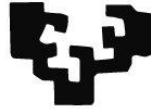


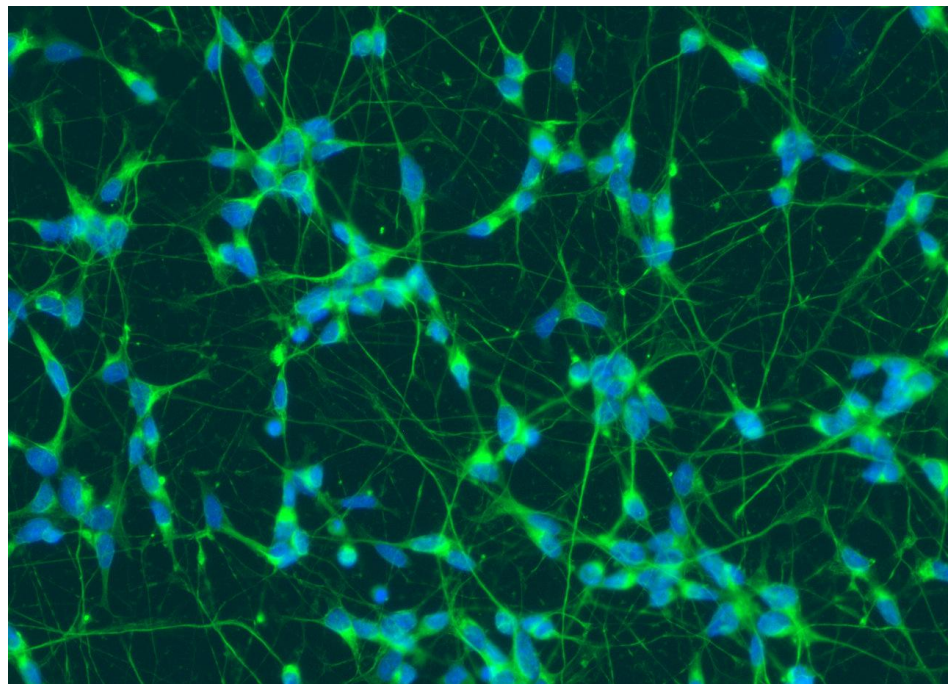
eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

**Efecto neuroprotector del medio acondicionado por  
células madre mesenquimales de tejido adiposo.  
Estudio sobre un modelo de estrés oxidativo  
inducido en la línea SH-SY5Y**



María Cordero Arce  
Leioa, 2018

Directores:  
Prof. Dr. Teodoro Palomares Casado  
Prof. Dra. Ana Isabel Alonso Varona



*A mis aitas*



## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han acompañado durante estos años de doctorado.

En primer lugar, a mis directores de tesis, el Dr. Teodoro Palomares y la Dra. Ana Alonso, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis, por todo lo que me han enseñado en estos años, por su tiempo dedicado y su paciencia.

En segundo lugar, a Cristina, Fede y Eva. Gracias por hacer el camino más fácil, siempre recordaré al equipo redox con muchísimo cariño.

Patricia, Vero, María, gracias por acompañarme en mis visitas al laboratorio en los últimos años y mucho ánimo en la recta final de vuestros doctorados. A todos los compañeros con los que he coincidido en el departamento, gracias por formar parte de esto.

Agradecer también a las Doctoras María Torrecilla y Cristina Bruzos del Departamento de Farmacología por su gran trabajo con las células SH-SY5Y. También a los Doctores Alejandro Díez y Ricardo Andrade de los SGIker, por su ayuda y buen trabajo al microscopio.

Gracias a la Fundación Jesús de Gangoiti Barrera por la gran labor que hacen ayudando a la investigación y por haberme permitido disfrutar de sus becas durante dos años.

A Carmen, Elena, Vanessa, Marikilla y Nagore. A David, Jessica y Hélder. A Jenni. Muchas gracias por vuestros ánimos, por vuestro interés en saber sobre mi tesis, por entender que haya estado ausente últimamente.

Daniel, gracias por animarme, por comprender que era el momento de mi tesis, por tus consejos, tu paciencia y tu cariño.

Aita, ama, Izaskun y Gerardo, gracias por estar ahí, por toda vuestra ayuda y cariño durante estos años y siempre. Gracias aita y ama por vuestros esfuerzos para que yo pudiera aprender. Gracias Eider por ser la mejor sobrina del mundo, por tus sonrisas que hacen todo más fácil.



## ÍNDICE





<b>ÍNDICE DE MATERIAS</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	ix
<b>ABREVIATURAS</b> .....	ix

## ÍNDICE DE MATERIAS

<b>I.JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO</b> .....	1
<b>II.INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>II.1. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y DEL NITRÓGENO (RONS)</b> .....	7
II.1.1. Producción de ROS .....	7
II.1.2. Funciones fisiológicas de los ROS .....	10
<b>II.2. SISTEMAS ANTIOXIDANTES CELULARES</b> .....	12
II.2.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos.....	12
II.2.2. Sistemas antioxidantes no enzimáticos.....	14
<b>II.3. ESTRÉS OXIDATIVO</b> .....	16
<b>II.4. PAPEL DESEMPEÑADO POR EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA NEURODEGENERACIÓN</b> .....	18
II.4.1. Enfermedad de Alzheimer .....	19
II.4.2. Enfermedad de Parkinson .....	20
II.4.3. Enfermedad de Huntington.....	21
II.4.4. Esclerosis lateral amiotrófica.....	21
<b>II.5. MODELOS EXPERIMENTALES <i>IN VITRO</i> PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO NEURONAL</b> .....	23
<b>II.6. TERAPIA FARMACOLÓGICA ANTIOXIDANTE</b> .....	28
<b>II.7. TERAPIA CON CÉLULAS MADRE</b> .....	38
II.7.1. Definición y clasificación de las células madre.....	38
II.7.2. Células Madre Derivadas de Tejido Adiposo.....	45
<b>III.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	51

<b>IV.MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	55
<b>IV.1. MATERIAL Y TÉCNICAS</b> .....	57
IV.1.1. Células .....	57
IV.1.1.1. Línea celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) .....	57
IV.1.1.2. Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADSC, Adipose-derived Stem Cell) .....	58
IV.1.2. Cultivos celulares.....	58
IV.1.2.1. Descongelación y mantenimiento del cultivo.....	58
IV.1.2.2. Congelación de las células .....	59
IV.1.2.3. Siembra de la suspensión celular en placas.....	60
IV.1.2.4. Inducción diferenciación neuronal de SH-SY5Y .....	60
IV.1.2.5. Obtención del medio acondicionado por ADSCs .....	60
IV.1.3. Técnicas de experimentación.....	61
IV.1.3.1. Inducción de estrés oxidativo .....	61
IV.1.3.2. Determinación viabilidad y proliferación celular.....	61
IV.1.3.3. Determinación niveles intracelulares de ROS.....	61
IV.1.3.4. Técnicas de inmunodetección .....	62
IV.1.3.5. Determinación de la presencia y concentración de factores de crecimiento en el ADSC-MA, mediante ELISA .....	63
IV.1.3.6. Electrofisiología – Registros de <i>patch clamp</i> .....	63
<b>IV.2. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES</b> .....	65
IV.2.1. Estudio del efecto del estrés oxidativo sobre las células SH-SY5Y no diferenciadas .....	65
IV.2.2. Determinación del protocolo de diferenciación de las células SH-SY5Y.....	65
IV.2.2.1. Protocolos de diferenciación empleados .....	65
IV.2.2.2. Estudio de la eficacia de los diferentes protocolos de diferenciación empleados.....	66
IV.2.3. Estudio del efecto del estrés oxidativo sobre células SH-SY5Yd .....	68
IV.2.4. Estudio del efecto de las ADSCs sobre las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo.....	69
IV.2.4.1. Efecto del co-cultivo con ADSCs sobre la proliferación de las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo .....	69
IV.2.4.2. Determinación de la presencia de factores de crecimiento en el ADSC-MA .....	70
IV.2.4.3. Efecto del ADSC-MA sobre las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo .....	70
IV.2.5. Efecto del tratamiento con NAC y BDNF sobre las SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo, aislados o en combinación con ADSC-MA ....	71

<b>IV.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>74</b>
<b>V.RESULTADOS .....</b>	<b>77</b>
<b>V.1. NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y: CARACTERIZACIÓN Y RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO.....</b>	<b>79</b>
V.1.1. Caracterización celular .....	79
V.1.2. Efecto del estrés oxidativo inducido en las células SH-SY5Y mediante su exposición al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	80
V.1.2.1. Efecto del estrés oxidativo sobre los niveles intracelulares de ROS.....	80
V.1.2.2. Efecto del estrés oxidativo sobre la proliferación celular...81	
<b>V.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS AGENTES DIFERENCIADORES SOBRE LAS CÉLULAS SH-SY5Y .....</b>	<b>83</b>
V.2.1. Efecto de los agentes diferenciadores sobre las células SH-SY5Y en la proliferación celular .....	84
V.2.2. Efecto de los agentes diferenciadores sobre las células SH-SY5Y en los niveles intracelulares de ROS .....	84
V.2.3. Efecto de los agentes diferenciadores en el fenotipo de las células SH-SY5Y.....	85
V.2.4. Estudio del efecto de la adición de BDNF al medio diferenciador de las células SH-SY5Y .....	86
V.2.4.1. Estudio del efecto de la adición de BDNF sobre la proliferación celular .....	86
V.2.4.2. Estudio del efecto de la adición de BDNF sobre los niveles intracelulares de ROS .....	88
V.2.4.3. Selección de población tipo N.....	88
<b>V.3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LAS CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS (SH-SY5Hd) .....</b>	<b>91</b>
V.3.1. Efecto del estrés oxidativo sobre la viabilidad celular .....	91
V.3.2. Efecto del estrés oxidativo sobre los niveles intracelulares de ROS..91	
V.3.3. Efecto del estrés oxidativo sobre la expresión de NF-200 .....	92
V.3.4. Efecto del estrés oxidativo sobre parámetros de electrofisiología....93	
<b>V.4. ESTUDIO DEL EFECTO MODULADOR DE LAS ADSCs SOBRE LAS CÉLULAS SH-SY5Hd SOMETIDAS A ESTRÉS OXIDATIVO .....</b>	<b>95</b>
V.4.1. Efecto del co-cultivo con ADSCs sobre las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo.....	95
V.4.2. Análisis del contenido del ADSC-MA y de su efecto sobre las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo.....	96
V.4.2.1. Análisis del contenido del ADSC-MA.....	96

