

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA GENÉTICA**



TITULO:

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MIELINIZANTE DEL COCULTIVO DE NEURONAS Y CÉLULAS DE SCHWANN DIFERENCIADAS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE TEJIDO ADIPOSEO HUMANO UTILIZANDO COMO ANDAMIO DE NERVIOS PERIFÉRICOS DESCELULARIZADOS.

PRESENTADO POR:

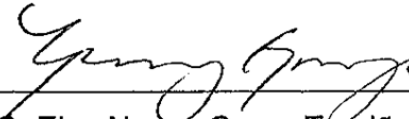
I.B.Q. JUAN ANTONIO ROJAS MURILLO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

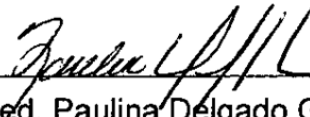
Monterrey N.L. junio 2021

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MIELINIZANTE DEL COCULTIVO DE NEURONAS Y CÉLULAS DE SCHWANN DIFERENCIADAS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO UTILIZANDO COMO ANDAMIO DE NERVIÓ PERIFÉRICO DESCELULARIZADO.

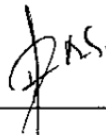
Aprobación de tesis:



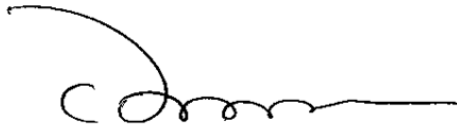
Dra. C. Elsa Nancy Garza Treviño.
Directora de Tesis



Dra. med. Paulina Delgado González.
Codirectora de Tesis



Dr. C. Daniel Arellanos Soto.
Miembro de la comisión de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez.
Subdirector de Estudios de Posgrado

Esta investigación se llevó a cabo en la **Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Facultad de Medicina y Hospital Universitario “José Eleuterio González”, Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.**

Bajo la dirección de:

- Dra. Elsa Nancy Garza Treviño.
Directora
- Dra. Paulina Delgado González.
Codirectora
- Dr. Daniel Arellanos Soto.
Miembro de la comisión

Con la colaboración de las siguientes dependencias:

- **Departamento de Histología.**
- **Departamento de anatomía.**
- **Departamento de fisiología.**
- **Hospital militar regional de especialidades.**

Colaboradores:

- | | |
|--|--|
| • Dr. José Francisco Islas Cisneros.
Departamento de Bioquímica. | • Dr. Alejandro Quiroga Garza.
Departamento de anatomía. |
| • Dr. Alberto Camacho Morales.
Departamento de Bioquímica. | • Dra. Nancy Estela Fernández Garza.
Departamento de fisiología. |
| • Dr. Adolfo Soto Domínguez.
Departamento de Histología. | • M.V.Z. Gilberto Arévalo Martínez.
Departamento de fisiología. |
| • Dr. Humberto Rodríguez Rocha.
Departamento de Histología. | • M.C. Adriana Quiroz Reyes.
Laboratorio de terapia celular. |
| • Dra. Karla Judith González Colunga.
Hospital militar regional de especialidades. | • Med. Pablo Alfonso Carriquiry Chequer.
Laboratorio de terapia celular. |

*“He oído decir, que **las personas entran a nuestras vidas por una razón:**
Traernos algo que debemos aprender.
Por eso somos llevados a aquellos que más **nos ayudan a crecer,**
y si se los permitimos, los ayudamos a cambio.”*
Bien, yo no sé si creo que eso es verdad.
Pero sé que soy quien soy hoy, porque te conocí.
Y aunque nunca nos volvamos a encontrar en esta vida
siempre estarás conmigo como una **huella en mi corazón**
porque mucho de mí este hecho de lo que aprendí de ti.
Sin embargo ¿Quién puede decir que cambie para bien?
Bien, **porque te conocí,** sé que **he cambiado para bien.**

Traducido y modificado de “For Good”, Stephen Lawrence Schwartz



AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado para el desarrollo de mi proyecto de investigación y tesis con mi beca de posgrado.

A mi comisión de tesis por guiarme durante este proyecto y darme las herramientas necesarias para concluir satisfactoriamente con mi posgrado.

A mi directora de tesis la Dra. Elsa Nancy Garza Treviño, por guiarme durante todo este proceso de aprendizaje que no fue nada fácil, por enseñarme a que con poco se puede hacer mucho y que cuando se quiere se puede y no hay limitaciones, por creer en mí e impulsarme a continuar.

A la Dra. Paulina Delgado González, que además de preocuparse por mi desempeño como tesista se preocupaba por el lado personal, por cómo me sentía y si estaba a gusto.

Al Dr. Daniel Arellanos Soto por ser paciente y revisarme mi tesis con muy poco tiempo de antelación y en tiempo record.

Al Dr. Francisco Islas y al Dr. Alberto Camacho, por facilitarme material y reactivos fundamentales para el desarrollo de mi tesis.

A mis profesores de posgrado del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, que me enseñaron conocimientos, puntos de vista y a siempre ver más allá de las cosas, a todo el personal administrativo, en especial a Ary por aguantar mis ocurrencias cada que iba por alguna duda o asunto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Quiero agradecer primeramente a Dios por permitirme cumplir otra de mis metas, por bendecirme a cada paso de mi vida a pesar de que actualmente mi relación con él no es buena, por cuidarme siempre y mandarme a nacer en una familia a la que amo.

A mis Padres que aun siendo adulto me apoyan incondicionalmente, por darme mucho más de lo que necesitaba siempre, porque mucho de lo que soy se los debo a ellos y cada uno de mis logros, son de ellos también, por darme el mejor ejemplo de cómo quiero ser cuando sea Papá, no hay en el universo una cifra tan grande para describir mi amor por ustedes, son lo mejor que la vida me pudo dar.

A mis hermanos (y sus familias), Chita, Danny y Jorge por toda una vida con ustedes y por hacerme obligarme a mí mismo a ser mejor en lo que hago, por ayudarme cada vez que lo necesité, por confiar en mí y por agrandar mi familia con nuevos seres a los que amo muchísimo, los amo incondicionalmente con todo el amor que existe en el universo y más.

A mi Abuelita Manuela en el cielo y mi familia de parte materna, por su apoyo, elogios ejemplos y amor, Por ver en mí una mejor versión de la que soy, ponerme como ejemplo y hacerme querer y ser como “Esa versión” que ellos ven en mí y a mis padrinos Toño y Mary por siempre ir a visitarme a cualquier lugar donde me encuentre.

A mi familia de parte paterna, por darme los mejores ejemplos de cómo una persona debe ser, por enseñarme valores, humildad y el sentido de la familia, que aunque no se vean muy seguido siempre se tratan como si siempre se vieran, con el mismo amor, cariño y felicidad.

Quiero agradecer a mi Tía Lila (Dra. Maurilia Rojas) por darme, desde niño, un ejemplo de lo que quería ser de grande, profesionalmente hablando, por siempre motivarme a seguir estudiando, soñar en grande y cumplir mis sueños, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme experimentar, aprender, perfeccionar y reafirmar conocimientos.

A todos y cada uno de mis amigos, de la iglesia, de la escuela, de la vida, por su compañía, crecimiento, complicidad, peleas, discusiones, consejos, momentos vividos y más... Por estar ahí para mí.

A la familia Vázquez Juárez, por abrirme los brazos y cuidarme cuando llegue a Monterrey, especialmente a Juany que a pesar de que hace un año y medio que ya no vivo con ellos aún sigue pendiente de mí.

A mis compañeras de maestría que aunque en ocasiones no nos llevábamos muy bien y nuestras opiniones chocaban hicieron ligeramente más llevadera mi duración en el programa de maestría, y a Toño que de verdad se convirtió en mi amigo y cómplice en la cata de comida.

A mis compañeros-amigos del Departamento de Bioquímica, Adriana, con quien más conviví durante mi maestría, a Elda por siempre tener una plática interesante que duraban horas, y recientemente a Pablo que se incorporó al laboratorio y rápidamente se volvió mi amigo.

A Heriberto por ser mi amigo y aguantarme casi desde que llegue a Mty.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Sistema Nervioso	1
1.1.1. Neuronas	2
1.1.2. Papel de las células mielinizantes en el sistema nervioso	3
1.1.2.1. Oligodendrocitos.....	4
1.1.2.2. Células de Schwann	4
1.2. Enfermedades desmielinizantes	6
1.2.1. Lesión de Medula Espinal (LME).....	6
1.3. Enfoques terapéuticos para el tratamiento de LME.....	9
1.3.1. Terapias con enfoque Quirúrgico	9
1.3.2. Terapias con enfoque Farmacológico	10
1.3.3. Terapias con enfoque Físico.....	11
1.3.4. Terapias con enfoque Biológico	11
1.3.4.1. Terapia celular como tratamiento de LME.....	12
1.3.5. Uso de biomateriales como soporte celular	13
1.3.5.1. Aplicación clínica de estrategias combinatorias.....	15
2. ANTECEDENTES	18
2.1. Antecedentes directos.....	18
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS.....	21
5.1. Objetivo general.....	21
5.2. Objetivos específicos.....	21
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	22
7. METODOLOGÍA.....	23
7.1. Obtención de las células	23
7.1.1. Aislamiento de CMM-TAh.....	23
7.1.2. Cultivo y expansión de CMM-TAh.....	23

7.1.3.	Caracterización inmunocitoquímica de CMM-Tah	24
7.2.	Diferenciación de CMM-TAh	25
7.2.1.	Diferenciación de CMM-TAh a Neuronas	25
7.2.1.1.	Caracterización inmunocitoquímica de neuronas diferenciadas	25
7.2.2.	Diferenciación de CMM-TAh a Células de Schwan	25
7.2.2.1.	Caracterización inmunocitoquímica de células de Schwann diferenciadas	26
7.3.	Determinación de la concentración citotóxica 50 del complejo B	26
7.4.	Determinación del medio óptimo de cocultivo	26
7.5.	Transducción de neuronas con Mcherry-GFP	27
7.6.	Generación del andamio de nervio ciático	27
7.6.1.	Descelularización del nervio ciático de rata	27
7.6.2.	Pruebas histológicas	28
7.6.2.1.	Técnica histológica	28
7.6.2.2.	Tinción de Hematoxilina y Eosina (HyE)	28
7.6.2.3.	Tinción de fluorescencia (DAPI)	29
7.6.2.4.	Tinción inmunohistoquímica	29
7.7.	Cocultivo en andamio desceldularizado	29
7.8.	Análisis del andamio receldularizado	30
7.9.	Análisis estadístico	30
8.	RESULTADOS	31
8.1.	Aislamiento, caracterización y diferenciación de CMM-TAh mediante factores de crecimiento en poblaciones de células de Schwann y neuronas.	31
8.1.1.	Aislamiento y caracterización de CMM-TAh	31
8.1.2.	Diferenciación de CMM-TAh a Células de Schwann y caracterización inmunocitoquímica de las células diferenciadas	31
8.1.3.	Diferenciación de CMM-TAh a Neuronas y caracterización de las células diferenciadas	34
8.2.	Determinación de la actividad mielinizante del cocultivo de neuronas y células de Schwann, sobre un andamio desceldularizado de nervio periférico	36
8.2.1.	Generación y caracterización inmunocitoquímica del andamio de nervio ciático de rata	36
8.2.2.	Transducción lentiviral de neuronas	36
8.2.3.	Determinación de la concentración media citotóxica 50 del complejo B	38
8.2.4.	Cocultivo 2D de Neuronas-Células de Schwann	39

8.2.5. Cocutivo en andamio	43
9. DISCUSIÓN.....	48
10. CONCLUSIONES.....	56
11. PERSPECTIVAS.....	57
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fuentes de obtención de diferentes linajes celulares utilizados en las estrategias terapéuticas basadas en células.	13
Figura 2: Estrategia Experimental	22
Figura 3: Aislamiento y caracterización de CMM-TAh	32
Figura 4: Diferenciación de CMM-TAh a Células de Schwann y caracterización inmunocitoquímica.	33
Figura 5: Diferenciación de CMM-TAh a Neuronas y caracterización inmunocitoquímica	35
Figura 6: Descelularización y caracterización del andamio de nervio periférico	37
Figura 7: Imágenes de microscopia de fluorescencia de las neuronas transducidas con GFP/mCherry	38
Figura 8: Curva de muerte celular por complejo B.	38
Figura 9: Caracterización de células de Schwann en cocultivo en 2D	40
Figura 10: Caracterización de neuronas en cocultivo en 2D.	41
Figura 11: Caracterización de la producción de mielina en cocultivo en 2D	42
Figura 12:	43
Figura 13: Pruebas de recelularización del andamio	44
Figura 14: Caracterización de la producción de mielina del cocultivo en andamio.	45
Figura 15: Niveles de mielina en el andamio	46
Figura 16: Comparación del cocultivo de Células de Schwann y Neuronas contra el cocultivo de oligodendrocitos + Neuronas.	47

ABREVIATURAS

SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
LME	Lesión de médula espinal
PLP	Proteína proteolipídica
PBM	Proteína básica de mielina
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
PLGA	Acido poli lactico-co-glicolitico
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
CMM	Células madre mesenquimales
CMM-TAh	Células madre mesenquimales de tejido adiposo humano
b-FGF	Factor de crecimiento básico derivado de fibroblastos
PDGF-AA	Factor de crecimiento derivado de plaquetas recombinante-AA
HRG	Heregulina
ATRA	Ácido transretinoico
µg	Microgramo
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mm	milímetro
µm	Micrómetro
h	Hora
min	Minuto
seg	Segundo
rpm	Revoluciones por minuto
cm ²	Centímetros cuadrados
cm ³	Centímetros cúbicos
CO ₂	Dióxido de carbono
SFB	Suero fetal bovino
°C	Grado centígrado

RESUMEN

I.B.Q. Juan Antonio Rojas Murillo.

Título: “Evaluación de la actividad mielinizante del cocultivo de neuronas y células de Schwann diferenciadas a partir de células madre mesenquimales de tejido adiposo humano utilizando como andamio de nervio periférico descelularizado”.

INTRODUCCIÓN: La lesión de la médula espinal (LME) es un problema clínico que produce alteraciones de la función sensorial, motora o autónoma normal y, en última instancia, hasta la afección de la respiración, la micción y la digestión, lo cual pone en riesgo la vida de los pacientes. Algunos enfoques terapéuticos para LME son la terapia regenerativa, como terapias basadas en células, ingeniería de tejidos, ya sea a través de remielinización y/o brotación axonal para establecer conectividad neuronal y lograr la recuperación funcional. Actualmente se estudia el potencial terapéutico que tienen las células de Schwann y los oligodendrocitos para remielinizar los axones desprotegidos en la LME aguda y que puedan restablecer las conexiones neuronales dentro de la lesión. **OBJETIVO:** Evaluar el cocultivo de células de Schwann y neuronas derivadas de células madre mesenquimales de tejido adiposo humano (CMM-TAh) y factores de crecimiento en un nervio periférico descelularizado, y comparar su potencial mielinizante contra el cocultivo de neuronas y oligodendrocitos. **METODOLOGÍA:** Se obtuvieron CMM-TAh y posteriormente se diferenciaron por medio de medios de cultivo enriquecidos a poblaciones de neuronas y células de Schwann, se caracterizaron inmunohistoquímicamente con los marcadores NF, S100, PBM y GFAP. Se obtuvo el andamio a partir de nervio ciático de rata y se descelularizó utilizando detergentes, se comprobó la descelularización y desmielinización utilizando tinción de H&E, DAPI e inmunotinción contra PBM. Se transdujeron lentiviralmente las neuronas con GFP/mCherry y se validó la transfección con fluorescencia. Se calculó la CC_{50} de complejo B para optimizar el medio de cocultivo y se realizó el cocultivo de neuronas y células de Schwann en ausencia y presencia de complejo B a los días 7 y 14, se caracterizó inmunohistoquímicamente contra PBM, S100 y NF para posteriormente realizar una prueba de t de Student. Se realizó el cocultivo en andamio a los días 3 y 7, se comprobó la recelularización del andamio y la detección de ambos linajes en andamio por medio de tinción H&E, DAPI y fluorescencia. Para determinar la mielina producida se realizó una inmunotinción contra PBM se realizó una prueba de T para ver diferencias entre los tratamientos y se comparó con los datos de cocultivo de oligodendrocitos y neuronas. **RESULTADOS:** Se obtuvieron diferencias significativas entre el control y el tratamiento con complejo B en cuanto a la diferenciación de las células de Schwann al día 14 de cocultivo en D y de producción de mielina al día 7 de cocultivo, sin embargo, en cuanto a la diferenciación de neuronas no se observaron diferencias significativas. En cuanto al cocultivo en andamio el tratamiento con complejo B presentó diferencias significativas al día 3 y 7, ya que alcanzaban casi el 50% de mielinización del control y al compararse con el cocultivo de neuronas y oligodendrocitos se observó que el tratamiento de cocultivo más complejo B mejora la mielinización del cocultivo de neuronas u oligodendrocitos aproximadamente 1.45 veces. **CONCLUSIÓN:** Se logró desarrollar un modelo *in vitro* para potenciar la mielinización mediante el cocultivo de neuronas y células de Schwann a base de un medio de cocultivo rico en factores de diferenciación y complejo B, encontrando un incremento de 4.15 veces más mielina que el cocultivo sin complejo B y 1.5 veces más mielina que el cocultivo de neuronas y oligodendrocitos, sin embargo, aún es necesario mejorar el modelo para lograr obtener un andamio recelularizado altamente funcional.

Dra. Elsa Nancy Garza Treviño
Directora de tesis

ABSTRACT

I.B.Q. Juan Antonio Rojas Murillo.

Title: "Evaluation of the myelinating activity of the coculture of neurons and Schwann cells differentiated from mesenchymal stem cells of human adipose tissue using decellularized peripheral nerve as scaffold".

INTRODUCTION: Spinal cord injury (SCI) is a clinical problem that produces alterations in normal sensory, motor or autonomic function and, ultimately, to the impairment of respiration, urination and digestion, which puts in risk the lives of patients. Some therapeutic approaches for SCI are regenerative therapy, such as cell-based therapies, tissue engineering, either through remyelination and / or axonal sprouting to establish neuronal connectivity and achieve functional recovery. The therapeutic potential of Schwann cells and oligodendrocytes is currently being studied to remyelinate unprotected axons in acute SCI and to restore neuronal connections within the lesion. **OBJECTIVE:** To evaluate the co-culture of Schwann cells and neurons derived from human adipose tissue mesenchymal stem cells and growth factors in a decellularized peripheral nerve, and to compare their myelinating potential against the co-culture of neurons and oligodendrocytes. **METHODOLOGY:** MSC-TAh were obtained from adipose tissue and subsequently differentiated by means of culture media enriched to populations of neurons and Schwann cells, they were characterized immunohistochemically with the markers NF, S100, PBM and GFAP. The scaffold was obtained from rat sciatic nerve and decellularized using detergents, decellularization and demyelination were verified using H&E staining, DAPI and immunostaining against PBM. Neurons were lentivirally transduced with GFP / mCherry and fluorescence transfection was validated. The CC50 of complex B was calculated to optimize the coculture medium and the coculture of neurons and Schwann cells was carried out in the absence and presence of complex B on days 7 and 14, it was characterized immunohistochemically against PBM, S100 and NF to subsequently perform a Student's t test. Scaffold coculture was performed on days 3 and 7, the recellularization of the scaffold and the detection of both scaffold lineages were verified by means of H&E, DAPI and fluorescence staining. To determine the myelin produced, an immunostaining against PBM was carried out, a T test was performed to see differences between the treatments and it was compared with the co-culture data of oligodendrocytes and neurons. **RESULTS:** Significant differences were obtained between the control and the treatment with complex B in terms of the differentiation of Schwann cells at day 14 of coculture in D and of myelin production at day 7 of coculture, however, in terms of the neuron differentiation, no significant differences were observed. Regarding the scaffold coculture, the treatment with complex B presented significant differences on day 3 and 7, since they reached almost 50% myelination of the control and when compared with the coculture of neurons and oligodendrocytes, it was observed that the more complex coculture treatment B improves myelination of neuron or oligodendrocyte coculture approximately 1.45 times. **CONCLUSION:** It was possible to develop an in vitro model to enhance the myelination of the coculture of neurons and Schwann cells based on a coculture medium rich in differentiation factors and complex B, which managed to improve the myelination of the cocultures of neurons and cells of Schwann approximately 4.15 times and from the coculture of neurons and oligodendrocytes 1.5 times, however, it is still necessary to polish the model to obtain a highly functional recellularized scaffold.

Dra. Elsa Nancy Garza Treviño
Directora de tesis

1. INTRODUCCIÓN

Las células pueden comunicarse entre sí, de modo que la recepción de un estímulo por una célula puede resultar en actividad móvil o secretora de otras células y en conjunto, en un organismo pluricelular, ejecutar una actividad concreta, sin embargo para que esto sea posible es necesario que las células sean capaces de transmitir dicho estímulo, así como una gran sincronización a la hora de recibir y transmitir dichos estímulos, ya que la sincronización de estas actividades influyen en las actividades vitales de las células.

Tales niveles de organización y sincronización celular necesitan de un sistema que se encargue de guiar dichos procesos, en los mamíferos un conjunto de células se encarga de regular tales procesos (como las neuronas y las células gliales), y ese conjunto de células forman el sistema nervioso.

1.1. Sistema Nervioso

En el humano, el sistema nervioso central (SNC) se encuentra formado por el encéfalo (cerebro, cerebelo y tronco encefálico) y la medula espinal, este último se encuentra ubicado en el conducto raquídeo, y se extiende desde el agujero occipital hasta la segunda vértebra lumbar (Nieuwenhuys, 2008). En este sistema los conjuntos de axones llamados nervios conectan el SNC con todas las partes del cuerpo. Estos nervios son los componentes más conspicuos del sistema nervioso periférico (SNP) (Kiernan & Rajakumar, 2014).

La medula espinal se compone de una capa gris central, la cual se encuentra rodeada por una cobertura o capa blanca. La capa gris es donde se encuentran los cuerpos celulares de las neuronas del SNC (Kiernan & Rajakumar, 2014), es una mezcla de células nerviosas y sus prolongaciones, neuroglia y vasos sanguíneos; en cambio la sustancia blanca es una región del tejido del SNC que contiene axones, pero no cuerpos de células neuronales. Consiste en una mezcla de fibras nerviosas, neuroglía y vasos sanguíneos que rodea la sustancia gris, su color blanco se debe a la proporción elevada de fibras nerviosas mielínicas (Chú Lee, Cuenca & López, 2015; Kiernan & Rajakumar, 2014).

1.1.1. Neuronas

Dentro del SNC existen células especializadas conocidas como neuronas o células nerviosas cuya función es transferir información rápidamente de una parte del cuerpo a otra. La neurona es la célula fundamental del sistema nervioso. El término "neurona" se refiere al cuerpo celular de la célula nerviosa que a menudo es sólo una pequeña parte del volumen celular total. La célula completa constituye una estructura que se ocupa de la generación, conducción y transmisión de impulsos y, en algunos casos, una sola célula realiza esta tarea a una distancia muy larga (Cantile & Youssef, 2016). La neurona se compone del soma y los axones. El soma es la fábrica metabólica de toda la célula, y allí tiene lugar la mayor parte de las operaciones sintéticas y degradantes (Cantile & Youssef, 2016; Kiernan & Rajakumar, 2014). Los axones son poseen en toda su longitud un sistema de transporte bidireccional que mueve los componentes tanto hacia afuera como hacia el soma (Cantile & Youssef, 2016).

Cuando una neurona sufre un daño irreparable, toda la célula muere y los cambios consiguientes se extienden por toda la extensión de su dominio. Sin embargo, las longitudes largas del axón pueden degenerar sin comprometer la viabilidad del resto de la célula y sin inducir un cambio morfológico dramático en el soma, y a menudo hay margen para la regeneración adecuada de la extremidad axonal perdida (Cantile & Youssef, 2016; Kerschensteiner et al., 2005).

La neurona madura es una célula posmitótica (Cantile & Youssef, 2016) y suele expresar ciertos marcadores característicos que ayudan a su identificación inmunocitoquímica, como son neurofilamento (NF) y β -tubulina (TUJ1) (Jang et al., 2010). Todas las neuronas de un organismo, junto con sus células de soporte, constituyen al sistema nervioso (Kiernan & Rajakumar, 2014). Para llevar a cabo su función comunicativa, una neurona exhibe dos actividades diferentes pero acopladas. La primera es la conducción de una señal de una parte de la célula a otra y la segunda es la transmisión sináptica, que es la comunicación entre células adyacentes (Lichtman & Colman, 2000). Un impulso, también llamado potencial de acción, es una onda de despolarización eléctrica que se propaga dentro de la membrana superficial de la neurona, en este proceso un estímulo aplicado a una parte de la neurona inicia un impulso que viaja a todas las demás partes de la célula (Bean, 2007).

En los vertebrados las funciones motoras, sensoriales y cognitivas del sistema nervioso requieren una rápida propagación de impulsos, que se ve facilitada por el aislamiento de

los axones con mielina. La envoltura de los axones por esta membrana glial multicapa reduce la capacitancia y aumenta la resistencia transversal de la membrana plasmática axonal (Nave & Werner, 2014). Al restringir los potenciales de acción a segmentos axonales cortos no mielinizados (los nódulos de Ranvier), la mielina proporciona la base estructural para la propagación del potencial de acción saltatorio (Tasaki, 1939), que acelera la conducción nerviosa de 20 a 100 veces en comparación con los axones no mielinizados del mismo diámetro sin ocupar mucho espacio (Nave & Werner, 2014).

