et al., 2004; Kim et al., 2007; Chang et al., 2010; Portmann-Lanz et al., 2010; Leyva-Leyva et al., 2013; Dallatana et al., 2024). Sin embargo, los co-cultivos de hAMSC y CGR se mantuvieron durante 96 horas en medio NB-B27, que carece de factores inductores de diferenciación y de FBS (ver Materiales y Métodos). La evaluación de la expresión del marcador axonal SMI31 en monocultivos de hAMSC mantenidas en estas mismas condiciones no mostró marcaje positivo. Por el contrario, las inmunotinciones revelaron que la presencia de axones SMI31 positivos se producía únicamente en los co-cultivos de hAMSC y CGR previamente axotomizadas. Por esta razón, aunque no podemos descartar que, eventualmente, alguna hAMSC pueda adquirir un fenotipo similar a neurona durante los co-cultivos con CGR, nuestros resultados indican que estamos ante una re-extensión axonal de CGR adultas axotomizadas y no de axones derivados de la diferenciación de hAMSC.

Parece claro, por tanto, que las hAMSC proporcionan el suficiente aporte trófico *in vitro* para el eventual recrecimiento de axones de las CGR axotomizadas supervivientes, desempeñando así un papel esencial en la promoción de la regeneración axonal de las CGR axotomizadas adultas.

Una vez confirmada la capacidad neuroregenerativa de las hAMSC, el siguiente objetivo que nos propusimos fue la determinación del mecanismo por el cual las hAMSC inducen regeneración axonal en neuronas del SNC. Uno de los modelos de acción de las MSC más estudiados está ligado a inmunomodulación. Se ha descrito que el contacto célula-célula es un prerrequisito para la inhibición de la proliferación de PBMC (linfocitos T) por

DISCUSIÓN

parte de las hAMSC. Además, las citoquinas inflamatorias liberadas por linfocitos T y células presentadoras de antígeno durante la respuesta inmunitaria modulan la función de hAMSC, dando lugar a la secreción de factores de crecimiento, moléculas de adhesión y factores inmunosupresores que ejercen efectos pleiotrópicos sobre una amplia variedad de células inmunitarias (Wolbank et al., 2007; Kang et al., 2012; Insausti et al., 2014).

Las CGR adultas axotomizadas cultivadas sobre un sustrato no celular, como es PLL, en medio NB-B27, mostraron una reducida habilidad para regenerar sus axones, especialmente en condiciones de baja concentración de oxígeno. Sin embargo, en los co-cultivos de CGR con un sustrato biológico (TS12 o hAMSC), la neurorregeneración observada aumenta. Así, confirmamos que TS12 es una línea celular de baja regeneración (Plaza et al., 2016) y promueve neurorregeneración respecto a las CGR sembradas sobre PLL (control negativo), aunque no de manera significativa. En contraste, la monocapa de hAMSC proporciona un sustrato más efectivo (regenerativo), ya que incrementa de 4 a 14 veces con respecto a PLL el porcentaje de neuronas con axón en condiciones de normoxia e hipoxia, respectivamente. Además, la longitud axonal media aumentó 4,5 veces en normoxia y 25 veces en hipoxia, al sembrar las CGR sobre la monocapa de hAMSC respecto a los cultivos de CGR sobre PLL. No parece que el número de hAMSC determine la regeneración observada en ambas concentraciones de oxígeno, ya que no se apreciaron diferencias significativas en los parámetros cuantificados entre las diferentes densidades empleadas (5×10^4 , 8×10^4 y 1×10^5 hAMSC). Estos resultados concuerdan con lo publicado anteriormente, ya que en la literatura está ampliamente aceptado que es necesario un sustrato permisivo para la regeneración axonal (Wigley & Berry, 1988; Sonigra et al., 1999; Horner & Gage, 2000). Se han descrito sustratos permisivos, como células de Schwann o células de glía envolvente olfativa (Sonigra et al., 1999; Gómez et al., 2018; Horner & Gage, 2000; Moreno-Flores et al., 2002, 2003).

La interacción directa célula-célula puede facilitar la transferencia de señales que promuevan supervivencia neuronal y el crecimiento axonal. La expresión de moléculas de adhesión de la superficie celular de las hAMSC, como CD44, CD73 o CD90, puede desempeñar un papel importante en el proceso de regeneración. Por otro lado, la comunicación intercelular se realiza a través de *gap junctions*. El grupo de Tarasiuk *et al.* constata la formación de estas estructuras entre MSC y neuronas de los ganglios de la raíz dorsal de rata. De hecho, el bloqueo de las uniones anula el efecto pro-supervivencia observado en el co-cultivo directo de las neuronas con MSC durante 30

días (Tarasiuk et al., 2022). La transferencia de material citoplasmático y mitocondrial intracelular también se realiza a través de estructuras tubulares recientemente descritas conocidas como TNT (del inglés, *tunneling nanotubes*). Estas estructuras, de diámetro y longitud variables, están formadas por microfilamentos del citoesqueleto de F-actina y permiten el intercambio bidireccional y unidireccional entre células de moléculas y orgánulos como las mitocondrias. Se ha descrito la formación de TNT entre MSC y diferentes tipos celulares, como cardiomiocitos, hepatocitos, neuronas sensoriales, células del epitelio de la córnea y CGR (Staff et al., 2019; Jiang et al., 2020; Tarasiuk et al., 2022). La capacidad de las hAMSC de transferir moléculas reguladoras, mediadores, factores tróficos o mitocondrias “sanas” a CGR en nuestra aproximación podría representar un mecanismo válido para explicar la transferencia de señales que promueven regeneración axonal. Por ello, el estudio más detallado de estas interacciones celulares y las moléculas implicadas proporcionará una visión más profunda de los mecanismos subyacentes a la neurorregeneración mediada por hAMSC.

En ausencia del sustrato biológico proporcionado por las hAMSC, el porcentaje de CGR capaz de regenerar axón (porcentaje de neuronas con axón SMI31 positivo) al ser incubadas con medios condicionados previamente por hAMSC se reduce significativamente respecto al de las CGR sembradas sobre una monocapa de hAMSC. Sin embargo, la longitud media alcanzada por los axones regenerados es equivalente a la observada en los co-cultivos directos con la monocapa de células mesenquimales. Esto indica que, sin el sustrato biológico proporcionado por las hAMSC, un menor número de CGR son capaces de recrecer su axón, pero los axones regenerados elongan más micras (aquellas que lo hacen, regeneran axones más largos). A pesar de que el medio condicionado de hipoxia promueve una re-extensión axonal media similar a la de normoxia, la diferencia respecto al control no es significativa, probablemente porque las hAMSC proliferan más en hipoxia y, como resultado de su mayor crecimiento, el medio puede contener mayor concentración de moléculas y productos de desecho del metabolismo celular.

Por otra parte, al establecer co-cultivos indirectos mediante membranas Transwell, en los que las CGR y las hAMSC compartían las mismas condiciones, pero estaban separadas físicamente (se permite la comunicación célula-célula sin que haya un contacto directo), se observa una reducción del porcentaje de neuronas con axón SMI31 positivo que es también significativa respecto a las CGR sembradas sobre una monocapa de hAMSC. También se reduce la longitud media axonal, pero no de manera significativa.

DISCUSIÓN

Estos datos sugieren la presencia de moléculas y factores directamente implicados en la extensión (elongación) de los axones regenerados, bien en forma de factores solubles o encapsulados en vesículas extracelulares en los medios condicionados de hAMSC. Basándonos en la bibliografía, escogimos los tres factores neurotróficos implicados en la biología neuronal más estudiados, como son las neurotrofinas BDNF, NGF y NT-3 (Lessmann et al., 2003; Pramanik et al., 2017; Norte-Muñoz et al., 2024b; Li et al., 2022). La administración intravítrea de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es el mejor neuroprotector descrito hasta la fecha para CGR axotomizadas por transección completa del nervio o aplastamiento (Parrilla-Reverter et al., 2009; Sánchez-Migallón et al., 2011).

Las hAMSC cultivadas *in vitro* sintetizan constitutivamente y a lo largo de los pases estudiados, tanto en su medio de cultivo óptimo como en el medio NB-B27, los precursores intracelulares de estas neurotrofinas. Además, se ha comprobado que estos factores son secretados al medio en forma de factores solubles. Se ha descrito que las hAMSC sintetizan y secretan factores neurotróficos (Li et al., 2022; Park et al., 2018; Seong et al., 2023; Volkman & Offen, 2017).

La secreción de las neurotrofinas podría estar modulada por el contacto entre las CGR y las hAMSC en los co-cultivos directos (la interacción dinámica entre ambos tipos celulares puede articular la secreción). Tanto en normoxia como en hipoxia, la liberación de las formas solubles de las NT por parte de las hAMSC disminuye en presencia de las CGR, siendo significativamente menor en el caso de NT-3. La menor liberación de las neurotrofinas en los medios de los co-cultivos indirectos muy posiblemente se debe al número de hAMSC sembradas sobre la membrana Transwell, que es un orden de magnitud inferior (3×10^3 células) respecto al de los co-cultivos directos ($5-10 \times 10^4$ hAMSC). Además, esta menor concentración puede explicar que la longitud axonal media alcanzada en los co-cultivos indirectos sea menor que la promovida por los medios condicionados de hAMSC.

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo de regeneración neuronal observado en nuestro modelo se realizaron ensayos de neutralización de BDNF y NGF solubles, observando una disminución parcial de la neurorregeneración mediada por hAMSC. El bloqueo de BDNF y NGF disminuyó el porcentaje de neuronas capaces de regenerar su axón en normoxia, aunque no de manera significativa. Asimismo, la longitud media de los axones regenerados disminuye en ambas concentraciones de oxígeno al neutralizar

BDNF, tanto de manera individual, pero también de manera conjunta con anti-NGF en condiciones de normoxia.

Nuestro estudio sobre el papel que ejercen las NT en neuroregeneración mediada por hAMSC fue realizado en un modelo de cultivo de CGR con sustrato biológico. En su artículo de revisión sobre la regeneración de SNC, Horner y Gage afirman (que se asume) que las neurotrofinas inducen crecimiento axonal cuando el sustrato permisivo está presente. Más aún, las CGR no son capaces de sobrevivir en presencia de factores tróficos como BDNF y CNTF a menos que sus niveles de cAMP estén elevados (Boia et al., 2020). Por ello, las NT no se utilizan como un efector individual sino en combinación con matrices o células promotoras de crecimiento (Horner & Gage, 2000). Por otro lado, hay estudios que apoyan que la señalización de las NT para los eventos que son locales al axón y la sinapsis serían separables de la señalización para los eventos mediados por el cuerpo celular distal (Howe & Mobley, 2005; Harvey et al., 2006). En nuestro modelo, por tanto, el contacto célula-célula podría compensar, a nivel local, la disminución de la concentración de los factores solubles presentes en el medio de cultivo, mediante el mantenimiento de niveles adecuados de cAMP en las CGR, la internalización de las NT y sus receptores en el soma neuronal, o por el aporte continuo de NT solubles y mediante exovesículas. Además, los estudios de MacInnis y Campenot, mostraban que una señal neuronal de supervivencia puede llegar a los cuerpos celulares sin ir acompañada del NGF que la causa (MacInnis & Campenot, 2002). De esta manera, aunque haya un reducción de la concentración de NGF y BDNF en el medio, puede ser que éstos interactúen con receptores TrkA y TrkB e induzcan también señales de supervivencia y elongación axonal mediante transporte retrógrado. Este mismo mecanismo podría explicar que, en ausencia de las hAMSC como sustrato biológico, se reduzca el porcentaje de CGR capaces de regenerar axón, pero se mantenga la elongación axonal observada respecto a los co-cultivos directos. Estudios del bloqueo de las NT en cultivos de CGR axotomizadas sin sustrato biológico permitirían completar la caracterización del mecanismo subyacente de la neuroregeneración mediada por hAMSC y el rol desempeñado por las NT en dicho proceso.