V.4.3. Efecto del ADSC-MA sobre la proliferación celular .....	97
V.4.4. Efecto del ADSC-MA sobre los niveles intracelulares de ROS.....	98
V.4.5. Efecto del ADSC-MA sobre la expresión de NF-200 .....	99
V.4.6. Efecto del ADSC-MA sobre la electrofisiología.....	99
<b>V.5. ESTUDIO DEL POSIBLE EFECTO MODULADOR DE LA NAC SOBRE SH-SY5Yd SOMETIDAS A ESTRÉS OXIDATIVO, AISLADO O EN COMBINACIÓN CON ADSC-MA .....</b>	<b>101</b>
V.5.1. Efecto sobre la viabilidad celular .....	101
V.5.2. Efecto sobre los valores intracelulares de ROS .....	102
V.5.3. Efecto sobre la expresión de NF-200 .....	102
V.5.4. Efecto sobre los parámetros de electrofisiología .....	103
<b>V.6. ESTUDIO DEL EFECTO DEL BDNF, AISLADO O EN COMBINACIÓN CON ADSC- MA, SOBRE LAS CÉLULAS SH-SY5Yd SOMETIDAS A ESTRÉS OXIDATIVO .....</b>	<b>105</b>
V.6.1. Efecto sobre la viabilidad celular .....	105
V.6.2. Efecto sobre los niveles intracelulares de ROS .....	106
V.6.3. Efecto sobre el fenotipo neuronal NF-200.....	106
V.6.4. Efecto sobre los parámetros de electrofisiología .....	107
<b>VI.DISCUSIÓN.....</b>	<b>109</b>
<b>VII.CONCLUSIONES .....</b>	<b>125</b>
<b>VIII.BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>129</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Relación entre estrés oxidativo, inflamación y neurodegeneración .....	19
<b>Figura.2.</b> Esquema sobre la relación del estrés oxidativo en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas.....	22
<b>Figura 3.</b> Fórmula química de la NAC y mecanismo de acción. ....	33
<b>Figura 4.</b> Tejidos y órganos de los que se extraen MSCs. ....	40
<b>Figura 5.</b> Ensayos clínicos con MSCs. ....	44
<b>Figura 6.</b> Esquema sobre las limitaciones más importantes para la supervivencia celular durante el trasplante de ADSCs y posibles estrategias para la mejora de las terapias celulares.....	47

<b>Figura 7.</b> Resumen de tratamientos para el acondicionamiento de ADSCs.....	50
<b>Figura 8.</b> Cultivo de células SH-SY5Y con inmunomarcaje para NF-200 con Alexa Fluor® 488 (verde) y núcleos con Hoechst (azul). Las flechas identifican los dos tipos celulares S y N. ....	57
<b>Figura 9.</b> Cultivo de células ADSCs en frasco de 75 cm <sup>2</sup> . ....	58
<b>Figura 10.</b> Secuencia de diferenciación de las células SH-SY5Y con ATRA. ....	65
<b>Figura 11.</b> Secuencia de diferenciación de las células SH-SY5Y con ec23.....	66
<b>Figura 12.</b> Secuencia de diferenciación de las células SH-SY5Y con ec23 + BDNF.....	66
<b>Figura 13.</b> Células SH-SY5Y en frasco de cultivo T25 obtenidas con microscopía óptica. [A]. Gráfica que expresa el número de células totales obtenidas mediante recuento directo a 1, 24, 48 y 72 horas [B].Imágenes de inmunofluorescencia de las células marcadas con MAP-2-Alexa Fluor® 488 (verde) [C] y NF-200- Alexa Fluor® 488 (verde)[D]. ....	79
<b>Figura 14.</b> Niveles intracelulares de ROS en las células SH-SY5Y sometidas a concentraciones crecientes de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.01, 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mM). ....	80
<b>Figura 15.</b> Proliferación de las células SH-SY5Y sometidas a concentraciones crecientes de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a tiempos 0, 1, 24 y 48 horas ....	81
<b>Figura 16.</b> Imágenes de células SH-SY5Y diferenciadas con ec23 1µM, marcadas con anticuerpo anti-NF-200- Alexa Fluor® 488 (verde) y núcleos con Hoechst (azul), sobre sustrato Poli-D-lisina [A] y sobre laminina [B]. ....	83
<b>Figura 17.</b> Protocolo de diferenciación de las células SH-SY5Y con ATRA o ec23. ....	84
<b>Figura 18.</b> Proliferación de células SH-SY5Y sin diferenciar, diferenciadas con ATRA o con ec23. Número de células medidas a tiempos 7 y 10 días ....	84
<b>Figura 19.</b> Niveles intracelulares de ROS en SH-SY5Y diferenciadas y sin diferenciar. Valores expresados en u.a.a los 30 y 60 minutos. ....	85
<b>Figura 20.</b> Imágenes de microscopía de fluorescencia con marcaje NF-200 con Alexa Fluor® 488 (verde) y núcleos con Hoechst (azul) en células SH-SY5Y sin diferenciar [A], tratadas con ATRA [B] o con ec23 [C]. ....	85
<b>Figura 21.</b> Protocolo de diferenciación de las células SH-SY5Yd. ....	86
<b>Figura 22.</b> Proliferación de las células SH-SY5Y diferenciadas con ec23 y con ec23+BDNF. Valores relativos al control a las 24 y 48 horas. ....	87
<b>Figura 23.</b> Tasa proliferativa de las células SH-SY5Y diferenciadas con ec23 y con ec23+BDNF. Valores relativos al tiempo 0 a las 24 y 48 horas. ....	87
<b>Figura 24.</b> Niveles intracelulares de ROS en las células SH-SY5Y diferenciadas con ec23 y SH-SY5Yd. Valores expresados en u.a. a los 30 y 60 minutos. ....	88
<b>Figura 25.</b> Imágenes de las células SH-SY5Yd, microscopía de contraste de fases [A] y [C] y microscopía confocal con inmunomarcaje del NF-200 con Alexa Fluor® 488 (verde) y núcleos con Hoechst (azul) [B] y [D]. Población heterogénea con células tipo S (flecha) y células tipo N (punta de flecha) [B]. Células tipo N seleccionadas [D]. ....	89

<b>Figura 26.</b> Viabilidad de células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo. Valores relativos al control a las 24 y 48 horas.....	91
<b>Figura 27.</b> Niveles intracelulares de ROS en SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo. Valores expresados en u.a. a los 5, 30 y 60 minutos. ....	92
<b>Figura 28.</b> Imágenes de microscopía de fluorescencia de inmunodetección de NF-200 con Alexa Fluor® 488 (verde) y núcleos con Hoechst (azul) en células SH-SY5Yd control [A] y oxidadas [B]. ....	92
<b>Figura 29.</b> Análisis electrofisiológico de células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo. Medida del potencial de membrana [A], resistencia [B], capacitancia [C] y corriente vs voltaje [D].....	93
<b>Figura 30.</b> Viabilidad de las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo y en co-cultivo con las ADSCs. Valores expresados en número de células relativo al control a las 24 y 48 horas.....	96
<b>Figura 31.</b> Análisis del contenido en BDNF y GDNF mediante ELISA, en el ADSC-MA. Valores expresados en ng/ml.....	97
<b>Figura 32.</b> Viabilidad de las células SH-SY5Yd, sometidas a estrés oxidativo, en tratamiento con ADSC-MA y en co-cultivo. Valores expresados en número de células relativo al control a las 24 y 48 horas. ....	98
<b>Figura 33.</b> Niveles intracelulares de ROS en las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo tratadas con ADSC-MA. Valores relativos al control a 5, 30 y 60 minutos. ....	98
<b>Figura 34.</b> Imágenes de microscopía de fluorescencia con inmunomarcaje del NF-200 con Alexa Fluor® 488 (verde) y núcleos con Hoechst (azul) en células SH-SY5Yd oxidadas [A] y, oxidadas y tratadas con ADSC-MA [B].....	99
<b>Figura 35.</b> Análisis electrofisiológico de las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo y tratadas con ADSC-MA. Medida del potencial de membrana [A], resistencia [B], capacitancia [C] y corriente vs voltaje [D]. ....	100
<b>Figura 36.</b> Viabilidad de las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo, tratadas con ADSC-MA, NAC o NAC+ADSC-MA. Valores relativos al control a las 24 y 48 horas.....	101
<b>Figura 37.</b> Niveles intracelulares de ROS en SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo y tratadas con ADSC-MA, NAC y NAC+ADSC-MA. Valores relativos al control medidos a 5, 30 y 60 minutos.....	102
<b>Figura 38.</b> Imágenes de microscopía de fluorescencia con inmunomarcaje para el NF-200 con Alexa Fluor® 488 (verde) y núcleos con Hoechst (azul), en células SH-SY5Yd oxidadas y tratadas con NAC [A], oxidadas y tratadas con ADSC-MA [B] oxidadas y tratadas con ADSC-MA + NAC [C]. ....	103
<b>Figura 39.</b> Análisis electrofisiológico de las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo y tratadas con NAC y NAC+ADSC-MA. Medida del potencial de membrana [A], resistencia [B], capacitancia [C] y corriente vs voltaje [D].....	104

<b>Figura 40.</b> Viabilidad de las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo, sin tratar, tratadas con ADSC-MA, con BDNF y con BDNF+ADSC-MA. Valores relativos al control a las 24 y 48 horas.....	105
<b>Figura 41.</b> Niveles intracelulares de ROS en células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo, tratadas con ADSC-MA, BDNF o BDNF + ADSC-MA. Valores relativos al control (0.25mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) medidos a los 5, 30 y 60 minutos. ....	106
<b>Figura 42.</b> Imágenes de microscopia de fluorescencia con inmunomarcage de NF-200 con Alexa Fluor® 488 (verde) y núcleos con Hoechst (azul), en células SH-SY5Yd oxidadas y tratadas con BDNF [A], oxidadas y tratadas con ADSC-MA [B] y oxidadas y tratadas con BDNF + ADSC-MA [C]. ....	107
<b>Figura 43.</b> Análisis electrofisiológico de las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo y tratadas con ADSC-MA, BDNF y BDNF+ADSC-MA. Medida del potencial de membrana [A], resistencia [B], capacitancia [C] y corriente vs voltaje [D]. ....	108

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Antioxidantes naturales y sus fuentes. ....	31
<b>Tabla 2.</b> Efectos neuroprotectores producidos por los antioxidantes naturales y sintéticos observados en diferentes modelos experimentales <i>in vitro</i> . ....	34
<b>Tabla 3.</b> Efectos neuroprotectores producidos por antioxidantes naturales y sintéticos observados en diferentes modelos experimentales <i>in vivo</i> . ....	36
<b>Tabla 4.</b> Ensayos clínicos (en marcha o completados) con MSCs.....	41