1.1.2. Papel de las células mielinizantes en el sistema nervioso

Dentro del SNC, los axones son mielinizados por los oligodendrocitos. La vaina de mielina forma una estructura en espiral alrededor del axón de la neurona, y cada oligodendrocito forma múltiples segmentos de mielina que se envuelven alrededor de muchos axones espinales (Chang et al., 2016). Las células de Schwann por su parte mielinizan el nervio en el sistema nervioso periférico (SNP), y se ha comprobado que al existir daño, estas células desempeñan una función neuroprotectora y migran al sitio de la lesión después de una lesión de médula espinal (LME) para envolver los axones de la médula espinal (Yao, 2018). Las células de Schwann contribuyen a la restauración de las vainas de mielina alrededor de algunos axones espinales (Keirstead et al., 1999) y se sabe que algunas células de Schwann derivadas de células progenitoras en el SNC pueden formar mielina periférica (Guest et al., 2005).

La función principal de la mielinización es aumentar la tasa de propagación de los potenciales de acción a través del axón, lo que permite una transmisión de señal más eficiente a través del sistema nervioso (Bercury & Macklin, 2015; Yao, 2018). La vaina de mielina aísla al axón de la actividad eléctrica, y la estructura segmentada de la vaina permite la conducción rápida de los impulsos nerviosos a través de los segmentos (Shrestha et al., 2014). La mielinización neuronal es esencial para el mantenimiento de la conectividad neuronal y la correcta función cognitiva entre el cerebro y la médula espinal (Yao, 2018).

Si bien la estructura de la mielina formada por oligodendrocitos y células de Schwann tiene una ultraestructura similar, no está compuesta por el mismo conjunto de proteínas. Mientras que la mielina central y periférica comparten la proteína básica de mielina, el SNP carece de glicoproteína o proteína proteolípida asociada a mielina.

1.1.2.1. Oligodendrocitos

Los oligodendrocitos son las células mielinizantes del SNC. Se generan a partir de células progenitoras de oligodendrocitos siguiendo procesos estrechamente orquestados de migración, proliferación y diferenciación (Baumann & Pham-Dinh, 2001). Los oligodendrocitos son fundamentales para la formación de mielina en el SNC en desarrollo y críticos para la regeneración de la mielina después de una lesión. La función principal y evidente de los oligodendrocitos es la formación de una vaina de mielina alrededor de la mayoría de los axones en el SNC. Un oligodendrocito extiende muchas prolongaciones, cada una de las cuales contacta y envuelve repetidamente un tramo de axón con la consiguiente condensación de sus membranas para formar mielina (Ahuja, Wilson, et al., 2017). En el mismo axón, los segmentos de mielina adyacentes pertenecen a diferentes oligodendrocitos y el número de prolongaciones que forman vainas de mielina a partir de un único oligodendrocito varía según el área del SNC (Baumann & Pham-Dinh, 2001).

El conjunto de marcadores de superficie para identificar a los oligodendrocitos sobre otras células son la proteína proteolítica (PLP), una de las principales proteínas de la mielina del SNC y la proteína básica de mielina (PBM) que está altamente relacionada con el proceso de mielinización (Baumann & Pham-Dinh, 2001) además ambos marcadores solo son expresados por los oligodendrocitos maduros.

1.1.2.2. Células de Schwann

Las células de Schwann son un tipo de células gliales del SNP que se encuentran asociadas con las neuronas y sus axones (Scherer, 1997). Este tipo de células se clasifican en células de Schwann mielinizantes y no mielinizantes, cada célula de Schwann mielinizante está asociada con un solo segmento axonal, alrededor del cual forma una vaina de mielina, en cambio las células no mielinizantes pueden envolver varios axones amielínicos sin formar vaina de mielina (Kettenmann & Verkhratsky, 2013).

La formación de la vaina de mielina requiere que las células de Schwann se diferencien a un estado de mielinización lo que involucra una síntesis extensa de la membrana, para lo cual ocurren cambios importantes en los niveles de expresión génica y se modifica el citoesqueleto para permitir que la membrana se enrolle alrededor de los axones de las neuronas (Mirsky et al., 2002).

La supervivencia de las células de Schwann en ausencia de axones es fundamental para su papel neuroprotector en el contexto de la regeneración nerviosa (Cerqueira, Lee, Cornelison, et al., 2018). Las células de Schwann quedan sin axones en el segmento nervioso distal a una lesión, y para una reparación exitosa, los axones deben ingresar a este segmento y crecer a lo largo de él para permitir la regeneración de la interconexión neuronal (Mirsky & Jessen, 1999).

En la investigación comúnmente se utilizan un conjunto de marcadores de superficie para identificar a las células de Schwann sobre otras células; como lo son la proteína S100, una proteína de unión a calcio y la proteína acida fibrilar glial (GFAP) que forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto de las células gliales como los astrocitos y las células de Schwann (Jiang et al., 2008; Kingham et al., 2007), además gracias a que el proceso de mielinización es mediado por diversos factores y proteínas relacionadas a la mielina (PBM, PLP, etc.) se han podido diferenciar a las células de Schwann mielinizantes y no mielinizantes (Mirsky & Jessen, 2007) y su actividad en cultivo, además mediante la adición de ciertos factores se ha podido aumentar *in vitro* e *in vivo* el porcentaje de mielinización de estas células y la expresión de dichos marcadores.

Uno de los inductores comúnmente utilizados para potenciar la actividad mielinizante de las células de Schwann son las vitaminas del complejo B. El metabolismo del complejo B genera diferentes intermediarios metabólicos de diferentes rutas, las cuales indirectamente se relacionan con la producción de mielina, por ejemplo, la vitamina B1 (tiamina) que sirve como coenzima de la piruvato deshidrogenasa cuyo producto de reacción es intermediario del ciclo de Krebs y del metabolismo de carbohidratos; cuya actividad se ve reflejada en la producción de acetil coenzima A, un precursor de algunos neurotransmisores y de algunos componentes de la mielina (Martin et al., 2003). El metabolismo de la vitamina B6 (Piridoxina) genera fosfato de piridoxal, una coenzima en la síntesis de esfingolípidos, los cuales son componentes importantes en la formación de mielina (Spinneker et al., 2007). Por su parte la vitamina B12 (cobalamina) se involucra en la síntesis de S-adenosil metionina y succinil coenzima A, que participa en la formación de ácidos grasos y poliaminas que pueden ser incorporados a las vainas de mielina (Calderón-Ospina & Nava-Mesa, 2020).

1.2. Enfermedades desmielinizantes

El SNC es susceptible a diversas enfermedades desmielinizantes que se caracterizan por lugares selectivos de degradación de la mielina que varían tanto en su distribución como en su gravedad (Deber & Reynolds, 1991).

Una enfermedad desmielinizante es cualquier condición que resulta en daño a la vaina de mielina que rodea las fibras nerviosas en el SNC. Como consecuencia los impulsos nerviosos se ralentizan o incluso se detienen, provocando problemas neurológicos (Deber & Reynolds, 1991; Love, 2006; Waxman, 1989).

El término desmielinización describe una pérdida de mielina con preservación relativa de los axones, esto como resultado de enfermedades que dañan las vainas de mielina o las células que las forman. Aunque los axones que han sido desmielinizados tienden a atrofiarse y eventualmente se degeneran, las enfermedades desmielinizantes excluyen aquellas en las que la degeneración axonal ocurre primero y la degradación de la mielina es secundaria (Love, 2006).

Las enfermedades desmielinizantes del SNC se pueden clasificar según su patogenia en varias categorías: desmielinización por procesos inflamatorios, desmielinización viral, desmielinización por alteraciones metabólicas adquiridas, formas hipóxico-isquémicas de desmielinización y desmielinización por compresión focal (Love, 2006), sin embargo una de las principales enfermedades que involucra la desmielinización de los axones y que es de relevancia mundial son las enfermedades producidas por las lesiones en la médula espinal, ya que los estudios morfológicos y fisiológicos demuestran que la desmielinización constituye un componente significativo de la patología en este tipo de lesiones (Waxman, 1989).

1.2.1. Lesión de Medula Espinal (LME)

La lesión de la médula espinal (LME) es un problema clínico grave que se asocia con una disminución drástica de la calidad de vida de las personas afectadas (Norrbrink Budh & Österåker, 2007) ya que produce alteraciones de la función sensorial, motora o autónoma normal y, en última instancia, hasta la afeción de la respiración, la micción y la digestión, lo cual pone en riesgo la vida de los pacientes (Fehlings et al., 2017). Las LME resultan en

una condición debilitante, y tienen diversas implicaciones físicas y sociales devastadoras a largo y corto plazo, ya que la discapacidad debido a este tipo de traumatismos es un gran problema que afecta a personas de todas las edades a nivel mundial (The National SCI Statistical Center, 2013), además el manejo y tratamiento de las LME requiere de atención médica especializada debido a las implicaciones antes mencionadas, para los pacientes y sus familias pueden representar una carga financiera considerable, ya que son necesarios cuidados agudos de alto nivel a corto plazo, junto con el manejo de complicaciones a largo plazo (Fehlings et al., 2017).

Estadísticamente hablando del traumatismo por LME, esta tiene una prevalencia más alta en hombres que en mujeres y una edad de máxima incidencia de menos de 30 años. La principal causa de LME son los accidentes automovilísticos, seguidos de caídas en la población de edad avanzada (Fehlings et al., 2017). La LME afecta la economía de algunos países, ya que los sistemas de salud nacionales tienen que cubrir parte del tratamiento, según el régimen del paciente, además de que la mayoría de los pacientes se encuentran en edad económicamente productiva (Fehlings et al., 2017; Tsintou et al., 2015). En algunos países de Norteamérica la LME representa una carga económica estimada de por vida de entre \$ 1.47 millones de dólares para paraplejia incompleta, y \$ 3.03 millones de dólares para un paciente con tetraplejia completa; con una carga económica total anual estimada de \$ 2.67 billones de dólares (\$ 1.57 billones en costos directos y \$ 1.10 billones en costos indirectos) volviendo a la LME una de las enfermedades más costosas a nivel mundial (Krueger et al., 2013).

Las lesiones en la médula espinal pueden categorizarse en dos fases o tipos de lesiones: la lesión/fase primaria y lesión/fase secundaria. La LME primaria es la lesión que resulta de fuerzas físicas del evento traumático inicial, y se considera que es el determinante más importante de la gravedad del cuadro clínico (Ahuja, Nori, et al., 2017). Se considera como lesión primaria a la ruptura del tejido neural como resultado inmediato de las fuerzas físicas y mecánicas aplicadas a la médula espinal, a medida que falla la columna vertebral (Kabu et al., 2015). Como consecuencia del traumatismo, se presentan en tiempos muy cortos múltiples eventos severos como daño vascular (vasos sanguíneos rotos), ruptura de membranas celulares y axones de las neuronas, las microhemorragias ocurren en cuestión de minutos en la capa gris central y se expande desde el epicentro de la lesión, tanto radial como axialmente (Kabu et al. 2015). Se estima en un promedio de varios minutos posterior a la lesión, la médula espinal se inflama para ocupar el diámetro total del canal espinal al

nivel de la lesión, lo cual en ocasiones causa una mayor interrupción del flujo sanguíneo de la médula espinal, aumentando progresivamente la isquemia en la zona afectada (Werndle et al. 2014).

Posterior a la lesión primaria, se inicia una cascada de eventos que desencadenan una lesión secundaria, la cual se caracteriza por promover la expansión en la zona de lesión del tejido neural y déficits de respuesta neurológicos (Yip & Malaspina, 2012), así como una lesión tisular progresiva después de la lesión primaria (Ahuja, Nori, et al., 2017). Las células dañadas y necróticas en el sitio de la lesión primaria desencadenan la cascada de la lesión secundaria que tiene una fase aguda, intermedia y crónica, y se extiende con el tiempo desde la materia gris hasta la materia blanca (Vélez, 2004). Durante esta cascada de lesiones secundarias, las células inflamatorias como los macrófagos, las microglías, las células T y los neutrófilos se infiltran en el sitio de la lesión como resultado de la interrupción de la barrera hematoencefálica (Ahuja, Nori, et al., 2017). Estas células desencadenan la liberación de citocinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucinas (IL) -1 α , IL-1 β e IL-6, además se produce hipercalcemia intracelular que activa las proteasas dependientes de calcio y causa disfunción mitocondrial, la cual conduce a la muerte celular apoptótica (Nakamura et al., 2003) y la desmielinización de los axones conservados (Beattie et al., 2000), además, las células inflamatorias fagocíticas liberan especies reactivas de oxígeno que promueven daño oxidativo en el ADN, oxidación de proteínas y oxidación de lípidos (Hausmann, 2003). Posterior a la LME, se liberan de forma regulada aminoácidos excitatorios, como el glutamato y el aspartato, gracias a la liberación de las células alteradas (M. Liu et al., 2015). La activación excesiva de los receptores de aminoácidos excitadores produce citotoxicidad y pérdida de neuronas y glía por muerte celular, tanto necrótica como apoptótica (Ahuja, Nori, et al., 2017); la lesión secundaria finalmente conduce a la formación de una cicatriz glial que puede impedir la regeneración axonal dentro de la lesión (Hausmann, 2003; Silver & Miller, 2004).

Como se mencionó anteriormente la LME severa puede destruir porciones sustanciales de la sustancia blanca de la médula espinal donde los axones desmielinizados de las neuronas sobrevivientes puede persistir; estas neuronas son susceptibles a lesiones posteriores y degeneración progresiva Walleriana (un proceso ordenado de muerte axonal) y en teoría, las células productoras de mielina como los oligodendrocitos y células de Schwann pueden remielinizar estos axones y amortiguar el daño (Ahuja, Wilson, et al., 2017).

Actualmente se estudia el potencial terapéutico que tienen las células de Schwann y los

oligodendrocitos para remielinizar los axones desprotegidos en la LME aguda y que puedan restablecer las conexiones neuronales dentro de la lesión.

1.3. Enfoques terapéuticos para el tratamiento de LME

Para seleccionar una estrategia terapéutica para el tratamiento de la LME es necesario considerar el tiempo que ha pasado después del traumatismo, así como la etapa de la lesión en la que se encuentra el paciente, sin embargo, las grandes diferencias en las poblaciones con LME (edad, raza, edad, sexo) explican parcialmente porque actualmente no existe un tratamiento efectivo para dicho traumatismo (Tator, 2006), no obstante, actualmente se están estudiando múltiples estrategias para tratar este traumatismo tomando en cuenta las consideraciones mencionadas anteriormente, por ejemplo: las intervenciones tempranas después de la lesión primaria tienen como objetivo prevenir el mecanismo de LME secundaria mediante el uso de terapias con fármacos y neuroprotectores; mientras que en una etapa crónica, se trata principalmente con terapia regenerativa, como terapias basadas en células, ingeniería de tejidos, ya sea a través de remielinización y/o brotación axonal para establecer conectividad neuronal y lograr la recuperación funcional (Kabu et al., 2015; Varma et al., 2013).

1.3.1. Terapias con enfoque Quirúrgico

Las técnicas quirúrgicas para la reparación de la LME se han utilizado desde hace algunos años, sin embargo, se han obtenido resultados muy variados, controversiales y ampliamente cuestionados por la comunidad médica. Este enfoque terapéutico para la LME aguda se limita a la alineación espinal, la descompresión nerviosa y la estabilización de la columna, lo que evita lesiones neurológicas adicionales. La descompresión quirúrgica es el abordaje más utilizado, sin embargo, solo del 1% al 1,8% de los pacientes con LME cervical y torácica reportados pudieron caminar después de una cirugía de descompresión quirúrgica (A. Cristante et al., 2012).

La prevención de daños mayores y la rehabilitación temprana de los pacientes son dos beneficios quirúrgicos conocidos (Damasceno et al., 2010). Sin embargo, las complicaciones son otro desafío comúnmente reportado en el tratamiento quirúrgico. A pesar de que la incidencia de complicaciones relacionadas con el abordaje quirúrgico es baja (Kajimoto et al., 2007), además algunos abordajes quirúrgicos todavía se consideran

experimentales, como los que buscan construir puentes para cruzar el área dañada de la médula espinal (A. Cristante et al., 2012), sin embargo, este último se espera que pudiera tener un mayor potencial si se aplica combinada con otros enfoques.

1.3.2. Terapias con enfoque Farmacológico

La terapia farmacológica juega un papel importante en el tratamiento de la LME ya que los ensayos clínicos y experimentales demuestran que diversos medicamentos pueden contribuir eficazmente al tratamiento de la LME disminuyendo los efectos de la lesión secundaria (Blight & Zimber, 2001). Actualmente los corticosteroides y gangliósidos ya están aprobados para uso en humanos, siendo los corticosteroides más frecuentemente estudiados la dexametasona y la metilprednisolona. Los gangliósidos son moléculas de glicolípidos que se derivan del ácido siálico que *in vitro*, aumentan la formación y crecimiento de neuritas, expansiones protoplásmicas de axones que originan nuevas conexiones funcionales, inducen la regeneración neuronal y promueven la neuroplasticidad (A. Cristante et al., 2012).

Por otra parte, los esteroides se utilizan principalmente debido a la acción antiinflamatoria de estos compuestos y su eficacia en el tratamiento del edema cerebral. Sin embargo, la metilprednisolona también aumenta el flujo sanguíneo y estabiliza las membranas celulares, inhibiendo la peroxidación lipídica con la consecuente reducción en la producción de radicales libres (Hall, 2011) y debido a que el estrés oxidativo se considera un sello distintivo de la LME, la reducción del estrés oxidativo se ha estudiado como una intervención terapéutica para la LME (A. Cristante et al., 2012; Jia et al., 2012). El objetivo es prevenir la peroxidación lipídica catalizada por hierro inducida por radicales libres y el daño oxidativo en las proteínas neuronales de la columna (Hall, 2011). Los estudios experimentales muestran que los antioxidantes y los bloqueadores de radicales libres, solos o en combinación, pueden acelerar la recuperación funcional de ratas con LME (A. F. Cristante et al., 2009).

El complejo de vitamina B ayuda a aliviar la degeneración del sistema nervioso y se administran clínicamente como vitamina B1 (tiamina), vitamina B6 (piridoxina) en combinación con vitamina B12 (Calderón-Ospina & Nava-Mesa, 2020). Estas vitaminas, en particular la vitamina B12, exhiben papeles importantes en varios eventos biológicos para mantener las funciones neuronales normales (Hobbenaghi et al., 2013). Se ha demostrado

que la aplicación del complejo de vitamina B o vitamina B12 aumenta el número de células de Schwann, las fibras nerviosas mielinizadas y el diámetro de los axones, y por lo tanto, promueve la regeneración de fibras nerviosas mielinizadas y la proliferación de células de Schwann (Lopatina et al., 2011).

1.3.3. Terapias con enfoque Físico

Con el fin de minimizar el daño de la lesión secundaria de la médula espinal, se emplean las terapias con enfoques físicos, siendo las más estudiadas la hipotermia, el oxígeno hiperbárico y el ejercicio, especialmente en cinta rodante (A. Cristante et al., 2012).

La terapia de enfriamiento local (hipotermia) por perfusión o irrigación con solución salina (Albin & White, 1987) se basa en la suposición de que las bajas temperaturas protegen los tejidos del SNC de los efectos de la hipoxia y la isquemia. Sin embargo, esta técnica es difícil de aplicar y conlleva una tasa de mortalidad alta (A. Cristante et al., 2012).

La terapia con oxígeno hiperbárico se fundamenta en que una disminución de la perfusión se puede compensar aumentando la presión parcial de oxígeno y consiste en hacer que el paciente respire oxígeno puro dentro de una cámara hiperbárica a una presión superior a la presión atmosférica para lograr una alta presión parcial de oxígeno en el tejido (A. Cristante et al., 2012; A. F. Cristante et al., 2012).

Por su parte el entrenamiento en cinta rodante produce una mejora en la recuperación, la coordinación y el rendimiento neurológico con varios tipos de ejercicios que son elementos obligatorios en los programas de rehabilitación clínica en LME (Winter et al., 2007).

1.3.4. Terapias con enfoque Biológico

El enfoque biológico consta en suministrar componentes biológicos con capacidad regenerativa, como los factores de crecimiento en conjunto con trasplantes autólogos de células totipotentes autólogas u homólogas (A. Cristante et al., 2012).

Actualmente este enfoque es el más utilizado en la medicina regenerativa, en especial la terapia celular, ya que la principal ventaja de suministrar células indiferenciadas o células multipotentes es que tienen la capacidad de proliferar y generar células de cualquier linaje o tipo de tejido.

1.3.4.1. Terapia celular como tratamiento de LME

Las terapias basadas en células o terapias celulares como tratamiento para LME tienen como objetivo facilitar la neuroregeneración, ya sea reemplazando y/o reparando las células dañadas, ya sea directamente o indirectamente a través de secreción de factores, que alteran el medio ambiente, haciéndolo más adecuado para la regeneración (Bliss et al., 2010). Este enfoque busca minimizar la propagación de la lesión secundaria mediante el trasplante de células; las cuales, son capaces de modular la respuesta inflamatoria, regenerar circuitos neuronales perdidos y remielinizar axones (Kato et al., 2019; Tsintou et al., 2015).

El trasplante celular después de LME tiene varios objetivos: 1) unir cualquier quiste o cavidad; 2) reemplazar las células muertas (por ejemplo, para proporcionar nuevas neuronas o células mielinizantes); 3) crear un ambiente favorable para la regeneración de axones (Thuret et al., 2006).

Actualmente las terapias basadas en células para el tratamiento del SNC dañado se han basado en la utilización de diversos linajes celulares con efectos neuroprotectores, tal es el caso de las células madre mesenquimales (MSC), células madre progenitoras neurales, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, y su progenie diferenciada. La ventaja de la utilización de estos tipos de células es que pueden obtenerse fácil y directamente del paciente a partir de diversas fuentes (**Figura 1**) y cada linaje tiene sus propias ventajas y desventajas en el tratamiento de LME (Tsintou et al., 2015). Sin embargo uno de los linajes actualmente más prometedores tanto para terapia celular como para ingeniería de tejidos son las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (CMM-TAh), ya que pueden obtenerse más fácilmente y en mayores cantidades que las células madre mesenquimales de médula ósea (CMM-MO), además proliferan más rápidamente y experimentan una diferenciación neural más eficiente en comparación con otras CMM (Zhang et al., 2012).

Uno de los principales puntos clave de este enfoque terapéutico es el método de trasplante de células, ya que puede alterar el efecto neuroprotector de estas, por ejemplo, los efectos obtenidos con la inyección directa de células se han atribuido principalmente a la secreción de factores de crecimiento más que a la capacidad de las células para diferenciar y formar tejido nuevo (Joyce et al., 2010; Tsintou et al., 2015). Sin embargo, el principal problema este enfoque de terapia celular para LME y trastornos del SNC es la baja eficacia de las

técnicas de trasplante celular, debido principalmente al entorno hostil dentro y alrededor del sitio de la lesión en el cual se trasplantan las células (Tsintou et al., 2015). Este ambiente hostil es causado por diversos mecanismos de respuesta a la lesión, por ejemplo, regulación positiva de las moléculas inhibitoras, formación de cicatriz glial, inflamación, ausencia astrocitos para guiar el crecimiento de los axones, etc. lo que causa una baja tasa de supervivencia, diferenciación incontrolada e integración ineficaz de las células en el tejido del huésped (Mothe et al., 2013). Por lo que actualmente se están desarrollando y probando biomateriales que puedan servir como vehículo para el trasplante de células y que a la vez puedan emular el entorno natural de las células. Proporcionando un soporte estructural ideal para el crecimiento y proliferación de las células del SNC y SNP.

La estrategia terapéutica basada en células se ha convertido en la parte más importante de la medicina traslacional y los ensayos clínicos para la LME (Kabu et al., 2015).

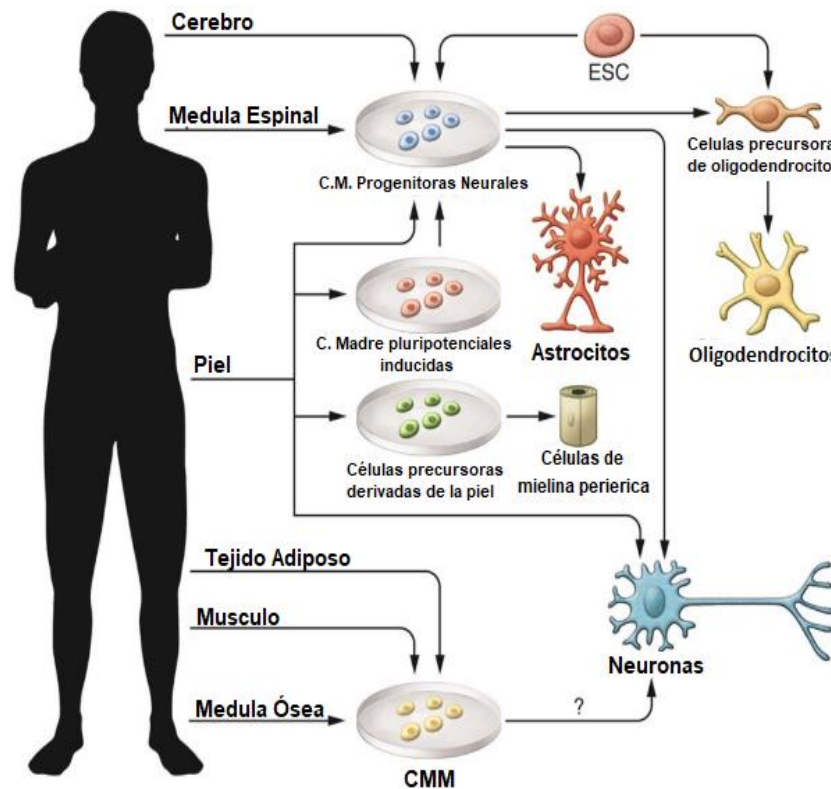


Figura 1: Fuentes de obtención de diferentes linajes celulares utilizados en las estrategias terapéuticas basadas en células.