Por otra parte, los análisis realizados se basan en la cuantificación y neutralización de las formas solubles de las NT secretadas al medio por hAMSC. Está ampliamente documentada la actividad paracrina de las MSC a través de la secreción de moléculas y factores tróficos, incluidas NT, encapsulados en VE y exosomas (Staff et al., 2019; Kulubya et al., 2021; Seong et al., 2023). Sin embargo, el efecto parece ser transitorio

DISCUSIÓN

(Chen et al., 2009a). En nuestro caso, datos preliminares del grupo sobre la caracterización de exosomas secretados por hAMSC confirman la presencia del factor activo BDNF de bajo peso molecular en el cargo de los mismos. Es posible suponer, entonces, que la actividad neuroregenerativa de las hAMSC pueda ser realizada también a través de liberación factores neurotróficos contenidos en microvesículas y/o exosomas. Por esta razón, la neutralización de las formas solubles de las NT sólo bloquearía parcialmente la acción de éstas sobre las CGR adultas axotomizadas. Además, la liberación de VE por parte de hAMSC en condiciones de hipoxia es mayor que la detectada en cultivos mantenidos en normoxia. La realización de cultivos de CGR adultas axotomizadas con y sin sustrato biológico en presencia de vesículas extracelulares obtenidas a partir de cultivos de hAMSC (o una combinación de exosomas de hAMSC y CGR sembradas sobre sustratos biológicos) será lo que permitirá conocer de manera más detallada el mecanismo de regeneración y abordar los estudios *in vivo* con mayor conocimiento del proceso. Además, identificar y caracterizar las moléculas bioactivas, como proteínas, lípidos, ARN mensajero (mRNA) y microARN (miRNA) que contengan los exosomas será fundamental para la comprensión mecanística del proceso, el diseño y la optimización de una posible terapia efectiva.

En conjunto, estos resultados sugieren un mecanismo dual para la neuroregeneración inducida por hAMSC. El contacto célula-célula y la secreción por parte de las hAMSC de moléculas y factores tróficos. Ambos mecanismos, además, son complementarios. En nuestro modelo experimental, el co-cultivo directo entre hAMSC y CGR adultas es un requisito necesario para promover en las CGR un aumento de su capacidad para recrecer su axón. Es decir, el contacto célula-célula es imprescindible para generar el ambiente adecuado para que las CGR puedan regenerar su axón. Las NT secretadas al medio por hAMSC, como factores solubles o a través de VE, participarían, además, de manera determinante, en la elongación de los axones regenerados.

Los resultados obtenidos sobre la neuroregeneración inducida por hAMSC no muestran diferencias significativas en relación con la concentración de oxígeno en los cultivos. Si bien es cierto que la capacidad inherente de las CGR axotomizadas para regenerar axón *in vitro* es menor en un contexto de hipoxia que en normoxia. En los diferentes modelos utilizados la regeneración axonal promovida en hipoxia es equivalente a la alcanzada en los cultivos homólogos mantenidos en normoxia. Esto sugiere que las hAMSC y sus medios condicionados generan el entorno adecuado para que las CGR se adapten a esta condición. En un contexto *in vivo*, la muerte de CGR debida a isquemia puede asociarse,

entre otras causas, a disfunción mitocondrial y estrés oxidativo. La inyección de factores tróficos incrementa la viabilidad de las CGR tras isquemia, pero los efectos son temporales (Bickler & Donohoe, 2002; Harvey et al., 2006). La protección contra el estrés oxidativo proporcionado por hAMSC y su aporte de factores tróficos puede resultar en un soporte más a largo plazo de las CGR, por lo que sería necesario realizar estudios en una ventana de tiempo superior.

Además, la estabilización de HIF-1 α modula la expresión de cientos de genes implicados en una gran variedad de procesos celulares. La expresión de estos genes se refleja en el contenido de las VE secretadas. Varios estudios demuestran que las VE derivadas de MSC acondicionadas en hipoxia tienen una mayor capacidad regenerativa que las obtenidas en condiciones de normoxia (Pulido-Escribano et al., 2022).

Finalmente, afrontamos el estudio de la funcionalidad de los axones regenerados mediante la detección de proteínas vinculadas al proceso de sinapsis y transmisión de potenciales de acción, y ensayos de electrofisiología.

Tanto la sinapsina como SV2A son marcadores asociados con axones en desarrollo y con sinapsis maduras. Ambas juegan un papel esencial en la regulación del ciclo de las vesículas sinápticas y su movilización, así como en la liberación de neurotransmisores y la plasticidad sináptica de axones activos, maduros y funcionalmente establecidos (Ciruelas et al., 2019; Zhang & Augustine, 2021). La detección de estas proteínas sinápticas en los axones regenerados de las CGR adultas axotomizadas en co-cultivos con hAMSC, tanto en normoxia como en hipoxia, es un indicio de que el proceso de regeneración neuronal está progresando de manera adecuada y que los axones están recuperando no únicamente algunas de sus características estructurales normales sino también funcionales. Asimismo, la presencia de sinapsina y SV2 en los axones apunta que éstos tienen el equipo necesario para la liberación de neurotransmisores, indicando que pueden establecer sinapsis potencialmente funcionales e integrarse en los circuitos neuronales preexistentes.

Por otra parte, la funcionalidad de los axones se define por su capacidad para generar, conducir y transmitir potenciales de acción de manera eficiente y coordinada. Los canales de sodio activados por voltaje (VGSC) son cruciales para la excitabilidad y la propagación de señales eléctricas en las neuronas y otras células excitables. La subunidad Nav1.1 α (SCN1A) es una de las varias isoformas de las subunidades alfa de VGSC, localizada preferentemente en cuerpos celulares y dendritas (Catterall et al., 2010). La tinción

DISCUSIÓN

positiva de SCN1A de los axones regenerados de las CGR en los co-cultivos en las diferentes concentraciones de oxígeno ensayadas sugiere que dichos axones están adquiriendo características eléctricas similares a las de los axones maduros, lo que es crucial para su función normal en el sistema nervioso. No obstante, se requiere que la densidad de VGSC en el segmento inicial del axón sea alta para que una neurona pueda generar potenciales de acción (Kole et al., 2008). Tras el análisis de las imágenes obtenidas por inmunotinción, la co-expresión de la proteína MAP2A,B y SCN1A confirmó la ubicación adecuada en el compartimento somatodendrítico neuronal de los VGSC. Si bien la presencia y localización de VGSC es un requisito fundamental para la capacidad de las neuronas de generar y transmitir potenciales de acción, su mera detección no significa que esos axones sean activamente funcionales, es decir, que tengan la habilidad de transmitir señales eléctricas. Por ello, decidimos realizar ensayos de electrofisiología con el objetivo de confirmar que la regeneración mediada por hAMSC inducía el recrecimiento de axones con la capacidad de generar potenciales de acción cuando son estimulados adecuadamente.

Los ensayos realizados mediante *voltage clamp* permitieron obtener registros de corrientes de sodio de 1627 pA y 468 pA de axones regenerados en condiciones de normoxia e hipoxia, respectivamente. La diferencia en la amplitud generada por la entrada de sodio en ambas condiciones de oxígeno podría deberse a que el número o tipo concreto de VGSC de los axones regenerados en condiciones de baja concentración de oxígeno es menor que sus homólogos recrecidos en normoxia. En trabajos sobre la adaptación de neuronas corticales de tortugas a la hipoxia (y anoxia), Bickler observa la retirada de moléculas de canales iónicos de la membrana plasmática (Bickler et al., 2000). Es posible que las neuronas, en respuesta a las condiciones de estrés generadas por la hipoxia, reduzcan la actividad de los canales de sodio y potasio para minimizar el daño celular. La reducción de la actividad de los canales iónicos disminuye los requerimientos celulares de ATP para mantener los gradientes iónicos a través de las membranas celulares. Esto es crucial en condiciones de hipoxia, donde la producción de ATP está comprometida por la disponibilidad de oxígeno. Por lo general, las acciones de la hipoxia sobre canales iónicos parecen ser adaptativas, en el sentido de que el efecto es la supresión de los canales excitatorios y el aumento de los inhibitorios (Bickler & Donohoe, 2002). La hipoxia puede inducir cambios en los niveles de segundos mensajeros intracelulares, como el ATP y el AMP cíclico, así como en la concentración de iones Ca^{2+} . Estos cambios pueden afectar la fosforilación y la regulación de los canales Nav a través

de diversas vías de señalización, como la proteína kinasa A y la proteína kinasa C. Por otro lado, la hipoxia puede aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden modificar la función de los canales de sodio a través de la oxidación de residuos específicos de aminoácidos en los canales (Bickler & Donohoe, 2002).

Los datos presentados en esta tesis doctoral permiten afirmar que las hAMSC promueven regeneración axonal *in vitro* de CGR adulta axotomizadas en condiciones de normoxia e hipoxia. Asimismo, se demuestra que los axones regenerados en ambas condiciones de cultivo son activos desde un punto de vista electrofisiológico. El mecanismo subyacente a esta neurorregeneración mediada por hAMSC implica el contacto célula-célula y la secreción de factores neurotróficos. Futuros experimentos revelarán con mayor detalle este proceso de regeneración y abrirán posibilidades para el abordaje de aproximaciones terapéuticas *in vivo* de neuroprotección y regeneración de SNC.

CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

1. Las hAMSC empleadas en esta tesis doctoral cumplen los criterios establecidos por la ISCT como células mesenquimales estromales humanas en cuanto a su adherencia a superficies de cultivo, panel de expresión de marcadores de superficie y potencial de diferenciación mesodérmica.
2. Las hAMSC expresan el marcador mesenquimal y la molécula de adhesión vimentina y CD44, y no expresan el marcador epitelial E-cadherina, tanto en normoxia como en hipoxia.
3. Las hAMSC expresan los marcadores neurales Tuj-1, NeuN y nestina. Sin embargo, son negativas para el marcador de progenitores neurales CD133 y para el marcador de astrocitos GFAP, no observándose diferencias en las diferentes concentraciones de oxígeno ensayadas.
4. La expresión de los marcadores de pluripotencia *NANOG*, *OCT4* y *SOX2* es mayor en hAMSC que en células diferenciadas HEK293T, pero menor que la obtenida en ipsc, por lo que las hAMSC no pueden ser consideradas como células pluripotentes.
5. La baja concentración de oxígeno en cultivo aumenta la capacidad de proliferación y migración, así como el potencial de diferenciación osteogénica y adipogénica *in vitro* de las hAMSC.
6. Las hAMSC promueven neuroregeneración de CGR de rata adulta axotomizadas en co-cultivos directos e indirectos *in vitro*, tanto en normoxia como en hipoxia. En co-cultivos directos, el porcentaje de neuronas con axón y la longitud media de los axones regenerados es significativamente mayor que la mostrada por las CGR sembradas sobre el sustrato PLL.
7. Los medios NB-B27 condicionados por hAMSC en normoxia e hipoxia promueven un aumento de la longitud media de los axones regenerados, pero no afectan al porcentaje de CGR capaces de regenerar axón, respecto al control de CGR sembradas sobre PLL.

CONCLUSIONES

8. Las hAMSC sintetizan de forma constitutiva los precursores de los factores tróficos BDNF, NGF y NT-3, tanto en el medio basal DMEM-glucosa alta, como en el medio NB-B27. La síntesis de los precursores de BDNF y NT-3 no depende de los pases ni de la concentración de oxígeno en el cultivo. La síntesis del precursor de NGF no depende del tiempo en cultivo, pero aumenta significativamente en condiciones de hipoxia.
9. Las hAMSC secretan las formas activas solubles de las NT BDNF y NGF cuando son mantenidas en medio NB-B27. La concentración de BDNF y NGF soluble en los medios de los co-cultivos directos disminuye en presencia de CGR de rata adulta axotomizadas. No se detectó en este medio NT-3 soluble.
10. La neutralización de las formas solubles de BDNF y NGF, de manera individual o conjunta, tiende a disminuir, pero no bloquea completamente, la regeneración mediada por hAMSC en las diferentes concentraciones de oxígeno en cultivo, aunque la media del porcentaje de neuronas con axón no presentó cambios en hipoxia.
11. Los axones regenerados expresan los marcadores de vesículas sinápticas sinapsina y SV2A.
12. Los axones regenerados expresan canales de sodio dependientes de voltaje Nav1.1 α . Esta expresión se localiza en los somas celulares, dendritas y la parte inicial de los axones de CGR.
13. Las CGR con axones regenerados son electrofisiológicamente funcionales, siendo capaces de disparar potenciales de acción en las dos concentraciones de oxígeno ensayadas. La amplitud de las corrientes de sodio y potasio son menores en axones regenerados en hipoxia que sus homólogos de normoxia.

BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abomaray, F. M., Al Jumah, M. A., Kalionis, B., AlAskar, A. S., Al Harthy, S., Jawdat, D., Al Khaldi, A., Alkushi, A., Knawy, B. A., & Abumaree, M. H. (2015). Human Chorionic Villous Mesenchymal Stem Cells Modify the Functions of Human Dendritic Cells, and Induce an Anti-Inflammatory Phenotype in CD1+ Dendritic Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, *11*(3), 423-441. <https://doi.org/10.1007/s12015-014-9562-8>
- Akram, R., Anwar, H., Javed, M. S., Rasul, A., Imran, A., Malik, S. A., Raza, C., Khan, I. U., Sajid, F., Iman, T., Sun, T., Han, H. S., & Hussain, G. (2022). Axonal Regeneration: Underlying Molecular Mechanisms and Potential Therapeutic Targets. *Biomedicines*, *10*(12), 3186. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123186>
- Alison, M. R., & Islam, S. (2009). Attributes of adult stem cells. *The Journal of Pathology*, *217*(2), 144-160. <https://doi.org/10.1002/path.2498>
- Alviano, F., Fossati, V., Marchionni, C., Arpinati, M., Bonsi, L., Franchina, M., Lanzoni, G., Cantoni, S., Cavallini, C., Bianchi, F., Tazzari, P. L., Pasquinelli, G., Foroni, L., Ventura, C., Grossi, A., & Bagnara, G. P. (2007). Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Developmental Biology*, *7*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-11>
- Andalib, E., Kashfi, M., Mahmoudvand, G., Rezaei, E., Mahjoor, M., Torki, A., & Afkhami, H. (2023). Application of hypoxia-mesenchymal stem cells in treatment of anaerobic bacterial wound infection: Wound healing and infection recovery. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1251956. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1251956>
- Andrzejewska, A., Lukomska, B., & Janowski, M. (2019). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *37*(7), 855-864. <https://doi.org/10.1002/stem.3016>
- Araújo, A. B., Salton, G. D., Furlan, J. M., Schneider, N., Angeli, M. H., Laureano, Á. M., Silla, L., Passos, E. P., & Paz, A. H. (2017). Comparison of human mesenchymal stromal cells from four neonatal tissues: Amniotic membrane, chorionic membrane, placental decidua and umbilical cord. *Cytotherapy*, *19*(5), 577-585. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.03.001>

BIBLIOGRAFÍA

- 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>
- Bailo, M., Soncini, M., Vertua, E., Signoroni, P. B., Sanzone, S., Lombardi, G., Arienti, D., Calamani, F., Zatti, D., Paul, P., Albertini, A., Zorzi, F., Cavagnini, A., Candotti, F., Wengler, G. S., & Parolini, O. (2004). Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. *Transplantation*, *78*(10), 1439-1448. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000144606.84234.49>
- Barker, N., Bartfeld, S., & Clevers, H. (2010). Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell Stem Cell*, *7*(6), 656-670. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.11.016>
- Barzegar Behrooz, A., Syahir, A., & Ahmad, S. (2019). CD133: Beyond a cancer stem cell biomarker. *Journal of Drug Targeting*, *27*(3), 257-269. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1479756>
- Belmar-Lopez, C., Mendoza, G., Oberg, D., Burnet, J., Simon, C., Cervello, I., Iglesias, M., Ramirez, J. C., Lopez-Larrubia, P., Quintanilla, M., & Martin-Duque, P. (2013). Tissue-derived mesenchymal stromal cells used as vehicles for anti-tumor therapy exert different in vivo effects on migration capacity and tumor growth. *BMC Medicine*, *11*, 139. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-139>
- Belmar-López, C., Vassaux, G., Medel-Martinez, A., Burnet, J., Quintanilla, M., Ramón Y Cajal, S., Hernandez-Losa, J., De la Vieja, A., & Martin-Duque, P. (2022). Mesenchymal Stem Cells Delivery in Individuals with Different Pathologies: Multimodal Tracking, Safety and Future Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1682. <https://doi.org/10.3390/ijms23031682>
- Bianco, P., Robey, P. G., Saggio, I., & Riminucci, M. (2010). «Mesenchymal» stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): A critical discussion of their nature, identity, and significance in incurable skeletal disease. *Human Gene Therapy*, *21*(9), 1057-1066. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.136>
- Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, *2*(4), 313-319. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.03.002>

- Bickler, P. E., & Donohoe, P. H. (2002). Adaptive responses of vertebrate neurons to hypoxia. *The Journal of Experimental Biology*, *205*(Pt 23), 3579-3586. <https://doi.org/10.1242/jeb.205.23.3579>
- Bickler, P. E., Donohoe, P. H., & Buck, L. T. (2000). Hypoxia-induced silencing of NMDA receptors in turtle neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(10), 3522-3528. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-10-03522.2000>
- Bilic, G., Ochsenein-Kölble, N., Hall, H., Huch, R., & Zimmermann, R. (2004). In vitro lesion repair by human amnion epithelial and mesenchymal cells. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *190*(1), 87-92. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2003.07.011>
- Bilic, G., Zeisberger, S. M., Mallik, A. S., Zimmermann, R., & Zisch, A. H. (2008). Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy. *Cell Transplantation*, *17*(8), 955-968. <https://doi.org/10.3727/096368908786576507>
- Biswas, A., Rajasekaran, R., Saha, B., Dixit, K., Vaidya, P. V., Ojha, A. K., & Dhara, S. (2023). Human placenta/umbilical cord derivatives in regenerative medicine—Prospects and challenges. *Biomaterials Science*, *11*(14), 4789-4821. <https://doi.org/10.1039/d2bm01977a>
- Boia, R., Ruzafa, N., Aires, I. D., Pereiro, X., Ambrósio, A. F., Vecino, E., & Santiago, A. R. (2020). Neuroprotective Strategies for Retinal Ganglion Cell Degeneration: Current Status and Challenges Ahead. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7), 2262. <https://doi.org/10.3390/ijms21072262>
- Brown, C., McKee, C., Bakshi, S., Walker, K., Hakman, E., Halassy, S., Svinarich, D., Dodds, R., Govind, C. K., & Chaudhry, G. R. (2019). Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *13*(9), 1738-1755. <https://doi.org/10.1002/term.2914>
- Bulati, M., Miceli, V., Gallo, A., Amico, G., Carcione, C., Pampalone, M., & Conaldi, P. G. (2020). The Immunomodulatory Properties of the Human Amnion-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Induced by INF- γ Produced by Activated Lymphomonocytes and Are Mediated by Cell-To-Cell Contact and Soluble Factors. *Frontiers in Immunology*, *11*, 54. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00054>

BIBLIOGRAFÍA

- Cai, J., Weiss, M. L., & Rao, M. S. (2004). In search of «stemness». *Experimental Hematology*, *32*(7), 585-598. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2004.03.013>
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, *9*(5), 641-650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
- Caplan, A. I. (2008). All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell*, *3*(3), 229-230. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.08.008>
- Caplan, A. I. (2017). Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Translational Medicine*, *6*(6), 1445-1451. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>
- Caruso, M., Evangelista, M., & Parolini, O. (2012). Human term placental cells: Phenotype, properties and new avenues in regenerative medicine. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, *1*(2), 64-74.
- Catterall, W. A., Kalume, F., & Oakley, J. C. (2010). NaV1.1 channels and epilepsy. *The Journal of Physiology*, *588*(Pt 11), 1849-1859. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.187484>
- Centurione, L., Passaretta, F., Centurione, M. A., Munari, S. D., Vertua, E., Silini, A., Liberati, M., Parolini, O., & Di Pietro, R. (2018). Mapping of the Human Placenta: Experimental Evidence of Amniotic Epithelial Cell Heterogeneity. *Cell Transplantation*, *27*(1), 12-22. <https://doi.org/10.1177/0963689717725078>
- Chancellor, D., Barrett, D., Nguyen-Jatkoe, L., Millington, S., & Eckhardt, F. (2023). The state of cell and gene therapy in 2023. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *31*(12), 3376-3388. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.11.001>
- Chang, Y.-J., Hwang, S.-M., Tseng, C.-P., Cheng, F.-C., Huang, S.-H., Hsu, L.-F., Hsu, L.-W., & Tsai, M.-S. (2010). Isolation of mesenchymal stem cells with neurogenic potential from the mesoderm of the amniotic membrane. *Cells, Tissues, Organs*, *192*(2), 93-105. <https://doi.org/10.1159/000295774>
- Chen, L., He, D.-M., & Zhang, Y. (2009). The differentiation of human placenta-derived mesenchymal stem cells into dopaminergic cells in vitro. *Cellular & Molecular Biology Letters*, *14*(3), 528-536. <https://doi.org/10.2478/s11658-009-0015-3>
- Chen, Z., Tortella, F. C., Dave, J. R., Marshall, V. S., Clarke, D. L., Sing, G., Du, F., & Lu, X.-C. M. (2009a). Human amnion-derived multipotent progenitor cell treatment

- alleviates traumatic brain injury-induced axonal degeneration. *Journal of Neurotrauma*, *26*(11), 1987-1997. <https://doi.org/10.1089/neu.2008.0863>
- Chen, Z., Tortella, F. C., Dave, J. R., Marshall, V. S., Clarke, D. L., Sing, G., Du, F., & Lu, X.-C. M. (2009b). Human amnion-derived multipotent progenitor cell treatment alleviates traumatic brain injury-induced axonal degeneration. *Journal of Neurotrauma*, *26*(11), 1987-1997. <https://doi.org/10.1089/neu.2008.0863>
- Cho, J. S., Lee, J., Jeong, D. U., Kim, H. W., Chang, W. S., Moon, J., & Chang, J. W. (2018). Effect of Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Dementia Rat Model via Microglial Mediation: A Comparison between Stem Cell Transplant Methods. *Yonsei Medical Journal*, *59*(3), 406-415. <https://doi.org/10.3349/ymj.2018.59.3.406>
- Choumerianou, D. M., Dimitriou, H., & Kalmanti, M. (2008). Stem cells: Promises versus limitations. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, *14*(1), 53-60. <https://doi.org/10.1089/teb.2007.0216>
- Ciruelas, K., Marcotulli, D., & Bajjalieh, S. M. (2019). Synaptic Vesicle Protein 2: A multifaceted regulator of secretion. *Seminars in cell & developmental biology*, *95*, 130-141. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.02.003>
- Clark, K. C., Wang, D., Kumar, P., Mor, S., Kulubya, E., Lazar, S. V., & Wang, A. (2022). The Molecular Mechanisms Through Which Placental Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Myelin Regeneration. *Advanced Biology*, *6*(2), e2101099. <https://doi.org/10.1002/adbi.202101099>
- Clevers, H., & Watt, F. M. (2018). Defining Adult Stem Cells by Function, not by Phenotype. *Annual Review of Biochemistry*, *87*, 1015-1027. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012341>
- Coronado, R. E. (2018). Chapter 15—Therapeutic Effect of Extracellular Vesicles Derived From Adult/Perinatal Human Mesenchymal Stem Cells. En A. Atala, K. J. Cetrulo, R. R. Taghizadeh, S. V. Murphy, & C. L. Cetrulo (Eds.), *Perinatal Stem Cells* (pp. 201-215). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812015-6.00015-7>
- Corselli, M., Chen, C.-W., Sun, B., Yap, S., Rubin, J. P., & Péault, B. (2012). The tunica adventitia of human arteries and veins as a source of mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, *21*(8), 1299-1308. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0200>

BIBLIOGRAFÍA

- Covas, D. T., Siufi, J. L. C., Silva, A. R. L., & Orellana, M. D. (2003). Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, *36*(9), 1179-1183. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2003000900006>
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T. S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P.-N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B. M., Badylak, S., Buhring, H.-J., Giacobino, J.-P., Lazzari, L., ... Péault, B. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, *3*(3), 301-313. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.003>
- Dallatana, A., Cremonesi, L., Pezzini, F., Fontana, G., Innamorati, G., & Giacomello, L. (2024). The Placenta as a Source of Human Material for Neuronal Repair. *Biomedicines*, *12*(7), 1567. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12071567>
- Danieli, P., Malpasso, G., Ciuffreda, M. C., Cervio, E., Calvillo, L., Copes, F., Pisano, F., Mura, M., Kleijn, L., de Boer, R. A., Viarengo, G., Rosti, V., Spinillo, A., Roccio, M., & Gnechi, M. (2015). Conditioned medium from human amniotic mesenchymal stromal cells limits infarct size and enhances angiogenesis. *Stem Cells Translational Medicine*, *4*(5), 448-458. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0253>
- Delorme, B., Chateauvieux, S., & Charbord, P. (2006). The concept of mesenchymal stem cells. *Regenerative Medicine*, *1*(4), 497-509. <https://doi.org/10.2217/17460751.1.4.497>
- Díaz-Prado, S., Muiños-López, E., Hermida-Gómez, T., Rendal-Vázquez, M. E., Fuentes-Boquete, I., de Toro, F. J., & Blanco, F. J. (2010). Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. *Journal of Cellular Biochemistry*, *111*(4), 846-857. <https://doi.org/10.1002/jcb.22769>
- Díaz-Prado, S., Muiños-López, E., Hermida-Gómez, T., Rendal-Vázquez, M. E., Fuentes-Boquete, I., de Toro, F. J., & Blanco, F. J. (2011). Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, *17*(1), 49-59. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2010.0136>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315-317.