## ABREVIATURAS

**ADSC:** *Adipose-derived Stem Cell*, Célula Madre Mesenquimal derivada de tejido Adiposo

**ADSC-MA:** Medio acondicionado por ADSCs

**AraC:** *Cytosine arabinoside*, Arabinósido de Citosina

**ARE:** *Antioxidant Response Elements*, Elemento de Respuesta Antioxidante

**ATP:** Adenosín trifosfato

**ATRA:** Ácido *all-trans* Retinoico

**αSyn:** Alfa-sinucleína

**βA:** β-amiloide

**BDNF:** *Brain Derived Neurotrophic Factor*, Factor neurotrófico derivado del cerebro

**bFGF:** *Basic Fibroblast Growth Factor*, Factor básico de Crecimiento de Fibroblastos

**CAG:** Citosina, Adenina, Guanina

**CNTF:** *Ciliary Neurotrophic Factor*, Factor Neurotrófico Ciliar

**CRISPR:** *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, Sistema de Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas

**cGMP:** Guanosin Monofosfato cíclico

**CoQ:** Coenzima Q

**dbcAMP:** Dibutilil Adenosin Monofosfato Cíclico

**DCF:** Diclorofluoresesceína

**DCX:** Doblecortina

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**EA:** Enfermedad de Alzheimer

**ec23:** 4-(5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-ylethynyl) benzoic acid

**EH:** Enfermedad de Huntington

**ELA:** Esclerosis Lateral Amiotrófica

**EMA:** Agencia Europea del Medicamento

**eNOS:** NOS endotelial

**EP:** Enfermedad de Parkinson

**ERKs:** *Extracellular signal-Regulated Kinases*, Quinasa Regulada por Señales Extracelulares

**ERO-1:** *Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin-1*, Oxidorreductasa 1 del Retículo Endoplasmático

**FDA:** *Food and Drug Administration*, Administración de Alimentos y Medicamentos

**Fe<sup>2+</sup>:** Hierro reducido

**Fe<sup>3+</sup>:** Hierro oxidado

**FGF:** *Fibroblast Growth Factor*, Factor de crecimiento de fibroblastos

**fHSCs:** *Fetal Hematopoietic Stem Cell*, Célula Madre Fetal Hematopoyética

**FMN:** Flavina mononucleótido oxidada



**FMNH:** Flavina mononucleótido reducida

**fMSCs:** *Fetal Mesenchymal Stem Cell*, Célula Madre Fetal Mesenquimal

**GABA:** Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**GAPDH:** Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

**G-CSF:** *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*, Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos

**GDNF:** *Glial-cell Derived Neurotrophic Factor*, Factor neurotrófico derivado del Célula Glial

**GLT-1:** Transportador de glutamato-1

**GLUT-3:** Transportador de glucosa 3

**GPX:** Glutación peroxidasa

**GR:** Glutación reductasa

**GRX:** Glutarredoxina

**GSH:** Glutación intracelular reducido

**GSSG:** Glutación disulfuro oxidado

**H<sub>2</sub>DCF-DA:** 2,7-diclorofluoresceína diacetato

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno

**hAEC:** *Human Amniotic Epithelial Cell*, Célula epitelial amniótica humana

**hAMSC:** *Human Amniotic Mesenchymal Stem Cell*, Célula Madre Mesenquimal amniótica humana

**hCMSCs:** *Human Chorionic Mesenchymal Stem Cell*, Célula Madre Mesenquimal coriónica humana

**hCTCs:** *Human Chorionic Trophoblast Stem Cell*, Célula Trofoblástica Coriónica Humana

**hESC:** *Human Embryonic Stem Cell*, Célula Madre Embrionaria humana

**hFCS:** *Human Fetal Stem Cell*, Célula Madre Fetal

**HGF:** *Hepatocyte Growth Factor*, Factor de Crecimiento de Hepatocitos

**HIF-1 $\alpha$ :** Subunidad  $\alpha$  del factor inducible por hipoxia

**HSC:** *Hematopoietic Stem Cell*, Células Madre Hematopoyéticas

**IGF:** *Insulin-like Growth Factor*, Factor de Crecimiento Insulínico

**iNOS:** NOS insensible al calcio

**IL:** Interleucina

**iPSCs:** *Induced Pluripotent Stem Cell*, Célula Madre Pluripotente Inducida

**ISCT:** *International Society for Cellular Therapy*, Sociedad Internacional de Terapia Celular

**JNK:** *C-Jun N-terminal kinase*, Quinasa c-Jun N-terminal

**Keap1:** *Kelch-like ECH-associated protein 1*, Proteína 1 asociada a ECH tipo kelch

**mtNOS:** NOS localizada en la mitocondria

**MAPK:** *Mitogen-Activated Protein Kinases*, Proteína quinasas activadas por mitógenos

**MPP<sup>+</sup>:** 1-metil-4-fenil piridinio

**MTT:** Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

**MAP-2:** *Microtubule-Associated Protein*, Proteína Asociada a Microtúbulos

**MSC:** *Mesenchymal Stem Cell*, Célula madre mesenquimal

**NAC:** N-acetilcisteína

**NADH:** Nicotinamida adenina dinucleótido reducido

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

**NF-200:** *Neurofilament 200kDa*, Neurofilamento 200kDa

**NF-κB:** *Nuclear Factor kappa B*, Factor nuclear kappa B

**NGF:** *Nerve Growth Factor*, Factor de Crecimiento Nervioso

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**nNOS:** NOS neuronal

**NO<sup>•</sup>:** Óxido nítrico

**NO<sup>-</sup>:** Anión nitrosilo

**NO<sup>+</sup>:** Cation nitrosonio

**NOS:** Óxido nítrico sintetasa

**Nrf-1:** *Nuclear Respiratory Factor*, Factor Nuclear Respiratorio

**NSC:** *Neural Stem Cell*, Célula Madre neural

**NT:** *Neurotrophin*, Neurotrofina

**NTR:** *Neurotrophin Receptor p75*, Receptor de Neurotrofinas p75

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:** Radical superóxido

**OH<sup>•</sup>:** Radical hidroxilo

**OH<sup>-</sup>:** Anión hidróxido

**8-OHG:** 8-hidroxiguanina

**ONOO<sup>-</sup>:** Peroxinitrito

**PGC-1 $\alpha$** : *Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  co-activator 1 $\alpha$* , Proteína 1 $\alpha$  coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas

**PINK1**: *PTEN-induced putative kinase 1*, kinasa putativa 1 inducida por PTEN

**PKA**: Protein Kinase A, Proteína quinasa A

**PBS**: *Phosphate Buffered Saline*, Tampón Fosfato Salino

**PDI**: *Protein Disulfide Isomerase*, Proteína Disulfuro Isomerasa

**RAR**: Receptor de Ácido Retinoico

**Redox**: Óxido-Reducción

**RNS**: *Reactive Nitrogen Species*, Especies Reactivas del Nitrógeno

**ROS**: *Reactive Oxygen Species*, Especies Reactivas del Oxígeno

**RONS**: *Reactive Oxygen and Nitrogen Species*, Especies Reactivas del Oxígeno y del Nitrógeno

**SBF**: Suero Bovino Fetal

**SC**: *Stem Cell*, Célula Madre

**sGC**: *Soluble Guanylate Cyclase*, Guanilato Ciclasa Soluble

**SH-SY5Y**: Línea celular de neuroblastoma humano

**SH-SY5Yd**: Células SH-SY5Y diferenciadas

**SNC**: Sistema Nervioso Central

**SNCA**: *Alpha-synuclein*, Alfa sinucleína

**SOD**: Superóxido dismutasa

**TPA**: 12-O-tetradecanoforbol-13-acetato

**Trk**: *Receptor Tyrosine Kinase*, Receptor de Tirosina Quinasa

**TMB**: 3, 3',-5,5'-tetramethylbenzidine

**TLR**: *Toll-like receptor4*, Receptor Tipo Toll

**TRX**: Tiorredoxina

**3-NP**: Ácido Nitropropónico

**TNF- $\alpha$** : *Tumor Necrotic Factor-Alpha*, Factor de Necrosis Tumoral-Alfa

**UA**: Unidades Arbitrarias

**VEGF**: *Vascular Endothelial Growth Factor*, Factor de Crecimiento Endotelial Vascular



## **I. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**



Las enfermedades neurodegenerativas, como las de Parkinson, Alzheimer, Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica, suponen un reto en el área de investigación biomédica, debido a su alta prevalencia derivada del envejecimiento de la población y a su coste sociosanitario. En la actualidad no existe tratamiento curativo para estos procesos y las actuaciones terapéuticas son, por lo tanto, exclusivamente de tipo paliativo y de atención social.

Por estas razones, resulta necesario el planteamiento de nuevas estrategias terapéuticas que aborden algunos de los elementos clave de la fisiopatología de estas enfermedades. Dos de las bases fisiopatológicas consideradas más importantes para el desarrollo y progresión de estas complejas y multifactoriales enfermedades neurológicas, son la neuroinflamación y el estrés oxidativo, condiciones ambas que están íntimamente relacionadas entre sí.

Las neuronas y las células gliales son poblaciones celulares susceptibles de sufrir las consecuencias derivadas del estrés oxidativo; por un lado, el alto consumo de oxígeno que se produce durante su metabolismo y, por otro, su limitada capacidad antioxidante, las predispone a tener que responder a una superproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS). Estas especies reactivas inducen *i*, un daño directo en las macromoléculas celulares (ADN, proteínas y lípidos); *ii*, la activación de vías de señalización intercelulares, dando como resultado la expresión de genes sensibles al estrés y proteínas relacionadas con el daño oxidativo y *iii*, la inflamación mediada por la glía (incluyendo la liberación de mediadores inmunes, como el óxido nítrico y citoquinas pro-inflamatorias).

Teniendo en cuenta estos datos en la actualidad, dos de los principales elementos en la investigación para el control de estas enfermedades, son el análisis de la respuesta neuronal al estrés oxidativo y la búsqueda de nuevas estrategias dirigidas a prevenir o superar la neurotoxicidad inducida por dicho estrés.

En la presente introducción se abordan los mecanismos de producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), sus funciones biológicas, los sistemas biológicos antioxidantes, el concepto de estrés oxidativo y su influencia en la neurodegeneración, para finalizar con las propuestas terapéuticas que tienen como objetivo hacer frente al estrés oxidativo: la utilización de agentes farmacológicos antioxidantes naturales y sintéticos y, la terapia con células madre como nueva vía de abordaje de las enfermedades neurodegenerativas.