1.3.5. Uso de biomateriales como soporte celular

Un método alternativo para administrar células al sitio de la lesión que puede abordar el problema del control de la diferenciación y migración celular consiste en sembrar células en andamios y luego implantar el andamio en la lesión (S. Liu et al., 2018). Este método tiene varias ventajas sobre la inyección directa. Una ventaja es que los andamios pueden proporcionar un ambiente más favorecedor para la supervivencia celular, así como un soporte trófico para las células (Willerth & Sakiyama-Elbert, 2008). En algunos casos, estos andamios se pueden modificar para contener señales para promover la supervivencia celular y promover la diferenciación de células progenitoras y actualmente se ha evaluado una variedad de materiales para su uso como andamios para el tratamiento de LME (Nomura et al., 2006).

La colocación experimental de injertos de nervios periféricos (ciático o sural) en la médula espinal ha tenido éxito. Una de las ventajas de este enfoque, en comparación con el trasplante de otros tejidos neuronales, es que con los injertos de nervios periféricos es posible dirigir la regeneración de los axones (Houle et al., 2010). Estos andamios proporcionan una estructura de soporte para el crecimiento celular que guía la regeneración axonal, por lo que las características de un andamio ideal serían: tener una estructura similar a la médula espinal, facilitar la adhesión celular y tener compatibilidad con el componente celular (S. Liu et al., 2018). Gracias a numerosos estudios, el uso de andamios acelulares, derivados de tejido nervioso y preparado a través de métodos químicos ha tomado un gran auge. En estos, el componente celular es eliminado, mientras que se conserva la matriz extracelular (MEC) (Porzionato et al., 2018). Entre las ventajas que provee esta tecnología se encuentran: disponibilidad ilimitada, baja inmunogenicidad y estructura tridimensional intacta similar a la del tejido nervioso (Nomura et al., 2006).

La arquitectura de los andamios para el tratamiento de la LME es diseñada para imitar la disposición de la materia blanca y gris que se encuentra en la médula espinal no lesionada (Shrestha et al., 2014). Estos andamios se han utilizado para promover la diferenciación neuronal al presentar señales de diferenciación, además se ha demostrado que la liberación controlada de factores en dichos andamios proporciona efectos benéficos a corto plazo como tratamiento para la LME (Willerth & Sakiyama-Elbert, 2008).

Los andamios con trasplante de células son prometedores como una alternativa a los métodos de inyección. Tales andamios pueden mejorar la supervivencia celular después del trasplante y promover la diferenciación en los fenotipos deseados en función de las

propiedades del andamio (Tsintou, Dalamagkas and Seifalian, 2015; Nomura, Tator and Shoichet, 2006; Willerth and Sakiyama-Elbert, 2008).

Para tener el efecto deseado se requiere de un andamio en combinación con células y factores de crecimiento con el fin de diseñar un injerto mielinizado funcional para su futuro uso como posible tratamiento en la LME, el cual sea capaz de reestablecer las conexiones neuronales dentro de la zona de lesión.

1.3.5.1. Aplicación clínica de estrategias combinatorias

Los sistemas de cocultivo se pueden usar en aplicaciones de medicina regenerativa ya que imitan la estructura tridimensional del tejido original, permiten tener una mayor comprensión de la interacción de los diversos tipos celulares que influyen en el comportamiento, y el entorno del microambiente durante el proceso de reparación. Algunos ejemplos recientes de cocultivos se describen a continuación:

Gang et al., (2010) construyeron un andamio de polímero sembrado con células madre neurales y células de Schwann que se modeló a partir de la materia gris y blanca del cordón medular intacto. La parte interna del andamio emulaba la materia gris a través de una capa de polímero porosa diseñada para ser sembrada con células madre neurales y células de Schwann para reemplazo celular, así como soporte trófico. La porción externa emulaba la materia blanca con poros largos orientados axialmente para guía axonal y porosidad radial para permitir el transporte de fluidos mientras inhibía el crecimiento de tejido cicatricial. Ellos encontraron que las células madre neuronales trasplantadas puede sobrevivir, diferenciarse (neuronas) y migrar en la médula espinal de las ratas hasta 24 semanas después de la lesión. El co-trasplante de células en un andamio de PLGA (ácido poli lactico-co-glicolítico) puede promover la recuperación funcional de la médula espinal lesionada

Gao et al., (2013) evaluaron si los andamios de bioingeniería tenían el potencial de apoyar y guiar el crecimiento axonal en un modelo clínicamente más relevante de lesión severa de la médula espinal, en el estudio ratas adultas se sometieron a una lesión grave que consistía en una transección completa de la médula espinal, con la colocación de andamios de agarosa con diferentes tipos celulares entre ellos células de Schwann en el sitio de la lesión, ellos reportaron que si bien estos tipos de células son compatibles con la unión y extensión axonal, los axones no pueden retener su organización nativa en fascículos de función

relacionada, lo que resulta en un crecimiento axonal en la lesión que está desorganizada y en forma de patrón en la agarosa y guían la regeneración axonal motora a lo largo de toda la lesión.

Günther *et al.*, (2015) combinaron andamios de diferentes diámetros de canal con una liberación de BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro) de las células estromales de médula ósea incorporadas y encontraron que esta combinación es superior para el crecimiento axonal dirigido en comparación con un injerto en suspensión de las mismas células sin andamio.

Yang *et al.*, (2017) investigaron los efectos de una estrategia combinatoria para el tratamiento de LME en ratas adultas usando un andamio PLGA de múltiples canales que contenía células de Schwann y CMM injertados. Ellos encontraron que el andamio PLGA multicanal efectivamente colmó la brecha de la lesión en ratas con LME completamente transectadas, y la estrategia de implantación conjunta promovió la supervivencia y diferenciación de CMM en células similares a las neuronas, lo que condujo a una mayor regeneración de axones y recuperación funcional.

Hyung *et al.*, (2015) reportaron un sistema de cocultivo que comprende neuronas motoras primarias y células de Schwann de ratón. En el estudio ellos encontraron que en su sistema las neuronas motoras sobrevivieron durante al menos 3 semanas en cultivo y que las células de Schwann formaron una vaina de mielina alrededor de los axones de las neuronas motoras. Además, reportaron que las neuronas motoras exhibieron una mayor viabilidad y axones extendidos más largos en comparación con el monocultivo de neuronas motoras. Ellos también encontraron que en su cocultivo las células de Schwann mielinizan los axones de las neuronas motoras dentro de las 3 semanas de cocultivo y que el tratamiento con coenzima Q10 facilita la mielinización.

Ishii *et al.*, (2017) describieron sistemas de cocultivo mielinizante de neuronas derivadas de la línea de células madre de roedores y células de Schwann inmortalizadas. Ellos encontraron que las neuronas diferenciadas derivadas de una línea de células madre neurales de rata adulta (1464R), y las motoneuronas derivadas de una línea de células madre embrionarias de ratón (NCH4.3) al ser cultivadas en conjunto con células Schwann (IFRS1) estas forman mielina en los axones de las neuronas hasta las 4 semanas de cultivo.

Zheng *et al.*, (2018) cocultivaron células de Schwann y neuronas inducidas a partir de células madre mesenquimales de médula ósea *in vitro* y se trasplantaron a un modelo de

lesión del nervio ciático de rata. Ellos demostraron que el cocultivo de células de Schwann con neuronas inducidas a partir de células madre mesenquimales de médula ósea aceleró la proliferación de células de Schwann y promovió la expresión y secreción de factores neurotróficos y moléculas de adhesión neural *in vitro*. También encontraron que las neuronas inducidas a partir de CMM de medula ósea reactivaron a las células de Schwann nativas, facilitaron su proliferación y mejoraron la mielinización, la regeneración axonal y la recuperación funcional de los nervios ciáticos.

Cerqueira, Lee, & Bunge, (2018) describieron la preparación de un cultivo combinado de neuronas, células de Schwann y astrocitos espacialmente definidos para imitar el entorno de un injerto de células de Schwann dentro de un sitio de lesión en la médula espinal. Ellos sembraron células de Schwann y las monocapas de astrocitos en compartimentos separados, las neuronas se agregaron a la monocapa de células de Schwann y después formaron un límite de células de astrocitos y células de Schwann. Encontraron que a los 2 días después del cultivo se puede encontrar migración de células de Schwann y se puede medir el crecimiento de neuritas a través del límite del cultivo.

Li y cols.(Li et al., 2020) fabricaron un modelo de cocultivo con células de Schwann-células madre neuronales, en el modelo establecieron cultivo en forma de núcleo y cubierta. Las células de Schwann se encapsularon en la cubierta de hidrogel de alginato y las células madre neuronales se concentraron en un núcleo con alta densidad celular para imitar parcialmente la posición espacial relativa de las neuronas y las células gliales, donde las células gliales forman vainas de mielina que se envuelven alrededor de los axones de las neuronas y se asimilan a un autoinjerto. Ellos demostraron que las células de Schwann en la porción de la cubierta expresan mayor abundancia de genes del factor neurotrófico que en las placas de Petri. Reportaron que hay una mayor tendencia general a la proliferación y diferenciación celular de las células madre neuronales, lo que podría deberse a su alimentación por factores neurotróficos secretados.

2. ANTECEDENTES

2.1. Antecedentes directos

En nuestro laboratorio Jacobo Arreola, (2014) logró diferenciar *in vitro* las CMMH-TA a células parecidas a oligodendrocitos, usando T3 como inductor. Además, demostró que el cultivo en Matrigel y cocultivo con neuronas (línea celular de rata) no mejora la diferenciación celular ya que no alteró la expresión de los marcadores analizados, bajo las condiciones del experimento.

Posteriormente López Guerra, (2014) desarrolló un protocolo para el proceso de descelularización y recelularización *in vitro* de nervio ciático de rata con CMM-TA, obtenidas también de rata y diferenciadas *in vitro* a células de Schwann. En el modelo de lesión periférica (*in vivo*-rata) se observó un aumento en la remielinización y en la recuperación de la integridad de los axones después de un período de 9 semanas al compararlo con el grupo control.

Recientemente se estableció un modelo *in vitro* para potenciar la actividad mielinizante de los oligodendrocitos utilizando neuronas, factores de crecimiento y un nervio de rata descelularizado como andamio en tres dimensiones por 3, 7 y 21 días con el medio de cocultivo. Los resultados obtenidos demuestran que ambas poblaciones pueden sobrevivir, reproducirse e interactuar dentro del nervio. Sin embargo, hubo una notable disminución del crecimiento celular después del día 7, aunque se logró detectar la PBM en los nervios hasta por 21 días (Valencia Salgado, 2019).

Debido a que los oligodendrocitos son células con condiciones complejas para la realización de un cultivo exitoso y que requieren una gran cantidad de factores de crecimiento para el mantenimiento de las células diferenciadas (Pukos et al., 2019) (Porzionato et al., 2018) y que las células de Schwann han demostrado tener una gran actividad mielinizante en los modelos de cocultivo, en el presente proyecto evaluamos un modelo de cocultivo con neuronas y células de Schwann en un cultivo 3D usando como andamio los nervios periféricos de rata descelularizados con el medio de cocultivo y medio condicionado en ausencia y presencia de complejo B.

3. JUSTIFICACIÓN

La desmielinización resultante después de una LME dificulta la reparación del daño en el tejido, volviendo a este tipo de lesión una de las enfermedades más caras a nivel mundial. Actualmente los avances terapéuticos se centran en el uso de terapia celular regenerativa por medio del uso de andamios celulares, Y pese a que dentro del grupo de investigación se han diseñado un andamio a partir de nervio ciático de rata recelularizado con neuronas y oligodendrocitos con buenos niveles de mielinización aún es necesario mejorar las condiciones de cultivo, ya que ambos linajes celulares son difíciles de generar y mantener en el andamio, además es necesario lograr una distribución más uniforme de la mielinización, así como la detección de ambos linajes celulares.

4. HIPÓTESIS

El cocultivo de neuronas y células de Schwann derivadas de células madre Mesenquimales de tejido adiposo humano adicionado con factores de diferenciación sobre el andamio de nervio descelularizado, presentará un alto nivel de mielinización igual o similar al cocultivo de neuronas y oligodendrocitos.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el cocultivo de células de Schwann y neuronas derivadas de células madre mesenquimales de tejido adiposo humano y factores de crecimiento en un nervio periférico descelularizado, y comparar su potencial mielinizante contra el cocultivo de neuronas y oligodendrocitos.

5.2. Objetivos específicos

1. Aislar, caracterizar y diferenciar células madre mesenquimales de tejido adiposo humano mediante factores de crecimiento en poblaciones de células de Schwann y neuronas.
2. Evaluar la actividad mielinizante del cocultivo de células de Schwann-neuronas, sobre un andamio descelularizado de nervio periférico de rata.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental consistió en la obtención de las CMM-TAh a partir de tejido graso, las cuales se caracterizaron y diferenciaron a poblaciones de neuronas y células de Schwann. Por otra parte se generó el andamio de nervio descelularizado de rata. Las neuronas fueron transducidas con un gen reportero, posteriormente se realizó la determinación de la CC_{50} del complejo B y se optimizó el medio de cocultivo. Una vez obtenido el andamio y el cocultivo caracterizado se realizó el cocultivo en andamio por 3 y 7 días. Finalmente se midió el porcentaje de mielinización alcanzado mediante inmunohistoquímica. La estrategia general se muestra en la **Figura 2**.

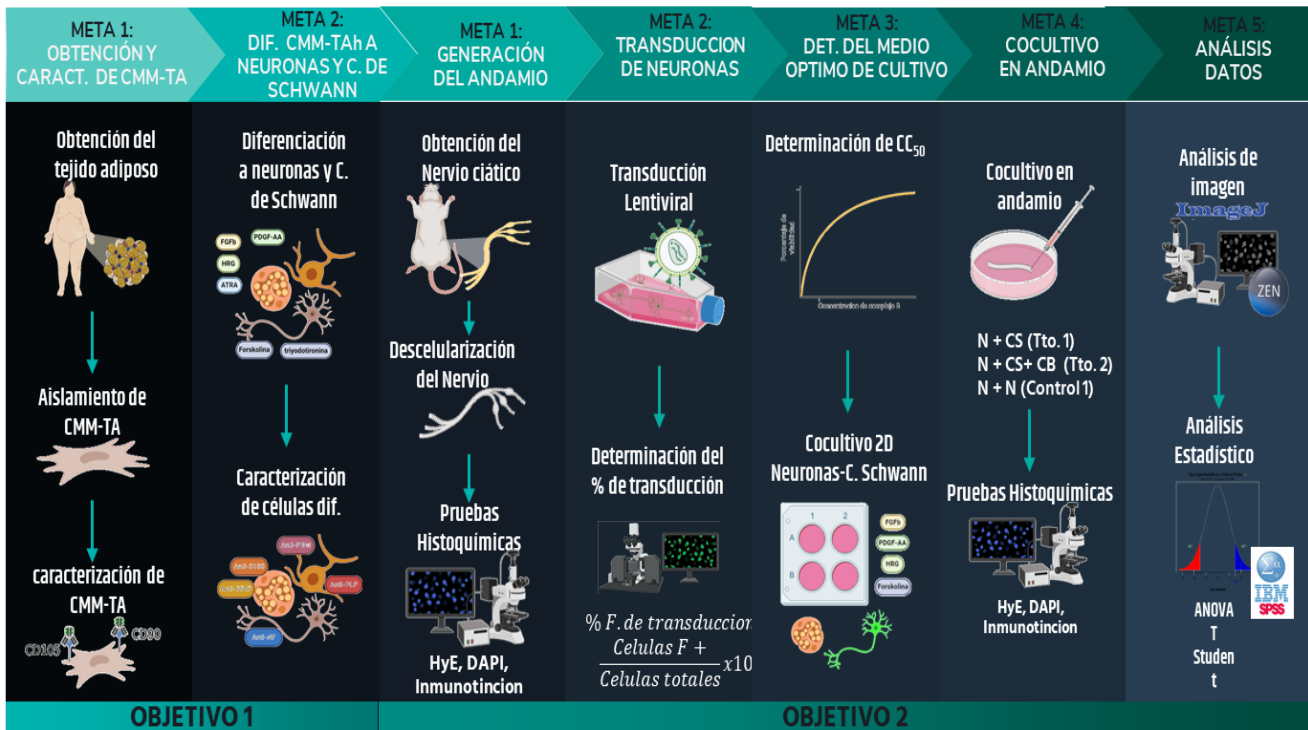


Figura 2: Estrategia Experimental. Metodología experimental general por objetivos y metas

7. METODOLOGÍA

7.1. Obtención de las células

7.1.1. Aislamiento de CMM-TAh

El aislamiento de las CMMH-TA se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Alstrup *et al.*, (2019). El lipoaspirado (50 mL) producto de desecho de una persona adulta y sana, proveniente del Departamento de Cirugía Plástica del Hospital Universitario, se incubó con 5 mL de una solución (200UI/mL) de colagenasa I (Sigma Aldrich de México) a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5% por 1 h. La muestra se homogenizó con una pipeta Pasteur y se separaron las células de los *detritus* del tejido y células adiposas mediante centrifugación a 1000 × g por 15 min a 21°C y se eliminó el sobrenadante. Las células se lavaron dos veces, resuspendiéndolas en 2 ml de solución salina isotónica de fosfatos, pH 7.4 (PBS) y centrifugaron a 1000 × g por 15 min. Las células se resuspendieron en 2 mL de medio de cultivo DMEM (Sigma-Aldrich de México) suplementado con 10% de suero fetal bovino ([SFB] v/v), 2.5 µg/mL de anfotericina B y 100 µg/mL de gentamicina (p/v). Se sembraron las células en botellas de poliestireno de 25 cm² con tapón permeable a los gases (CORNING® - Corning Incorporated, Corning, NY, USA) conteniendo 5 mL de medio DMEM. Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ por 48 h. Las células no adheridas y el medio usado se desecharon. A las células adheridas se les agregó 5 mL de medio completo fresco y se incubaron en atmósfera de CO₂ al 5 % a 37°C hasta que las CMMH-TA alcanzaron un 80% de confluencia.

7.1.2. Cultivo y expansión de CMM-TAh

Al alcanzar una confluencia de 80% a las cajas de cultivo primario de 25 cm² se les añadió 1 mL de tripsina al 0.25% en PBS y se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 5 min. Las células se colocaron en un tubo de 15 mL y se les agregó 1 mL de medio completo, se centrifugaron a 4,000 × g. El paquete celular se resuspendió en 1 mL de medio fresco completo y la suspensión celular se dividió en dos alícuotas. Cada alícuota se colocó en dos botellas de 25 cm² nuevas y se añadió medio fresco a las botellas hasta alcanzar los 5 mL, las botellas se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Cada tercer día, el medio de cultivo usado se reemplazó por un volumen igual de medio completo fresco. Cuando las monocapas de CMM-TA alcanzaron una confluencia de 80%, se resembraron las células.

7.1.3. Caracterización inmunocitoquímica de CMM-TAh

Se sembraron las CMM-TAh en microcámara de cultivo (Chamber Slide System), colocando 80×10^3 células en cada pocillo, se incubaron las preparaciones a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ hasta que alcanzaron el 80% de confluencia. Estas células se lavaron suavemente con PBS, se fijaron por 20 min a 4°C con metanol-acetona (1:1 v/v) y se lavaron de nuevo con PBS. Las células se marcaron con los anticuerpos monoclonales anti-CD105, anti-CD90 y anti-CD34 (Abcam, Cambridge, MA., USA), según el siguiente protocolo, a la microcámara se le agregaron 300 µL de TBST y se incubó la preparación a 25°C por 5 min. A continuación, la microcámara se incubó con 150 µL de peróxido de hidrógeno al 3% a temperatura ambiente por 10 min para eliminar la actividad de peroxidasa endógena. Después la microcámara se lavó con TBST por 5 min y se agregó el reactivo para bloquear proteínas, incluido en el kit, a continuación, se incubó la preparación por 30 min a 37°C. Se le añadió 100 µL del anticuerpo monoclonal primario anti-CD105, anti-CD90 o anti-CD34 diluido 1:100 con diluyente para anticuerpos (DakoCytomation antibody Diluent with Reducing Components) y se incubó en cámara húmeda toda la noche a 4°C o 45 min a 37°C. Se lavó dos veces la preparación con TBST por 5 min; se le agregaron 100 µL de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano y se incubó por 30 min a 37°C en cámara húmeda. Se lavó la preparación con TBST por 5 min, se añadió la solución de estreptavidina-HRP y se incubó por 30 min a 37°C en cámara húmeda. Se lavó con TBST por 5 min y se reveló con DAB por 10 min, se preparó DAB con 1 gota de cromógeno y 20 gotas de sustrato. Posteriormente se lavó la preparación tres veces con agua destilada por 2 min. Los núcleos celulares se contrastaron incubando las preparaciones con hematoxilina por 1 min; se enjuagó con agua destilada y se deshidrataron las células incubándolas sucesivamente en soluciones crecientes de alcohol al 70%, al 95%, al 100% y xilol 100%.

Las preparaciones se montaron con Entellan y se colocó un cubreobjetos sobre ellas. Como control positivo se utilizaron cortes de hígado humano, como testigo negativo cortes de yeyuno y como control de la técnica CMMH-TA a las que no se les agregó el anticuerpo primario. Previo al marcaje, los tejidos que se usaron como controles se hidrataron con etanol al 100%, 96% y 70% seguido de agua destilada y TBST. Cada paso de hidratación duró 3 min y se realizó a temperatura ambiente. Para la exposición de los antígenos se utilizó una solución de TRS (Target Retrieval Solution 1X de Dako) por 1 h a 90°C. Para posteriormente realizar el marcaje con el anticuerpo previamente descrito.

7.2. Diferenciación de CMM-TAh

7.2.1. Diferenciación de CMM-TAh a Neuronas

Para la diferenciación a neuronas, las CMM-TAh fueron expuestas a un cóctel de factores neurotróficos según el protocolo descrito por Jang *et al.*, (2010). Se incubaron las CMM-TAh en botellas de cultivo con medio DMEM/F12 con 1% de suero bovino fetal, 100 ng/mL factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), 50 µg/mL del antibiótico gentamicina y 50 µg/mL de antimicótico a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 7 días. Para continuar la diferenciación neuronal, las células fueron expuestas al medio de inducción con 1% SBF, 100 ng/mL de bFGF, 10 µM de forskolina, 50 µg/mL en DMEM/F12 y se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 7 días.

7.2.1.1. Caracterización inmunocitoquímica de neuronas diferenciadas

Las células con morfología neuronal se sometieron a una tinción inmunohistoquímica para identificación y cuantificación del marcador típico Neurofilamento (NF) un marcador característico de linajes neuronales. Como control positivo se utilizó la línea celular C6 y CMM-TAh como control negativo, los tejidos controles se hidrataron con inmersiones sucesivas de 3 minutos en etanol al 100%, 96% y 70% seguido de agua destilada y TBST. Las células diferenciadas se sembraron en las microcámaras de cultivo, se lavaron suavemente con PBS, se fijaron por 20 min a 4°C con metanol-acetona (1:1 v/v) y se lavaron de nuevo con PBS. Las células y tejidos se marcaron con el anticuerpo monoclonal anti-NF (Neurofilamento) en solución de TRS (Target Retrieval Solution 1X de Dako) por 1 h a 90°C. Posteriormente se siguió la metodología descrita en la sección 7.1.3

7.2.2. Diferenciación de CMM-TAh a Células de Schwan

A partir de las células del tercer pase se incubaron las CMM-TAh en medio DMEM/F12 suplementado con β-Mercaptoetanol 1mM (SIGMA-ALDRICH®) y se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 24 h, se cambió el medio por en medio DMEM/F12 suplementado con SBF al 10% adicionado con ácido transretinoico (ATRA) 0.1mM (Calbiochem®, ©MerkKGaA, Darmstadt, Alemania) y se incubó a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 72 h. Finalmente, las células se cambiaron a medio DMEM/F12 adicionado con SBF al 10%, forskolina 5mM (Calbiochem®), factor de crecimiento de fibroblastos humano recombinante-b (bFGF) 10 ng/mL(PEPROTECH, INC., Rocky Hill. NJ, USA), factor

de crecimiento derivado de plaquetas humanas recombinante-AA (PDGF-AA) 10 ng/mL (PEPROTECH, INC.) y 1 β -heregulina humana recombinante (HRG) 200 ng/mL (PEPROTECH, INC) y se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% de 2 a 8 días, renovándose el medio de acuerdo con el crecimiento de las células.

7.2.2.1. Caracterización inmunocitoquímica de células de Schwann diferenciadas

Las células con morfología fibroblastoide y de huso se sometieron a tinción inmunohistoquímica para identificación y cuantificación de los marcadores típicos GFAP (Proteína acida fibrilar glial), S100 y PBM, que son marcadores característicos de células de Schwann. Como control positivo se usó cerebro de rata y CMM-TAh como control negativo, los tejidos controles se hidrataron con inmersiones sucesivas de 3 minutos en etanol al 100%, 96% y 70% seguido de agua destilada y TBST. Las células diferenciadas se sembraron en microcámaras de cultivo, se lavaron suavemente con PBS, se fijaron por 20 min a 4°C con metanol-acetona (1:1 v/v) y se lavaron de nuevo con PBS. Las células y tejidos se marcaron con los anticuerpos monoclonales anti-GFAP (Proteína acida fibrilar glial) y anti-S100 y anti-PBM en solución de TRS (Target Retrieval Solution 1X de Dako) por 1 h a 90°C. Posteriormente se siguió la metodología descrita en la sección 7.1.3.