<https://doi.org/10.1080/14653240600855905>

- Eleuteri, S., & Fierabracci, A. (2019). Insights into the Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(18), 4597. <https://doi.org/10.3390/ijms20184597>
- El-Kadiry, A. E.-H., Rafei, M., & Shammaa, R. (2021). Cell Therapy: Types, Regulation, and Clinical Benefits. *Frontiers in Medicine*, *8*, 756029. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.756029>
- Fehrer, C., Brunauer, R., Laschober, G., Unterluggauer, H., Reitinger, S., Kloss, F., Gully, C., Gassner, R., & Lepperdinger, G. (2007). Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell*, *6*(6), 745-757. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00336.x>
- Fitzsimmons, R. E. B., Mazurek, M. S., Soos, A., & Simmons, C. A. (2018). Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *Stem Cells International*, *2018*, 8031718. <https://doi.org/10.1155/2018/8031718>
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F., & Keiliss-Borok, I. V. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, *17*(4), 331-340. <https://doi.org/10.1097/00007890-197404000-00001>
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., & Frolova, G. P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, *6*(2), 230-247.
- Ge, X., Wang, I.-N. E., Toma, I., Sebastiano, V., Liu, J., Butte, M. J., Reijo Pera, R. A., & Yang, P. C. (2012). Human amniotic mesenchymal stem cell-derived induced pluripotent stem cells may generate a universal source of cardiac cells. *Stem Cells and Development*, *21*(15), 2798-2808. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0435>
- Ghamari, S.-H., Abbasi-Kangevari, M., Tayebi, T., Bahrami, S., & Niknejad, H. (2020). The Bottlenecks in Translating Placenta-Derived Amniotic Epithelial and Mesenchymal Stromal Cells Into the Clinic: Current Discrepancies in Marker Reports. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 180. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00180>

BIBLIOGRAFÍA

- Giampà, C., Alvino, A., Magatti, M., Silini, A. R., Cardinale, A., Paldino, E., Fusco, F. R., & Parolini, O. (2019). Conditioned medium from amniotic cells protects striatal degeneration and ameliorates motor deficits in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *23*(2), 1581-1592. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14113>
- Golchin, A., & Farahany, T. Z. (2019). Biological Products: Cellular Therapy and FDA Approved Products. *Stem Cell Reviews and Reports*, *15*(2), 166-175. <https://doi.org/10.1007/s12015-018-9866-1>
- Goldberg, J. L., Espinosa, J. S., Xu, Y., Davidson, N., Kovacs, G. T. A., & Barres, B. A. (2002). Retinal ganglion cells do not extend axons by default: Promotion by neurotrophic signaling and electrical activity. *Neuron*, *33*(5), 689-702. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00602-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00602-5)
- Gómez, R. M., Sánchez, M. Y., Portela-Lomba, M., Ghotme, K., Barreto, G. E., Sierra, J., & Moreno-Flores, M. T. (2018). Cell therapy for spinal cord injury with olfactory ensheathing glia cells (OECs). *Glia*, *66*(7), 1267-1301. <https://doi.org/10.1002/glia.23282>
- Gomez-Salazar, M., Gonzalez-Galofre, Z. N., Casamitjana, J., Crisan, M., James, A. W., & Péault, B. (2020). Five Decades Later, Are Mesenchymal Stem Cells Still Relevant? *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 148. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00148>
- Grzywocz, Z., Pius-Sadowska, E., Klos, P., Gryzik, M., Wasilewska, D., Aleksandrowicz, B., Dworzczynska, M., Sabalinska, S., Hoser, G., Machalinski, B., & Kawiak, J. (2014). Growth factors and their receptors derived from human amniotic cells in vitro. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, *52*(3), 163-170. <https://doi.org/10.5603/FHC.2014.0019>
- Gu, Q., Gu, Y., Shi, Q., & Yang, H. (2016). Hypoxia Promotes Osteogenesis of Human Placental-Derived Mesenchymal Stem Cells. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, *239*(4), 287-296. <https://doi.org/10.1620/tjem.239.287>
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, *391*(2), 85-100. <https://doi.org/10.1007/BF00656997>
- Han, Z. C., Du, W. J., Han, Z. B., & Liang, L. (2017). New insights into the heterogeneity

- and functional diversity of human mesenchymal stem cells. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 28(s1), S29-S45. <https://doi.org/10.3233/BME-171622>
- Haque, N., Rahman, M. T., Abu Kasim, N. H., & Alabsi, A. M. (2013). Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy. *TheScientificWorldJournal*, 2013, 632972. <https://doi.org/10.1155/2013/632972>
- Harvey, A. R., Hu, Y., Leaver, S. G., Mellough, C. B., Park, K., Verhaagen, J., Plant, G. W., & Cui, Q. (2006). Gene therapy and transplantation in CNS repair: The visual system. *Progress in Retinal and Eye Research*, 25(5), 449-489. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2006.07.002>
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 9, 12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>
- Hirota, R., Sasaki, M., Honmou, O., & Yamashita, T. (2023). Mesenchymal Stem Cell Transplantation for Spinal Cord Injury: Current Status and Prospects. *Spine Surgery and Related Research*, 7(4), 319-326. <https://doi.org/10.22603/ssrr.2022-0234>
- Hoang, D. M., Pham, P. T., Bach, T. Q., Ngo, A. T. L., Nguyen, Q. T., Phan, T. T. K., Nguyen, G. H., Le, P. T. T., Hoang, V. T., Forsyth, N. R., Heke, M., & Nguyen, L. T. (2022). Stem cell-based therapy for human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 272. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01134-4>
- Holzwarth, C., Vaegler, M., Gieseke, F., Pfister, S. M., Handgretinger, R., Kerst, G., & Müller, I. (2010). Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biology*, 11, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-11>
- Hong, S. H., Gang, E. J., Jeong, J. A., Ahn, C., Hwang, S. H., Yang, I. H., Park, H. K., Han, H., & Kim, H. (2005). In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330(4), 1153-1161. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.086>
- Horner, P. J., & Gage, F. H. (2000). Regenerating the damaged central nervous system. *Nature*, 407(6807), 963-970. <https://doi.org/10.1038/35039559>

BIBLIOGRAFÍA

- Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Deans, R. J., Krause, D. S., Keating, A., & International Society for Cellular Therapy. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *7*(5), 393-395. <https://doi.org/10.1080/14653240500319234>
- Howe, C. L., & Mobley, W. C. (2005). Long-distance retrograde neurotrophic signaling. *Current Opinion in Neurobiology*, *15*(1), 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.01.010>
- Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annual Review of Neuroscience*, *24*, 677-736. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.677>
- Huang, Y.-C., Yang, Z.-M., Chen, X.-H., Tan, M.-Y., Wang, J., Li, X.-Q., Xie, H.-Q., & Deng, L. (2009). Isolation of mesenchymal stem cells from human placental decidua basalis and resistance to hypoxia and serum deprivation. *Stem Cell Reviews and Reports*, *5*(3), 247-255. <https://doi.org/10.1007/s12015-009-9069-x>
- Huxlin, K. R., & Goodchild, A. K. (1997). Retinal ganglion cells in the albino rat: Revised morphological classification. *The Journal of Comparative Neurology*, *385*(2), 309-323.
- Hwang, J. H., Shim, S. S., Seok, O. S., Lee, H. Y., Woo, S. K., Kim, B. H., Song, H. R., Lee, J. K., & Park, Y. K. (2009). Comparison of cytokine expression in mesenchymal stem cells from human placenta, cord blood, and bone marrow. *Journal of Korean Medical Science*, *24*(4), 547-554. <https://doi.org/10.3346/jkms.2009.24.4.547>
- Ilancheran, S., Michalska, A., Peh, G., Wallace, E. M., Pera, M., & Manuelpillai, U. (2007). Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biology of Reproduction*, *77*(3), 577-588. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.055244>
- In 't Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G. M. J. S., Claas, F. H. J., Fibbe, W. E., & Kanhai, H. H. H. (2004). Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *22*(7), 1338-1345. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0058>

- In 't Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., Noort, W. A., Claas, F. H. J., Willemze, R., Fibbe, W. E., & Kanhai, H. H. H. (2003). Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*, *102*(4), 1548-1549. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1291>
- Insausti, C. L., Blanquer, M., García-Hernández, A. M., Castellanos, G., & Moraleda, J. M. (2014). Amniotic membrane-derived stem cells: Immunomodulatory properties and potential clinical application. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, *7*, 53-63. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S58696>
- Izumi, M., Pazin, B. J., Minervini, C. F., Gerlach, J., Ross, M. A., Stolz, D. B., Turner, M. E., Thompson, R. L., & Miki, T. (2009). Quantitative comparison of stem cell marker-positive cells in fetal and term human amnion. *Journal of Reproductive Immunology*, *81*(1), 39-43. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.02.007>
- Jiang, D., Chen, F.-X., Zhou, H., Lu, Y.-Y., Tan, H., Yu, S.-J., Yuan, J., Liu, H., Meng, W., & Jin, Z.-B. (2020). Bioenergetic Crosstalk between Mesenchymal Stem Cells and various Ocular Cells through the intercellular trafficking of Mitochondria. *Theranostics*, *10*(16), 7260-7272. <https://doi.org/10.7150/thno.46332>
- Jiang, F., Ma, J., Liang, Y., Niu, Y., Chen, N., & Shen, M. (2015). Amniotic Mesenchymal Stem Cells Can Enhance Angiogenic Capacity via MMPs In Vitro and In Vivo. *BioMed Research International*, *2015*, 324014. <https://doi.org/10.1155/2015/324014>
- Jiao, H., Shi, K., Zhang, W., Yang, L., Yang, L., Guan, F., & Yang, B. (2016). Therapeutic potential of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells in APP transgenic mice. *Oncology Letters*, *12*(3), 1877-1883. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4857>
- Kang, J. W., Koo, H. C., Hwang, S. Y., Kang, S. K., Ra, J. C., Lee, M. H., & Park, Y. H. (2012). Immunomodulatory effects of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Veterinary Science*, *13*(1), 23-31. <https://doi.org/10.4142/jvs.2012.13.1.23>
- Kawamichi, Y., Cui, C.-H., Toyoda, M., Makino, H., Horie, A., Takahashi, Y., Matsumoto, K., Saito, H., Ohta, H., Saito, K., & Umezawa, A. (2010). Cells of extraembryonic mesodermal origin confer human dystrophin in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Cellular Physiology*, *223*(3), 695-702. <https://doi.org/10.1002/jcp.22076>

BIBLIOGRAFÍA

- Keating, A. (2012). Mesenchymal Stromal Cells: New Directions. *Cell Stem Cell*, *10*(6), 709-716. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.015>
- Kerschensteiner, D. (2022). Feature Detection by Retinal Ganglion Cells. *Annual Review of Vision Science*, *8*, 135-169. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-100419-112009>
- Kim, H. G., & Choi, O. H. (2011). Neovascularization in a mouse model via stem cells derived from human fetal amniotic membranes. *Heart and Vessels*, *26*(2), 196-205. <https://doi.org/10.1007/s00380-010-0064-6>
- Kim, J., Kang, H. M., Kim, H., Kim, M. R., Kwon, H. C., Gye, M. C., Kang, S. G., Yang, H. S., & You, J. (2007). Ex vivo characteristics of human amniotic membrane-derived stem cells. *Cloning and Stem Cells*, *9*(4), 581-594. <https://doi.org/10.1089/clo.2007.0027>
- Kim, K.-S., Kim, H. S., Park, J.-M., Kim, H. W., Park, M.-K., Lee, H.-S., Lim, D. S., Lee, T. H., Chopp, M., & Moon, J. (2013). Long-term immunomodulatory effect of amniotic stem cells in an Alzheimer's disease model. *Neurobiology of Aging*, *34*(10), 2408-2420. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.03.029>
- Kim, M. J., Shin, K. S., Jeon, J. H., Lee, D. R., Shim, S. H., Kim, J. K., Cha, D.-H., Yoon, T. K., & Kim, G. J. (2011). Human chorionic-plate-derived mesenchymal stem cells and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: A comparative analysis of their potential as placenta-derived stem cells. *Cell and Tissue Research*, *346*(1), 53-64. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1249-8>
- Kim, S.-W., Zhang, H.-Z., Kim, C. E., An, H. S., Kim, J.-M., & Kim, M. H. (2012). Amniotic mesenchymal stem cells have robust angiogenic properties and are effective in treating hindlimb ischaemia. *Cardiovascular Research*, *93*(3), 525-534. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr328>
- Kim, U. S., Mahroo, O. A., Mollon, J. D., & Yu-Wai-Man, P. (2021). Retinal Ganglion Cells- Diversity of Cell Types and Clinical Relevance. *Frontiers in Neurology*, *12*, 661938. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.661938>
- Koike, C., Zhou, K., Takeda, Y., Fathy, M., Okabe, M., Yoshida, T., Nakamura, Y., Kato, Y., & Nikaido, T. (2014). Characterization of Amniotic Stem Cells. *Cellular Reprogramming*, *16*(4), 298-305. <https://doi.org/10.1089/cell.2013.0090>