## **II. INTRODUCCIÓN**



## II.1. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y DEL NITRÓGENO (RONS)

En las reacciones biológicas que intervienen en el metabolismo celular se producen una gran variedad de especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS), las cuales resultan fundamentales para la vida celular. A pesar de que el oxígeno molecular ( $O_2$ ) es crucial para la vida de la mayor parte de los organismos, se trata de una molécula que no es totalmente inocua. Así, el efecto perjudicial del  $O_2$  es una consecuencia de su reducción metabólica univalente que conlleva la formación de moléculas tóxicas químicamente reactivas, denominadas especies reactivas de oxígeno. Los ROS engloban a los radicales libres como el anión radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), así como otros derivados del  $O_2$  como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el ácido hipocloroso (HOCl). Los RNS incluyen las diferentes formas de óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), el anión nitrosilo ( $NO^-$ ), el catión nitrosonio ( $NO^+$ ) y el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y desempeñan un papel esencial en la señalización celular. Así, pueden eliminar de forma efectiva las respuestas dependientes del NO o, por el contrario, los compuestos derivados pueden actuar duplicando los efectos del NO o antagonizándolos.

### II.1.1. Producción de ROS

Los RONS pueden tener un origen exógeno y endógeno. Las fuentes de RONS exógenas son la luz ultravioleta, la radiación ionizante, ciertos medicamentos o químicos y toxinas presentes en el medio ambiente. La producción de los RONS endógenos es mediada por las enzimas mitocondriales, del retículo endoplasmático y de los peroxisomas (Mani S, 2015; Song P, 2015).

La mitocondria es la principal productora de RONS en la mayoría de las células. Se han propuesto diferentes vías de producción de RONS, las cuales son principalmente moduladas por la cadena de transporte de electrones (Mancuso M, 2006). El complejo I de la cadena de transporte de electrones es el responsable de la producción de  $O_2^{\cdot-}$  y facilita la transferencia de electrones de la NADH al CoQ, a la vez que los protones son trasladados desde la matriz hasta el espacio intermembrana. El complejo II está involucrado en la reducción del CoQ, mientras que el complejo III participa en la generación de  $O_2^{\cdot-}$  en el espacio intermembrana (Bolisetty S, 2013).

**Producción de ROS.** El  $O_2^{\cdot -}$  es el precursor de la mayoría de los ROS y es capaz de modificar diferentes biomoléculas como el ADN y, causar daño en proteínas mediante la oxidación de ciertos aminoácidos como el triptófano, la metionina, la histidina y los residuos de cisteína. La principal fuente de esta especie reactiva son los complejos I, II y III de la cadena respiratoria en la mitocondria. El  $O_2^{\cdot -}$  mitocondrial está asociado con la regulación de las vías inflamatorias, la síntesis de las citoquinas inflamatorias y los mecanismos de la inmunidad innata.

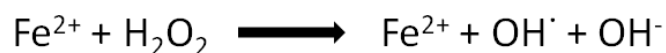
Este anión es catalizado en la matriz mitocondrial por la superóxido dismutasa (SOD) en  $H_2O_2$ .



El  $H_2O_2$  también se genera en los peroxisomas mediante diferentes enzimas como la urato oxidasa, la 1- $\alpha$ -hidroxiácido oxidasa y la D-aminoácido oxidasa (Llesuy S, 1994). En el retículo endoplasmático lo hace a través de la autooxidación del citocromo  $P_{450}$  (FMNH):



El  $H_2O_2$  es considerado una especie reactiva intermedia de gran importancia ya que posee la capacidad de generar  $OH^{\cdot}$  en presencia de metales como el hierro mediante la reacción de Fenton (Chance B, 1979):



Este radical hidroxilo también se puede generar mediante la reacción de Haber-Weiss, donde el radical superóxido reacciona con el peróxido de hidrógeno (Halliwell B, 2006):



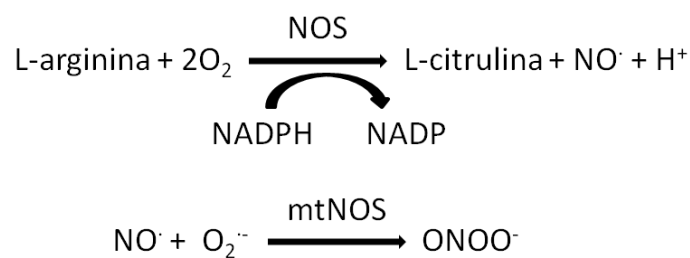
Además de la mitocondria, otro importante productor de ROS en las células es el retículo endoplasmático. En condiciones fisiológicas normales, las reacciones de formación de puentes disulfuro y el plegamiento de proteínas, catalizadas por la oxidorreductasa-1 del retículo endoplasmático (ERO-1) y la proteína disulfuro isomerasa (PDI), generan un aumento en los niveles intracelulares de ROS. En

condiciones de estrés oxidativo, los niveles de glutatión (GSH) intracelular disminuyen al reducir la formación incorrecta de puentes disulfuro durante el plegamiento de proteínas, lo cual también genera un aumento de los niveles intracelulares de los ROS (Gordillo G, 2010). Además, el gasto de ATP que se produce durante el plegamiento de proteínas en un ambiente oxidante puede provocar la fosforilación oxidativa en la mitocondria y, como consecuencia, provocar también un aumento en los niveles intracelulares de ROS (Bhandary B, 2012; Malhotra JD, 2007).

Otro orgánulo que interviene en la producción de ROS en las células son los peroxisomas. Estos orgánulos participan en numerosas vías metabólicas como la oxidación de ácidos grasos, la síntesis de fosfolípidos, el catabolismo de aminoácidos y en la ruta de las pentosas fosfato. Bajo condiciones fisiológicas normales, el consumo de oxígeno puede conducir a la producción de  $H_2O_2$  mediante la transferencia de  $O_2$  de diferentes enzimas como la acil-coA oxidasa, la D-aspartato oxidasa o la urato oxidasa (Mani S, 2015). Las catalasas presentes en los peroxisomas descomponen el  $H_2O_2$  y así se mantiene el equilibrio redox (Schrader M, 2006). Cuando los peroxisomas se dañan y los niveles de catalasa decrecen, se produce un incremento de  $H_2O_2$  en el citosol, lo que genera un estado de estrés oxidativo en las células (Valko M, 2007).

**La producción de RNS** comienza con la reacción del  $O_2^{\cdot-}$  con el  $NO^{\cdot}$  (generado a partir de la L-arginina). El  $NO^{\cdot}$  genera otras especies reactivas intermedias capaces de desencadenar daño nitrosativo (Drew B, 2002). Una excesiva producción de  $NO^{\cdot}$  está relacionada con isquemia, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades inflamatorias crónicas (Lee J, 2004; Salman KA, 2013).

La reacción entre el  $O_2^{\cdot-}$  y el  $NO^{\cdot}$  forma  $ONOO^-$ , especie reactiva con una alta capacidad para dañar lípidos, bases de ADN y proteínas (Ahmadinejad F, 2017) o incluso inducir la muerte neuronal excitotóxica (Valko M, 2007).



Estas reacciones están catalizadas por la oxido nítrico sintetasa (NOS). Esta enzima presenta varias isoformas en función de su localización: la isoforma NOS neuronal (nNOS), la cual se expresa en células gliales; la NOS endotelial (eNOS) que se expresa en el endotelio vascular; la NOS insensible al calcio (iNOS), cuya expresión puede ser inducida por citoquinas y liposacáridos bacterianos (Foerstermann U, 2012) y la isoforma localizada en la mitocondria (mtNOS).

### II.1.2. Funciones fisiológicas de los ROS

Los ROS actúan como mensajeros celulares en múltiples eventos fisiológicos (Droge W, 2002), entre los que cabe destacar:

- *Regulación de cascadas de señalización celular.* Los diferentes tipos de células, como los fibroblastos, células del músculo liso vascular, cardiomiocitos o células endoteliales, producen ROS a través de la NADPH oxidasa para regular la transmisión de señales intracelulares (Thannickal V, 1995; Jones S, 1996).

- *Regulación del tono vascular.* La regulación del tono vascular por el guanosin monofosfato cíclico (cGMP) es un caso especial. La activación de la enzima guanilato ciclasa soluble (sGC) se produce por el  $H_2O_2$  y el radical  $NO^\cdot$  (Wolin M, 1999). La sGC cataliza la formación de cGMP, el cual es empleado como un mensajero secundario en un gran número de respuestas fisiológicas. La activación de cGMP modula funciones de proteínas quinasas, canales iónicos, el tono del músculo liso y la inhibición de la adhesión plaquetaria.

- *Sensor de los cambios en la concentración de oxígeno.* La homeostasis del oxígeno es preservada en los organismos por una fuerte regulación de los glóbulos rojos (Acker H, 1995). Se cree que los cambios en la concentración del oxígeno son reconocidos por diferentes proteínas productoras de ROS, como el citocromo b.

- *Regulación de la adhesión celular.* La adhesión celular juega un papel importante en la embriogénesis, la proliferación celular, la diferenciación o en la reparación de heridas. Los cambios en las propiedades adhesivas de las células y tejidos están relacionados con cambios en el estado redox de la célula (Frenette P, 1996).

- *Regulación de la respuesta inmune.* La activación de linfocitos T durante la respuesta inmune es regulada por un cambio en el estado redox del GSH. Las funciones

de células T, como por ejemplo la producción de interleucina-2 (IL-2), pueden ser inducidas por la concentración de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  (Los M, 1995). También existe la evidencia de que el estado redox intracelular modula la función de los macrófagos (Hamuro J, 1999).

- *Inducción de la apoptosis.* La entrada en la apoptosis depende del equilibrio entre las señales inductoras de la muerte celular, como las provocadas por el desequilibrio redox, y las señales inductoras de supervivencia celular, como factores de crecimiento y citoquinas (Hengartner M, 2000).

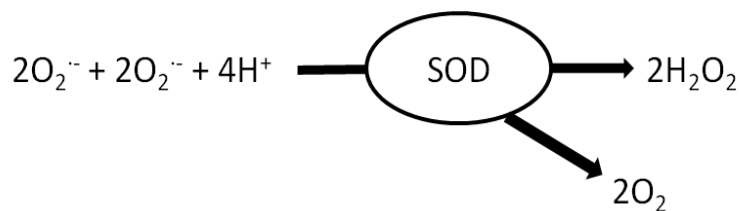
- *Supervivencia celular bajo condiciones de hipoxia.* El factor inducible por hipoxia (HIF) regula el metabolismo y la supervivencia celular en condiciones de hipoxia. El incremento de ROS estabiliza a la subunidad  $\alpha$  del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) mediante un incremento de la generación del radical  $OH^{\cdot}$  por  $H_2O_2$ .

## II.2. SISTEMAS ANTIOXIDANTES CELULARES

Los RONS pueden ejercer un papel biológico dual, actuando como agentes beneficiosos o dañinos, en función de su concentración. Así, mientras una concentración moderada de RONS resulta imprescindible para generar los efectos deseados en la respuesta celular, una producción excesiva de RONS genera estrés oxidativo, un proceso nocivo para la estructura celular mediado por el daño en los lípidos, membranas, proteínas y ADN (Schwab L, 2014). Existen una gran variedad de mecanismos antioxidantes con los que las células pueden defenderse cuando los RONS exceden sus niveles fisiológicos. Estos sistemas pueden ser enzimáticos y no enzimáticos.