7.3. Determinación de la concentración citotóxica 50 del complejo B

Se sembraron 20,000 CMM-TAh en 50 μ L de medio DMEM (10% SFB) en una placa de 96 pozos y se incubaron por 48 horas a 37°C a una atmósfera del 5% de CO₂, posteriormente de agregaron 30 ng, 10 ng, 5ng, 2 ng, 1 ng, 0.5 ng y 0.01 ng de complejo B en 50 μ L de medio DMEM (10% SFB), se incubaron por 48 h y se añadieron 200 μ L del reactivo Cell titerGlo® y medio la luminiscencia en un lector de placas con el protocolo de luminiscencia y se calculó el porcentaje de células muertas.

7.4. Determinación del medio óptimo de cocultivo

Se incubaron, células de Schwann y neuronas viables (10:1) en cada uno de los cuatro compartimentos de una microcámara. Cada compartimento contenía medio de cocultivo

constituido de DMEM/F12 suplementado con 1% SBF, bFGF (100ng/mL), PDGF (10ng/mL), HRG (200ng/mL) y Forskolina (10µM) (DMEM/F12) además de ausencia o presencia de complejo B a 50 µg/mL, los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ durante 7 días y posteriormente se realizó la caracterización inmunocitoquímica utilizando los marcadores típicos de cada linaje previamente descritos.

7.5. Transducción de neuronas con Mcherry-GFP

En botellas de cultivo de 25 cm² se inocularon 5 × 10⁵ neuronas derivadas de CMM-TAh y se incubaron por 16 h en atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C. Posteriormente se adicionaron 5 µg de sulfato de protamina / mL (Sigma-Aldrich) para transducir las CMM-TAh. Todos los cultivos se infectaron con el vector lentiviral a una multiplicidad de infección (MOI) de 2 partículas virales/célula, de acuerdo a lo establecido por Yuan *et al.*, (2016). Las células se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda de CO₂ al 5% por 48 h. Se realizó un pase del cultivo y a cada uno se le agregó 200 µg de geneticina (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) / mL para seleccionar las células transducidas. Se realizó el conteo de las células totales y las células verde-fluorescentes por medio de microscopio de fluorescencia y se calculó la eficiencia del procedimiento como porcentaje de transducción.

Para calcular la eficiencia de transducción se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de transduccion} = \frac{\text{Células GFP+/mCherry+}}{\text{célulastotales}} \times 100\%;$$
 donde, células-GFP+/mCherry+ serán células que muestran una señal verde y roja fluorescente bajo el microscopio de fluorescencia.

7.6. Generación del andamio de nervio ciático

7.6.1. Descelularización del nervio ciático de rata

La descelularización del nervio ciático de rata se realizó de acuerdo con el protocolo y condiciones establecidas por López Guerra, (2014). Se extrajeron nervios ciáticos de ratas Wistar adultas de aproximadamente 15 mm de longitud. Los nervios ciáticos extraídos se sumergieron en agua destilada por 24 h a agitación constante a 500 rpm a temperatura ambiente, posteriormente los nervios se expusieron a Tritón X-100 (SIGMA-ALDRICH®, San Luis, MO, Estados Unidos) al 1% durante 24 h en agitación a 500 rpm a temperatura

ambiente, a continuación, se cambió la solución de Tritón X-100 por una solución de desoxicolato de sodio (SIGMA-ALDRICH®), al 5% y se sometió a agitación a 500 rpm a temperatura ambiente por 4h. Este proceso se repitió por 15 días bajo condiciones de esterilidad. Por último, se realizó un lavado final en agua destilada y los nervios se almacenaron en buffer PBS 1X, pH 7,2 a 4 ° C hasta su uso.

7.6.2. Pruebas histológicas

7.6.2.1. Técnica histológica

Los nervios se fijaron con glutaraldehído al 2.5% durante 24h, posteriormente se sumergieron las muestras en alcohol etílico al 60% por 1h y fueron transferidos a los alcoholes etílicos al 70%, 80% y 96% incubándose 1h en cada uno de los alcoholes. Las muestras fueron transferidas a alcohol etílico absoluto por 1h y después a una solución de etanol absoluto:xilol (1:1) por 1h. Se incubaron en xilol por 1h y por último se embebieron en parafina líquida por 1h y se dejó enfriar hasta que la parafina solidificó.

Una vez embebidos en parafina se realizaron los cortes correspondientes (4 y 5 µm) con el microtomo. Los cortes se montaron en portaobjetos de cristal y se colocaron en la estufa a 60°C por 10 min. Se desparafinaron con xilol por 5 min, posteriormente se incubaron en una mezcla de xilol-etanol por 5 min seguido de etanol absoluto por 2 min, se colocaron en etanol 96% por 2 min y se enjuagaron en agua destilada.

7.6.2.2. Tinción de Hematoxilina y Eosina (HyE)

Los cortes de 5 µm desparafinados se sumergieron en hematoxilina (ANALYTYKA INC., D.F., México) por 2 min, se lavaron dos veces con agua corriente, se realizó una inmersión rápida en alcohol ácido, se lavaron de nuevo con agua corriente, se realizaron dos inmersiones rápidas en agua amoniacal 1%, se enjuagaron con agua corriente y posteriormente con agua destilada. Enseguida, se realizaron 9 inmersiones en eosina (ANALYTYKA INC.). Los cortes ya teñidos se sumergieron en etanol a 96% de 10 a 20 seg y luego por 1min. Fueron transferidos los cortes a etanol absoluto por 2 min, se colocaron los cortes en mezcla de xilol-etanol por 3min, se sumergieron en xilol por 2 min, se colocó una gota de resina Entellan sobre el portaobjetos y sobre esta se colocó el cubreobjetos, eliminando las burbujas.

7.6.2.3. Tinción de fluorescencia (DAPI)

Se tomaron las células fijadas con metanol-acetona (1:1 v/v) en un portaobjetos o cortes desparafinados y rehidratados sobre un portaobjetos, se les añadieron 7µL de DAPI y se observó al microscopio.

7.6.2.4. Tinción inmunohistoquímica

Primero, se realizó la exposición de antígenos en solución recuperadora de antígenos (por sus siglas en inglés TRS, Target Retrieval Solution)(Abcam®, Cambridge, Inglaterra, Reino Unido) por 20 min, enseguida tanto los controles de técnica como las muestras fueron colocadas en TBST (Abcam®) durante 5 min, después se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% (Abcam®) durante 10 min a 37°C, se hizo un lavado con TBST durante 5 min y después se colocó en el anticuerpo primario (los cortes se incubaron a 4°C durante toda la noche). Se emplearon anticuerpos primarios para detectar Proteína Básica de la Mielina (por sus siglas en inglés MBP, Myelin Basic Protein) (Dako®, Carpintería, CA, USA) y Neurofilamento (NF) (Dako®). Luego se lavaron con TBST, se agregó el anticuerpo secundario del Kit de detección Mouse & Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC de Abcam®, se incubó a 37°C por 30 min y se volvieron a lavar con TBST, después se agregó la solución de estreptavidina HRP (Abcam®), de la misma manera se incubaron a 37°C por 30 min y se volvieron a lavar con TBST. Enseguida se les añadió el 3-3' diaminobenzidina (DAB) (Abcam®) durante 10 min. Por último, se retiró el DAB y se lavaron las muestras y los controles con agua destilada para después contrateñir con Hematoxilina de Gill, y después se deshidrataron gradualmente con soluciones crecientes de etanol (70-100%) hasta llegar a xilol, para enseguida montar las laminillas con Entellan.

7.7. Cocultivo en andamio descelularizado

Dentro de los nervios descelularizados se inyectaron suavemente, con una jeringa de insulina, 50 µL de una suspensión celular con 100,000 neuronas transducidas con Mcherry-GFP en los nervios se incubaron por 3 días con el medio para mantener a la población de neuronas, esto con el fin de favorecer que las neuronas adquieran una morfología

característica. Posteriormente se inyectaron en el nervio 1×10^6 células /50 μ L con células de Schwann. Se mantuvieron en medio de cocultivo con y sin complejo B a una $CC_{50} = 50$ μ g/mL durante 3 y 7 días. El medio usado fue reemplazado por medio fresco cada tercer día. Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado.

7.8. Análisis del andamio recelularizado

Una vez concluido el tiempo de cultivo los nervios se fijaron con solución de Carnoy, se obtuvieron cortes transversales y longitudinales, se evaluaron mediante inmunofluorescencia las dos poblaciones celulares que se encuentran en el nervio utilizando los marcadores PBM, S100 y NF y el kit *Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) detection IHC Kit* (Abcam, Burlingame, California, USA) según el protocolo del fabricante como se describió en la sección 7.1.3

7.9. Análisis estadístico

Para cuantificar la cantidad de mielina en los nervios re-celularizados se utilizó el software Image J para medir las unidades de densidad en nervios control y los experimentos para posteriormente realizar en el análisis comparativo.

Para el análisis estadístico se aplicó una prueba de t de Student, considerando como diferencias significativas los resultados que presentaron un valor de $p < 0.05$

8. RESULTADOS

8.1. Aislamiento, caracterización y diferenciación de CMM-TAh mediante factores de crecimiento en poblaciones de células de Schwann y neuronas.

8.1.1. Aislamiento y caracterización de CMM-TAh

Las células obtenidas a partir del tejido adiposo que se mantuvieron en cultivo se observaron para verificar la adherencia al plástico y su morfología. Al pase 3 las células adheridas al plástico presentaron una morfología fibroblastoide, es decir una morfología bipolar alargada al adherirse al sustrato, tal como se muestra en la **Figura 3A**. Posteriormente para confirmar la identidad de las células aisladas se realizó una caracterización inmunocitoquímica de las células contra los marcadores CD34, CD90 y CD105 (**Figuras 3C a 3J**), que son marcadores de superficie típicos de las CMM-TAh, y se calculó el porcentaje de células positivas a los diferentes marcadores tomando como células positivas aquellas células que presentaban una señal color café en el citoplasma y como células negativas al marcador aquellas cuya señal café en el citoplasma estaba ausente, para el marcador CD34 el porcentaje obtenido fue de $99.01\% \pm 0.65$, para CD90 $98.26\% \pm 0.62$ y para CD105 $98.86\% \pm 0.37$ como se muestra en la **Figura 3B**, esto confirmó la identidad de las células aisladas como CMM-TAh.

8.1.2. Diferenciación de CMM-TAh a Células de Schwann y caracterización inmunocitoquímica de las células diferenciadas

Una vez confirmada la identidad de las CMM-TAh se realizó la diferenciación a células de Schwann, una vez concluida se observó el cultivo obtenido y se encontraron células con morfología fibroblastoide, muy similares al cultivo de CMM-TAh, sin embargo, estas células presentaron un patrón de crecimiento tipo remolino, como se observa en la **Figuras 4A y 4B**, y al observar las células más aisladas en el cultivo se observó que presentaban una morfología fibroblastoide ligeramente más alargada en comparación con las CMM-TAh asemejándose más a morfología tipo huso (**Figura 4C**). Posteriormente era necesario confirmar la diferenciación de las células por lo cual se realizó una caracterización inmunocitoquímica de las células diferenciadas contra los marcadores típicos de las células de Schwann proteína S100, GFAP y para evaluar la producción de mielina por parte de las células el marcador PBM (**Figuras 4D a 4K**) donde se tomaron como células positivas

aquellas que presentaban una señal color café en el citoplasma y como células negativas al marcador aquellas, cuya señal café en el citoplasma estaba ausente, posteriormente se realizó el cálculo del porcentaje de células positivas a cada marcador y tal como se aprecia en la **Figura 4L**, con el marcador S100 observamos un $62.90\% \pm 7.78$ de células positivas al marcador, GFAP un $99.51\% \pm 0.43$ y PBM un $76.29\% \pm 5.87$ con lo que se confirmó la identidad de la fracción de células diferenciadas a células tipo Schwann.

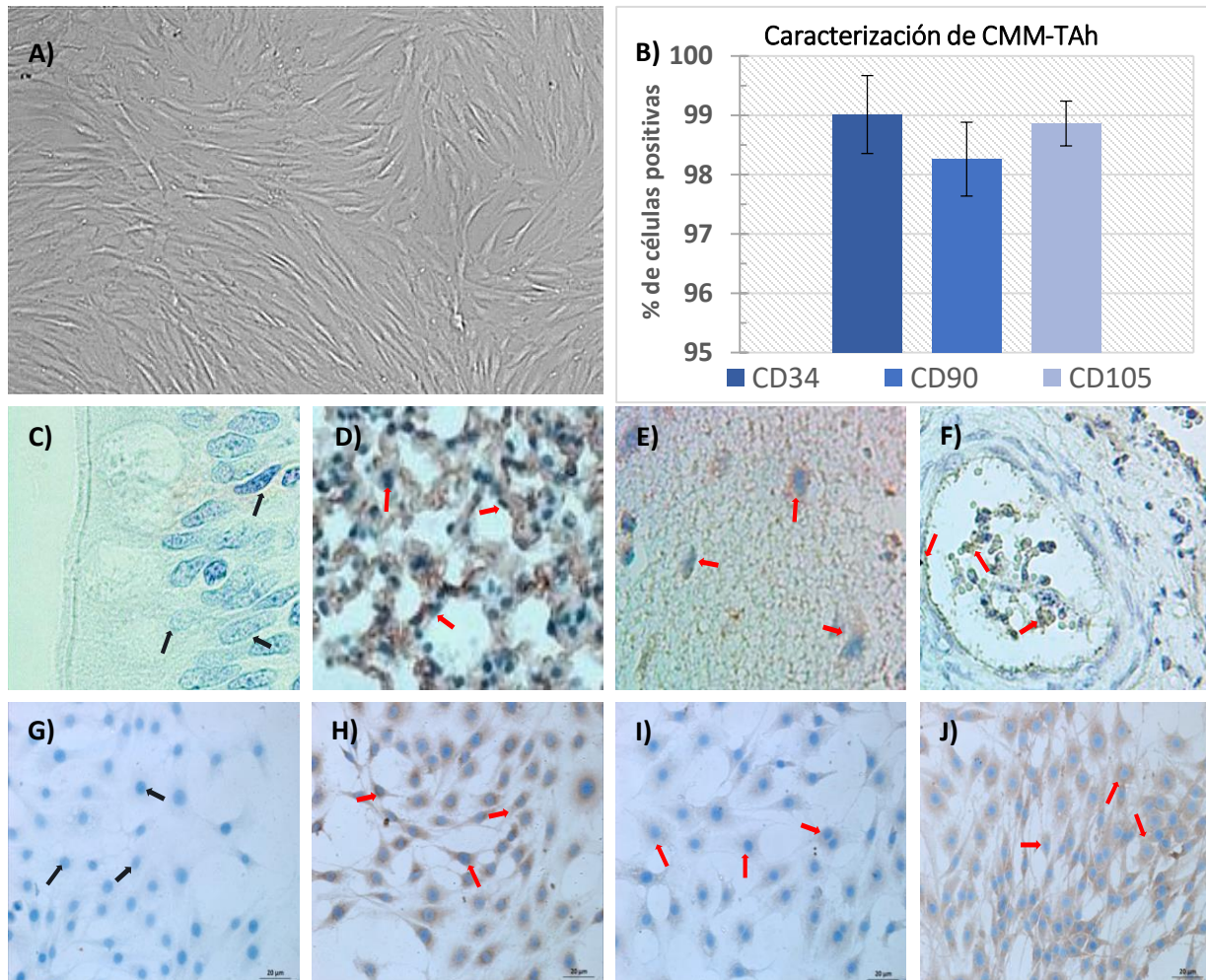


Figura 3: Aislamiento y caracterización de CMM-TAh. **A)** Cultivo 2D de las CMM-TAh aisladas; **B)** Porcentajes de expresión de marcadores típicos de linajes de CMM-TAh CD34, CD90 y CD105; **C-J)** Imágenes representativas de las tinciones inmunohistoquímicas e inmunocitoquímicas contra los marcadores CD34, CD90 y CD105. **C)** Control negativo (Corte de yeyuno); **D)** Control positivo de CD34 (corte de pulmón de rata); **E)** Control positivo de CD90 (Corte de cerebro de rata); **F)** Control positivo de CD105 (Corte de endotelio vascular); **G)** Control de la técnica (CMM-TAh sin anticuerpo primario); **H)** Tinción inmunocitoquímica de las células aisladas contra CD34; **I)** Tinción inmunocitoquímica de las células aisladas contra CD90; **J)** Tinción inmunocitoquímica de las células aisladas contra CD105. Las flechas rojas muestran las células positivas al marcador, las flechas negras muestran las células negativas al marcador.

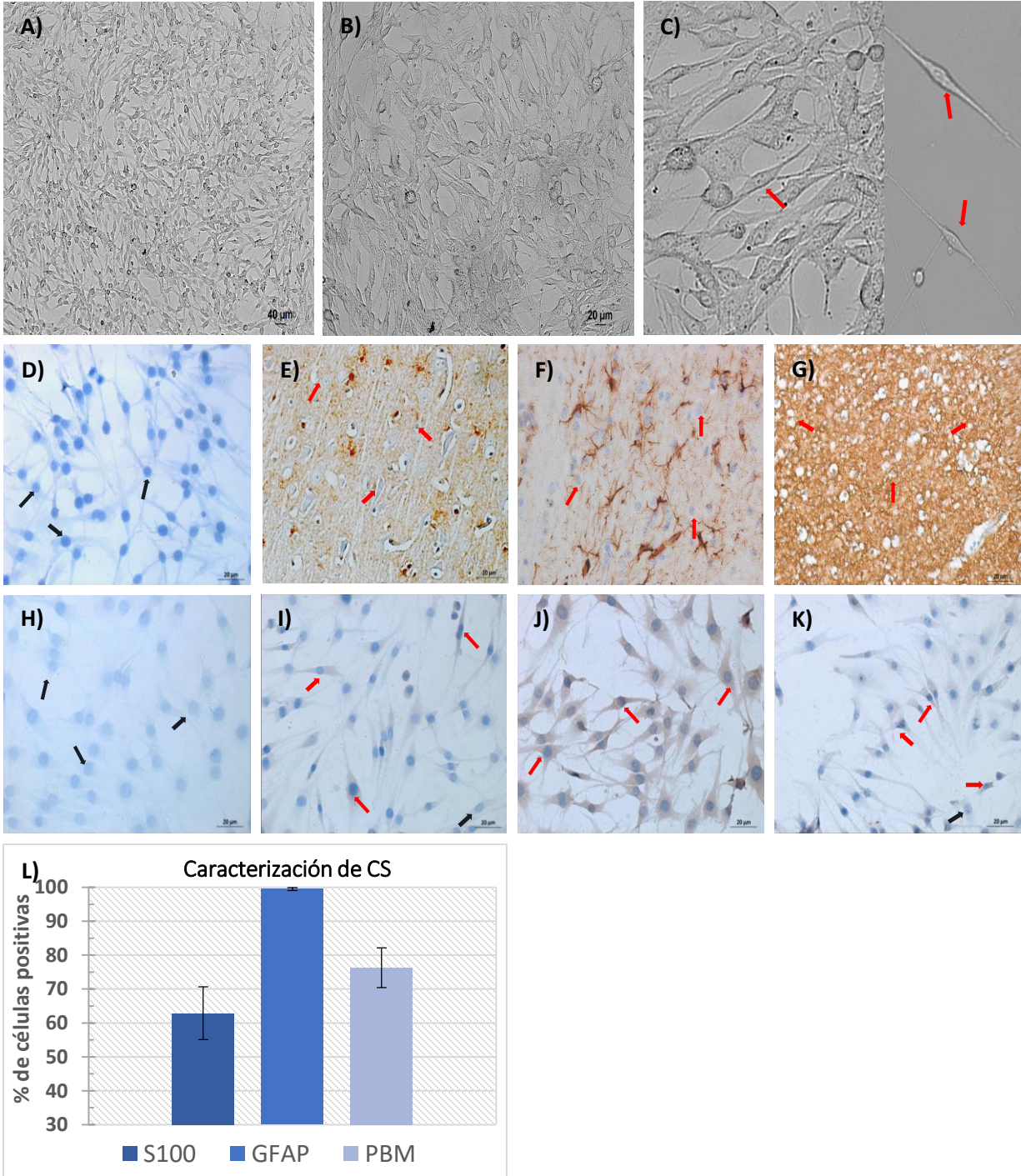


Figura 4: Diferenciación de CMM-TAh a Células de Schwann y caracterización inmunocitoquímica. A-C) Cultivo 2D de las CMM-TAh diferenciadas a células de Schwann. A) 10X; B) 40X; C) Morfología de las CMM-TAh diferenciadas (flechas rojas); D-K) Imágenes representativas de las tinciones inmunohistoquímicas e inmunocitoquímicas contra los marcadores PBM, S100 y GFAP. D) Control negativo (CMM-TAh); E) Control positivo de S100 (corte de cerebro de rata); F) Control positivo de GFAP (Corte de cerebro de rata); G) Control positivo de PBM (Corte de cerebro de rata); H) Control de la técnica (CMM-TAh diferenciadas a CS sin anticuerpo primario); I) Tinción inmunocitoquímica de las células diferenciadas contra S100; ; J) Tinción inmunocitoquímica de las células diferenciadas contra GFAP; K) Tinción inmunocitoquímica de las células diferenciadas contra PBM; L) Porcentajes de expresión de marcadores típicos de linajes de CS S100, GFAP y PBM. Las flechas rojas muestran las células positivas al marcador, las flechas negras muestran las células negativas al marcador.

8.1.3. Diferenciación de CMM-TAh a Neuronas y caracterización de las células diferenciadas

Una vez obtenidas y confirmado el linaje de las células de Schwann el siguiente paso fue generar el siguiente linaje para el cocultivo, donde las CMM-TAh se sometieron a diferenciación a linaje neuronal, posteriormente se observó en el microscopio para evaluar la morfología celular y el patrón de crecimiento. El cultivo presento un patrón de crecimiento donde las células se reacomodaban en grupos, y cada agrupación se encontraba conectada con otros grupos celulares a través de prolongaciones, dando una morfología tipo red como de muestra en la **Figuras 5A y 5B**. Posteriormente al observar las células más aisladas dentro del cultivo se encontraron poblaciones de células con diferentes morfologías, donde algunas presentaban una morfología fibroblastoide, mientras otras presentaban una morfología más neuronal tipo I y II con 3 o más prolongaciones, algunas con prolongaciones largas y otras con prolongaciones cortas, tal como se observa en la **Figuras 5C a 5F**. Posteriormente se realizó la caracterización inmunocitoquímica contra el marcador NF para confirmar la identidad del linaje celular obtenido (**Figuras 5G a 5J**), de nuevo se tomaron como células positivas aquellas que presentaban una señal color café en el citoplasma y como células negativas al marcador, aquellas cuya señal café en el citoplasma se encontraba ausente, con base a los datos obtenidos se calculó el porcentaje de células positivas a NF y cómo puede observarse en la **Figura 5K** el porcentaje de células positivas fue de $35.42\% \pm 17.29$ con lo que se confirmó el porcentaje de células que se habían diferenciado a un linaje tipo neuronal.