- Kole, M. H. P., Ilschner, S. U., Kampa, B. M., Williams, S. R., Ruben, P. C., & Stuart, G. J. (2008). Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nature Neuroscience*, *11*(2), 178-186. <https://doi.org/10.1038/nn2040>
- Komaki, M., Numata, Y., Morioka, C., Honda, I., Tooi, M., Yokoyama, N., Ayame, H., Iwasaki, K., Taki, A., Oshima, N., & Morita, I. (2017). Exosomes of human placenta-derived mesenchymal stem cells stimulate angiogenesis. *Stem Cell Research & Therapy*, *8*(1), 219. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0660-9>
- König, J., Huppertz, B., Desoye, G., Parolini, O., Fröhlich, J. D., Weiss, G., Dohr, G., Sedlmayr, P., & Lang, I. (2012). Amnion-derived mesenchymal stromal cells show angiogenic properties but resist differentiation into mature endothelial cells. *Stem Cells and Development*, *21*(8), 1309-1320. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0223>
- Kordelas, L., Rebmann, V., Ludwig, A.-K., Radtke, S., Ruesing, J., Doepfner, T. R., Epple, M., Horn, P. A., Beelen, D. W., & Giebel, B. (2014). MSC-derived exosomes: A novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia*, *28*(4), 970-973. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.41>
- Krasnodembskaya, A., Song, Y., Fang, X., Gupta, N., Serikov, V., Lee, J.-W., & Matthay, M. A. (2010). Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *28*(12), 2229-2238. <https://doi.org/10.1002/stem.544>
- Kubo, M., Sonoda, Y., Muramatsu, R., & Usui, M. (2001). Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *42*(7), 1539-1546.
- Kulubya, E. S., Clark, K., Hao, D., Lazar, S., Ghaffari-Rafi, A., Karnati, T., Ebinu, J. O., Zwienerberg, M., Farmer, D. L., & Wang, A. (2021). The Unique Properties of Placental Mesenchymal Stromal Cells: A Novel Source of Therapy for Congenital and Acquired Spinal Cord Injury. *Cells*, *10*(11), 2837. <https://doi.org/10.3390/cells10112837>
- Kulus, M., Sibiak, R., Stefańska, K., Zdun, M., Wiczorkiewicz, M., Piotrowska-Kempisty, H., Jaśkowski, J. M., Bukowska, D., Ratajczak, K., Zabel, M., Mozdziak, P., & Kempisty, B. (2021). Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Human and Animal Perinatal Tissues-Origins, Characteristics, Signaling Pathways, and Clinical

BIBLIOGRAFÍA

- Trials. *Cells*, *10*(12), 3278. <https://doi.org/10.3390/cells10123278>
- Kumar, P., Becker, J. C., Gao, K., Carney, R. P., Lankford, L., Keller, B. A., Herout, K., Lam, K. S., Farmer, D. L., & Wang, A. (2019). Neuroprotective effect of placenta-derived mesenchymal stromal cells: Role of exosomes. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *33*(5), 5836-5849. <https://doi.org/10.1096/fj.201800972R>
- Kwon, S. Y., Chun, S. Y., Ha, Y.-S., Kim, D. H., Kim, J., Song, P. H., Kim, H. T., Yoo, E. S., Kim, B. S., & Kwon, T. G. (2017). Hypoxia Enhances Cell Properties of Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *14*(5), 595-604. <https://doi.org/10.1007/s13770-017-0068-8>
- Lee, O. K., Kuo, T. K., Chen, W.-M., Lee, K.-D., Hsieh, S.-L., & Chen, T.-H. (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, *103*(5), 1669-1675. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1670>
- Lessmann, V., Gottmann, K., & Malsangio, M. (2003). Neurotrophin secretion: Current facts and future prospects. *Progress in Neurobiology*, *69*(5), 341-374. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(03\)00019-4](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(03)00019-4)
- Leyva-Leyva, M., Barrera, L., López-Camarillo, C., Arriaga-Pizano, L., Orozco-Hoyuela, G., Carrillo-Casas, E. M., Calderón-Pérez, J., López-Díaz, A., Hernandez-Aguilar, F., González-Ramírez, R., Kawa, S., Chimal-Monroy, J., & Fuentes-Mera, L. (2013). Characterization of mesenchymal stem cell subpopulations from human amniotic membrane with dissimilar osteoblastic potential. *Stem Cells and Development*, *22*(8), 1275-1287. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0359>
- Li, J.-Y., Ren, K.-K., Zhang, W.-J., Xiao, L., Wu, H.-Y., Liu, Q.-Y., Ding, T., Zhang, X.-C., Nie, W.-J., Ke, Y., Deng, K.-Y., Liu, Q.-W., & Xin, H.-B. (2019). Human amniotic mesenchymal stem cells and their paracrine factors promote wound healing by inhibiting heat stress-induced skin cell apoptosis and enhancing their proliferation through activating PI3K/AKT signaling pathway. *Stem Cell Research & Therapy*, *10*(1), 247. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1366-y>
- Li, L., Bennett, S. A. L., & Wang, L. (2012). Role of E-cadherin and other cell adhesion molecules in survival and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Adhesion & Migration*, *6*(1), 59-70. <https://doi.org/10.4161/cam.19583>
- Li, L., Jaiswal, P. K., Makhoul, G., Jurakhan, R., Selvasandran, K., Ridwan, K., & Cecere, R. (2017). Hypoxia modulates cell migration and proliferation in placenta-derived

- mesenchymal stem cells. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, *154*(2), 543-552.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2017.03.141>
- Li, M., Chen, H., & Zhu, M. (2022). Mesenchymal stem cells for regenerative medicine in central nervous system. *Frontiers in Neuroscience*, *16*, 1068114. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.1068114>
- Lin, Y., Ren, X., Chen, Y., & Chen, D. (2020). Interaction Between Mesenchymal Stem Cells and Retinal Degenerative Microenvironment. *Frontiers in Neuroscience*, *14*, 617377. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.617377>
- Lindenmair, A., Hatlapatka, T., Kollwig, G., Hennerbichler, S., Gabriel, C., Wolbank, S., Redl, H., & Kasper, C. (2012). Mesenchymal Stem or Stromal Cells from Amnion and Umbilical Cord Tissue and Their Potential for Clinical Applications. *Cells*, *1*(4), 1061-1088. <https://doi.org/10.3390/cells1041061>
- Lindvall, O., Kokaia, Z., & Martinez-Serrano, A. (2004). Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nature Medicine*, *10 Suppl*, S42-50. <https://doi.org/10.1038/nm1064>
- Liu, Q.-W., Huang, Q.-M., Wu, H.-Y., Zuo, G.-S.-L., Gu, H.-C., Deng, K.-Y., & Xin, H.-B. (2021). Characteristics and Therapeutic Potential of Human Amnion-Derived Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2), 970. <https://doi.org/10.3390/ijms22020970>
- MacInnis, B. L., & Campenot, R. B. (2002). Retrograde support of neuronal survival without retrograde transport of nerve growth factor. *Science (New York, N.Y.)*, *295*(5559), 1536-1539. <https://doi.org/10.1126/science.1064913>
- Magatti, M., Masserdotti, A., Bonassi Signoroni, P., Vertua, E., Stefani, F. R., Silini, A. R., & Parolini, O. (2020). B Lymphocytes as Targets of the Immunomodulatory Properties of Human Amniotic Mesenchymal Stromal Cells. *Frontiers in Immunology*, *11*, 1156. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01156>
- Manuelpillai, U., Moodley, Y., Borlongan, C. V., & Parolini, O. (2011). Amniotic membrane and amniotic cells: Potential therapeutic tools to combat tissue inflammation and fibrosis? *Placenta*, *32 Suppl 4*, S320-325. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.04.010>
- Mariotti, E., Mirabelli, P., Abate, G., Schiattarella, M., Martinelli, P., Fortunato, G., Di Noto, R., & Del Vecchio, L. (2008). Comparative characteristics of mesenchymal stem

BIBLIOGRAFÍA

- cells from human bone marrow and placenta: CD10, CD49d, and CD56 make a difference. *Stem Cells and Development*, 17(6), 1039-1041. <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0212>
- Martinez, V. G., Ontoria-Oviedo, I., Ricardo, C. P., Harding, S. E., Sacedon, R., Varas, A., Zapata, A., Sepulveda, P., & Vicente, A. (2017). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha improves immunomodulation by dental mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 208. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0659-2>
- Mendt, M., Rezvani, K., & Shpall, E. (2019). Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use. *Bone Marrow Transplantation*, 54(Suppl 2), 789-792. <https://doi.org/10.1038/s41409-019-0616-z>
- Mihu, C. M., Rus Ciucă, D., Soritău, O., Suşman, S., & Mihu, D. (2009). Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie*, 50(1), 73-77.
- Miki, T. (2018). Stem cell characteristics and the therapeutic potential of amniotic epithelial cells. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 80(4), e13003. <https://doi.org/10.1111/aji.13003>
- Miki, T., Lehmann, T., Cai, H., Stolz, D. B., & Strom, S. C. (2005). Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 23(10), 1549-1559. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0357>
- Minagawa, T., Imamura, T., Igawa, Y., Aizawa, N., Ishizuka, O., & Nishizawa, O. (2010). Differentiation of smooth muscle cells from human amniotic mesenchymal cells implanted in the freeze-injured mouse urinary bladder. *European Urology*, 58(2), 299-306. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2009.12.031>
- Moeinabadi-Bidgoli, K., Babajani, A., Yazdanpanah, G., Farhadhosseinabadi, B., Jamshidi, E., Bahrami, S., & Niknejad, H. (2021). Translational insights into stem cell preconditioning: From molecular mechanisms to preclinical applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 142, 112026. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112026>
- Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., & Quiñones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in stem cell biology: A critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*, 7(2), 150-161. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.007>

- Moonshi, S. S., Adelnia, H., Wu, Y., & Ta, H. T. (2022). Placenta-derived mesenchymal stem cells for treatment of diseases: A clinically relevant source. *Advanced Therapeutics*, *5*(10), 1-14. <https://doi.org/10.1002/adtp.202200054>
- Moraes, D. A., Sibov, T. T., Pavon, L. F., Alvim, P. Q., Bonadio, R. S., Da Silva, J. R., Pic-Taylor, A., Toledo, O. A., Marti, L. C., Azevedo, R. B., & Oliveira, D. M. (2016). A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*, *7*(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0359-3>
- Moreno-Flores, M. T., Díaz-Nido, J., Wandosell, F., & Avila, J. (2002). Olfactory Ensheathing Glia: Drivers of Axonal Regeneration in the Central Nervous System? *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, *2*(1), 37-43. <https://doi.org/10.1155/S1110724302000372>
- Moreno-Flores, M. T., Lim, F., Martín-Bermejo, M. J., Díaz-Nido, J., Avila, J., & Wandosell, F. (2003). Immortalized olfactory ensheathing glia promote axonal regeneration of rat retinal ganglion neurons. *Journal of Neurochemistry*, *85*(4), 861-871. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01729.x>
- Murray, I. R., West, C. C., Hardy, W. R., James, A. W., Park, T. S., Nguyen, A., Tawonsawatruk, T., Lazzari, L., Soo, C., & Péault, B. (2014). Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *71*(8), 1353-1374. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1462-6>
- Musiak-Wysocka, A., Kot, M., & Majka, M. (2019). The Pros and Cons of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies. *Cell Transplantation*, *28*(7), 801-812. <https://doi.org/10.1177/0963689719837897>
- Musiak-Wysocka, A., Kot, M., Sułkowski, M., Badyra, B., & Majka, M. (2019). Molecular and Functional Verification of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs) Pluripotency. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(8), 1807. <https://doi.org/10.3390/ijms20081807>
- Naji, A., Eitoku, M., Favier, B., Deschaseaux, F., Rouas-Freiss, N., & Suganuma, N. (2019). Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *76*(17), 3323-3348. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03125-1>