### II.2.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos

Las **superóxido dismutasas (SODs)** son una clase de metaloenzimas fundamentales en el sistema de defensa antioxidante del organismo, cuya función es catalizar la dismutación del radical superóxido en oxígeno y  $H_2O_2$  (Fridovich I, 1995).

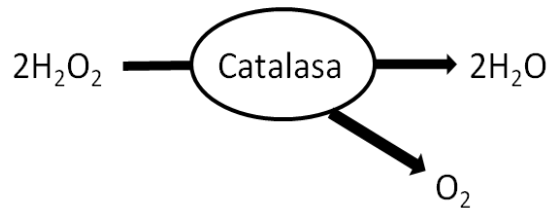


En los mamíferos existen tres isoformas de la enzima codificadas por tres genes diferentes. Las isoformas de SOD difieren en su localización y en el metal unido a ellas. La SOD-1 es una enzima citosólica con cobre y zinc como cofactor (Cu/Zn-SOD), la SOD-2 es una enzima mitocondrial con manganeso en su centro (Mn-SOD) y la SOD-3 es una enzima extracelular que contiene Cu/Zn denominada EC-SOD (Sentman M, 2006).

La importancia fisiológica de las SODs se ha demostrado en numerosos estudios en los que una sobreexpresión de las SODs sirve para atenuar las condiciones neuropatológicas, como los daños isquémicos (Keller J, 1998) y la enfermedad de Alzheimer (Dumont M, 2009; Massaad CA, 2009).

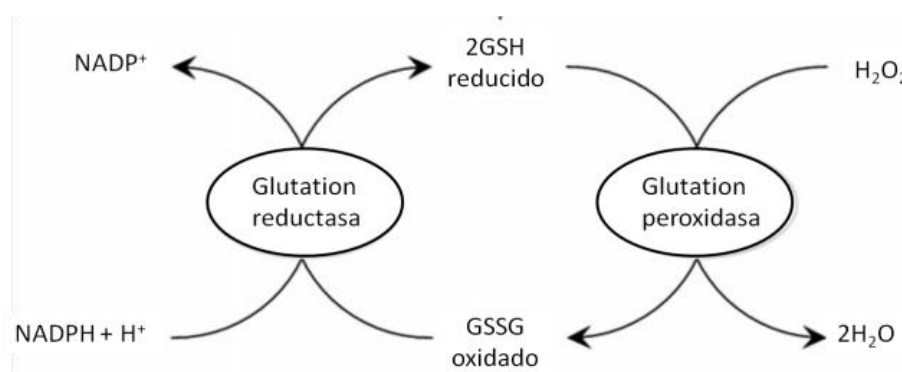
La **catalasa** es una enzima antioxidante que se encuentra en casi todos los organismos vivos. Su principal función es catalizar la descomposición del  $H_2O_2$  en agua y oxígeno (Chelikani P, 2004).





En estudios directamente relacionados con el envejecimiento y la neurodegeneración, se muestra que las disfunciones cognitivas relacionadas con la edad pueden ser parcialmente paliadas mediante tratamiento con análogos sintéticos SOD/catalasa (Liu R, 2003; Clausen A, 2010).

Las **enzimas glutatión peroxidasas (GPx)** constituyen un grupo de enzimas antioxidantes encargadas principalmente de reducir el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y los hidroperóxidos lipídicos en sus correspondientes alcoholes. Para dichas funciones, la GPx requiere de la oxidación del glutatión reducido (GSH), el cual se convierte en glutatión disulfuro oxidado (GSSG); posteriormente, éste es reconvertido de nuevo en GSH gracias a la acción de la glutatión reductasa (GR, enzima inducible en condiciones de estrés oxidativo), en presencia de NADPH (Ballatori N, 2009).



De este modo, el efecto de la GPx y de la GR como enzimas antioxidantes no puede dissociarse del precursor principal del sistema, el GSH. De hecho, la eficacia de estas enzimas en la neuroprotección depende de la disponibilidad del GSH y del GSSG como equivalentes de reducción (McLean C, 2005; Donahue A, 2006).

El grupo de las **tiol-disulfuro oxidorreductasas** incluye la glutarredoxina (GRX), la tiorredoxina (TRX) y la proteína disulfuro isomerasa (Wells WW, 1993). Tanto la GRX como la TRX son antioxidantes endógenos que contribuyen a la protección contra el estrés oxidativo, actuando específicamente en la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares en las proteínas (Barhwal K, 2009).

Las **peroxirredoxinas (PRXs)** están involucradas en la descomposición del  $H_2O_2$ , hidroperóxidos orgánicos y peroxinitritos (Chae H, 1993). Diversos estudios muestran que las PRXs son necesarias para el mantenimiento de la homeostasis en el estado redox (Kim S, 2008) y que durante la enfermedad de Alzheimer estas enzimas aumentan su concentración en respuesta al incremento de los niveles del péptido  $\beta$ -amiloide, con el propósito de proteger a las neuronas de la toxicidad inducida por este péptido (Zheng Y, 2007).

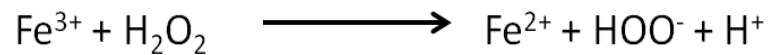
### II.2.2. Sistemas antioxidantes no enzimáticos

Además de los sistemas enzimáticos ya mencionados, existen otros sistemas antioxidantes no enzimáticos que se describen a continuación.

El **glutatión (GSH, L-g-glutamyl-L-cisteinil-glicina)** es la molécula antioxidante más abundante en el citoplasma celular. El GSH es un tripéptido de glutamato (Glu), cisteína (Cys) y glicina (Gly), que interviene en el mantenimiento del estado redox, así como en la viabilidad y el óptimo funcionamiento de las células (Aoyama K, 2008). El GSH actúa como co-sustrato de la GPx en la reducción del  $H_2O_2$  y de los lípidos hidroperóxidos (Anthony muthu TS, 2016).

Como agente antioxidante, el GSH juega un papel muy importante en la defensa oxidativa neuronal. Se ha observado que los niveles de GSH disminuyen durante el envejecimiento y en múltiples patologías, como la lesión medular traumática y las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson (Saharan S, 2014). Esta situación origina una serie de reacciones en cadena que dan como resultado, entre otras, una alteración en la homeostasis del calcio, provocando finalmente la muerte celular (Kraft R, 2004).

La **vitamina C o ácido ascórbico**, es un potente antioxidante que puede neutralizar los radicales libres mediante la donación de un átomo de hidrógeno. Durante este proceso la vitamina C se convierte en un radical libre, aunque esto carece de importancia, ya que el radical de vitamina C es muy estable debido a su estructura. Normalmente el  $Fe^{2+}$  es oxidado por el  $H_2O_2$  dando lugar a  $Fe^{3+}$  junto a un  $OH\cdot$  y un anión hidroxilo en la mencionada reacción de Fenton. Tras esta reacción el  $Fe^{3+}$  puede reducirse de nuevo a  $Fe^{2+}$  por la acción del  $H_2O_2$ , produciendo un radical peroxilo y un protón durante el proceso.



Sin embargo, en presencia de hierro y cobre, la vitamina C puede convertirse en un potente pro-oxidante. Ante la entrada de metales contaminantes del exterior o durante una lesión cerebral en la que la presencia de hierro y cobre es mayor (Halliwell B, 1990), la vitamina C puede acelerar esta última reacción, actuando como un aceptor de  $\text{Fe}^{3+}$  en lugar del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ocasionando estrés oxidativo.



**Vitamina E** es el término genérico referido a un grupo de tocoferoles y tocotrienoles, de los cuales el más estudiado es el  $\alpha$ -tocoferol, siendo ésta la forma más generalizada de vitamina E en el cerebro (Roy S, 2002). La vitamina E es una vitamina liposoluble conocida por su papel antioxidante, involucrada en eliminar los ROS formados en las membranas sometidas a peroxidación lipídica.

La **coenzima Q10** es una benzoquinona que se encuentra en la mayoría de las células transfiriendo electrones en la cadena transportadora de electrones (Voet D, 2008). Esta función es lo que hace que la coenzima Q pueda actuar como antioxidante. Por esta razón, la coenzima Q es ampliamente empleada como un suplemento alimenticio con el objetivo de revertir los efectos producidos por el estrés oxidativo durante el envejecimiento y el desarrollo de múltiples patologías como las enfermedades mitocondriales (Haas RH, 2007) y las enfermedades neurodegenerativas (Beal M, 2002).

La **melatonina** es la principal hormona pineal derivada del precursor serotonina. Su función es la regulación del ciclo del sueño, pero también es un potente neutralizador de ROS, siendo por ello un poderoso antioxidante (Hardeland R, 2005). A diferencia de la vitamina C y el GSH (los cuales son sólo efectivos en fase acuosa) y la vitamina E (efectiva en fase lipídica), la melatonina puede funcionar en ambas fases (Tan DX, 2002). Por este motivo puede atravesar fácilmente las membranas celulares y la barrera hematoencefálica (Reiter R, 2005), siendo por ello un agente importante para la protección contra el daño inducido por el estrés oxidativo en el SNC (Sharma M, 2001).

### II.3. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es la consecuencia de una situación en la que las defensas antioxidantes celulares se ven superadas por una excesiva generación de RONS. Bajo estas condiciones de estrés oxidativo, numerosas biomoléculas celulares como el ADN, los lípidos o las proteínas sufren modificaciones que conducen a la disfunción celular y como consecuencia, al daño en los tejidos y órganos (Shahrani MA, 2017).

Se distinguen cinco estados basados en la relación entre la suma total de la concentración de RONS en la célula y la capacidad de la barrera antioxidante. Se habla de equilibrio redox cuando:

- los niveles de la barrera antioxidante y los niveles de RONS están equilibrados.
- los niveles de RONS aumentan y este incremento va acompañado de un aumento equivalente de los sistemas antioxidantes.

Por el contrario, se produce estrés oxidativo cuando:

- los niveles de RONS aumentan, pero la barrera antioxidante no varía.
- los niveles de RONS permanecen inalterados, pero el sistema antioxidante disminuye.
- los niveles de RONS aumentan y, a la vez, los niveles de antioxidantes disminuyen (Niki E, 2012).

En el caso concreto del SNC, el estrés oxidativo actúa a diferentes niveles, activando una serie de vías relacionadas con el daño oxidativo, la apoptosis y la inflamación. Sin embargo, aún no está clara la razón por la cual en las enfermedades neurodegenerativas la inflamación deja de ser un proceso de defensa y reparación, para convertirse en un factor poderoso de destrucción neuronal.