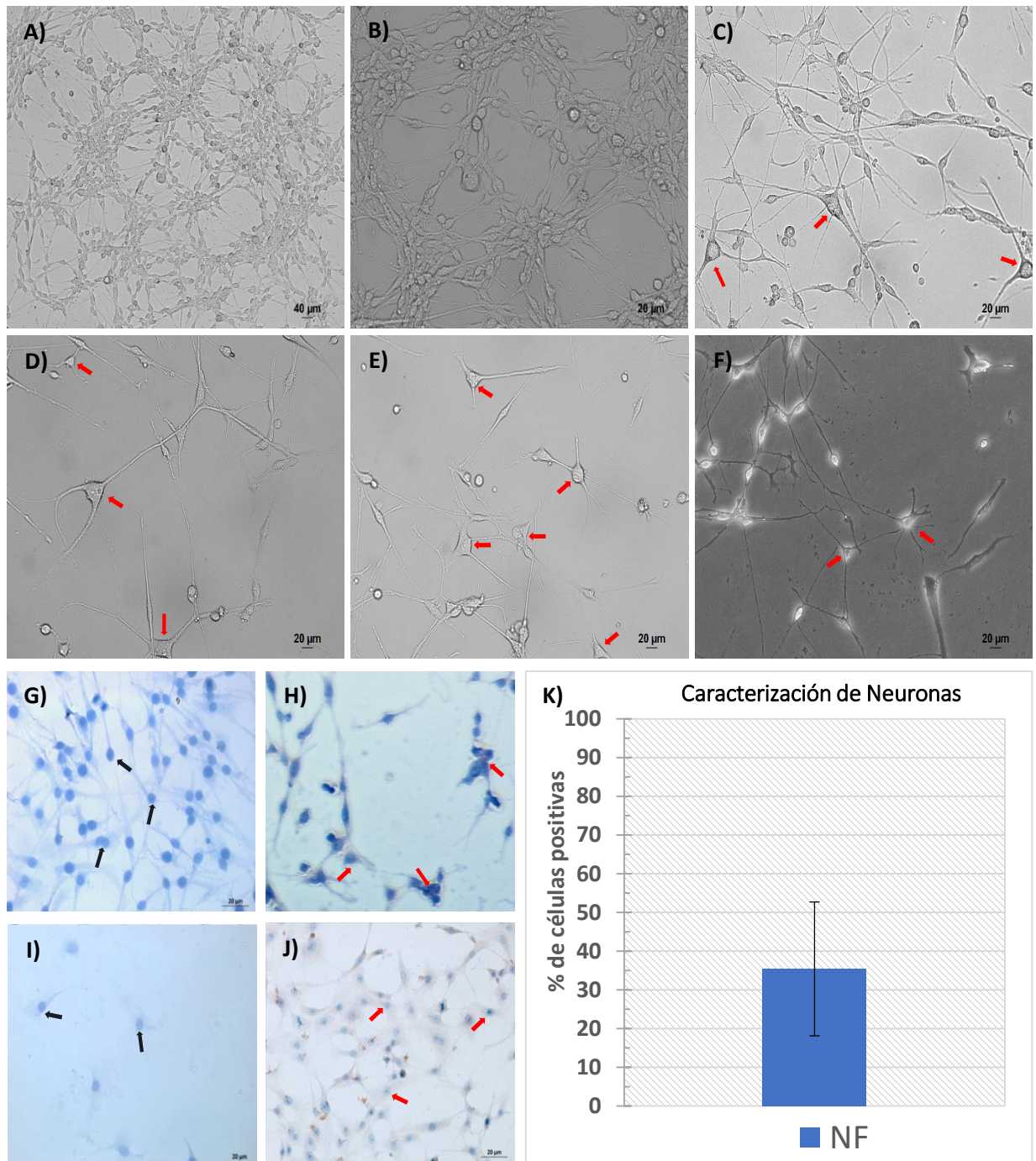


Figura 5: Diferenciación de CMM-TAh a Neuronas y caracterización inmunocitoquímica. A-B) Cultivo 2D de las CMM-TAh diferenciadas a neuronas. A) 10X; B) 40X; C-F) Morfología de las CMM-TAh diferenciadas a neuronas con morfología neuronal I y II (flechas rojas); G-J) Imágenes representativas de las tinciones inmunocitoquímicas contra el marcador NF. G) Control negativo (CMM-TAh); H) Control positivo de NF (Línea celular C6); I) Control de la técnica (CMM-TAh diferenciadas a neuronas sin anticuerpo primario); J) Tinción inmunocitoquímica de las células diferenciadas contra NF; K) Porcentajes de expresión del marcador típico de linaje neuronal NF. Las flechas rojas muestran las células positivas al marcador, las flechas negras muestran las células negativas al marcador.

8.2. Determinación de la actividad mielinizante del cocultivo de neuronas y células de Schwann, sobre un andamio descelularizado de nervio periférico

8.2.1. Generación y caracterización inmunocitoquímica del andamio de nervio ciático de rata

Una vez que se obtuvieron las poblaciones de neuronas y células de Schwann se generó el andamio de nervio periférico, para ello, se descelularizó el nervio ciático y se le realizó la técnica histológica y una tinción de H&E o DAPI para observar si había células presentes en el nervio mediante la observación de los núcleos celulares. Se realizó una comparación de una microscopia de las tinciones del andamio descelularizado contra un nervio sin descelularizar, y como se observa en las **Figuras 6A a 6D** en el nervio sin descelularizar existe la presencia de células, ya que se observan pequeñas manchas color morado (para H&E) o azul fluorescente (para DAPI) que representan los núcleos celulares, los cuales no se observan en el andamio descelularizado (**Figuras 6E a 6H**), con esto se confirmó la correcta descelularización del andamio de nervio periférico. Posteriormente se realizó una caracterización inmunocitoquímica contra PBM (**Figuras 6I a 6M**) para determinar las unidades de densidad de mielina en el andamio utilizando análisis de imagen con el software ImageJ. Tal como se muestra en la **Figura 6N** las unidades de densidad de mielina obtenida para el nervio sin descelularizar fueron 29.6 ± 0.5 y para el andamio descelularizado 1.06 ± 0.68 las cuales se utilizaron posteriormente para el cálculo de la mielina total generada por el cocultivo.

8.2.2. Transducción lentiviral de neuronas

Con el fin de poder detectar las neuronas dentro del andamio se realizó una transducción lentiviral de este linaje celular para que expresaran los genes reporteros GFP y mCherry, una vez hecha la transducción y añadido el agente de selección se tiñeron los núcleos celulares con DAPI y se analizaron las células por microscopia de fluorescencia para comprobar que las células se habían transducido correctamente y determinar el porcentaje de traducción, en la **Figura 7A** se pueden observar los núcleos celulares teñidos con DAPI, utilizados para determinar el número de células por campo, en las **Figuras 7B y 7C** se observa la señal de fluorescencia de las células transfectadas al observarse con los filtros GFP y RFP respectivamente, posteriormente se usaron los merge de las imágenes de GFP y RFP con DAPI (**Figuras 7A a 7F**) para diferenciar las células que presentaban señal

fluorescente de aquellas que no presentaban señal y calcular el porcentaje de transducción el cual fue de $48.13\% \pm 3.89$.

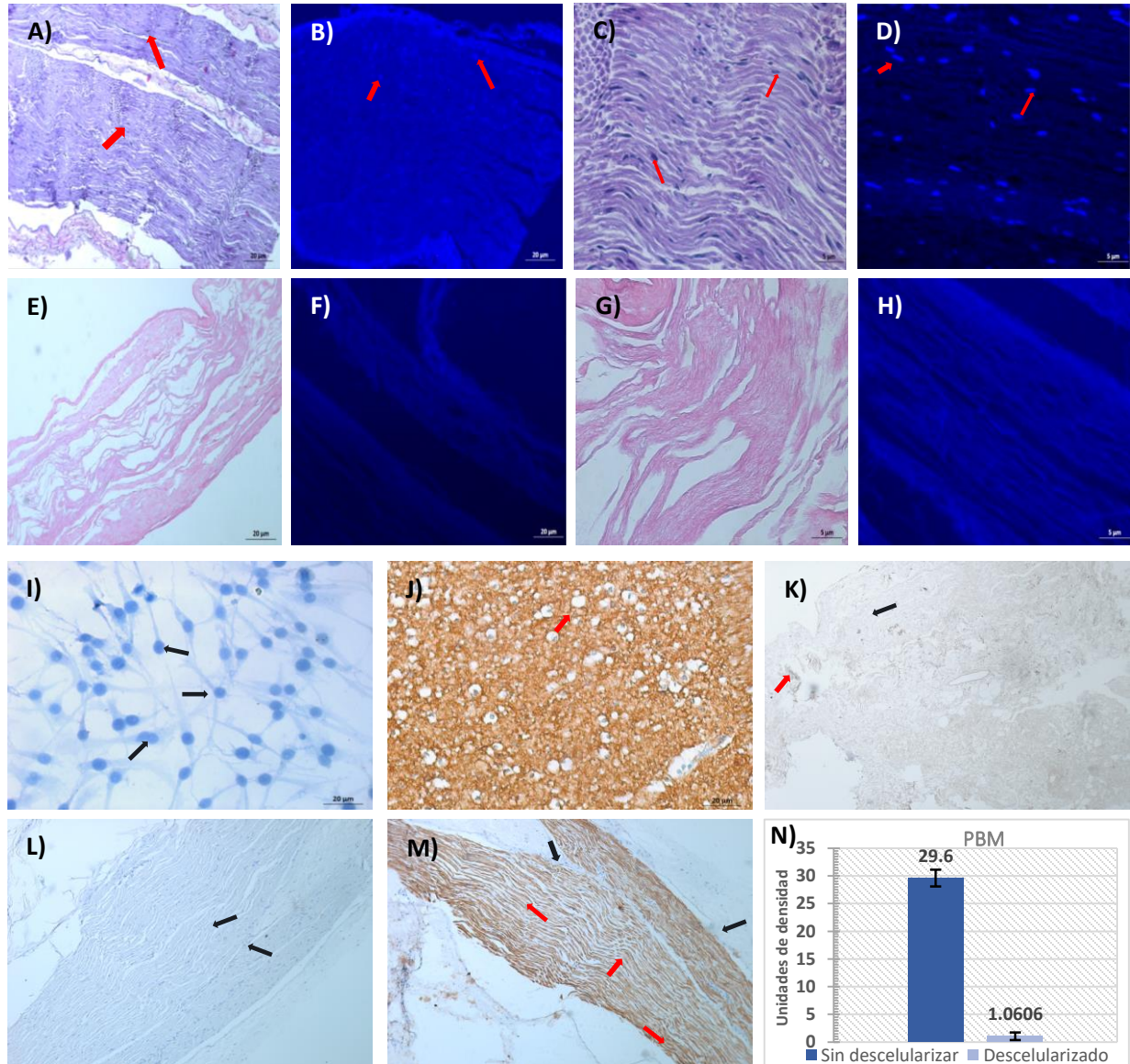


Figura 6: Descelularización y caracterización del andamio de nervio periférico. A-H) Imágenes representativas de las tinciones de H&E y DAPI de nervio sin descelularizar (A-D) y nervio descelularizado (E-H). **A)** Tinción H&E 10X; **B)** Tinción DAPI 10X; **C)** Tinción H&E 40X; **D)** Tinción DAPI 40X; **E)** Tinción H&E 10X; **F)** Tinción DAPI 10X; **G)** Tinción H&E 40X; **H)** Tinción DAPI 40X. Las flechas rojas muestran el núcleo de las células en la tinción. **I-M)** Imágenes representativas de las tinciones inmunohistoquímicas del andamio contra el marcador PBM; **I)** Control negativo (CMM-TAh); **J)** Control positivo de PBM (Corte de cerebro de rata); **K)** Tinción inmunocitoquímica del andamio descelularizado contra PBM; **L)** Control de la técnica (Andamio sin descelularizar sin anticuerpo primario); **M)** Tinción inmunocitoquímica del andamio sin descelularizar contra PBM; **N)** Unidades de densidad de mielina de los andamios descelularizado y sin descelularizar. Las flechas rojas muestran las células positivas al marcador, las flechas negras muestran las células negativas al marcador.

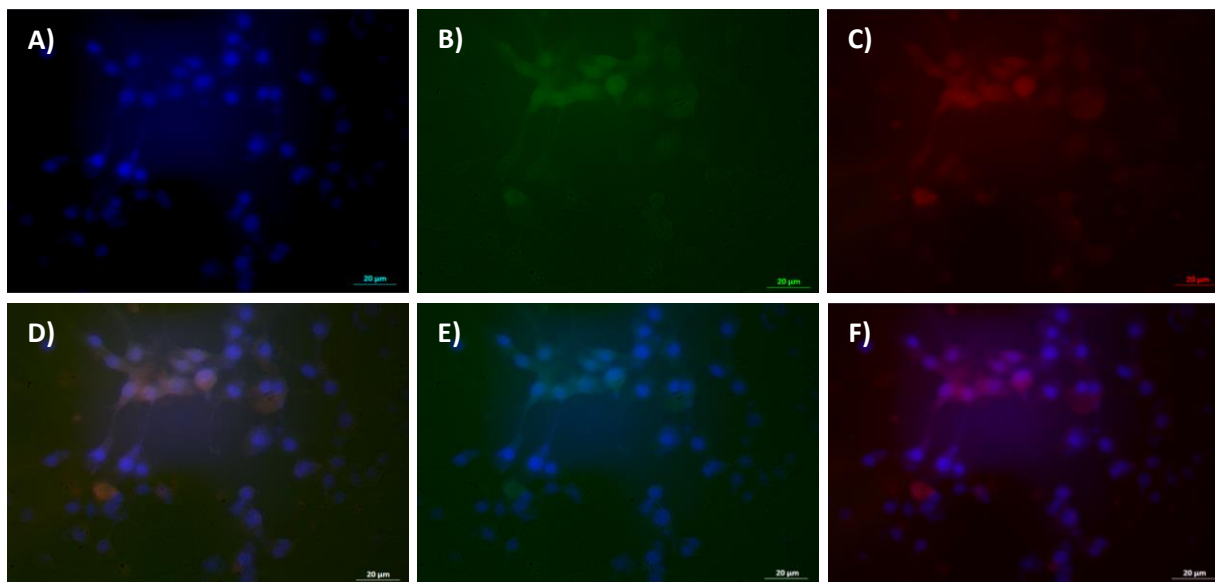


Figura 7: Imágenes de microscopia de fluorescencia de las neuronas transducidas con GFP/mCherry. A) Tinción de DAPI a 40X; B) Neuronas transducidas observadas con el filtro GFP; C) Neuronas transducidas observadas con el filtro RFP; D) MERGE DAPI, GFP y RFP; E) MERGE GFP y DAPI; F) MERGE RFP y DAPI. En azul se muestran los núcleos celulares.

8.2.3. Determinación de la concentración media citotóxica 50 del complejo B

Para optimizar el medio de cocultivo mediante la adición de un agente potenciador de la mielinización (Complejo B) fue necesario determinar la concentración del complejo B necesaria para generar un efecto terapéutico sin que fuera tan alta como para generar citotoxicidad, evaluamos la concentración de complejo B a la cual el 50% de las células se encontraba muertas, obteniendo una $CC_{50} = 5 \mu\text{g}$ de complejo B en $100 \mu\text{L}$ de medio de cultivo tal como se muestra en la **Figura 8**.

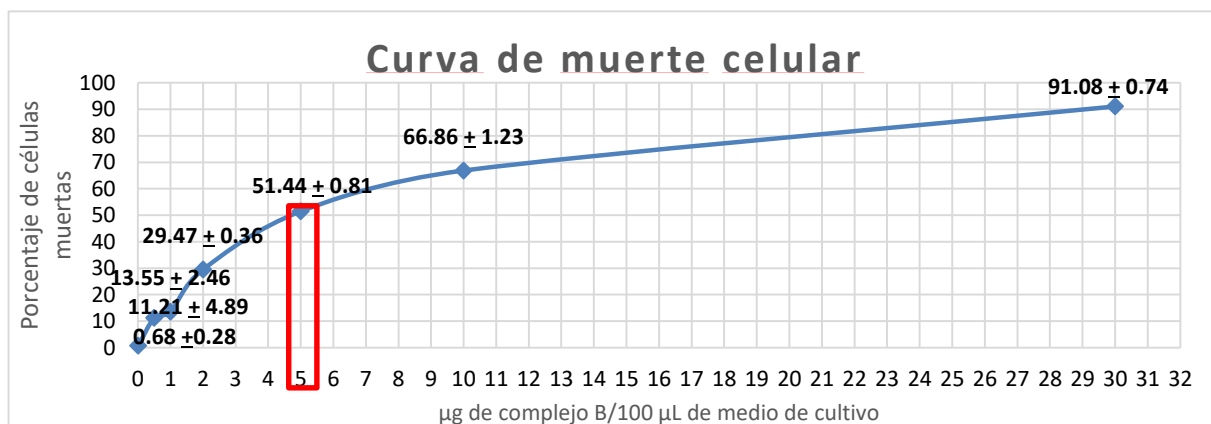


Figura 8: Curva de muerte celular por complejo B. El recuadro rojo muestra la concentración media citotóxica de complejo B.

8.2.4. Cocultivo 2D de Neuronas-Células de Schwann

Una vez determinada la concentración de complejo B que se agregaría al medio de cocultivo para potenciar la mielinización se realizó el cocultivo en 2D en presencia y ausencia del complejo B, para analizar las diferencias entre las dos condiciones con respecto a la expresión de los marcadores típicos de cada linaje (S100 y NF) y la producción de mielina (PBM) a los días 7 y 14. Para medir la expresión de los marcadores de superficie correspondientes a los linajes celulares se realizó una tinción inmunocitoquímica contra S100 para identificar las células tipo Schwann (**Figura 9**) contra NF para identificar las células de linaje neuronal (**Figura 10**) y contra PBM para evaluar la producción de mielina (**Figura 11**), donde se consideraron células positivas al marcador aquellas células que en su citoplasma presentaran una señal punteada color café, y células negativas al marcador aquellas que no presentaran dicha señal y con base al número de células positivas se calculó el porcentaje de expresión.

Para el marcador S100 se observó un aumento en la señal a los días 7 y especialmente en el día 14 en presencia de complejo B (**Figuras 9G y 9H** respectivamente) en comparación con los días 7 y 14 en ausencia de complejo B (**Figuras 9E y 9F** respectivamente), lo cual se comprobó con el cálculo del porcentaje de expresión del marcador en ambos cocultivos donde para los días 7 y 14 en ausencia de complejo B se obtuvieron $37.9\% \pm 4.14$ y $61.80\% \pm 6.23$ respectivamente tal como se observa en la **Figura 9I**, y en presencia de complejo B para los días 7 y 14 se obtuvieron $48.69\% \pm 2.33$ y $76.32\% \pm 2.37$ respectivamente como se observa en la **Figura 9J**.

En el caso de NF no se pudo observar un aumento evidente en la señal a los días 7 y 14 en presencia (**Figura 10G y 10H** respectivamente) o ausencia de complejo B (**Figura 10E y 10F** respectivamente), sin embargo al realizar el cálculo del porcentaje de expresión del marcador NF en ambos cocultivos se observó un ligero aumento en el porcentaje de expresión, donde para los días 7 y 14 en ausencia de complejo B se obtuvieron $41.87\% \pm 1.46$ y $50.70\% \pm 3.02$ respectivamente, tal como se observa en la **Figura 10I**, y como se aprecia en la **Figura 10J** en presencia de complejo B para los días 7 y 14 se obtuvieron $46.22\% \pm 2.64$ y $62.12\% \pm 2.82$ respectivamente.

La producción de mielina se evaluó con la expresión del marcador PBM, y al comparar la señal observada en la tinción inmunocitoquímica del día 7 en ausencia (**Figura 11E**) y presencia (**Figura 11G**) de complejo B no se pudo observar un aumento evidente en la

señal, sin embargo, al día 14 si se pudo apreciar un aumento de la señal en el cocultivo en presencia de complejo B (**Figura 11H**) en comparación con el cocultivo en ausencia de complejo B (**Figura 11F**). Posteriormente se realizó el cálculo del porcentaje de expresión de PBM y se encontró que para los días 7 y 14 en ausencia de complejo B como se observa en la **Figura 11I** fueron de $37.90\% \pm 4.14$ y $61.80\% \pm 6.23$ respectivamente, mientras que para el cocultivo en presencia de complejo B a los días 7 y 14 fueron mayores con $50.66\% \pm 2.33$ y $70.06\% \pm 2.37$, como se observa en la **Figura 11J**.

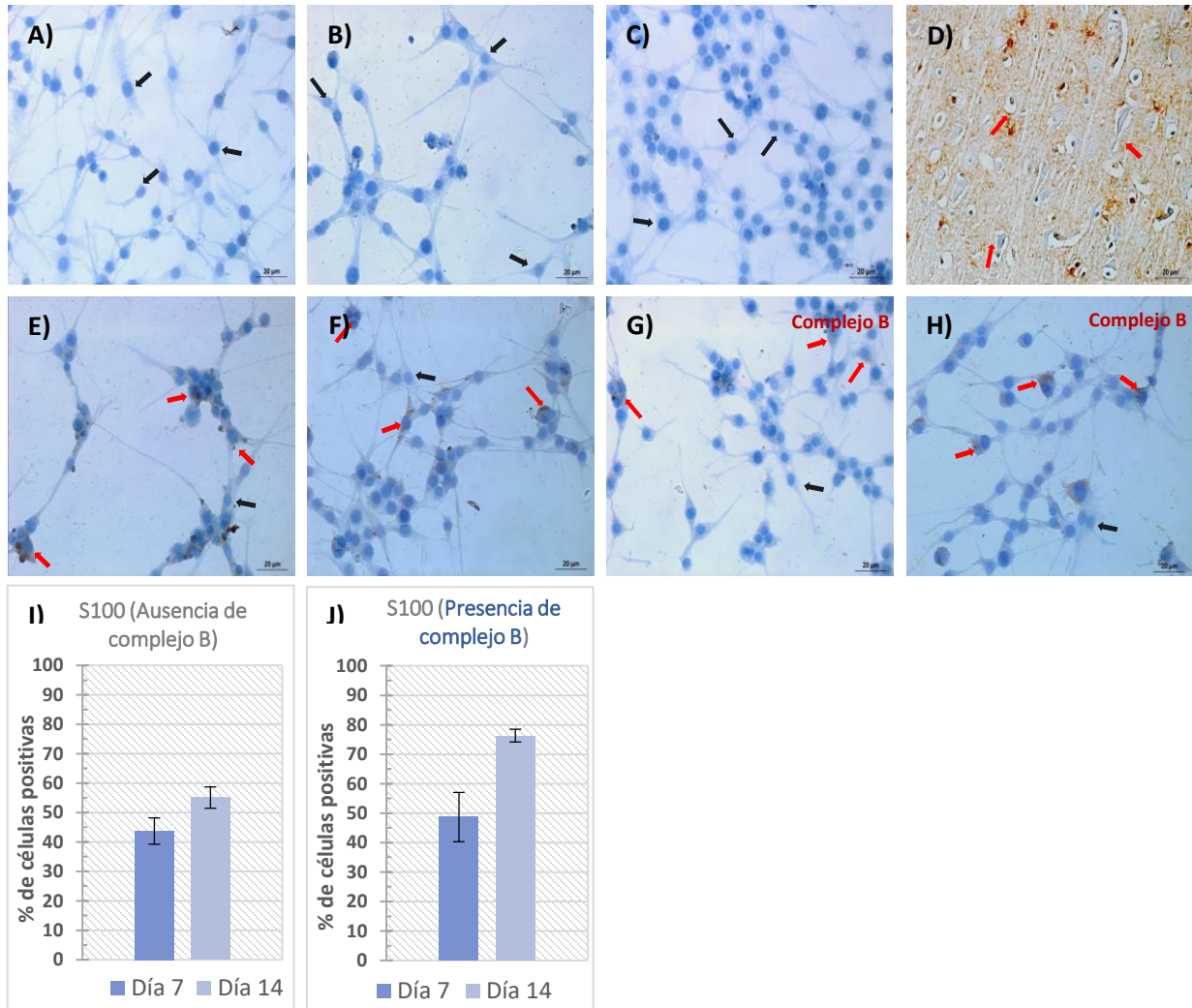


Figura 9: Caracterización de células de Schwann en cocultivo en 2D. A-H) Imágenes representativas de las tinciones inmunocitoquímicas del cocultivo de neuronas y células de schwann al día 7 y 14 en ausencia y presencia de complejo B contra el marcador S100. **A)** Control negativo (CMM-TAh); **B)** Control de técnica al día 7 (cocultivo sin anticuerpo primario); **C)** Control de técnica del día 14 (cocultivo sin anticuerpo primario); **D)** Control positivo de S100 (corte de cerebro de rata); **E-F)** Cocultivo en ausencia de complejo B. **E)** Cocultivo al día 7; **F)** Cocultivo al día 14; **G-H)** Cocultivo en presencia de Complejo B. **G)** Cocultivo al día 7; **H)** Cocultivo al día 14; **I)** Porcentaje de expresión del marcador S100 en cocultivo en ausencia de complejo B a los días 7 y 14. **J)** Porcentaje de expresión del marcador S100 en cocultivo en presencia de complejo B a los días 7 y 14; Las flechas rojas muestran las células positivas al marcador, las flechas negras muestran las células negativas al marcador.

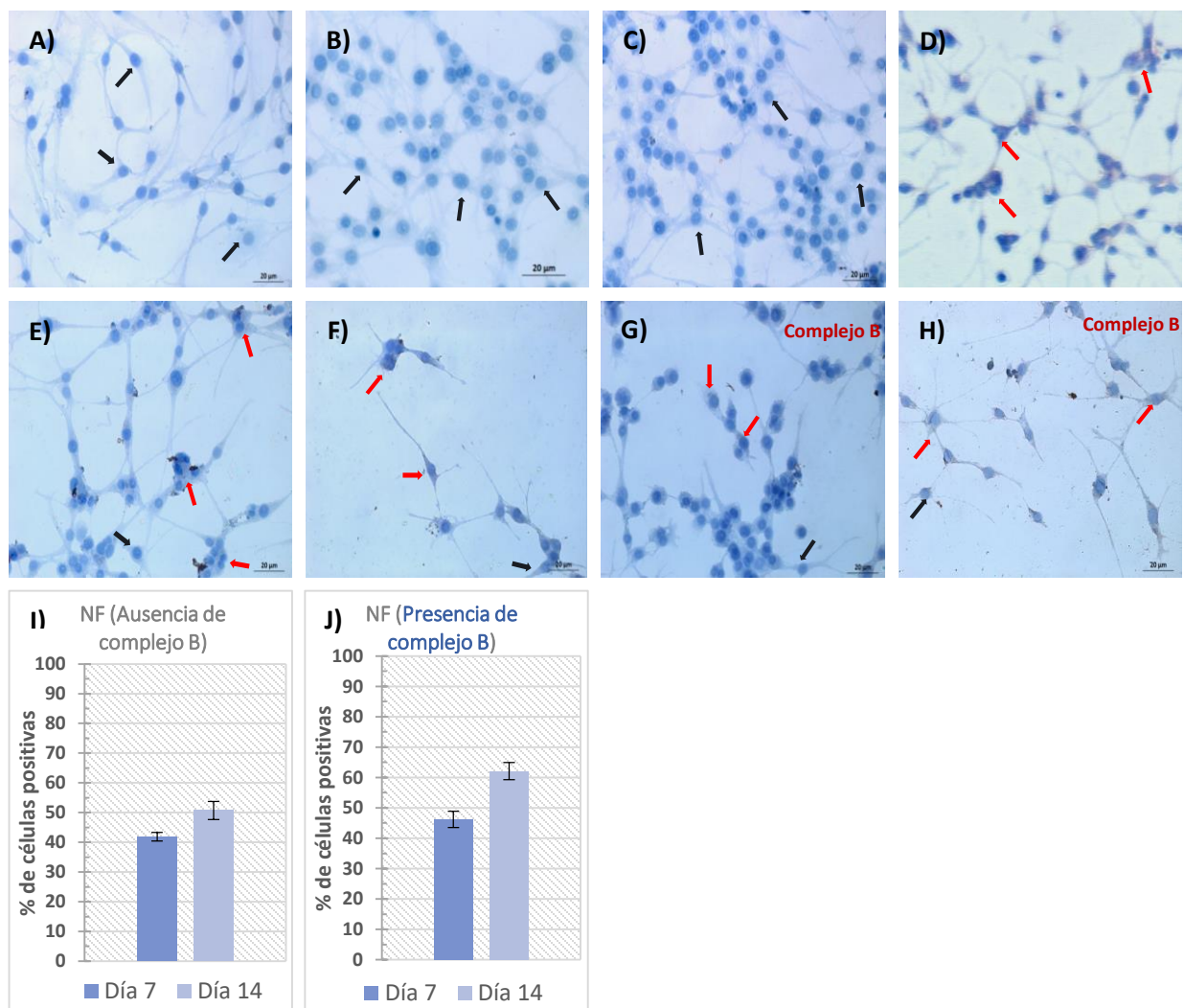


Figura 10: Caracterización de neuronas en cocultivo en 2D. A-H) Imágenes representativas de las tinciones inmunocitoquímicas del cocultivo de neuronas y células de Schwann al día 7 y 14 en ausencia y presencia de complejo B contra el marcador NF. **A)** Control negativo (CMM-TAh); **B)** Control de técnica al día 7 (cocultivo sin anticuerpo primario); **C)** Control de técnica del día 14 (cocultivo sin anticuerpo primario); **D)** Control positivo de NF (Línea celular C6); **E-F)** Cocultivo en ausencia de complejo B. **E)** Cocultivo al día 7; **F)** Cocultivo al día 14; **G-H)** Cocultivo en presencia de Complejo B. **G)** Cocultivo al día 14; **H)** Cocultivo al día 14; **I)** Porcentaje de expresión del marcador NF en cocultivo en ausencia de complejo B a los días 7 y 14. **J)** Porcentaje de expresión del marcador NF en cocultivo en presencia de complejo B a los días 7 y 14; Las flechas rojas muestran las células positivas al marcador, las flechas negras muestran las células negativas al marcador.