BIBLIOGRAFÍA

- Navas, A., Magaña-Guerrero, F. S., Domínguez-López, A., Chávez-García, C., Partido, G., Graue-Hernández, E. O., Sánchez-García, F. J., & Garfias, Y. (2018). Anti-Inflammatory and Anti-Fibrotic Effects of Human Amniotic Membrane Mesenchymal Stem Cells and Their Potential in Corneal Repair. *Stem Cells Translational Medicine*, *7*(12), 906-917. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0042>
- Nazarov, I., Lee, J. W., Soupene, E., Etemad, S., Knapik, D., Green, W., Bashkurova, E., Fang, X., Matthay, M. A., Kuypers, F. A., & Serikov, V. B. (2012). Multipotent stromal stem cells from human placenta demonstrate high therapeutic potential. *Stem Cells Translational Medicine*, *1*(5), 359-372. <https://doi.org/10.5966/sctm.2011-0021>
- Ni, L., Liu, X., Sochacki, K. R., Ebraheim, M., Fahrenkopf, M., Shi, Q., Liu, J., & Yang, H. (2014). Effects of hypoxia on differentiation from human placenta-derived mesenchymal stem cells to nucleus pulposus-like cells. *The Spine Journal: Official Journal of the North American Spine Society*, *14*(10), 2451-2458. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2014.03.028>
- Nitahara-Kasahara, Y., Nakayama, S., Kimura, K., Yamaguchi, S., Kakiuchi, Y., Nito, C., Hayashi, M., Nakaishi, T., Ueda, Y., & Okada, T. (2023). Immunomodulatory amnion-derived mesenchymal stromal cells preserve muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Stem Cell Research & Therapy*, *14*(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03337-0>
- Nogami, M., Tsuno, H., Koike, C., Okabe, M., Yoshida, T., Seki, S., Matsui, Y., Kimura, T., & Nikaido, T. (2012). Isolation and characterization of human amniotic mesenchymal stem cells and their chondrogenic differentiation. *Transplantation*, *93*(12), 1221-1228. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182529b76>
- Nombela-Arrieta, C., Ritz, J., & Silberstein, L. E. (2011). The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *12*(2), 126-131. <https://doi.org/10.1038/nrm3049>
- Norte-Muñoz, M., García-Bernal, D., García-Ayuso, D., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2024). Interplay between mesenchymal stromal cells and the immune system after transplantation: Implications for advanced cell therapy in the retina. *Neural Regeneration Research*, *19*(3), 542. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.380876>
- Norte-Muñoz, M., Lucas-Ruiz, F., Gallego-Ortega, A., García-Bernal, D., Valiente-Soriano, F. J., de la Villa, P., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2021). Neuroprotection

- and Axonal Regeneration Induced by Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Depend on the Type of Transplant. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 772223. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.772223>
- Nowack, A., Yao, J., Custer, K. L., & Bajjalieh, S. M. (2010). SV2 regulates neurotransmitter release via multiple mechanisms. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 299(5), C960-C967. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00259.2010>
- Ochsenbein-Kölbl, N., Bilic, G., Hall, H., Huch, R., & Zimmermann, R. (2003). Inducing proliferation of human amnion epithelial and mesenchymal cells for prospective engineering of membrane repair. *Journal of Perinatal Medicine*, 31(4), 287-294. <https://doi.org/10.1515/JPM.2003.040>
- Paradisi, M., Alviano, F., Pironi, S., Lanzoni, G., Fernandez, M., Lizzo, G., Giardino, L., Giuliani, A., Costa, R., Marchionni, C., Bonsi, L., & Calza, L. (2014). Human mesenchymal stem cells produce bioactive neurotrophic factors: Source, individual variability and differentiation issues. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 27(3), 391-402. <https://doi.org/10.1177/039463201402700309>
- Park, I.-H., Kim, K.-H., Choi, H.-K., Shim, J.-S., Whang, S.-Y., Hahn, S. J., Kwon, O.-J., & Oh, I.-H. (2013). Constitutive stabilization of hypoxia-inducible factor alpha selectively promotes the self-renewal of mesenchymal progenitors and maintains mesenchymal stromal cells in an undifferentiated state. *Experimental & molecular medicine*, 45, e44. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.87>
- Park, M., Kim, H. C., Kim, O., & Lew, H. (2018). Human placenta mesenchymal stem cells promote axon survival following optic nerve compression through activation of NF- κ B pathway. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(3), e1441-e1449. <https://doi.org/10.1002/term.2561>
- Parolini, O., Alviano, F., Bagnara, G. P., Bilic, G., Bühring, H.-J., Evangelista, M., Hennerbichler, S., Liu, B., Magatti, M., Mao, N., Miki, T., Marongiu, F., Nakajima, H., Nikaido, T., Portmann-Lanz, C. B., Sankar, V., Soncini, M., Stadler, G., Surbek, D., ... Strom, S. C. (2008). Concise review: Isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(2), 300-311. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0594>

BIBLIOGRAFÍA

- Parrilla-Reverter, G., Agudo, M., Sobrado-Calvo, P., Salinas-Navarro, M., Villegas-Pérez, M. P., & Vidal-Sanz, M. (2009). Effects of different neurotrophic factors on the survival of retinal ganglion cells after a complete intraorbital nerve crush injury: A quantitative in vivo study. *Experimental Eye Research*, *89*(1), 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.02.015>
- Pasquinelli, G., Tazzari, P., Ricci, F., Vaselli, C., Buzzi, M., Conte, R., Orrico, C., Foroni, L., Stella, A., Alviano, F., Bagnara, G. P., & Lucarelli, E. (2007). Ultrastructural characteristics of human mesenchymal stromal (stem) cells derived from bone marrow and term placenta. *Ultrastructural Pathology*, *31*(1), 23-31. <https://doi.org/10.1080/01913120601169477>
- Peichl, L. (1989). Alpha and delta ganglion cells in the rat retina. *The Journal of Comparative Neurology*, *286*(1), 120-139. <https://doi.org/10.1002/cne.902860108>
- Peichl, L. (1991). Alpha ganglion cells in mammalian retinae: Common properties, species differences, and some comments on other ganglion cells. *Visual Neuroscience*, *7*(1-2), 155-169. <https://doi.org/10.1017/s0952523800011020>
- Pessina, A., & Gribaldo, L. (2006). The key role of adult stem cells: Therapeutic perspectives. *Current Medical Research and Opinion*, *22*(11), 2287-2300. <https://doi.org/10.1185/030079906X148517>
- Pethe, P., & Kale, V. (2021). Placenta: A gold mine for translational research and regenerative medicine. *Reproductive Biology*, *21*(2), 100508. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2021.100508>
- Phinney, D. G., & Prockop, D. J. (2007). Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *25*(11), 2896-2902. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0637>
- Pipino, C., Shangaris, P., Resca, E., Zia, S., Deprest, J., Sebire, N. J., David, A. L., Guillot, P. V., & De Coppi, P. (2013). Placenta as a reservoir of stem cells: An underutilized resource? *British Medical Bulletin*, *105*, 43-68. <https://doi.org/10.1093/bmb/lds033>
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New*

- York, N.Y.*), 284(5411), 143-147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- Plaza, N., Simón, D., Sierra, J., & Moreno-Flores, M. T. (2016). Transduction of an immortalized olfactory ensheathing glia cell line with the green fluorescent protein (GFP) gene: Evaluation of its neuroregenerative capacity as a proof of concept. *Neuroscience Letters*, 612, 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.12.001>
- Pogozhykh, O., Prokopyuk, V., Figueiredo, C., & Pogozhykh, D. (2018). Placenta and Placental Derivatives in Regenerative Therapies: Experimental Studies, History, and Prospects. *Stem Cells International*, 2018, 4837930. <https://doi.org/10.1155/2018/4837930>
- Portela-Lomba, M., Simón, D., Russo, C., Sierra, J., & Moreno-Flores, M. T. (2020). Coculture of Axotomized Rat Retinal Ganglion Neurons with Olfactory Ensheathing Glia, as an In Vitro Model of Adult Axonal Regeneration. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 165. <https://doi.org/10.3791/61863>
- Portmann-Lanz, C. B., Schoeberlein, A., Huber, A., Sager, R., Malek, A., Holzgreve, W., & Surbek, D. V. (2006). Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 194(3), 664-673. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2006.01.101>
- Portmann-Lanz, C. B., Schoeberlein, A., Portmann, R., Mohr, S., Rollini, P., Sager, R., & Surbek, D. V. (2010). Turning placenta into brain: Placental mesenchymal stem cells differentiate into neurons and oligodendrocytes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 202(3), 294.e1-294.e11. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2009.10.893>
- Pramanik, S., Sulistio, Y. A., & Heese, K. (2017). Neurotrophin Signaling and Stem Cells- Implications for Neurodegenerative Diseases and Stem Cell Therapy. *Molecular Neurobiology*, 54(9), 7401-7459. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0214-7>
- Pratama, G., Vaghjiani, V., Tee, J. Y., Liu, Y. H., Chan, J., Tan, C., Murthi, P., Gargett, C., & Manuelpillai, U. (2011). Changes in Culture Expanded Human Amniotic Epithelial Cells: Implications for Potential Therapeutic Applications. *PLoS ONE*, 6(11), e26136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026136>
- Pulido-Escribano, V., Torrecillas-Baena, B., Camacho-Cardenosa, M., Dorado, G., Gálvez-Moreno, M. Á., & Casado-Díaz, A. (2022). Role of hypoxia preconditioning in therapeutic potential of mesenchymal stem-cell-derived extracellular vesicles.

BIBLIOGRAFÍA

- World Journal of Stem Cells*, 14(7), 453-472.
<https://doi.org/10.4252/wjsc.v14.i7.453>
- Ramon y Cajal, S. (1928). *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*, translated by MAY, R.M. Oxford University Press.
- Ren, H., Cao, Y., Zhao, Q., Li, J., Zhou, C., Liao, L., Jia, M., Zhao, Q., Cai, H., Han, Z. C., Yang, R., Chen, G., & Zhao, R. C. (2006). Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347(1), 12-21.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.169>
- Romanov, Y. A., Svintsitskaya, V. A., & Smirnov, V. N. (2003). Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: Candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 21(1), 105-110.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.21-1-105>
- Rosová, I., Dao, M., Capoccia, B., Link, D., & Nolta, J. A. (2008). Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(8), 2173-2182.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1104>
- Roubelakis, M. G., Trohatou, O., & Anagnou, N. P. (2012). Amniotic fluid and amniotic membrane stem cells: Marker discovery. *Stem Cells International*, 2012, 107836.
<https://doi.org/10.1155/2012/107836>
- Sakuragawa, N., Kakinuma, K., Kikuchi, A., Okano, H., Uchida, S., Kamo, I., Kobayashi, M., & Yokoyama, Y. (2004). Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. *Journal of Neuroscience Research*, 78(2), 208-214. <https://doi.org/10.1002/jnr.20257>
- Salehinejad, P., Moshrefi, M., & Eslaminejad, T. (2020). An Overview on Mesenchymal Stem Cells Derived from Extraembryonic Tissues: Supplement Sources and Isolation Methods. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 13, 57-65. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S248519>
- Samal, J. R. K., Rangasami, V. K., Samanta, S., Varghese, O. P., & Oommen, O. P. (2021). Discrepancies on the Role of Oxygen Gradient and Culture Condition on Mesenchymal Stem Cell Fate. *Advanced Healthcare Materials*, 10(6), e2002058.
<https://doi.org/10.1002/adhm.202002058>