El control del estrés oxidativo está regulado a nivel transcripcional principalmente por un mecanismo endógeno. Los promotores de los genes que participan en la reducción del estrés oxidativo, la inflamación y la acumulación de metabolitos tóxicos contienen una secuencia específica de unión común denominada elemento de respuesta antioxidante (ARE, por sus siglas en inglés *Antioxidant Response Elements*), que puede ser activada por diversos factores de transcripción entre los que se incluyen:

**El factor activador Nrf2.** En condiciones normales, el Nrf2 se encuentra unido a la proteína 1 asociada a ECH tipo kelch (Keap1) en el citoplasma dirigida a su degradación en el proteosoma. En un estado de estrés oxidativo, la proteína Keap1 libera a Nrf2, que se trasloca al núcleo donde se une a ARE, permitiendo la expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la glutatión transferasa o la NAD(P)H (Ramsey CP, 2007). Además, la activación de Nrf2 también permite la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor antiinflamatorio IL-10, el co-factor de transcripción mitocondrial Nrf-1 y la proteína 1 $\alpha$  coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC-1 $\alpha$ ) (Sandberg M, 2014). Por todo ello, el Nrf2 podría ser una buena diana terapéutica para controlar la neuroinflamación asociada con la neurodegeneración.

**El factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B).** La actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B está relacionada con la plasticidad neuronal y la neurodegeneración, por lo que este factor es crucial para el mantenimiento de la homeostasis del sistema nervioso central (SNC) (Mattson M, 2005). En condiciones normales se sitúa en el citoplasma formando un complejo inactivo que consiste en dos subunidades, p50 y p65, y una subunidad inhibitoria llamada I $\kappa$ B. En respuesta al estrés oxidativo, I $\kappa$ B es fosforilada, ubiquitinada y degradada por el proteosoma, lo cual permite la traslocación de NF- $\kappa$ B al núcleo para regular la expresión de genes y la codificación de citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento como el BDNF (Gutierrez H, 2011).

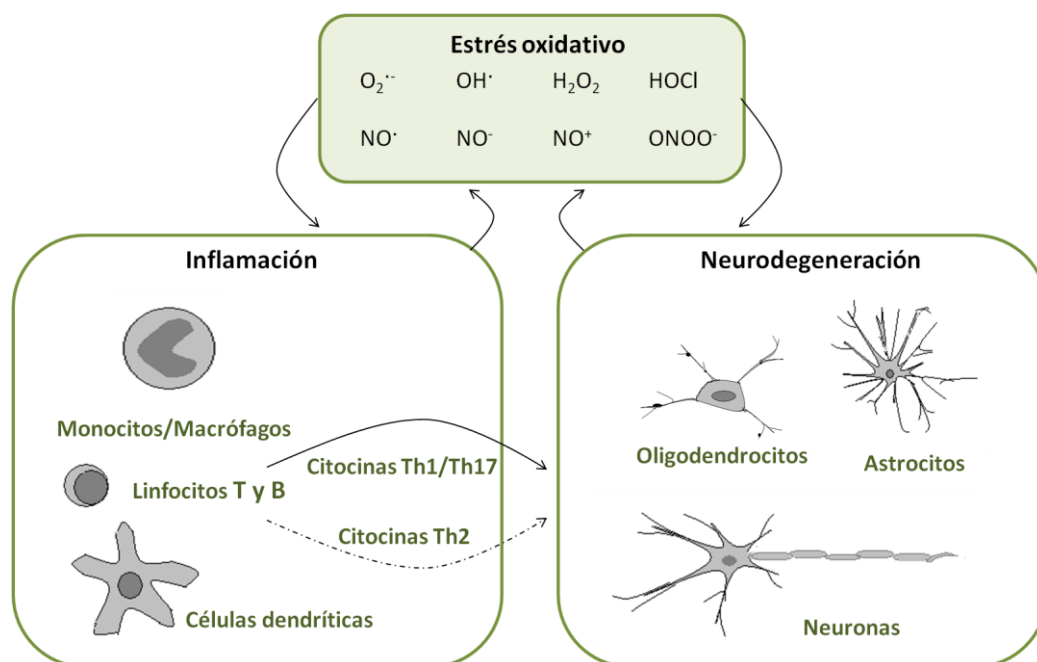
**Las proteínas activadas por mitógenos o MAPKs.** La cascada de transducción de las MAPKs está organizada en 3 subfamilias: quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs), quinasas c-Jun N-terminal (JNK) y la MAPK p38. El papel de de las ERKs está asociado principalmente con señales de supervivencia, aunque dependiendo del tipo y la función de la célula, la activación de esta quinasa puede tener un efecto protector o de promoción de muerte celular (Murugaiyah V, 2015). Las JNKs regulan las vías apoptóticas e inflamatorias que se activan durante la neuroinflamación, mediante el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial (Coffey ET, 2014; Mehan S, 2011). Por último, numerosos estudios muestran que la elevada activación de p38 contribuye a la neuroinflamación y al daño neuronal características de patologías como la enfermedad de Alzheimer o el Parkinson (Coulthard LR, 2009).

### **II.4. PAPEL DESEMPEÑADO POR EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA NEURODEGENERACIÓN**

Las enfermedades neurodegenerativas son dolencias en las cuales se produce un deterioro progresivo e irreversible del SNC. Son ejemplos de este tipo de enfermedades la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

La fisiopatología de estas enfermedades es multifactorial, siendo determinantes el estrés oxidativo, los factores genéticos, la excitotoxicidad, la agregación de proteínas y la alteración en el desarrollo de importantes procesos celulares, como los producidos en las mitocondrias. El SNC es especialmente sensible al estrés oxidativo debido a varias razones: *i*, sus células tienen un elevado consumo de O<sub>2</sub>, el cerebro puede catabolizar más de  $4 \times 10^{21}$  moléculas de glucosa/minuto; *ii*, se producen elevadas cantidades de ROS y RNS como consecuencia de reacciones neuroquímicas específicas, como la oxidación de la dopamina; *iii*, el incremento del depósito de iones metálicos como consecuencia de la edad, catalizando la producción de cantidades crecientes de ROS y RNS y *iv*, existe una elevada cantidad de lípidos en el SNC (mielina) que son particularmente sensibles a la oxidación, ocasionando una acumulación de productos de descomposición como el malondialdehído (MDA) o los ácidos grasos nitrogenados (NO<sub>2</sub>-Fas).

En el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas se producen elevados niveles de ROS y RNS como consecuencia de la infiltración de monocitos/macrófagos y la activación de la microglia, actuando como mediadores en la neurodegeneración y en el daño axonal típico de estas enfermedades (figura 1, modificada de Chiurciu V, 2014). Asimismo, los radicales libres pueden activar algunos factores de transcripción, como el NF-κB, que incrementan la expresión de genes implicados en la fisiopatología de estas enfermedades, como los que codifican las citocinas proinflamatorias o moléculas de adhesión a los endotelios vasculares. Por otro lado, se ha observado que el incremento de ROS y RNS en el tejido cerebral se ve acompañado de una reducción significativa del sistema antioxidante celular que incluye una disminución de la actividad de la SOD, catalasa, GSH/GPx, α-tocoferol y ácido úrico. Como consecuencia, se incrementa la actividad de la lipooxigenasa, manteniendo el estatus inflamatorio en el SNC (Chiurciu V, 2016).



**Figura 1.** Relación entre el estrés oxidativo, la inflamación y la neurodegeneración. Las especies reactivas son producidas por diferentes tipos celulares provocando un proceso inflamatorio mediante la liberación de citocinas proinflamatorias y, un proceso de neurodegeneración, que induce la muerte neuronal y axonal.  $O_2^{\cdot-}$ : anión radical superóxido;  $OH^{\cdot}$ : radical hidroxilo;  $H_2O_2$ : peróxido de hidrógeno;  $HOCl$ : ácido hipocloroso;  $NO^{\cdot}$ : óxido nítrico;  $NO^-$ : anión nitrosilo;  $NO^+$ : catión nitrosonio;  $ONOO^-$ : peroxinitrito.

#### II.4.1. Enfermedad de Alzheimer

La EA es la causa más común de demencia, se caracteriza por un progresivo deterioro de las funciones cognitivas y una pérdida de neuronas, principalmente en el hipocampo, la zona del cerebro encargada de la memoria y la orientación espacial. Las dos principales características neuropatológicas de la EA son la anormal acumulación de placas  $\beta$ -amiloides ( $\beta A$ ) y de ovillos neurofibrilares debidos de la hiperfosforilación de la proteína Tau (Butterfield DA, 2014; Winner B, 2015).

El estrés oxidativo es un factor importante en la patogénesis de la EA (Bonda DJ, 2010). Las placas proteicas  $\beta A$  pueden reducir los niveles del  $Ca^{2+}$  almacenado en el retículo endoplasmático, dando como resultado un exceso de  $Ca^{2+}$  citosólico. En respuesta a este incremento del  $Ca^{2+}$  citosólico, se reducen los niveles de GSH endógeno y, como consecuencia, se elevan los niveles de ROS intracelulares (Ferreiro E, 2008). Se ha demostrado que el estrés oxidativo observado en pacientes de EA es resultado de la activación de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) lo cual conduce a una excesiva entrada de  $Ca^{2+}$ , promoviendo la permeabilidad celular y el consecuente aumento de los niveles intracelulares de RONS (Nakamura T, 2010; Nakamura T, 2011).

Además, las proteínas  $\beta$ A pueden provocar la formación de radicales libres directamente por la activación de la NADPH oxidasa (Shelat PB, 2008) y pueden activar la vía de las caspasas, jugando un papel importante en la inducción de la apoptosis neuronal (fig.2; Awasthi A, 2005).

Por otro lado, la superproducción de ROS inducida por la proteína  $\beta$ A modifica las vías de señalización celulares e inicia la hiperfosforilación de la proteína Tau, a través de la activación de p38 MAPK, produciéndose una anormal acumulación de proteínas Tau hiperfosforiladas lo que conduce a la formación de más ovillos neurofibrilares (fig.2; Bulat N, 2009; Giraldo E, 2014).

### II.4.2. Enfermedad de Parkinson

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después de la EA. Es una enfermedad progresiva y crónica, causante de trastornos motores como hipocinesia, rigidez, temblor, inestabilidad postural, así como síntomas no motores como depresión, ansiedad y déficits cognitivos y olfativos. Se caracteriza por una pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra del cerebro (Winner B, 2015). Los mecanismos patológicos responsables de la pérdida neuronal han sido relacionados con un aumento de los niveles intracelulares de ROS y otros radicales libres (Dias V, 2013).