Para evaluar si existían diferencias significativas en la expresión de los marcadores típicos de células de Schwann (S100), neuronas (NF) y producción de mielina (PBM) entre los cocultivos con o sin complejo B. Se realizó una prueba de t (**Figura 12**) y se encontró que para el marcador PBM solo se apreciaron diferencias al día 7 tal y como se aprecia en la **Figura 12A**, para S100 en el día 7 no se encontraban diferencias significativas entre la ausencia o presencia de complejo B, ya que presentó un valor de $p = 0.803$, mientras que en el día 14 si se encontraron diferencias significativas entre ambas condiciones como se

observa en la **Figura 12B**, con un valor de $p < 0.001$. Finalmente se realizó una prueba de t para evaluar si existían diferencias significativas en la expresión de NF entre los cocultivos con o sin complejo B (**Figura 12C**) sin embargo, para ningún día se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y los pValue para el día 7 y 14 fueron de 0.1218 y 0.0745 respectivamente.

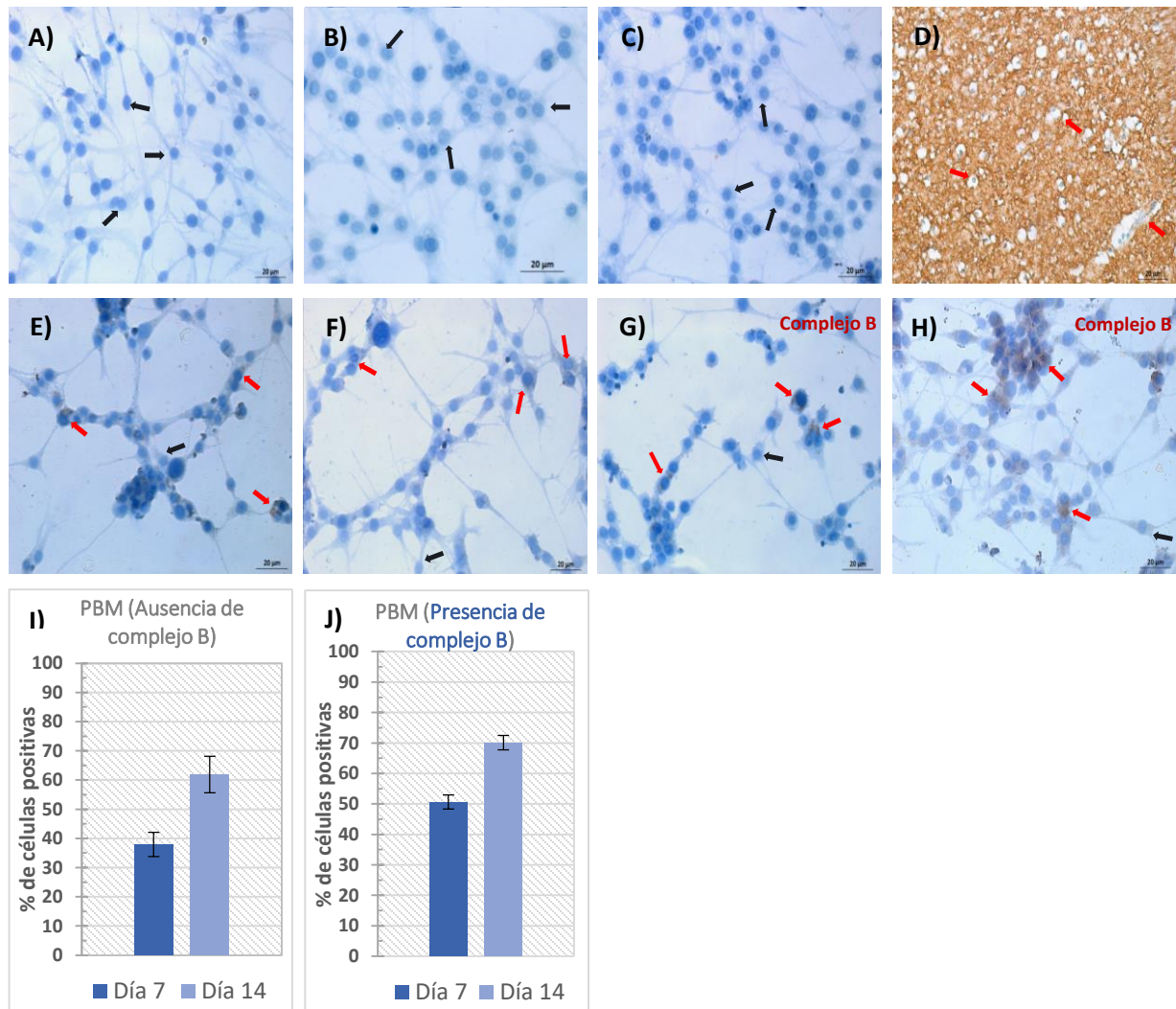


Figura 11: Caracterización de la producción de mielina en cocultivo en 2D. A-H) Imágenes representativas de las tinciones inmunocitoquímicas del cocultivo de neuronas y células de schwann al día 7 y 14 en ausencia y presencia de complejo B contra el marcador PBM. **A)** Control negativo (CMM-TAh); **B)** Control de técnica al día 7 (cocultivo sin anticuerpo primario); **C)** Control de técnica del día 14 (cocultivo sin anticuerpo primario); **D)** Control positivo de PBM (corte de cerebro de rata); **E-F)** Cocultivo en ausencia de complejo B. **E)** Cocultivo al día 7; **F)** Cocultivo al día 14; **G-H)** Cocultivo en presencia de Complejo B. **G)** Cocultivo al día 14; **H)** Cocultivo al día 14; **I)** Porcentaje de expresión del marcador PBM en cocultivo en ausencia de complejo B a los días 7 y 14. **J)** Porcentaje de expresión del marcador PBM en cocultivo en presencia de complejo B a los días 7 y 14; Las flechas rojas muestran las células positivas al marcador, las flechas negras muestran las células negativas al marcador.

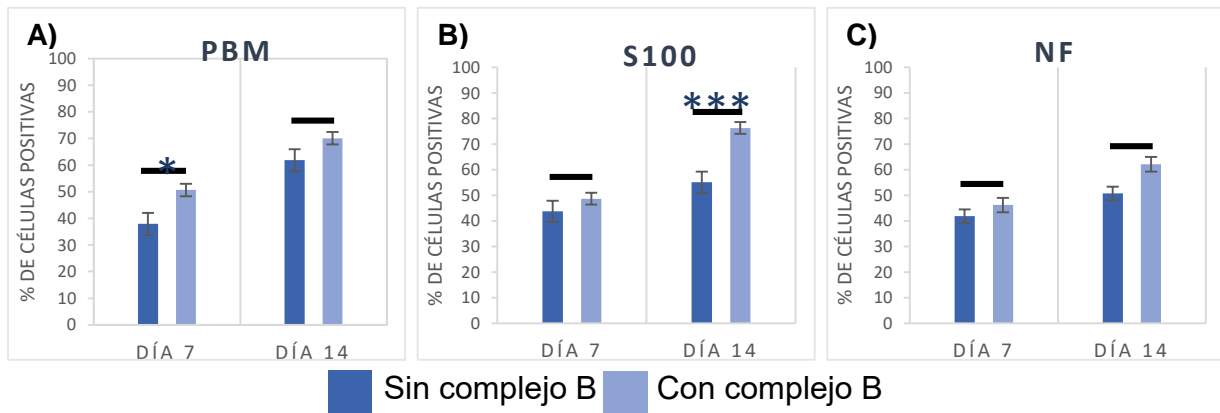


Figura 12: Prueba de t para la expresión de los marcadores PBM, S100 y NF en cocultivo en presencia o ausencia de complejo B a los 7 y 14 días de cocultivo. A) Prueba de t para la expresión de PBM en cocultivo; B) Prueba de t para la expresión de S100 en cocultivo; C) Prueba de t para la expresión de NF en cocultivo. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos.

8.2.5. Cocultivo en andamio

Una vez caracterizado el cocultivo, tanto en ausencia como en presencia de complejo B se procedió a realizar ahora el cocultivo en el andamio de nervio descelularizado, para medir la cantidad de mielina que el cocultivo era capaz de producir. Sin embargo, antes de caracterizar el cocultivo en andamio se realizó una tinción de H&E para verificar la recelularización del andamio. En las **Figuras 13A a 13D** se puede observar a los días 3 y 7 en color morado, los núcleos celulares teñidos con hematoxilina, por lo que a partir de tal evidencia podemos asegurar que el andamio fue correctamente recelularizado.

Posteriormente para ver si se podía detectar el linaje neuronal, el cual en estudios pasados no pudo detectarse dentro del andamio, se realizó una tinción de DAPI y se observó con microscopia de fluorescencia con el filtro de RFP para detectar las neuronas que expresaban los genes reporteros GFP y mCherry y se realizó el merge de las imágenes DAPI y RFP, como se aprecia en las **Figuras 13E a 13H** se observa una señal azul, la cual corresponde a los núcleos de las células teñidas con DAPI, además se puede observar señal fluorescente color rojo, la cual es emitida por las neuronas transducidas que expresaran mCherry, por lo que con base en las imágenes podemos garantizar de que se pudo detectar con éxito el linaje neuronal dentro del andamio a los días 3 y 7 en presencia y ausencia de complejo B.

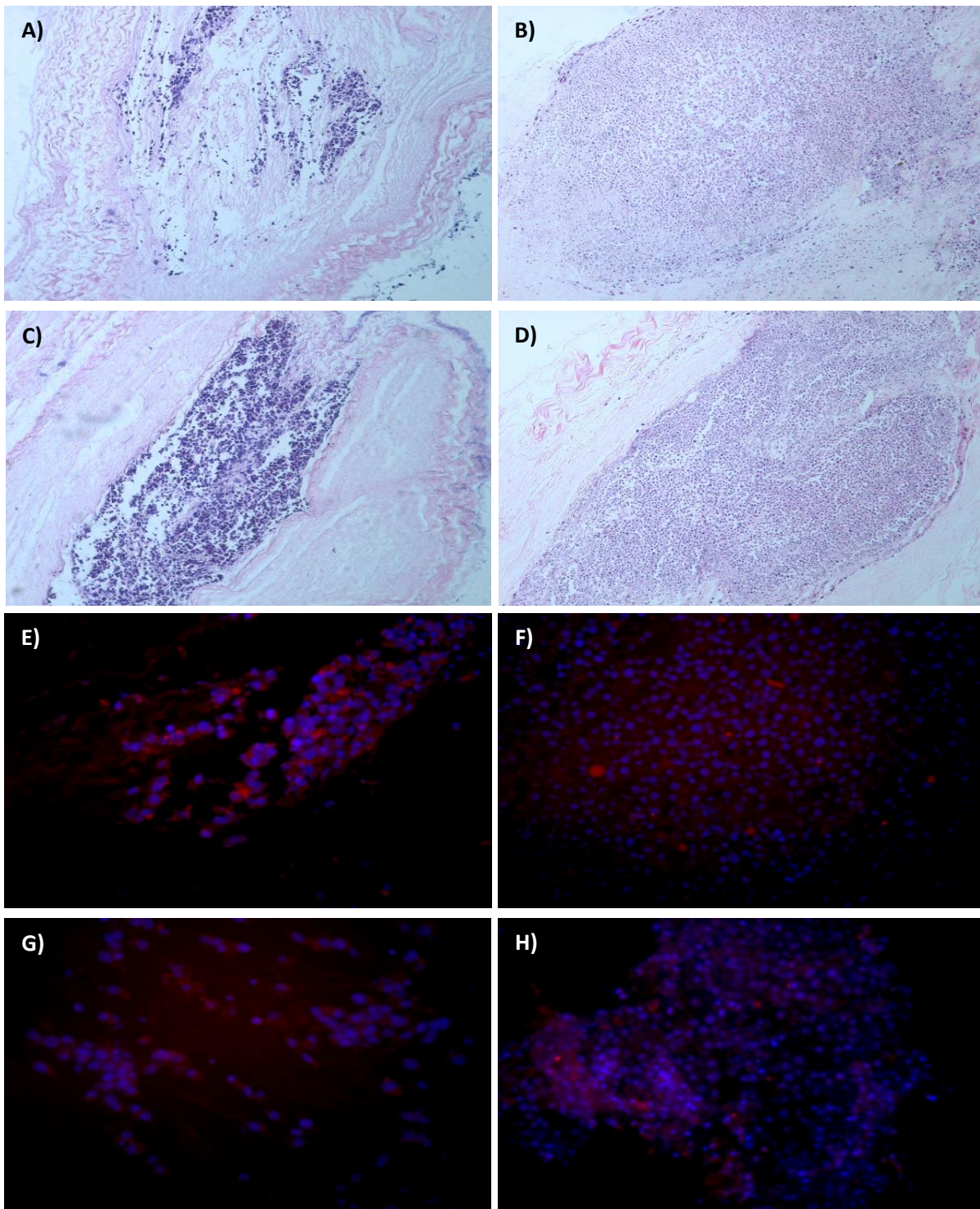


Figura 13: Pruebas de recellularización del andamio. A-D) Tinciones de H&E a 10X del andamio recelularizado. **A)** Día 3 en ausencia de complejo B; **B)** Día 3 en presencia de complejo B; **C)** Día 7 en ausencia de complejo B; **D)** Día 7 en presencia de complejo B; En morado se observan los núcleos celulares teñidos. **E-H)** Merge 10X DAPI-RFP del andamio recelularizado. **E)** Día 3 en ausencia de complejo B; **F)** Día 3 en presencia de complejo B; **G)** Día 7 en ausencia de complejo B; **H)** Día 7 en presencia de complejo B. En azul se observan los núcleos celulares tejidos con DAPI y en rojo se observan las neuronas que expresan GFP/mCherry.

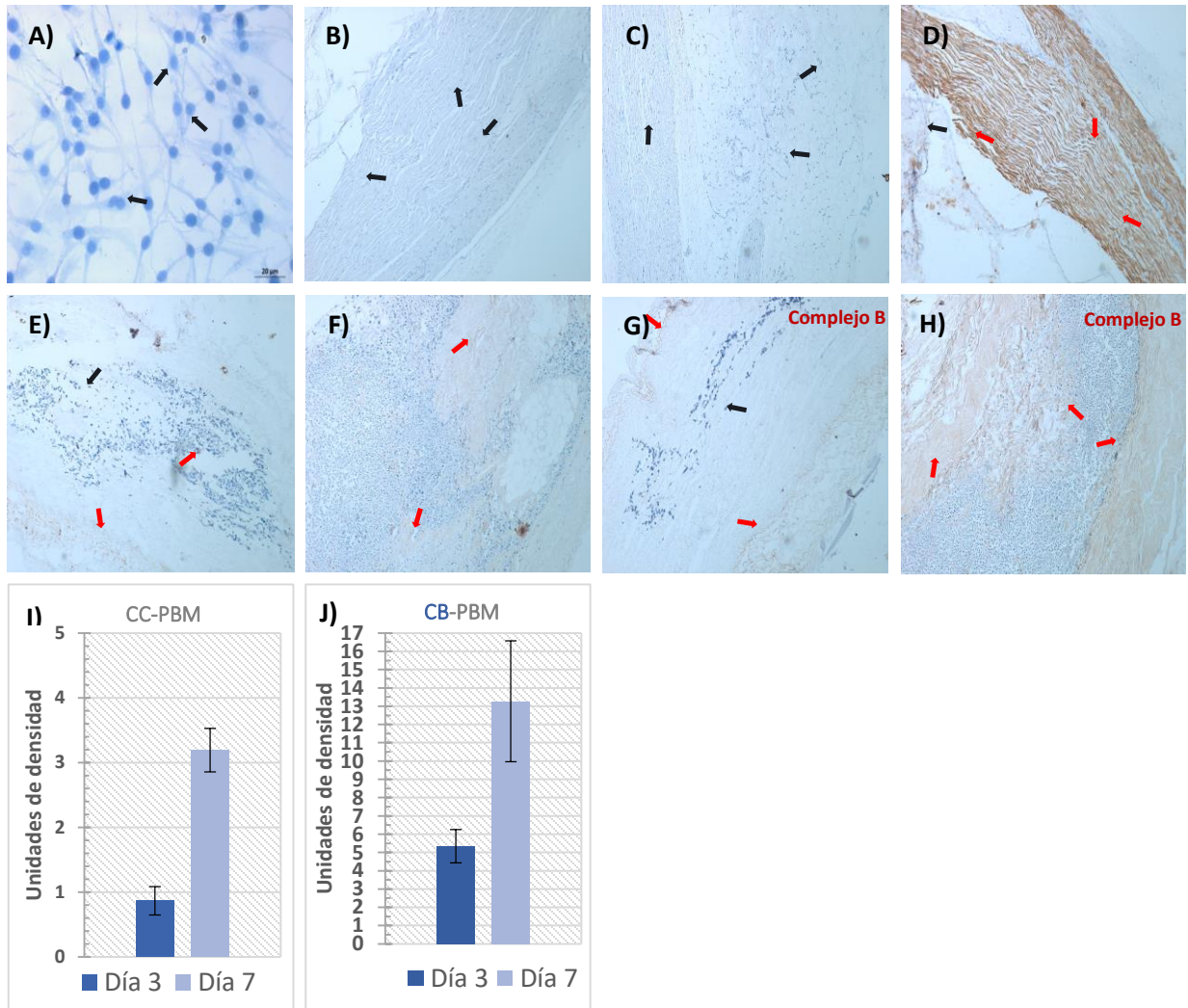


Figura 14: Caracterización de la producción de mielina del cocultivo en andamio. A-H) Imágenes representativas de las tinciones inmunohistoquímicas del cocultivo en andamio al día 3 y 7 en ausencia y presencia de complejo B contra el marcador PBM. **A)** Control negativo (CMM-TAh); **B)** Control de técnica al día 3 (andamio recelularizado sin anticuerpo primario); **C)** Control de técnica del día 7 (andamio recelularizado sin anticuerpo primario); **D)** Control positivo de PBM (corte de nervio ciático de rata); **E-F)** Cocultivo en andamio en ausencia de complejo B. **E)** Andamio recelularizado al día 3; **F)** Andamio recelularizado al día 7; **G-H)** Cocultivo en andamio en presencia de Complejo B. **G)** Andamio recelularizado al día 3; **H)** Andamio recelularizado al día 7; **I)** Unidades de densidad de mielina en ausencia de complejo B a los días 3 y 7; **J)** Unidades de densidad de mielina en presencia de complejo B a los días 3 y 7; Las flechas rojas muestran las células positivas al marcador, las flechas negras muestran las células negativas al marcador.

Una vez que se logró comprobar la correcta recelularización del andamio y la detección de los linajes celulares se realizó una caracterización inmunohistoquímica contra PBM para evaluar la cantidad de mielina producida por el cocultivo en el andamio (**Figura 14A a 14H**), a partir de las inmunohistoquímicas se calcularon las unidades de densidad de mielina en el andamio y posteriormente se le restó las unidades de mielina que se habían determinado que el andamio poseía (**Figura 6N**) para obtener la cantidad de mielina generada por el

cocultivo, en ausencia de complejo B al día 3 se obtuvieron 0.8664 ± 0.22 unidades de densidad, mientras que al día 7 en ausencia de complejo B se obtuvieron 3.1927 ± 0.33 unidades, tal como se observa en la **Figura 14I**, en presencia de complejo B los valores se muestran en la **Figura 14J** al día 3 se obtuvieron 5.34 ± 0.90 unidades de densidad y al día 7 un total de 13.2630 ± 3.03 unidades de densidad de mielina. Posteriormente para identificar si había diferencias significativas en relación con el tratamiento con complejo B se realizó una prueba de t. La prueba demostró que en ambos días se presentaban diferencias significativas al añadir complejo B como se observa en la **Figura 15**, donde al día 3 se obtuvo un valor de $p = 0.0011$ y al día una $p = 0.0006$. Posteriormente se compararon los resultados con los datos de cocultivo de oligodendrocitos y neuronas y se observó que para el día 3 el cocultivo de oligodendrocitos y neuronas presento más unidades de densidad de mielina que los otros cocultivos, sin embargo al día 7 el cocultivo de células de Schwann y neuronas en presencia de complejo B presenta el valor más alto que todos los grupos y en comparación con el control de nervio sin descellularizar el valor del cocultivo con complejo B se aproxima al 50% del nervio, por lo que podemos comprobar que al añadir complejo B se mejora 4.5 veces la mielinización y al sustituir los oligodendrocitos por células de Schwann y complejo B se potencia la mielinización en el andamio alrededor de 1.8 veces aproximadamente (**Figura 16**).

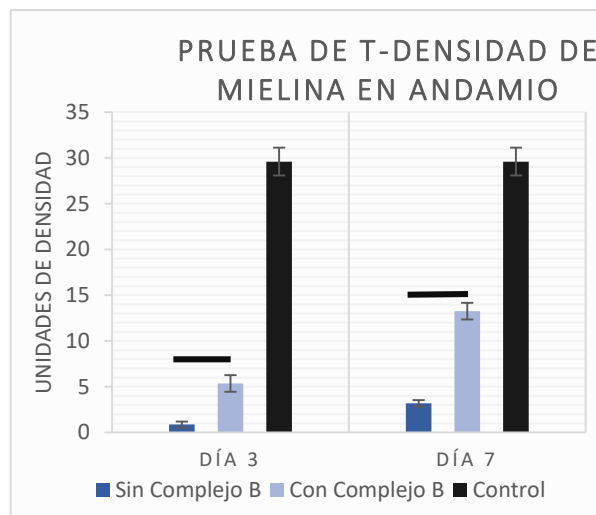


Figura 15: Niveles de mielina en el andamio. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos.

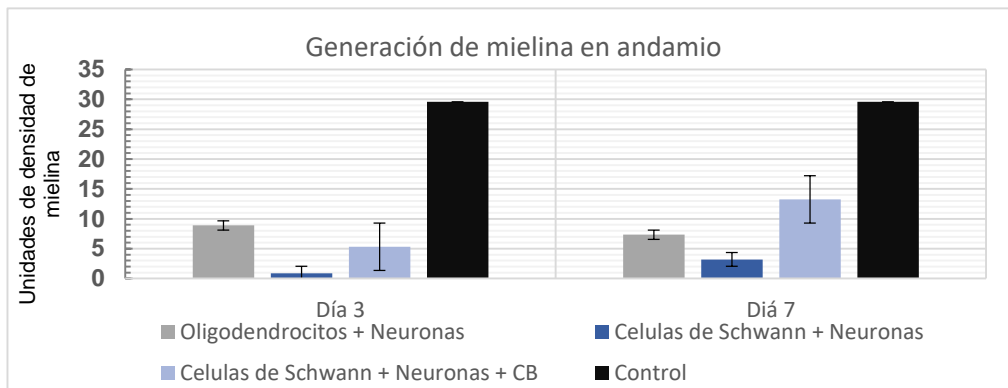


Figura 16: Comparación del cocultivo de *Células de Schwann* y *Neuronas* contra el cocultivo de *oligodendrocitos + Neuronas*.