- Sánchez-Migallón, M. C., Nadal-Nicolás, F. M., Jiménez-López, M., Sobrado-Calvo, P., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2011). Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal ganglion cells. *Experimental Eye Research*, *92*(4), 260-267. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.02.001>
- Sanes, J. R., & Masland, R. H. (2015). The types of retinal ganglion cells: Current status and implications for neuronal classification. *Annual Review of Neuroscience*, *38*, 221-246. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-034120>
- Seong, H.-R., Noh, C. H., Park, S., Cho, S., Hong, S.-J., Lee, A.-Y., Geum, D., Hong, S.-C., Park, D., Kim, T. M., Choi, E.-K., & Kim, Y.-B. (2023). Intraocular Pressure-Lowering and Retina-Protective Effects of Exosome-Rich Conditioned Media from Human Amniotic Membrane Stem Cells in a Rat Model of Glaucoma. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(9), 8073. <https://doi.org/10.3390/ijms24098073>
- Shammaa, R., El-Kadiry, A. E.-H., Abusarah, J., & Rafei, M. (2020). Mesenchymal Stem Cells Beyond Regenerative Medicine. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 72. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00072>
- Silini, A. R., Di Pietro, R., Lang-Olip, I., Alviano, F., Banerjee, A., Basile, M., Borutinskaite, V., Eissner, G., Gellhaus, A., Giebel, B., Huang, Y.-C., Janev, A., Kreft, M. E., Kupper, N., Abadía-Molina, A. C., Olivares, E. G., Pandolfi, A., Papait, A., Pozzobon, M., ... Parolini, O. (2020). Perinatal Derivatives: Where Do We Stand? A Roadmap of the Human Placenta and Consensus for Tissue and Cell Nomenclature. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 610544. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.610544>
- Soncini, M., Vertua, E., Gibelli, L., Zorzi, F., Denegri, M., Albertini, A., Wengler, G. S., & Parolini, O. (2007). Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *1*(4), 296-305. <https://doi.org/10.1002/term.40>
- Sonigra, R. J., Brighton, P. C., Jacoby, J., Hall, S., & Wigley, C. B. (1999). Adult rat olfactory nerve ensheathing cells are effective promoters of adult central nervous system neurite outgrowth in coculture. *Glia*, *25*(3), 256-269. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1136\(19990201\)25:3<256::aid-glia6>3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1136(19990201)25:3<256::aid-glia6>3.0.co;2-y)

BIBLIOGRAFÍA

- Staff, N. P., Jones, D. T., & Singer, W. (2019). Mesenchymal Stromal Cell Therapies for Neurodegenerative Diseases. *Mayo Clinic Proceedings*, *94*(5), 892-905. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.001>
- Subramani, P., Kannaiyan, J., Rajabathar, J. R., Paulpandian, P., Kamatchi, R. K., Paulraj, B., Al-Lohedan, H. A., Arokiyaraj, S., & Veeramani, V. (2021). Isolation, Expansion, and Characterization of Placenta Originated Decidua Basalis-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *ACS Omega*, *6*(51), 35538-35547. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05022>
- Sun, W., Li, N., & He, S. (2002). Large-scale morphological survey of rat retinal ganglion cells. *Visual Neuroscience*, *19*(4), 483-493. <https://doi.org/10.1017/s0952523802194107>
- Sung, C.-H., & Chuang, J.-Z. (2010). The cell biology of vision. *The Journal of Cell Biology*, *190*(6), 953-963. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006020>
- Sung, H. J., Hong, S. C., Yoo, J. H., Oh, J. H., Shin, H. J., Choi, I. Y., Ahn, K. H., Kim, S. H., Park, Y., & Kim, B. S. (2010). Stemness evaluation of mesenchymal stem cells from placentas according to developmental stage: Comparison to those from adult bone marrow. *Journal of Korean Medical Science*, *25*(10), 1418-1426. <https://doi.org/10.3346/jkms.2010.25.10.1418>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, *131*(5), 861-872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663-676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takashima, Y., Era, T., Nakao, K., Kondo, S., Kasuga, M., Smith, A. G., & Nishikawa, S.-I. (2007). Neuroepithelial Cells Supply an Initial Transient Wave of MSC Differentiation. *Cell*, *129*(7), 1377-1388. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.028>
- Tamagawa, T., Ishiwata, I., Sato, K., & Nakamura, Y. (2009). Induced in vitro differentiation of pancreatic-like cells from human amnion-derived fibroblast-like cells. *Human Cell*, *22*(3), 55-63. <https://doi.org/10.1111/j.1749-0774.2009.00069.x>

- Tamagawa, T., Oi, S., Ishiwata, I., Ishikawa, H., & Nakamura, Y. (2007). Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro. *Human Cell*, *20*(3), 77-84. <https://doi.org/10.1111/j.1749-0774.2007.00032.x>
- Tan, F., Li, X., Wang, Z., Li, J., Shahzad, K., & Zheng, J. (2024). Clinical applications of stem cell-derived exosomes. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *9*(1), 17. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01704-0>
- Tan, H., Li, X., Huang, K., Luo, M., & Wang, L. (2022). Morphological and distributional properties of SMI-32 immunoreactive ganglion cells in the rat retina. *The Journal of Comparative Neurology*, *530*(8), 1276-1287. <https://doi.org/10.1002/cne.25275>
- Tarasiuk, O., Ballarini, E., Donzelli, E., Rodriguez-Menendez, V., Bossi, M., Cavaletti, G., & Scuteri, A. (2022). Making Connections: Mesenchymal Stem Cells Manifold Ways to Interact with Neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(10), 5791. <https://doi.org/10.3390/ijms23105791>
- Teoh, P. L., Mohd Akhir, H., Abdul Ajak, W., & Hiew, V. V. (2023). Human Mesenchymal Stromal Cells Derived from Perinatal Tissues: Sources, Characteristics and Isolation Methods. *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS*, *30*(2), 55-68. <https://doi.org/10.21315/mjms2023.30.2.5>
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*, *282*(5391), 1145-1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Thuret, S., Moon, L. D. F., & Gage, F. H. (2006). Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature Reviews. Neuroscience*, *7*(8), 628-643. <https://doi.org/10.1038/nrn1955>
- Toda, A., Okabe, M., Yoshida, T., & Nikaido, T. (2007). The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *Journal of Pharmacological Sciences*, *105*(3), 215-228. <https://doi.org/10.1254/jphs.cr0070034>
- Torre, P. de la, & Flores, A. I. (2020). Current Status and Future Prospects of Perinatal Stem Cells. *Genes*, *12*(1), 6. <https://doi.org/10.3390/genes12010006>

BIBLIOGRAFÍA

- Troyer, D. L., & Weiss, M. L. (2008). Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *26*(3), 591-599. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0439>
- Tsuji, H., Miyoshi, S., Ikegami, Y., Hida, N., Asada, H., Togashi, I., Suzuki, J., Satake, M., Nakamizo, H., Tanaka, M., Mori, T., Segawa, K., Nishiyama, N., Inoue, J., Makino, H., Miyado, K., Ogawa, S., Yoshimura, Y., & Umezawa, A. (2010). Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. *Circulation Research*, *106*(10), 1613-1623. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.205260>
- Umezawa, A., Hasegawa, A., Inoue, M., Tanuma-Takahashi, A., Kajiwara, K., Makino, H., Chikazawa, E., & Okamoto, A. (2019). Amnion-derived cells as a reliable resource for next-generation regenerative medicine. *Placenta*, *84*, 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.06.381>
- Varadarajan, S. G., Hunyara, J. L., Hamilton, N. R., Kolodkin, A. L., & Huberman, A. D. (2022). Central nervous system regeneration. *Cell*, *185*(1), 77-94. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.10.029>
- Vellasamy, S., Sandrasaigaran, P., Vidyadaran, S., George, E., & Ramasamy, R. (2012). Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells derived from human placenta tissue. *World Journal of Stem Cells*, *4*(6), 53-61. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v4.i6.53>
- Ventura Ferreira, M. S., Bienert, M., Müller, K., Rath, B., Goecke, T., Opländer, C., Braunschweig, T., Mela, P., Brümmendorf, T. H., Beier, F., & Neuss, S. (2018). Comprehensive characterization of chorionic villi-derived mesenchymal stromal cells from human placenta. *Stem Cell Research & Therapy*, *9*(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0757-1>
- Vidal-Sanz, M., Avilés-Trigueros, M., Whiteley, S. J. O., Sauv e, Y., & Lund, R. D. (2002). Reinnervation of the pretectum in adult rats by regenerated retinal ganglion cell axons: Anatomical and functional studies. *Progress in Brain Research*, *137*, 443-452. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(02\)37035-3](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(02)37035-3)
- Vidal-Sanz, M., Galindo-Romero, C., Valiente-Soriano, F. J., Nadal-Nicolás, F. M., Ortin-Martinez, A., Rovere, G., Salinas-Navarro, M., Lucas-Ruiz, F., Sanchez-Migallon, M. C., Sobrado-Calvo, P., Aviles-Trigueros, M., Villegas-Pérez, M. P., & Agudo-

- Barriuso, M. (2017). Shared and Differential Retinal Responses against Optic Nerve Injury and Ocular Hypertension. *Frontiers in Neuroscience*, *11*, 235. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00235>
- Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., Rasminsky, M., Bray, G. M., & Aguayo, A. J. (1993). Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats. *Journal of Neurobiology*, *24*(1), 23-36. <https://doi.org/10.1002/neu.480240103>
- Vodyanik, M. A., Yu, J., Zhang, X., Tian, S., Stewart, R., Thomson, J. A., & Slukvin, I. I. (2010). A mesoderm-derived precursor for mesenchymal stem and endothelial cells. *Cell Stem Cell*, *7*(6), 718-729. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.11.011>
- Volkman, R., & Offen, D. (2017). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells in Neurodegenerative Diseases. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *35*(8), 1867-1880. <https://doi.org/10.1002/stem.2651>
- Wakitani, S., Mera, H., Nakamura, N., & Gobbi, A. (2023). Review of Caplan (1991) on cell-based therapeutic technology using Mesenchymal Stem Cells. *Journal of ISAKOS: Joint Disorders & Orthopaedic Sports Medicine*, *S2059-7754*(23)00554-0. <https://doi.org/10.1016/j.jisako.2023.08.010>
- Wang, A., Brown, E. G., Lankford, L., Keller, B. A., Pivetti, C. D., Sitkin, N. A., Beattie, M. S., Bresnahan, J. C., & Farmer, D. L. (2015). Placental mesenchymal stromal cells rescue ambulation in ovine myelomeningocele. *Stem Cells Translational Medicine*, *4*(6), 659-669. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0296>
- Wang, Q., Li, Y., Yuan, H., Peng, L., Dai, Z., Sun, Y., Liu, R., Li, W., Li, J., & Zhu, C. (2024). Hypoxia preconditioning of human amniotic mesenchymal stem cells enhances proliferation and migration and promotes their homing via the HGF/C-MET signaling axis to augment the repair of acute liver failure. *Tissue & Cell*, *87*, 102326. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2024.102326>
- Wei, J. P., Nawata, M., Wakitani, S., Kametani, K., Ota, M., Toda, A., Konishi, I., Ebara, S., & Nikaido, T. (2009). Human amniotic mesenchymal cells differentiate into chondrocytes. *Cloning and Stem Cells*, *11*(1), 19-26. <https://doi.org/10.1089/clo.2008.0027>
- Wigley, C. B., & Berry, M. (1988). Regeneration of adult rat retinal ganglion cell processes in monolayer culture: Comparisons between cultures of adult and neonatal neurons. *Brain Research*, *470*(1), 85-98. <https://doi.org/10.1016/0165->

BIBLIOGRAFÍA

3806(88)90204-0

- Wolbank, S., Peterbauer, A., Fahrner, M., Hennerbichler, S., van Griensven, M., Stadler, G., Redl, H., & Gabriel, C. (2007). Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: A comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Engineering*, *13*(6), 1173-1183. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0313>
- Wolbank, S., van Griensven, M., Grillari-Voglauer, R., & Peterbauer-Scherb, A. (2010). Alternative sources of adult stem cells: Human amniotic membrane. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, *123*, 1-27. https://doi.org/10.1007/10_2010_71
- Yu, S.-C., Xu, Y.-Y., Li, Y., Xu, B., Sun, Q., Li, F., & Zhang, X.-G. (2015). Construction of tissue engineered skin with human amniotic mesenchymal stem cells and human amniotic epithelial cells. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *19*(23), 4627-4635.
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*, *10*(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>
- Zeng, H.-L., Zhong, Q., Qin, Y.-L., Bu, Q.-Q., Han, X.-A., Jia, H.-T., & Liu, H.-W. (2011). Hypoxia-mimetic agents inhibit proliferation and alter the morphology of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *BMC Cell Biology*, *12*, 32. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-12-32>
- Zhang, D., Yan, K., Zhou, J., Xu, T., Xu, M., Lin, J., Bai, J., Ge, G., Hu, D., Si, W., Hao, Y., & Geng, D. (2019). Myogenic differentiation of human amniotic mesenchymal cells and its tissue repair capacity on volumetric muscle loss. *Journal of Tissue Engineering*, *10*, 2041731419887100. <https://doi.org/10.1177/2041731419887100>
- Zhang, M., & Augustine, G. J. (2021). Synapsins and the Synaptic Vesicle Reserve Pool: Floats or Anchors? *Cells*, *10*(3), 658. <https://doi.org/10.3390/cells10030658>
- Zhang, Y., Ma, L., Su, Y., Su, L., Lan, X., Wu, D., Han, S., Li, J., Kvederis, L., Corey, S., Borlongan, C. V., & Ji, X. (2019). Hypoxia conditioning enhances neuroprotective effects of aged human bone marrow mesenchymal stem cell-derived conditioned medium against cerebral ischemia in vitro. *Brain Research*, *1725*, 146432. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146432>