El estrés oxidativo generado en la EP está asociado con la disfunción del complejo I de la mitocondria. Esta disfunción mitocondrial se produce por la mutación de diversas proteínas como PINK1, parkin o alfa-sinucleína ( $\alpha$ Syn). La proteína PINK1, proteína presente en los tejidos humanos, juega un papel importante en la lucha contra el estrés oxidativo y el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial (Zuo L, 2013). La proteína Parkin mutante puede contribuir a la patogénesis de la EP autosómica recesiva, debido a su papel crítico en la supresión de ROS y en la prevención de la formación de proteínas neurotóxicas causadas por ubiquitinación (Jiang H, 2004; Zuo L, 2013). Además, el estrés oxidativo también provoca un mal funcionamiento del proteosoma, lo que provoca la agregación de  $\alpha$ Syn, que interrumpe la actividad del complejo I y, por ello, la síntesis de ATP se ve comprometida ocasionando la disfunción mitocondrial (fig.2; Ganguly G, 2017).



### II.4.3. Enfermedad de Huntington

La EH es una enfermedad neurodegenerativa asociada a la repetición inestable del triplete citosina-adenina-guanina (CAG) en el gen HTT, que afecta a la coordinación muscular. Es un trastorno caracterizado por movimientos anormales involuntarios y que conduce a una disminución cognitiva y a problemas psiquiátricos. (Aylward E, 2004; Kipps C, 2005).

La expansión de CAG repetido a lo largo del exon1 del gen HTT, da lugar a una proteína mutante (mHTT) que tiende a la agregación (Labbadia J, 2013). Los agregados de mHTT se acumulan en el cerebro de los enfermos afectados, lo cual provoca la desregulación del proceso de transcripción. Estas alteraciones son las responsables de los problemas motores y cognitivos de la EH (Gil-Mohapel J, 2014; Labbadia J, 2013).

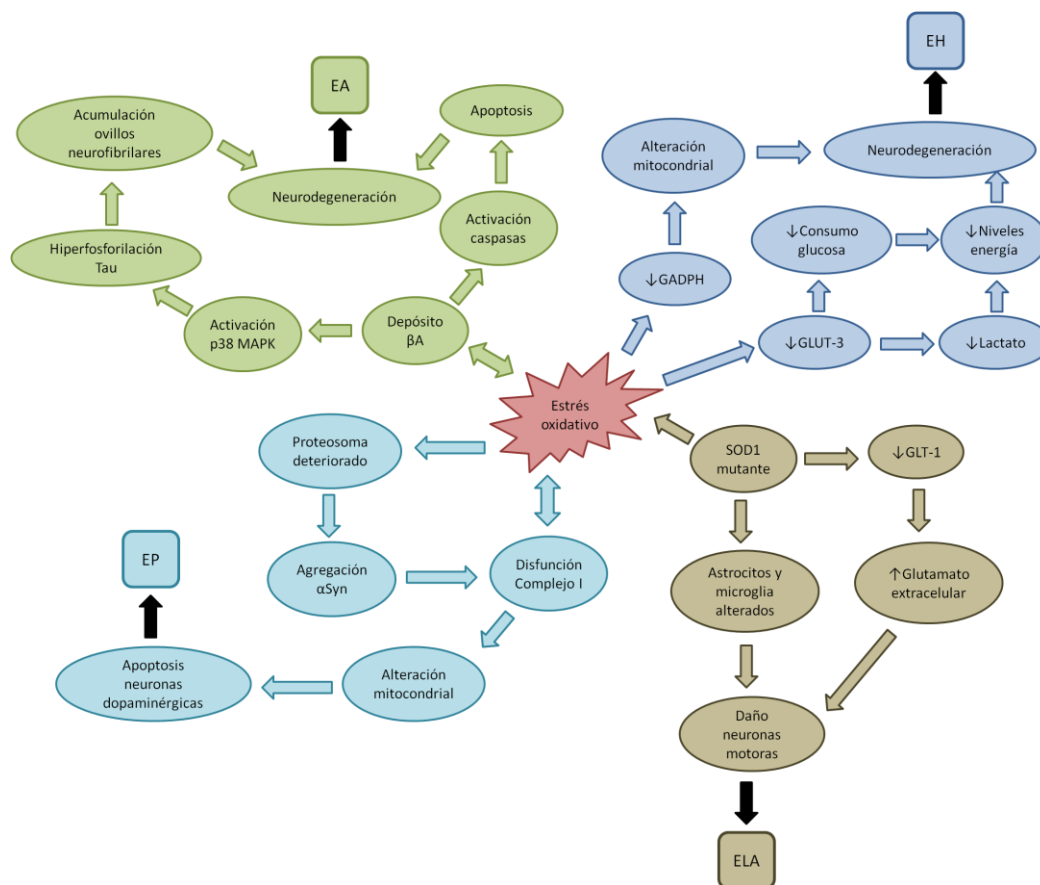
Diversos estudios han demostrado la estrecha relación que existe entre el estrés oxidativo, las alteraciones mitocondriales y la pérdida de neuronas que tiene lugar en el cuerpo estriado y en la corteza cerebral durante la EH (fig.2; Bolanos JP, 2009; Zuccato C, 2010). Bajo condiciones de estrés oxidativo, se reduce la expresión del transportador de glucosa 3 (GLUT-3) inhibiéndose el consumo de glucosa lo que produce una acumulación de lactato en las células (Covarrubias-Pinto A, 2015). Además, se ha identificado que el extremo N-terminal de la mHTT puede interactuar con las membranas mitocondriales, causando cambios en el calcio mitocondrial. La mHTT también puede inhibir el transporte de electrones en el complejo II mitocondrial dando lugar a un aumento de los niveles intracelulares de ROS y un descenso en la producción de ATP (Bossy-Wetzel E, 2008). Otros investigadores sugieren que el estrés oxidativo puede inactivar la actividad catalítica de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), causando daño mitocondrial (fig.2; Liot G, 2017).

### II.4.4. Esclerosis lateral amiotrófica

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a la unión neuromuscular, como consecuencia de un daño en las neuronas motoras de la corteza motora primaria, dando lugar a una parálisis muscular progresiva de pronóstico mortal. Se clasifica en dos tipos: ELA esporádica que aparece alrededor de los 50 ó 60 años, siendo su origen incierto, por lo que es difícil identificar sus causas genéticas o ambientales (Ingre C, 2015), y la ELA familiar, en la que alrededor de un 20% de los casos están relacionados con mutaciones en el gen que codifica la SOD1 (Gamez J, 2006). Las funciones de SOD1 son diversas e incluyen neutralizar el exceso de  $O_2^-$ ,

modular la respiración celular, el metabolismo y las modificaciones postranscripcionales. Es por ello que las alteraciones en la actividad de la SOD1 causan un aumento de los ROS conduciendo a un estrés oxidativo que daña a las células (Saccon RA, 2015).

Diversos estudios muestran que las mutaciones de la SOD1 provocan daño en las neuronas motoras por varias vías: pueden alterar la síntesis de aminoácidos en las células (Bastow EL, 2016), aumentar la producción de Nox-2 (Li Q, 2011) o alterar la actividad de las células gliales de soporte, astrocitos y microglia (Lee J, 2016). La expresión de SOD1 mutante en los astrocitos reduce la expresión del transportador de glutamato 1 (GLT-1), lo que provoca un incremento en la concentración de glutamato extracelular, ocasionando el daño neuronal (fig.2; Li K, 2015).



**Figura 2.** Esquema sobre la relación del estrés oxidativo en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas. EA: enfermedad de Alzheimer, EP: enfermedad de Parkinson, ELA: Esclerosis lateral amiotrófica, EH: enfermedad de Huntington, βA: placas β-amiloides, MAPK: proteínas activadas por mitógenos; αSyn: alfa-sinucleína, GLUT-3: transportador de glucosa 3, GAPDH gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, SOD: superóxido dismutasa, GLT-1: transportador de glutamato.

## II.5. MODELOS EXPERIMENTALES IN VITRO PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO NEURONAL

Las neuronas humanas son células altamente diferenciadas, cuyo cultivo *in vitro* es difícil de mantener, lo que supone una limitación para los estudios de neurotoxicidad y neuroinflamación. Por esta razón, es necesario desarrollar modelos experimentales que permitan garantizar un suministro ilimitado de células con características similares a las de las neuronas humanas. Entre las líneas celulares más empleadas como modelos *in vitro* para los estudios de neurotoxicidad, se pueden citar las siguientes:

**PC12**, línea celular establecida en 1976 a partir de un feocromocitoma de la médula suprarrenal de rata. El factor de crecimiento nervioso (NGF) induce la diferenciación neuronal de estas células, las cuales liberan diferentes neurotransmisores, como dopamina, noradrenalina y acetilcolina (Popova D, 2017).

Diversos estudios muestran que el tratamiento de estas células con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta los niveles intracelulares de ROS (Choi Y, 2005) y que algunos compuestos antioxidantes son capaces de neutralizar dicho incremento. Nakajima y cols. (2009) demostraron que la 3,4-dihidroxibenzalacetona y el ácido cafeico ejercen un mayor poder antioxidante que la NAC a la misma concentración sobre células PC12 tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Hou y cols. (2003), demostraron que la sesamina y la sesamolina previenen la muerte de las PC12 inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mediante la inhibición de MAPK y la activación de la caspasa 3.

**P19**, línea celular establecida en 1981 a partir de un teratoma de ratón. Son células multipotentes que pueden diferenciarse hacia las tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo. En estudios de neurotoxicidad se utilizan porque se diferencian a fenotipo neuronal al ser expuestas al ácido *all-trans* retinoico (ATRA, un derivado natural de la vitamina A), pudiendo diferenciarse también a células de la astrogliá. Las P19 diferenciadas expresan receptores para glutamato, GABA y acetilcolina (Popova D, 2017).

Algunos estudios han demostrado que la exposición de estas células a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduce su viabilidad (Ishihara I, 2000), efecto que se puede prevenir mediante el tratamiento con quercetina (Jembrek MJ, 2012). El efecto neuroprotector de este flavonoide está asociado a la disminución de la generación de ROS, la inhibición de la actividad de las caspasas 3/7 y la prevención de la condensación de la cromatina.

**NT2**, línea celular de teratocarcinoma humano, establecida en los años 80 a partir de una biopsia de un paciente con carcinoma de testículos (Andrews PW, 1988). Estas células se pueden diferenciar a neuronas mediante el empleo de dos inductores, el ATRA o el antimetabólico análogo de la citosina (AraC), tras lo cual expresan marcadores neuronales tales como NF-200, DCX y  $\beta$ -III-Tubulina (Gonzalez-Burguera I, 2016; Gordon J, 2013).