9. DISCUSIÓN

La capacidad de las CMM de poder diferenciarse en determinados linajes específicos y la facilidad de expandir los cultivos *in vitro* vuelven a este tipo de células como blancos terapéuticos potenciales de la medicina regenerativa. Estas células pueden aislarse de diferentes fuentes, como son cordón umbilical, medula ósea y el tejido adiposo, sin embargo, debido a la facilidad de obtención del tejido adiposo se prefiere esta fuente como la principal para la obtención de CMM.

Se aislaron CMM a partir de tejido adiposo y estas fueron expandidas *in vitro*, como se observa en la **Figura 3A** las células aisladas presentaron una morfología tipo fibroblastoide, este tipo de morfología coincide con lo reportado por Arévalo Romero et al., (2007) y Huang et al., (2007) para CMM. Además, como se observa en la **Figura 3B** las células presentaron expresión de los marcadores CD34, CD90 y CD105, como lo reportado por Lin et al., (2012) y Strem et al., (2005), con lo cual se pudo confirmar la identidad de las células como CMM-TAh. Aunque se sabe que CD34 es un marcador negativo para CMM-TAh y a pesar de que los resultados muestran un 99% de positividad Lin et al., (2012) establece que este marcador es positivo en cultivos frescos de CMM-TAh recién aislados y que con la propagación *in vitro* la expresión de CD34 comienza a disminuir hasta perderse según las condiciones de cultivo. Debido a que la caracterización se realizó con células de pases tempranos es normal observar la expresión de este marcador (C. S. Lin *et al.*, 2012).

Uno de los objetivos de este trabajo fue la diferenciación de las CMM-TAh en poblaciones de células tipo neuronas y células de Schwann, la diferenciación a células tipo Schwann se muestra en la **Figura 4** puede observarse células con morfología tipo huso que corresponde con lo expuesto por Caddick et al., (2006), la cual se observa en cultivos de células de Schwann aisladas de nervio y en cultivos de CMM-TAh diferenciadas a células tipo Schwann (Caddick *et al.*, 2006; Kingham *et al.*, 2007). La caracterización inmunocitoquímica contra los marcadores S100, GFAP y PBM se muestra en la **Figura 4L** donde se puede apreciar el porcentaje de expresión de los marcadores de las células diferenciadas. El marcador GFAP es un marcador de células gliales que junto a S100 son marcadores de células de Schwann (Caddick *et al.*, 2006; Kingham *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2017). El porcentaje de expresión de los marcadores difiere, ya que GFAP es de casi 100% de células positivas mientras que el de S100 es aproximadamente 62%. Tales resultados parecen indicar que existe una fracción de células que aún no se han diferenciado a células

de Schwann o se encuentran en un estado inmaduro, ya que se sabe que los precursores de las células de Schwann no expresan S100 y las células de Schwann inmaduras expresan muy poco o no expresan S100 (Liu *et al.*, 2015). Se sabe que dentro de las poblaciones de células de Schwann hay poblaciones productoras de mielina y hay otra población que no produce mielina (loghen *et al.*, 2020). Para identificar el porcentaje de la población de células tipo Schwann que son productoras de mielina se utilizó el marcador PBM y se observó que un 76% de las células diferenciadas eran productoras de mielina, sin embargo al considerar las desviaciones estándar y los resultados obtenidos con el marcador S100 no se encontraron diferencias significativas entre la expresión de ambos marcadores como era de esperarse, y las diferencias entre la expresión pueden deberse a diferencias entre los campos observados y el número de células en estos. Por lo que puede inferirse que todas las células diferenciadas son células productoras de mielina.

La diferenciación a neuronas se observa en la **Figura 5A y 5B**, encontrando que las células presentaron un patrón de crecimiento tipo red, lo cual concuerda con lo reportado por Babaloo *et al.*, (2019), que aunque utilizó otro método de diferenciación de CMM obtuvo un patrón de crecimiento similar. Al observar las células que se encontraban más separadas del resto de las células se pudo observar que estas cambiaron su morfología de fibroblastoide a neuronal tipo I y II, tal como se observa en las **Figuras 5C a 5F**, tal morfología se asemeja a la reportada por Babaloo *et al.*, (2019), Jang *et al.*, (2010) y Safford *et al.*, (2002). Para confirmar la identidad de las células diferenciadas se realizó una inmunotinción contra neurofilamento, una proteína característica del citoesqueleto de las neuronas maduras en el sistema nervioso (Gafson *et al.*, 2020), el porcentaje de células positivas al marcador fue de 35.42% como se observa en la **Figura 5K**, el cual se asemeja con el trabajo de Jang *et al.*, (2010) quien fue el autor original del método de diferenciación que se utilizó en este trabajo.

Se ha propuesto que una vez que se desee la implantación de las células, el beneficio terapéutico muchas veces se ve limitado por la cantidad de células utilizadas, el sitio de implantación y el microambiente que se tiene en el sitio de la lesión por lo que dentro de los abordajes recientes se ha explorado el uso de andamios. En el presente trabajo utilizamos como andamio nervio periférico descelularizado. Este fue descelularizado mediante diferentes detergentes y se validó mediante las tinciones de H&E y DAPI (**Figuras 6A-H**), logrando una eliminación del componente celular en una tasa superior al 90%, resultados que concuerdan con métodos publicados por otros autores (García-Pérez *et al.*, 2017;

Soury *et al.*, 2021; Zaminy *et al.*, 2021). La evaluación de los niveles de mielina se observa en la **Figura 6N**, donde posterior al proceso de descelularización se eliminó del andamio aproximadamente el 96.42% de la mielina, lo que concuerda con los reportes de García-Pérez *et al.*, (2017) donde se observó una evidente disminución de la presencia de mielina en las inmunohistoquímicas contra PBM (García-Pérez *et al.*, 2017; Soury *et al.*, 2021).

La expresión de un gen reportero es una herramienta muy útil, ya que nos permite detectar las células en un andamio o tejido y poder diferenciarlas de otras células. Con base en la **Figura 7** el porcentaje de transducción calculado se asemeja a lo reportado por P. Lin y cols (P. Lin *et al.*, 2012) para CMM-TAh donde obtuvo casi el 50% de células transducidas con condiciones similares a las de nuestro protocolo, sin embargo Ding & Kilpatrick, (2013) reportan un 85% para neuronas primarias, la diferencia puede deberse al tipo celular, ya que ellos utilizan neuronas que aislaron del cerebro y nuestras células eran neuronas derivadas de CMM-TAh (P. Lin *et al.*, 2012; Ding and Kilpatrick, 2013). En sus reportes P. Lin y cols. (P. Lin *et al.*, 2012) prueban diferentes MOI y observan que al aumentar a una MOI =10 se obtiene un porcentaje aproximado del 60% de transducción, y al aumentarla a MOI=50 logran casi el 100%, por lo que para mejorar el porcentaje de transducción en futuros ensayos es mejor estandarizar las MOI para el linaje celular utilizado ya que puede variar dependiendo el tipo celular utilizado.

A la fecha existe diferentes factores que potencian la actividad mielinizante como son los inhibidores de la γ -secretasa, biotina, y coenzima Q10 (Hyung *et al.*, 2015; Lariosa-Willingham *et al.*, 2016; Cui *et al.*, 2020), nosotros nos enfocamos en optimizar un medio de cocultivo previamente utilizado para potenciar la actividad mielinizante de células tipo neuronas y oligodendrocitos diferenciados a partir de CMM-TAh mediante la adición de un potenciador de la mielinización, en este caso el complejo B. Para ello, determinamos la CC50 fue de 5 μ g de complejo B/100 μ L de medio de cultivo, sin embargo en otros estudios se ha reportado que se pueden usar hasta 100 μ g/mL de Vitamina B (Yang, Peng and Hu, 2013), tal diferencia puede deberse al origen y naturaleza de las CMM usadas ya que en nuestro trabajo utilizamos CMM-TAh y los autores utilizaron CMM de hueso de rata, sin embargo considerando nuestra curva de muerte celular a la concentración de 100 μ g/mL de Vitamina B no hay mucha variación con 50 μ g/mL ya que es aproximadamente 10% de diferencia, por lo que sería prometedor utilizar dicha concentración y observar las diferencias en el cocultivo posterior.

Para caracterizar el cocultivo de neuronas y células de Schwann en presencia y ausencia de complejo B se evaluó el marcador S100 para analizar cómo es que el tratamiento con complejo B afectaba la fracción de células de Schwann en el cocultivo a diferentes días, como se observa en las **Figuras 9I y 9J** el porcentaje de expresión del marcador aumentó conforme pasaba los días de cocultivo, y al comparar los resultados se observa claramente que al añadir el complejo B al cocultivo los niveles de expresión superan al cocultivo sin complejo B y en la prueba t de Student se encontraron diferencias significativas solamente al día 14 (**Figura 12B**), con lo que se podría comprobar el papel que juega el complejo B como adyuvante en la maduración de las células de Schwann en el SNP (Scalabrino, 2009).

El siguiente marcador que se evaluó es el marcador NF para analizar como el cocultivo en presencia o ausencia de complejo B afectaba al linaje neuronal. En las **Figuras 10I y 10J** se observa que al igual que en el caso de S100 el porcentaje de expresión del marcador aumente conforme avanza el tiempo de cocultivo, por lo que se puede inferir que la condición de cocultivo por si sola ayuda a la diferenciación y maduración de las neuronas, lo cual se ve reflejado en el ligero aumento de la expresión del marcador típico del linaje neuronal, lo que concuerda con lo expuesto por Babaloo et al., (2019) para el proceso de diferenciación de CMM de endometrio humano a células tipo neuronas cultivándolas con células de Schwann y con lo expuesto por (Hyung *et al.*, 2015) para el cocultivo de neuronas motoras y células de Schwann. Sin embargo aunque al añadir complejo B los valores aumentaron ligeramente al realizar la prueba de t de Student no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (**Figura 12C**), esto podría deberse a que como ya se sabe uno de los principales papeles del complejo B en el sistema nervioso es mantenimiento y generación de las vainas de mielina que se relaciona directamente con la maduración de las células mielinizantes (células de Schwann y oligodendrocitos) y lo referente a las neuronas se ve más relacionado a la intercomunicación neuronal que se refleja en la producción de compuestos y moléculas relacionados con la sinapsis (Scalabrino, 2009).

El último marcador que se evaluó en el cocultivo en 2D fue el marcador de producción de mielina, PBM, al igual que con S100 y NF la expresión de este marcador parece aumentar

con el tiempo, ya sea en presencia o ausencia del complejo B tal y como se observa en las **Figuras 11I y 11J**, lo cual concuerda con los trabajos de Hyung y Nishimoto (Hyung *et al.*, 2015; Nishimoto *et al.*, 2015), al comparar la expresión del cocultivo en ausencia de complejo B con el cocultivo en presencia de complejo B (**Figura 12A**) se observó que al añadir el complejo B la expresión de PBM aumentó considerablemente en ambos días, sin embargo en la prueba de t de Student solo al día 7 se observaron diferencias significativas, lo cual concuerda con lo reportado por Nishimoto *et al.*, (2015) donde encontró que a partir del día 7 el cocultivo de células de Schwann y neuronas motoras en presencia de Metilcobalamina (componente del complejo B) presentaba diferencias significativas en cuanto a la expresión de PBM en comparación con el control sin complejo B, comprobando el papel del complejo B en la inducción de la producción de mielina por parte de las células de Schwann (Scalabrino, 2009). Existen diversos marcadores típicos de los linajes de neuronas y células de Schwann, de los cuales la expresión varía de acuerdo con el grado de diferenciación que las células presentan. Para neuronas inmaduras se encuentran los marcadores NeuroD1, olig2, PLP, y en el caso de neuronas maduras NF-L, NF-H y Tuj-1 (Jang *et al.*, 2010). En el caso de las células de Schwann mielinizantes los marcadores SOX10 y MPZ ayudan a identificarlas (Jessen, Mirsky and Lloyd, 2015; Liu *et al.*, 2015) mientras que las células precursoras de células de Schwann expresan GAP43 y Dhh y las células de Schwann no mielinizantes presentan los marcadores NCAM y P75NR (Liu *et al.*, 2015). Para futuros estudios sería recomendable ver el grado de maduración que ha sido alcanzado a los diferentes tiempos del cultivo. Además, incluir el análisis de los marcadores de CMM-TAh CD34, CD90 y CD105 (Strem *et al.*, 2005) para identificar la población de células no diferenciadas que se tienen en el andamio. Conocer la expresión de los marcadores previamente mencionados nos permitiría seguir el proceso de diferenciación, analizando en que etapas los marcadores comienzan a expresarse, tal como los trabajos de Curran, Chen, & Hunt, (2006) y así poder mejorar y potenciar la actividad de los linajes que se deseaba diferenciar. La medición de los marcadores también nos permitiría analizar en que etapas el tratamiento con complejo B comienza a producir diferencias significativas en la expresión mejorando la diferenciación celular y la producción de mielina. Para futuros estudios se recomienda también evaluar otros linajes neuronales como los astrocitos, que expresan S100b (Zhou *et al.*, 2015), que se sabe que juegan un papel en la progresión de la LME.

Una vez realizado el cocultivo en el andamio se utilizó la microscopía de fluorescencia poder localizar ambos linajes dentro del andamio, ya que en trabajos anteriores de nuestro grupo

de investigación en un modelo de neuronas y oligodendrocitos sembrados en un andamio igual al nuestro no pudieron identificar exitosamente los linajes celulares por medio de inmunotinciones. En el presente estudio logramos la detección de las células tipo neuronas que se distribuyeron uniformemente en el nervio descellularizado encontrándose una señal más intensa en el centro del nervio. Logramos detectar las neuronas hasta 7-10 días posteriores al tiempo en que fueron procesados los nervios y esto concuerda con los resultados obtenidos previamente en nuestro grupo, donde después de 40 días se detectó la señal fluorescente de mCherry. La señal de fluorescencia de GFP en el andamio presentó mucho ruido de fondo y esto pudo deberse a los residuos de parafina que suelen encontrarse en los tejidos que son sometidos a la técnica histológica (Kajimura *et al.*, 2016); se sabe que GFP es una proteína pequeña la cual se pierde fácilmente en las células y/o tejidos, ya que puede ser arrastrada por algunos solventes utilizados en la fijación y en la técnica histológica, lo que se asocia con interferencia a la hora de observar la señal (Nybo, 2012). Como punto de mejora para optimizar la señal de fluorescencia en el andamio sugerimos cambiar el método de fijación para evaluar la señal de GFP por parte de las neuronas, además se pudiera utilizar un vector para identificar a las células de Schwann mediante la expresión de un gen reportero y así poder analizar la interacción de ambos linajes en el andamio, y en un futuro al implantar el andamio en un modelo animal lograr analizar la migración e integración de las células al tejido.

Al analizar la producción de mielina por parte del cocultivo en el andamio logramos observar que el cocultivo en andamio en presencia de complejo B presentó mayores valores de densidad de mielina en comparación con el cocultivo en andamio sin complejo B, tal como se observa en la **Figura 14I** y **14J**. Al realizar la prueba de t de Student (**Figura 15**) se observó que a los días 3 y 7 había diferencias muy significativas entre los tratamientos, especialmente al día 7, lo que concuerda con lo reportado por Nishimoto *et al.*, (2015) para la producción significativa de mielina por parte de un cocultivo de neuronas motoras y células de Schwann en nervio periférico *in vivo* que comienza a partir del día 7 en presencia de complejo B. Al comparar los resultados obtenidos con el control de nervio sin descellularizar y los datos obtenidos del cocultivo en andamio de oligodendrocitos y neuronas (datos experimentales no mostrados) en la **Figura 16** logramos observar al día 3 que el mejor tratamiento con el mayor nivel de mielinización es el cocultivo de oligodendrocitos y neuronas, que presentó un 30% de mielinización al contrastar con el control de nervio nativo (control del 100% de mielinización), mientras que el cocultivo de neuronas y células de Schwann por sí solo mieliniza un 3% y el cocultivo con complejo B

un 16%. En el día 7 de cocultivo el mejor tratamiento fue el cocultivo de neuronas y células de Schwann en presencia de complejo B ya que mieliniza aproximadamente un 45% en comparación con el control de 100%, mientras que el cocultivo de neuronas y células de Schwann por si solo mieliniza aproximadamente un 10% y el cocultivo de oligodendrocitos y neuronas un 24%. Analizando los resultados podemos determinar que nuestro modelo de mielinización *in vitro* a base del cocultivo de neuronas y células de Schwann en presencia de complejo B es el mejor tratamiento ya que supera aproximadamente 1.5 veces la mielinización del cocultivo de neuronas y oligodendrocitos y aproximadamente 4.15 veces la mielinización del cocultivo en ausencia de complejo B, sin embargo aún es necesario evaluar más días de cocultivo para poder determinar con exactitud el comportamiento del cocultivo en el andamio.

Existen diversos puntos de mejora en nuestro modelo, así como algunos estudios que aún son necesarios para poder caracterizar completamente nuestro modelo de cocultivo, por ejemplo para poder calcular la eficacia de la mejora de la diferenciación bajo la condición de cocultivo y poderla comparar con los protocolos de diferenciación utilizados en este trabajo es necesario repetir los experimentos de cocultivo en formato de placa tipo transwell, asemejando la condición de cocultivo, pero con los linajes celulares separados por una barrera física semipermeable, de tal forma que solo los factores y productos metabólicos liberados por ambos linajes celulares puedan estar en contacto con el linaje contrario en el medio de cocultivo, así como en los trabajos reportados por Babaloo *et al.*, (2019) y Hyung *et al.*, (2021).

En nuestro modelo los factores de diferenciación son añadidos de forma exógena en el medio de cocultivo, sin embargo, durante el cultivo son liberados diversos factores que ayudan a la diferenciación celular *in vitro*. En algunos biomateriales especialmente aquellos que han sufrido un proceso de descelularización quedan remanentes de algunos componentes celulares así como algunos factores que pueden afectar los procesos de mielinización y diferenciación celular dentro del cocultivo (Porzionato *et al.*, 2018), por lo que es necesario caracterizar dicha fracción de componentes en el andamio para evaluar si la naturaleza de éste afecta significativamente los procesos del cocultivo una vez que las células han sido sembradas, y así distinguir como afecta cada uno de los factores involucrados (andamio, complejo B, y cocultivo) al modelo general de mielinización *in vitro*.

El modelo propuesto se basa en las propiedades del nervio periférico y sus similitudes estructurales con el SNC, por lo que la implantación quirúrgica pretende ser un reto en el

futuro, debido a esto es necesario explorar la posibilidad de modificar el andamio sin cambiar su naturaleza, de manera que pueda acoplarse a los diferentes tipos de LME. Una posible propuesta para poder lograr esto es la implementación de hidrogeles a base de nervio periférico descelularizado que solidifican a temperaturas fisiológicas como los desarrollados por Cornelison *et al.*, (2018), los cuales se ha demostrado que permiten la supervivencia de las células sembradas, permiten el crecimiento de axones a través de este andamio y promueve la mielinización en un modelo murino de LME (Cerqueira *et al.*, 2018; Cornelison *et al.*, 2018). Además, sería interesante probar el mismo modelo, pero con CMM de diferentes fuentes (medula ósea, endometrio, pulpa dental, etc.) y evaluar cuál de ellas presenta los mejores resultados, para posteriormente evaluar distintos biomateriales y así obtener un diseño óptimo para la implantación en un modelo animal de LME.

Aunque nuestros resultados son alentadores aún es necesario validar en un modelo animal de LME y explorar el potencial regenerativo y mielinizante dentro del tejido, la recuperación funcional del modelo animal y la respuesta del sistema inmune frente al andamio implantado. Esto nos permitirá explorar otras estrategias y métodos de implante celular, modificar el diseño de nuestro andamio y explorar otros potenciadores de la mielinización, de manera que cada vez más nos acerquemos al diseño de un modelo altamente funcional apto para su uso en el tratamiento de la LME en humanos y podamos mejorar la calidad de vida de los pacientes que sufren de esa enfermedad.

10. CONCLUSIONES

Se logró aislar y caracterizar con éxito CMM-TAh y diferenciarlas a poblaciones de neuronas y células de Schwann mielinizantes, además de la caracterización del cocultivo de las poblaciones celulares en 2D.

Por medio de la transducción lentiviral con GFP/mCherry se logró detectar exitosamente el linaje neuronal dentro del andamio, ya que en trabajos anteriores del grupo de investigación no se había podido detectar con éxito dentro del andamio utilizando inmunotinciones.

Con base en los resultados obtenidos en los experimentos de cocultivo en 2D se pudo comprobar que el complejo B potencia la mielinización y mejora la diferenciación de las células de Schwann en cocultivo con neuronas.

Se logró desarrollar un modelo *in vitro* para potenciar la mielinización del cocultivo de neuronas y células de Schwann a base de un medio de cocultivo rico en factores de diferenciación y complejo B, que logro mejorar la mielinización de los cocultivos de neuronas y células de Schwann 4.15 veces aproximadamente y del cocultivo de neuronas y oligodendrocitos 1.5 veces, sin embargo, aún es necesario pulir el modelo para lograr obtener un andamio recelularizado altamente funcional.

11. PERSPECTIVAS

Para poder hacer un análisis más completo y poder determinar con exactitud que tanto mejora la mielinización y la diferenciación de los linajes celulares en cocultivo se pretende repetir los experimentos de cocultivo en transwell para poder examinar individualmente cada linaje y ver cómo es afectado por las condiciones de cocultivo y cocultivo con complejo B, además es necesario medir la expresión de otros marcadores para medir el estado de maduración y diferenciación de los linajes celulares y la cantidad de CMM-TAh que no se han diferenciado.

Aun es necesario mejorar algunos aspectos del andamio, como mejorar la recelularización para mejorar aún más la mielinización por parte del cocultivo y obtener porcentajes de mielinización mayores, así de evaluar más días de cocultivo en el andamio, y con el fin de generar un andamio funcional que en un futuro pueda ser utilizado en humanos como tratamiento para enfermedades desmielinizantes o en LME aun es necesario probar nuestro andamio en un modelo animal y medir el índice terapéutico del andamio.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahuja, C. S., Nori, S., Tetreault, L., Wilson, J., Kwon, B., Harrop, J., Choi, D., & Fehlings, M. G. (2017). Traumatic spinal cord injury - Repair and regeneration. *Clinical Neurosurgery*, 80(3), S22–S90. <https://doi.org/10.1093/neuros/nyw080>
2. Ahuja, C. S., Wilson, J. R., Nori, S., Kotter, M. R. N., Druschel, C., Curt, A., & Fehlings, M. G. (2017). Traumatic spinal cord injury. *Nature Reviews Disease Primers*, 3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.18>
3. Albin, M. S., & White, R. J. (1987). Epidemiology, physiopathology, and experimental therapeutics of acute spinal cord injury. *Critical Care Clinics*, 3(3), 441–452.
4. Alstrup, T., Eijken, M., Bohn, A. B., Møller, B., & Damsgaard, T. E. (2019). Isolation of Adipose Tissue-Derived Stem Cells: Enzymatic Digestion in Combination with Mechanical Distortion to Increase Adipose Tissue-Derived Stem Cell Yield from Human Aspirated Fat. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, 48(1), 1–13. <https://doi.org/10.1002/cpsc.68>
5. Arévalo Romero, J. A., Pardo, V. M., & Paéz Guerrero, D. M. (2007). Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *Nova*, 5(8), 177. <https://doi.org/10.22490/24629448.387>
6. Babaloo, H., Ebrahimi-Barough, S., Derakhshan, M. A., Yazdankhah, M., Loffibakhshaiesh, N., Soleimani, M., Joghataei, M. T., & Ai, J. (2019). PCL/gelatin nanofibrous scaffolds with human endometrial stem cells/Schwann cells facilitate axon regeneration in spinal cord injury. *Journal of Cellular Physiology*, 234(7), 11060–11069. <https://doi.org/10.1002/jcp.27936>
7. Baumann, N., & Pham-Dinh, D. (2001). Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. *Physiological Reviews*, 81(2), 871–927. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.871>
8. Bean, B. P. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(6), 451–465. <https://doi.org/https://doi.org/10.3109/14653249.2012.711470>
9. Beattie, M. S., Farooqui, A. A., & Bresnahan, J. C. (2000). Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, 17(10), 915–925. <https://doi.org/10.1089/neu.2000.17.915>
10. Bercury, K. K., & Macklin, W. B. (2015). Dynamics and Mechanisms of CNS Myelination. *Developmental Cell*, 32(4), 447–458. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.016>
11. Blight, A. R., & Zimmer, M. P. (2001). Acute spinal cord injury: pharmacotherapy and drug development perspectives. *Current Opinion in Investigational Drugs (London, England : 2000)*, 2(6), 801–808.
12. Bliss, T. M., Andres, R. H., & Steinberg, G. K. (2010). Optimizing the success of cell transplantation therapy for stroke. *Neurobiology of Disease*, 37(2), 275–283. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.10.003>
13. Caddick, J., Kingham, P. J., Gardiner, N. J., Wiberg, M., & Terenghi, G. (2006). *Phenotypic and*

Functional Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Differentiated Along a Schwann Cell Lineage. 849(April), 840–849. <https://doi.org/10.1002/glia>