- Zhang, Y., Zheng, Z., Sun, J., Xu, S., Wei, Y., Ding, X., & Ding, G. (2024). The application of mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic brain injury: Mechanisms, results, and problems. *Histology and Histopathology*, 18716. <https://doi.org/10.14670/HH-18-716>
- Zhao, P., Ise, H., Hongo, M., Ota, M., Konishi, I., & Nikaido, T. (2005). Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation*, 79(5), 528-535. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000149503.92433.39>
- Zhou, H.-L., Fang, H., Luo, H.-T., Ye, M.-H., Yu, G.-Y., Zhang, Y., Mao, G.-H., Gao, Z.-Y., Cheng, Z.-J., & Zhu, X.-G. (2020). Intravenous administration of human amniotic mesenchymal stem cells improves outcomes in rats with acute traumatic spinal cord injury. *Neuroreport*, 31(10), 730-736. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001473>
- Zipori, D. (2005). The stem state: Plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 23(6), 719-726. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0030>

ANEXOS

8 ANEXOS

ANEXO I. Descripción de las MSC aisladas de la placenta humana

	Fuente	Morfología	Marcadores de superficie	Marcadores de células embrionarias	Diferenciación	Métodos de aislamiento	Comentarios	Patologías/ Aplicaciones	Referencias
Tejido fetal	Fluido amniótico (hAF)	Tipo AF: cuboidales-epiteliales, forma huso (hAF-MSC)	CD44+, CD29+, CD90+, CD105+(baja), CD166+, CD49e+, CD44+, HLA-I+	OCT4+, NANOG+, SSEA4+, TRA-1-60+, TRA-1-81	Osteogénesis, adipogénesis y neurogénesis (condrogénesis, fases iniciales)	Amniocentesis o punción de membranas fetales en cesáreas	No forman teratomas <i>in vivo</i> . Mayor capacidad de proliferación y espectro de diferenciación más amplio que MSC adultas	Cardiovasculares, gastrointestinales, hematopoyéticas, musculoesqueléticas, neurológicas, respiratorias, oftalmológicas y urinarias	(Roubelakis et al., 2012; Silini et al., 2020; Torre & Flores, 2020; Teoh et al., 2023)
			CD34-, CD45-, CD31-, HLA-II-						
	Vellosidades coriónicas (hCV-MSC)	No típica fibroblástica	CD44+, CD73+, CD105+, CD90+, CD49e+, CD146+, CD166+, CD106+, HLA-I	OCT4+*, NANOG+*, SOX2+	Osteogénesis, adipogénesis, condrogénesis, hepatogénesis y neurogénesis	Por digestión (colagenasas) y explante	Alta capacidad proliferativa. Posible contaminación materna	Ingeniería de tejido cartilaginoso y modelo <i>in vitro</i> de cáncer de mama; modelos <i>in vivo</i> espina bífida (Myelomeningocele); modelo <i>in vivo</i> de Parkinson, diabetes, cardíacas	(Portmann-Lanz et al., 2006; Abomaray et al., 2015; Wang et al., 2015; Ventura Ferreira et al., 2018)
		CD34-, CD45-, CD19-, CD40-, CD80-, CD83-, CD86-, HLA-II-							

Tejido fetal	Subendotelio de la vena y arterias de cordón umbilical (hUCVEC-MSc)	Fibroblástica	CD29+, CD13+, CD44+, CD49e+, CD54+, CD90+, fibronectina+, VCAM-1+, HLA-I+		Adipogénesis, osteogénesis	Explante o digestión enzimática (colagenasas)	MSC y células endoteliales. Muy baja frecuencia de aislamiento	Diabetes, aterosclerosis, modelo de ratón de contusión de médula espinal	(Covas et al., 2003; Salehinejad et al., 2020; Pethe & Kale, 2021)
			CD14-, CD45-, CD106-, CD61-, CD49d-, vWF-, PECAM-, HLA-II-						
	Membrana de recubrimiento del cordón umbilical					Explante, digestión enzimática (colagenasas, hialuronidasa, tripsina)	MSC y células epiteliales		(Romanov et al., 2003; Lindenmair et al., 2012; Salehinejad et al., 2020)
	Sangre de cordón umbilical (hUC-MSc) (no HSCs)	Fibroblástica	CD29+, CD146+, CD73+, CD166+, CD90+, CD177+, CD105+, CD44+, CD13+, HLA-I		Osteogénesis, adipogénesis* y condrogénesis, hepática y neural	Drenaje o aspiración <i>in utero</i> o <i>ex utero</i>	Mayor potencial proliferativo que BM-MSc. Número reducido	Lesión de médula espinal	(Lee et al., 2004; Hong et al., 2005; Salehinejad et al., 2020)
			CD3-, CD7-, CD19-, CD117-, CD133-, CD31-, CD34-, CD45-, CD14-, CD106-, HLA-II						

Tejido fetal	Gelatina de Wharton (hWJ-MSC)	Resultados contradictorios: subpoblaciones con morfología diferente. Homogénea con morfología fibroblástica	CD10+, CD13+, CD29+, CD44+, CD73+, CD90+, CD105+, HLA-I+	OCT4+, NANOG+, SOX2+, KLF4+, SSEA-1+, SSEA-4+, TRA-1-60+, TRA-1-81+	Mesodérmica, endodérmica y ectodérmica	Explante o digestión enzimática (colagenasas, hialuronidasa, tripsina)	Alta capacidad proliferativa y de auto-renovación. Alta expresión de telomerasa	Autoinmunes, pulmonares, cardiovasculares, hepáticas, musculoesqueléticas, diabetes y neurodegenerativas (lesión médula espinal)	(Troyer & Weiss, 2008; Musiał-Wysocka, Kot, Sułkowski, et al., 2019)
			CD11-, CD14-, CD19-, CD31-, CD38-, CD45-, CD40-, CD80-, CD86-, HLA-II-						
Células mesenquimales estromales de amnion (hAMSC)	Fibroblástica	CD90+, CD44+, CD73+, CD29+, CD13+, CD105+, CD166+, CD49e, CD10+, CD55+, CD59+, vimentina+, HLA-I+	SSEA-3+, SSEA-4+, OCT-4+, REX-1+, GATA-4+, Stro-1+, fosfatasa alcalina+*	TRA-1-60-, TERT-	Mesodérmica, endodérmica y ectodérmica	Digestión enzimática (tripsina+colagenasa o colagenasa/DNAsa)		Pulmonares, muscoesqueléticas, hepáticas (fallo hepático, cirrosis)	(Kim et al., 2007; Soncini et al., 2007; Mihu et al., 2009; Chang et al., 2010; Díaz-Prado et al., 2010; Portmann-Lanz et al., 2010; Roubelakis et al., 2012; Umezawa et al., 2019)
			CD14-, CD34-, CD45-, CD117-*, VCAM-1-, ICAM-1-*, PECAM-1-, BMP2-, FGF5-, Pax-6-, HLA-II-						

Tejido fetal	Células mesenquimales estromales de corion (hCMSC)	Fibroblástica	CD90+, CD73+, CD29+, CD13+, CD105+, CD54+, CD44+, CD166+, HLA-I+	OCT4+, GATA-4+, STAT-3+, NANOG+, TRA-1-60+	Mesodérmica, endodérmica y ectodérmica	Digestión enzimática (dispasa+colagenasa o colagenasa/DNAsa) y/o explante	Población homogénea de células de menor tamaño que otras MSC perinatales. Alta expresión de HFG	Como andamiajes en cicatrización, quemaduras, óseas y vasculares, pulmonares	(Portmann-Lanz et al., 2006; Soncini et al., 2007; Nazarov et al., 2012; Araújo et al., 2017)
			CD45-, CD34-, CD3-, CD31-, HLA-II-						
Tejido fetal	Células mesenquimales de plato coriónico (hCP-MSc)	Fibroblástica	CD90+, CD73+, CD105+, CD166+, CD54+, CD106+, CDCD44+, HLA-I+	OCT4+, NANOG+, SOX2+	Osteogénesis, adipogénesis, condrogénesis y hepatogénesis		Mayor capacidad proliferativa, migratoria e inmunomoduladora que otras MSC perinatales	Hepáticas, neurológicas y genitales	(Sung et al., 2010; Kim et al., 2011)
			CD45-, CD34-, CD14-, CD19-, HLA-II-						
Tejido materno	Decidua basalis y parietalis (hDB-MSc y hDP-MSc)	Fibroblástica	CD44+, CD90+, CD105+, CD117+, CD73+, CD29+, CD13+, CD146+, CD166+, HLA_I+	OCT4+, REX-1, GATA-4	Mesodérmica, endodérmica y ectodérmica	Explante y digestión enzimática	Las MSC de origen materno presentan mayor vida útil que las de origen fetal. Mayor capacidad proliferativa que hBM-MSc. Mayor potencial inmunosupresivo que hWJ-MSc	Cáncer de mama, esclerosis múltiple, diabetes, preeclampsia, daño en médula espinal, accidente isquémico	(Huang et al., 2009; Araújo et al., 2017; Subramani et al., 2021)
			CD34-, CD14-, CD133-, CD45-, CD31-, CD19-, STRO-1, CD40-, CD80-, CD83-, CD86-, HLA-II-						

*Controversia en bibliografía

ANEXO II. Descripción de las células del epitelio amniótico (hAEC) y del fluido amniótico (hAF) humanos

Fluido amniótico (hAF)	Tipo F: fibroblástica (hAFSCs)	CD44+, CD29+, CD90+, CD105+, CD73+, CD146+, CD166+, HLA-I+	OCT4+, SSEA4+, NANOG+*, SSEA-3+*, TRA-1-60+* y TRA-1-81+* (solo detectadas en primer trimestre)	Mesodérmica, endodérmica y ectodérmica	Amniocentesis o punción de membranas fetales en cesáreas y/o selección por CD117	No forman teratomas <i>in vivo</i> . Mayor capacidad de proliferación y espectro de diferenciación más amplio que MSC adultas	Cardiovasculares, gastrointestinales, hematopoyéticas, musculoesqueléticas, neurológicas, respiratorias, oftalmológicas y urinarias	(In 't Anker et al., 2003)
Células del epitelio amniótico (hAEC)	Poligonal	CD34-, CD45-, CD31-, HLA-II-	SSEA-3+, SSEA-4+, TRA-1-60+, TRA-1-81+, NANOG+, SOX-2+, OCT-4+, Rex-1+	Mesodérmica, endodérmica y ectodérmica	Digestión enzimática (tripsina)		Pulmonares, oculares, hepáticas, auditivas, cardiovasculares, musculoesquelético (esclerosis múltiple), neurológicas (Parkinson, daño médula ósea, ictus)	(Miki et al., 2005; Portmann-Lanz et al., 2006; Ilancheran et al., 2007; Toda et al., 2007; Chen et al., 2009b; Izumi et al., 2009; Díaz-Prado et al., 2010; Wolbank et al., 2010; Roubelakis et al., 2012; Koike et al., 2014; Centurione et al., 2018; Miki, 2018)
		CD44+, CD29+, CD90+, CD105+, CD73+, CD146+, CD166+, HLA-I+	OCT4+, SSEA4+, NANOG+*, SSEA-3+*, TRA-1-60+* y TRA-1-81+* (solo detectadas en primer trimestre)	Mesodérmica, endodérmica y ectodérmica	Amniocentesis o punción de membranas fetales en cesáreas y/o selección por CD117			