14. Calderón-Ospina, C. A., & Nava-Mesa, M. O. (2020). B Vitamins in the nervous system: Current knowledge of the biochemical modes of action and synergies of thiamine, pyridoxine, and cobalamin. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 26(1), 5–13. <https://doi.org/10.1111/cns.13207>
15. Cantile, C., & Youssef, S. (2016). Nervous System. In *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Sixth Edition* (Vol. 1, pp. 250–406). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5317-7.00004-7>
16. Cerqueira, S. R., Lee, Y.-S., & Bunge, M. B. (2018). *A Culture Model to Study Neuron-Schwann Cell-Astrocyte Interactions* (P. V. Monje & H. A. Kim (eds.); Vol. 1739, pp. 269–279). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7649-2_17
17. Cerqueira, S. R., Lee, Y. S., Cornelison, R. C., Mertz, M. W., Wachs, R. A., Schmidt, C. E., & Bunge, M. B. (2018). Decellularized peripheral nerve supports Schwann cell transplants and axon growth following spinal cord injury. *Biomaterials*, 177, 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.05.049>
18. Chang, K. J., Redmond, S. A., & Chan, J. R. (2016). Remodeling myelination: Implications for mechanisms of neural plasticity. *Nature Neuroscience*, 19(2), 190–197. <https://doi.org/10.1038/nn.4200>
19. Chù Lee, Á. J., Cuenca Buele, S., & López Bravo, M. (2015). Medula Espinal. In *Anatomía y fisiología del sistema nervioso*. (1ra., pp. 79–82). Universidad Tecnica de Machala. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/6662>
20. Cornelison, R. C., Gonzalez-Rothi, E. J., Porvasnik, S. L., Wellman, S. M., Park, J. H., Fuller, D. D., & Schmidt, C. E. (2018). Injectable hydrogels of optimized acellular nerve for injection in the injured spinal cord. *Biomedical Materials (Bristol)*, 13(3). <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aaab82>
21. Cristante, A., Barros, T., Marcon, R., Letaif, O., & Rocha, I. (2012). Therapeutic approaches for spinal cord injury. *Clinics*, 67(10), 1219–1224. [https://doi.org/10.6061/clinics/2012\(10\)16](https://doi.org/10.6061/clinics/2012(10)16)
22. Cristante, A. F., Barros Filho, T. E. P., Oliveira, R. P., Marcon, R. M., Rocha, I. D., Hanania, F. R., & Daci, K. (2009). Antioxidative therapy in contusion spinal cord injury. *Spinal Cord*, 47(6), 458–463. <https://doi.org/10.1038/sc.2008.155>
23. Cristante, A. F., Damasceno, M. L., Barros Filho, T. E. P., de Oliveira, R. P., Marcon, R. M., & da Rocha, I. D. (2012). Evaluation of the effects of hyperbaric oxygen therapy for spinal cord lesion in correlation with the moment of intervention. *Spinal Cord*, 50(7), 502–506. <https://doi.org/10.1038/sc.2012.16>
24. Cui, Q. L., Lin, Y. H., Xu, Y. K. T., Fernandes, M. G. F., Rao, V. T. S., Kennedy, T. E., & Antel, J. (2020). Effects of Biotin on survival, ensheathment, and ATP production by oligodendrocyte lineage cells in vitro. *PLoS ONE*, 15(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233859>
25. Curran, J. M., Chen, R., & Hunt, J. A. (2006). The guidance of human mesenchymal stem cell

- differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate. *Biomaterials*, 27(27), 4783–4793. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.05.001>
26. Damasceno, M. L., Letaif, O. B., Cristante, A. F., Marcon, R. M., Iutaka, A. S., Oliveira, R. P., & Barros Filho, T. E. P. de. (2010). Estudo retrospectivo dos resultados da utilização do halo craniano nas fraturas-luxações subaxiais. *Coluna/Columna*, 9(4), 376–380. <https://doi.org/10.1590/S1808-18512010000400006>
27. Deber, C. M., & Reynolds, S. J. (1991). Central nervous system myelin: structure, function, and pathology. *Clinical Biochemistry*, 24(2), 113–134. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(91\)90421-A](https://doi.org/10.1016/0009-9120(91)90421-A)
28. Ding, B., & Kilpatrick, D. L. (2013). Lentiviral vector production, titration, and transduction of primary neurons. *Methods in Molecular Biology*, 1018, 119–131. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-444-9_12
29. Fehlings, M. G., Tetreault, L. A., Wilson, J. R., Kwon, B. K., Burns, A. S., Martin, A. R., Hawryluk, G., & Harrop, J. S. (2017). A Clinical Practice Guideline for the Management of Acute Spinal Cord Injury: Introduction, Rationale, and Scope. *Global Spine Journal*, 7(3_supplement), 84S-94S. <https://doi.org/10.1177/2192568217703387>
30. Gafson, A. R., Barthélemy, N. R., Bomont, P., Carare, R. O., Durham, H. D., Julien, J. P., Kuhle, J., Leppert, D., Nixon, R. A., Weller, R. O., Zetterberg, H., & Matthews, P. M. (2020). Neurofilaments: Neurobiological foundations for biomarker applications. In *Brain* (Vol. 143, Issue 7, pp. 1975–1998). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa098>
31. Gang, C., Yan-rong, H. U., Hong, W. a N., Lei, X. I. a, Jun-hua, L. I., Fei, Y., Xue, Q. U., Shenguo, W., & Zhong-cheng, W. (2010). Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells and Schwann cells. *Chinese Medical Journal*, 123(30370543), 2424–2431. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2010.17.025>
32. Gao, M., Lu, P., Bednark, B., Lynam, D., Conner, J. M., Sakamoto, J., & Tuszynski, M. H. (2013). Templated agarose scaffolds for the support of motor axon regeneration into sites of complete spinal cord transection. *Biomaterials*, 34(5), 1529–1536. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.070>
33. García-Pérez, M. M., Martínez-Rodríguez, H. G., López-Guerra, G. G., Soto-Domínguez, A., Said-Fernández, S. L., Morales-Ávalos, R., Elizondo-Omaña, R. E., Montes-de-Oca-Luna, R., Guzmán-López, S., Castillo-Galván, M. L., Mendoza-Lemus, O. F., & Vilchez-Cavazos, F. (2017). A modified chemical protocol of decellularization of rat sciatic nerve and its recellularization with mesenchymal differentiated schwann-like cells: Morphological and functional assessments. *Histology and Histopathology*, 32(8), 779–792. <https://doi.org/10.14670/HH-11-844>
34. Guest, J. D., Hiester, E. D., & Bunge, R. P. (2005). Demyelination and Schwann cell responses adjacent to injury epicenter cavities following chronic human spinal cord injury. *Experimental*

- Neurology*, 192(2), 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.11.033>
35. Günther, M. I., Weidner, N., Müller, R., & Blesch, A. (2015). Cell-seeded alginate hydrogel scaffolds promote directed linear axonal regeneration in the injured rat spinal cord. *Acta Biomaterialia*, 27, 140–150. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.09.001>
 36. Hall, E. D. (2011). Antioxidant Therapies for Acute Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics*, 8(2), 152–167. <https://doi.org/10.1007/s13311-011-0026-4>
 37. Hausmann, O. N. (2003). Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. In *Spinal Cord* (Vol. 41, Issue 7, pp. 369–378). <https://doi.org/10.1038/sj.sc.3101483>
 38. Hobbenaghi, R., Javanbakht, J., Hosseini, E., Mohammadi, S., Rajabian, M., Moayeri, P., & Aghamohammad hassan, M. (2013). Neuropathological and neuroprotective features of vitamin B12 on the dorsal spinal ganglion of rats after the experimental crush of sciatic nerve: an experimental study. *Diagnostic Pathology*, 8(1), 815. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-8-123>
 39. Houle, J. D., Amin, A., Cote, M. P., Lemay, M., Miller, K., Sandrow, H., Santi, L., Shumsky, J., & Tom, V. (2010). Combining peripheral nerve grafting and matrix modulation to repair the injured rat spinal cord. *Journal of Visualized Experiments*, 33, 4–7. <https://doi.org/10.3791/1324>
 40. Huang, T., He, D., Kleiner, G., & Kuluz, J. T. (2007). Neuron-like Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells From Infant Piglets in Vitro. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 30(sup1), S35–S40. <https://doi.org/10.1080/10790268.2007.11753967>
 41. Hyung, S., Lee, S. R., Kim, J., Kim, Y., Kim, S., Kim, H. N., & Jeon, N. L. (2021). A 3D disease and regeneration model of peripheral nervous system—on—a—chip. *Science Advances*, 7(5), 9749–9778. <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABD9749>
 42. Hyung, S., Yoon Lee, B., Park, J. C., Kim, J., Hur, E. M., & Francis Suh, J. K. (2015). Coculture of Primary Motor Neurons and Schwann Cells as a Model for in Vitro Myelination. *Scientific Reports*, 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep15122>
 43. Ioghen, O., Manole, E., Gherghiceanu, M., O. Popescu, B., & Cristina Ceafalan, L. (2020). Non-Myelinating Schwann Cells in Health and Disease. In *Schwann Cells [Working Title]*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91930>
 44. Ishii, T., Kawakami, E., Endo, K., Misawa, H., & Watabe, K. (2017). Myelinating cocultures of rodent stem cell line-derived neurons and immortalized Schwann cells. *Neuropathology*, 37(5), 475–481. <https://doi.org/10.1111/neup.12397>
 45. Jacobo Arreola, S. (2014). *DIFERENCIACIÓN A OLIGODENDROCITOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS ORIGINADAS EN TEJIDO ADIPOSO*. Universidad Autonoma de Nuevo León.
 46. Jang, S., Cho, H. H., Cho, Y. B., Park, J. S., & Jeong, H. S. (2010). Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-25>
 47. Jessen, K. R., Mirsky, R., & Lloyd, A. C. (2015). Schwann cells: Development and role in nerve repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(7), 1–15.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020487>

48. Jia, Z., Zhu, H., Li, J., Wang, X., Misra, H., & Li, Y. (2012). Oxidative stress in spinal cord injury and antioxidant-based intervention. *Spinal Cord*, *50*(4), 264–274.
<https://doi.org/10.1038/sc.2011.111>
49. Jiang, L., Zhu, J., Liu, X., Xiang, P., Hu, J., & Yu, W.-H. (2008). Differentiation of rat adipose tissue-derived stem cells into Schwann-like cells in vitro. *NeuroReport*, *19*(10), 1015–1019.
<https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3283040efc>
50. Joyce, N., Annett, G., Wirthlin, L., Olson, S., Bauer, G., & Nolte, J. A. (2010). Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regenerative Medicine*, *5*(6), 933–946. <https://doi.org/10.2217/rme.10.72>
51. Kabu, S., Gao, Y., Kwon, B. K., & Labhasetwar, V. (2015). Drug delivery, cell-based therapies, and tissue engineering approaches for spinal cord injury. *Journal of Controlled Release*, *219*(1), 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.060>
52. Kajimoto, B. H. J., Addeo, R. L. D., Campos, G. C. de, Narazaki, D. K., Correia, L. dos S., Araújo, M. P. de, Cristante, A. F., Iutaka, A. S., Marcon, R. M., Oliveira, R. P., & Barros Filho, T. E. P. de. (2007). Estudo anatômico do trajeto da artéria vertebral na coluna cervical inferior humana. *Acta Ortopédica Brasileira*, *15*(2), 84–86. <https://doi.org/10.1590/S1413-78522007000200005>
53. Kajimura, J., Ito, R., Manley, N. R., & Hale, L. P. (2016). Optimization of Single- and Dual-Color Immunofluorescence Protocols for Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Archival Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *64*(2), 112–124.
<https://doi.org/10.1369/0022155415610792>
54. Katoh, H., Yokota, K., & Fehlings, M. G. (2019). Regeneration of spinal cord connectivity through stem cell transplantation and biomaterial scaffolds. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *13*(June), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00248>
55. Keirstead, H. S., Ben-Hur, T., Rogister, B., O’Leary, M. T., Dubois-Dalcq, M., & Blakemore, W. F. (1999). Polysialylated neural cell adhesion molecule-positive CNS precursors generate both oligodendrocytes and Schwann cells to remyelinate the CNS after transplantation. *Journal of Neuroscience*, *19*(17), 7529–7536. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-17-07529.1999>
56. Kerschensteiner, M., Schwab, M. E., Lichtman, J. W., & Misgeld, T. (2005). In vivo imaging of axonal degeneration in the rat optic nerve. *In Vivo*, *11*(5), 360–360.
57. Kettenmann, H., & Verkhratsky, A. (2013). Glial Cells. In *Neuroscience in the 21st Century* (Issue January, pp. 475–506). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1997-6_19
58. Kiernan, J., & Rajakumar, R. (2014). Spinal Cord. In *Barr’s The Human Nervous System: An Anatomical Viewpoint* (p. 448).
59. Kingham, P. J., Kalbermatten, D. F., Mahay, D., Armstrong, S. J., Wiberg, M., & Terenghi, G. (2007). *Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote*

- neurite outgrowth in vitro*. 207, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.06.029>
60. Krueger, H., Noonan, V. K., Trenaman, L. M., Joshi, P., & Rivers, C. S. (2013). The economic burden of traumatic spinal cord injury in Canada. *Chronic Diseases and Injuries in Canada*, 33(3), 113–122.
 61. Lariosa-Willingham, K. D., Rosler, E. S., Tung, J. S., Dugas, J. C., Collins, T. L., & Leonoudakis, D. (2016). Development of a central nervous system axonal myelination assay for high throughput screening. *BMC Neuroscience*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12868-016-0250-2>
 62. Li, X., Zhou, D., Jin, Z., Chen, H., Wang, X., Zhang, X., & Xu, T. (2020). A coaxially extruded heterogeneous core–shell fiber with Schwann cells and neural stem cells. *Regenerative Biomaterials*, 7(2), 131–139. <https://doi.org/10.1093/rb/rbz037>
 63. Lichtman, J. W., & Colman, H. (2000). Synapse Elimination and Indelible Memory. *Neuron*, 25(2), 269–278. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80893-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80893-4)
 64. Lin, C. S., Ning, H., Lin, G., & Lue, T. F. (2012). Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? In *Cytotherapy* (Vol. 14, Issue 10, pp. 1159–1163). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.3109/14653249.2012.729817>
 65. Lin, P., Lin, Y., Lennon, D. P., Correa, D., Schluchter, M., & Caplan, A. I. (2012). Efficient Lentiviral Transduction of Human Mesenchymal Stem Cells That Preserves Proliferation and Differentiation Capabilities. *STEM CELLS Translational Medicine*, 1(12), 886–897. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0086>
 66. Liu, M., Wu, W., Li, H., Li, S., Huang, L. T., Yang, Y. Q., Sun, Q., Wang, C. X., Yu, Z., & Hang, C. H. (2015). Necroptosis, a novel type of programmed cell death, contributes to early neural cells damage after spinal cord injury in adult mice. *Journal of Spinal Cord Medicine*, 38(6), 745–753. <https://doi.org/10.1179/2045772314Y.0000000224>
 67. Liu, S., Schackel, T., Weidner, N., & Puttagunta, R. (2018). Biomaterial-supported cell transplantation treatments for spinal cord injury: Challenges and perspectives. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(January). <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00430>
 68. Liu, Z., Jin, Y. Q., Chen, L., Wang, Y., Yang, X., Cheng, J., Wu, W., Qi, Z., & Shen, Z. (2015). Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture in vitro. *PLoS ONE*, 10(4), e0123278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123278>
 69. Lopatina, T., Kalinina, N., Karagyaur, M., Stambolsky, D., Rubina, K., Revischin, A., Pavlova, G., Parfyonova, Y., & Tkachuk, V. (2011). Adipose-Derived Stem Cells Stimulate Regeneration of Peripheral Nerves: BDNF Secreted by These Cells Promotes Nerve Healing and Axon Growth De Novo. *PLoS ONE*, 6(3), e17899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017899>
 70. Lopez Guerra, G. (2014). *DESCELULARIZACIÓN DE NERVIIO CIÁTICO DE RATA Y SU POSTERIOR RECELULARIZACIÓN in vitro CON CÉLULAS DE SCHWANN*. Universidad Autonoma de Nuevo León.
 71. Love, S. (2006). Demyelinating diseases. *Journal of Clinical Pathology*, 59(11), 1151–1159.

<https://doi.org/10.1136/jcp.2005.031195>

72. Martin, P. R., Singleton, C. K., & Hiller-Sturmhöfel, S. (2003). The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. *Alcohol Research and Health*, 27(2), 134–142.
73. McDonald, J. W., & Sadowsky, C. (2002). Spinal-cord injury. *The Lancet*, 359, 417–425.
74. Mirsky, R., & Jessen, K. R. (1999). The neurobiology of Schwann cells. *Brain Pathology*, 9(2), 293–311. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00228.x>
75. Mirsky, R., & Jessen, K. R. (2007). Early events in Schwann cell development. In P. Armati (Ed.), *The Biology of Schwann Cells* (pp. 13–36). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511541605.003>
76. Mirsky, R., Jessen, K. R., Brennan, A., Parkinson, D., Dong, Z., Meier, C., Parmantier, E., & Lawson, D. (2002). Schwann cells as regulators of nerve development. *Journal of Physiology Paris*, 96(1–2), 17–24. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(01\)00076-6](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(01)00076-6)
77. Mothe, A. J., Tam, R. Y., Zahir, T., Tator, C. H., & Shoichet, M. S. (2013). Repair of the injured spinal cord by transplantation of neural stem cells in a hyaluronan-based hydrogel. *Biomaterials*, 34(15), 3775–3783. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.02.002>
78. Nakamura, M., Houghtling, R. A., MacArthur, L., Bayer, B. M., & Bregman, B. S. (2003). Differences in cytokine gene expression profile between acute and secondary injury in adult rat spinal cord. *Experimental Neurology*, 184(1), 313–325. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00361-3](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00361-3)
79. Nave, K. A., & Werner, H. B. (2014). Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 503–533. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013101>
80. Nieuwenhuys, V. & Huijzen. (2008). The human central nervous system. In *The Human Central Nervous System*. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-34686-9>
81. Nishimoto, S., Tanaka, H., Okamoto, M., Okada, K., Murase, T., & Yoshikawa, H. (2015). Methylcobalamin promotes the differentiation of Schwann cells and remyelination in lysophosphatidylcholine-induced demyelination of the rat sciatic nerve. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(AUGUST), 298. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00298>
82. Nomura, H., Tator, C. H., & Shoichet, M. S. (2006). Bioengineered strategies for spinal cord repair. *Journal of Neurotrauma*, 23(3–4), 496–507. <https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.496>
83. Norrbrink Budh, C., & Österåker, A. L. (2007). Life satisfaction in individuals with a spinal cord injury and pain. *Clinical Rehabilitation*, 21(1), 89–96. <https://doi.org/10.1177/0269215506070313>
84. Nybo, K. (2012). GFP imaging in fixed cells. *BioTechniques*, 52(6), 359–360. <https://doi.org/10.2144/000113872>
85. Porzionato, A., Stocco, E., Barbon, S., Grandi, F., Macchi, V., & De Caro, R. (2018). Tissue-engineered grafts from human decellularized extracellular matrices: A systematic review and future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12).

<https://doi.org/10.3390/ijms19124117>

86. Pukos, N., Goodus, M. T., Sahinkaya, F. R., & McTigue, D. M. (2019). Myelin status and oligodendrocyte lineage cells over time after spinal cord injury: What do we know and what still needs to be unwrapped? *Glia*, 67(11), 2178–2202. <https://doi.org/10.1002/glia.23702>
87. Safford, K. M., Hicok, K. C., Safford, S. D., Halvorsen, Y. D. C., Wilkison, W. O., Gimble, J. M., & Rice, H. E. (2002). Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(2), 371–379. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00469-2](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00469-2)
88. Scalabrino, G. (2009). The multi-faceted basis of vitamin B12 (cobalamin) neurotrophism in adult central nervous system: Lessons learned from its deficiency. *Progress in Neurobiology*, 88(3), 203–220. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.04.004>
89. Scherer, S. S. (1997). The biology and pathobiology of Schwann cells. *Current Opinion in Neurology*, 10(5), 386–398. <https://doi.org/10.1097/00019052-199710000-00006>
90. Shrestha, B., Coykendall, K., Li, Y., Moon, A., Priyadarshani, P., & Yao, L. (2014). Repair of injured spinal cord using biomaterial scaffolds and stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 5(4), 1–11. <https://doi.org/10.1186/srct480>
91. Silver, J., & Miller, J. H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 5, Issue 2, pp. 146–156). <https://doi.org/10.1038/nrn1326>
92. Soury, M. El, García-García, Ó. D., Moretti, M., Perroteau, I., Raimondo, S., Lovati, A. B., & Carriel, V. (2021). Comparison of decellularization protocols to generate peripheral nerve grafts: A study on rat sciatic nerves. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms22052389>
93. Spinneker, A., Sola, R., Lemmen, V., Castillo, M. J., Pietrzik, K., & González-Gross, M. (2007). Vitamin B6 status, deficiency and its consequences--an overview. *Nutricion Hospitalaria*, 22(1), 7–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17260529>
94. Strem, B. M., Hicok, K. C., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R. E., Fraser, J. K., & Hedrick, M. H. (2005). *Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells*. 7–10.
95. Tasaki, I. (1939). THE ELECTRO-SALTATORY TRANSMISSION OF THE NERVE IMPULSE AND THE EFFECT OF NARCOSIS UPON THE NERVE FIBER. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 127(2), 211–227. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1939.127.2.211>
96. Tator, C. H. (2006). Review of treatment trials in human spinal cord injury: Issues, difficulties, and recommendations. *Neurosurgery*, 59(5), 957–982. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000245591.16087.89>
97. The National SCI Statistical Center. (2013). *Spinal Cord Injury Facts and Figures at a Glance. February*.
98. 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>
99. Tsintou, M., Dalamagkas, K., & Seifalian, A. M. (2015). Advances in regenerative therapies for

- spinal cord injury: A biomaterials approach. *Neural Regeneration Research*, 10(5), 726–742. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.156966>
100. Varma, A. K., Das, A., Wallace, G., Barry, J., Vertegel, A. A., Ray, S. K., & Banik, N. L. (2013). Spinal Cord Injury: A Review of Current Therapy, Future Treatments, and Basic Science Frontiers. *Neurochemical Research*, 38(5), 895–905. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-0991-6>
 101. Vélez, A. R. (2004). *Lesión de la médula espinal: mecanismos del daño medular*. 8, 69–73.
 102. Waxman, S. G. (1989). Demyelination in spinal cord injury. *Journal of the Neurological Sciences*, 91(1–2), 1–14. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(89\)90072-5](https://doi.org/10.1016/0022-510X(89)90072-5)
 103. Werndle, M. C., Saadoun, S., Phang, I., Czosnyka, M., Varsos, G. V., Czosnyka, Z. H., Smielewski, P., Jamous, A., Bell, B. A., Zoumprouli, A., & Papadopoulos, M. C. (2014). Monitoring of spinal cord perfusion pressure in acute spinal cord injury: Initial findings of the injured spinal cord pressure Evaluation Study*. *Critical Care Medicine*, 42(3), 646–655. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000028>
 104. Willerth, S. M., & Sakiyama-Elbert, S. E. (2008). Cell therapy for spinal cord regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(2), 263–276. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.08.028>
 105. Winter, B., Breitenstein, C., Mooren, F. C., Voelker, K., Fobker, M., Lechtermann, A., Krueger, K., Fromme, A., Korsukewitz, C., Floel, A., & Knecht, S. (2007). High impact running improves learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87(4), 597–609. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.11.003>
 106. Xie, S., Lu, F., Han, J., Tao, K., Wang, H., Simental, A., Hu, D., & Yang, H. (2017). Efficient generation of functional Schwann cells from adipose-derived stem cells in defined conditions. *Cell Cycle*, 16(9), 841–851. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1304328>
 107. Yang, E. Z., Zhang, G. W., Xu, J. G., Chen, S., Wang, H., Cao, L. L., Liang, B., & Lian, X. F. (2017). Multichannel polymer scaffold seeded with activated Schwann cells and bone mesenchymal stem cells improves axonal regeneration and functional recovery after rat spinal cord injury. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(5), 623–637. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.11>
 108. Yang, M. Z., Peng, L. J., & Hu, W. K. (2013). Methylcobalamin induces differentiation of rat bone mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 17(32), 5741–5748. <https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.2013.32.001>
 109. Yao, L. (2018). Glial Cell Engineering in Neural Regeneration. In *Glial Cell Engineering in Neural Regeneration*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-02104-7>
 110. Yip, P. K., & Malaspina, A. (2012). Spinal cord trauma and the molecular point of no return. *Molecular Neurodegeneration*, 7(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-6>
 111. Yuan, Z., Lourenco, S. D. S., Sage, E. K., Kolluri, K. K., Lowdell, M. W., & Janes, S. M. (2016). Cryopreservation of human mesenchymal stromal cells expressing TRAIL for human

- anti-cancer therapy. *Cytotherapy*, 18(7), 860–869. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.04.005>
112. Zaminy, A., Sayad-Fathi, S., Kasmaie, F., Jahromi, Z., & Zendedel, A. (2021). Decellularized peripheral nerve grafts by a modified protocol for repair of rat sciatic nerve injury. *Neural Regeneration Research*, 16(6), 1086. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.300449>
113. Zhang, H.-T., Liu, Z.-L., Yao, X.-Q., Yang, Z.-J., & Xu, R.-X. (2012). Neural differentiation ability of mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue: a comparative study. *Cytotherapy*, 14(10), 1203–1214. <https://doi.org/10.3109/14653249.2012.711470>
114. Zheng, Y., Huang, C., Liu, F., Lin, H., Niu, Y., Yang, X., & Zhang, Z. (2018). Reactivation of denervated Schwann cells by neurons induced from bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Brain Research Bulletin*, 139, 211–223. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.03.005>
115. Zhou, L. N., Cui, X. J., Su, K. X., Wang, X. H., & Guo, J. H. (2015). Beneficial reciprocal effects of bone marrow stromal cells and Schwann cells from adult rats in a dynamic co-culture system in vitro without intercellular contact. *Molecular Medicine Reports*, 12(4), 4931–4938. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4016>