Varios estudios demuestran su sensibilidad al estrés oxidativo. Así, el cultivo de estas células en condiciones de hipoxia reduce la viabilidad de las NT-2 y aumenta la expresión del HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  (Martin-Aragon Baudel MAS, 2017). De la misma manera, la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduce la viabilidad celular y aumenta los niveles de la 8-hidroxi guanina (8-OHG), biomarcador empleado para medir el daño oxidativo producido en el ADN (Lee M, 2001).

**Células madre neurales (NSCs)**, corresponden a poblaciones obtenidas a partir de células progenitoras neurales, cultivadas en presencia de mitógenos, como el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2). En esas condiciones, crecen en monocapa o formando agregados esféricos, conocidos como neuroesferas, y son capaces de diferenciarse hacia un linaje neural o glial (Svendsen C, 1998; Reynolds BA, 1992; Vescovi A, 1999). Estas células se emplean como modelo en el estudio de enfermedades neurodegenerativas, ya que pueden ser modificadas genéticamente y, así, expresar mutaciones características de estas patologías (Jakel R, 2004).

Distintos estudios muestran que la exposición de estas células al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoca un descenso de la viabilidad celular y un incremento de los niveles intracelulares de los ROS, efectos que son evitados con el pretratamiento de estas células con compuestos como el adjudin, un análogo de la lonidamina, compuesto que suprime la glicólisis en células tumorales y que se ha empleado junto con otros agentes para el tratamiento de diversos cánceres y, el osthol, un tipo de cumarina natural con potencial terapéutico frente al estrés oxidativo (Yan Y, 2017; Zhang T, 2017).

**Células Madre Pluripotentes Inducidas (iPSCs)**, descubiertas por Yamanaka en 2007, son obtenidas a partir de fibroblastos dérmicos humanos reprogramados mediante la inducción de la expresión de los genes Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4 (Takahashi K, 2007). Esta línea celular es empleada como modelo en el estudio de enfermedades

multigénicas, en estudios de toxicidad y en terapia celular. Para conseguir iPSCs específicas para una enfermedad son necesarias unas herramientas de ingeniería genómica precisas y flexibles. Entre todas las técnicas innovadoras de reprogramación empleadas, el sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) es considerada como la menos compleja y la más flexible para conseguir la edición genómica en células madre pluripotentes (Kime C, 2016). También se ha descrito una nueva técnica para generar neuronas *in vitro* empleando CRISPR/Cas9 para la inactivación de genes específicos asociados a diferentes neuropatologías en humanos (Rubio A, 2016). Además, un estudio reciente demostró que CRISPR puede ser empleado para ejercer alteraciones genómicas precisas en la expresión del gen crítico relacionado con la enfermedad de Parkinson, alfa sinucleína (SNCA), en neuronas humanas derivadas de iPSCs (Heman-Ackah SM, 2016). Otro estudio estableció un procedimiento que permite la señalización de mutaciones con CRISPR, generando así iPSCs humanos con combinaciones específicas de mutaciones asociadas a la enfermedad de Alzheimer (Paquet D, 2016). Las neuronas diferenciadas a partir de iPSCs específicas del paciente proporcionan una herramienta valiosa para el estudio *in vitro* del fenotipo molecular específico de enfermedades neurodegenerativas (Heman-Ackah SM, 2016). Sin duda, el rápido desarrollo de las iPSCs y las tecnologías de edición genómica, son herramientas importantes para el estudio de enfermedades neurodegenerativas mediante la terapia génica.

Diversos estudios muestran como la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de células iPSCs provoca un aumento de los niveles intracelulares de los ROS. El posterior tratamiento con antioxidantes, como el genipin (un conocido activador de la vía Nrf2) o la curcumina, produce un descenso de los niveles de los ROS y una disminución de la muerte celular (Chang K, 2016; Chang Y, 2014).

**SH-SY5Y**, subclon de la línea celular SK-N-SH, establecida en los años 70 a partir de una biopsia de la médula ósea de un paciente con neuroblastoma (Biedler J, 1973). Es una de las líneas más empleadas como modelo celular de enfermedades neurodegenerativas, para el estudio *in vitro* de neurotoxicidad inducida por estrés oxidativo y para evaluar tratamientos antiinflamatorios, antioxidantes y neuroprotectores (Shibley MM, 2016).

Sin embargo, la utilización de las células SH-SY5Y no diferenciadas implica diversas desventajas. En primer lugar, es una línea celular que está continuamente

dividiéndose, por lo que es difícil distinguir si los agentes neuroprotectores o neurotóxicos influyen en la proliferación celular o en el índice de muerte celular (Datki Z, 2003). En segundo lugar, las células SH-SY5Y en cultivo no siempre muestran los típicos marcadores de neuronas maduras, lo cual conduce a una incertidumbre en los experimentos (Presgraves S, 2004). En tercer lugar, las células SH-SY5Y no diferenciadas muestran menor sensibilidad a los agentes neurotóxicos y neuroprotectores que las neuronas del mesencéfalo primario (Storch A, 2000). Estos puntos débiles muestran que esta línea celular sin diferenciar no es un modelo ideal para el estudio de enfermedades neurodegenerativas.

Por el contrario, muchas líneas de investigación indican que la inducción de la diferenciación neuronal de las células SH-SY5Y da lugar a células con funcionalidad y fenotipo neuronal maduro. Tras la diferenciación, las células reducen su capacidad proliferativa, constituyen una población estable y muestran una red extensa de neuritas con morfología similar a la de las neuronas del cerebro humano (Fagerstrom S, 1996). Por estas razones son consideradas un buen modelo para el estudio de enfermedades neurodegenerativas.

Desde que en 1981 el 12-O-tetradecanoforbol-13-acetato (TPA) bioactivo fuera empleado para inducir la diferenciación en células SH-SY5Y, se han publicado un gran número de protocolos de diferenciación neuronal que emplean una combinación secuencial de retinoides, principalmente el ATRA y la neurotrofina BDNF (Encinas M, 2000).

Los efectos del ATRA en las células SH-SY5Y están bien caracterizados. El ATRA se une a dos clases de receptores hormonales nucleares no esteroideos, los receptores de ácido retinoico (RARs) y los receptores X retinoides (RXRs). El ATRA induce la diferenciación a través de la regulación de la transcripción de los genes reguladores de neurotrofinas (Clagett-Dame M, 2006), la vía de señalización WNT (Uemura K, 2003) y vías que implican a la proteína quinasa A (PKA) (Kim S, 2000). Se ha demostrado que las neurotrofinas modulan la supervivencia, la diferenciación, la sinaptogénesis y la actividad en neuronas. La familia de las neurotrofinas está formada principalmente por el factor de crecimiento nervioso (NGF), el BDNF, la neurotrofina-4 (NT-4/5) y la neurotrofina-3 (NT-3). Estas neurotrofinas pueden unirse a dos tipos diferentes de receptores de superficie, el receptor tirosin quinasa (TRK) y el receptor de neurotrofinas p75 (NTR) (Kaplan D, 2000). Hay además otros factores de crecimiento

que también participan en la inducción de la diferenciación celular, como son el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento insulínico I (IGF1), el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y el factor neurotrófico ciliar (CNTF) (Lavenius E, 1994).

La línea celular SH-SY5Y expresa un número reducido de receptores de neurotrofinas, razón por la cual no se diferencian cuando son estimuladas solamente con factores neurotróficos. Sin embargo, el tratamiento con ATRA causa la sobreexpresión de los receptores neurotróficos, haciendo a las células SH-SY5Y receptivas a las neurotrofinas (Cernaianu G, 2008). Además, la supervivencia de las células SH-SY5Y está condicionada por la coexistencia de neurotrofinas en el medio de cultivo (Kou W, 2008), de manera que, si son eliminadas del medio de cultivo, las células entran en apoptosis. Por este motivo, se ha utilizado de forma clásica la neurotrofina BDNF cuya presencia continua en el medio de cultivo permite una óptima diferenciación y evita que las células entren en apoptosis.

Sin embargo, el ATRA presenta importantes limitaciones derivadas de su inestabilidad y su alta susceptibilidad a la fotoisomerización, lo cual puede afectar a la concentración intracelular de ATRA y, en consecuencia, a la respuesta efectiva en la diferenciación celular (Suzuki T, 1998). Por esta razón se ha propuesto la utilización de análogos sintéticos del ácido retinoico más estables que el ATRA, como el ec23.

Los efectos a nivel bioquímico del ec23 en la diferenciación de las células SH-SY5Y no son conocidos aún, pero recientemente se ha comprobado que el ec23 induce una diferenciación neuronal óptima, de una manera similar al ATRA (Clemens G, 2013; Cordero M, 2015) y, posee una estabilidad química y física superior a éste (Christie VB, 2010), por lo que se puede considerar un buen sustituto del ATRA en la diferenciación de las células SH-SY5Y.

### II.6. TERAPIA FARMACOLÓGICA ANTIOXIDANTE

Dada la implicación del estrés oxidativo en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas, se ha propuesto como estrategia terapéutica la utilización de agentes antioxidantes para paliar, al menos en parte, la sintomatología de estas enfermedades.

De este modo, se han llevado a cabo un gran número de estudios empleando tanto antioxidantes naturales como sintéticos. Muchos de ellos se han realizado sobre modelos animales y modelos celulares *in vitro* de enfermedades neurodegenerativas, como son los cultivos de células SH-SY5Y y las células de feocromocitoma PC12.

El grupo de los antioxidantes naturales está formado por moléculas con diferentes propiedades y estructuras químicas (Guerra-Araiza C, 2013; Landete JM, 2012) (tabla1). Se puede dividir en tres subgrupos, los polifenoles, las vitaminas y sus derivados y, los minerales antioxidantes (Carocho M, 2013).

Los **polifenoles** son los antioxidantes naturales más numerosos. Los dos tipos de polifenoles más abundantes son los ácidos fenólicos y los flavonoides. Estos últimos se pueden clasificar, a su vez, en flavonoles, flavonas, catequinas, antocianinas e isoflavonas. Las principales fuentes de polifenoles son los vegetales, el vino, el té o la fruta (Quideau S, 2011). Numerosos estudios llevados a cabo durante los últimos años han demostrado que los polifenoles confieren protección contra enfermedades como la diabetes, el cáncer, infecciones y enfermedades neurodegenerativas (Graf B, 2005).

Uno de los polifenoles más estudiados por sus propiedades neuroprotectoras es el **resveratrol**. El mecanismo exacto del resveratrol como inductor de la neuroprotección no se conoce con claridad (Morris-Blanco KC, 2014), pero parece que muchos de sus efectos beneficiosos son promovidos por los siguientes mecanismos: *i*, la activación de la proteína SIRT1 o sirtuína-1 deacetilasa dependiente de NAD, que promueve la supervivencia celular en el SNC; *ii*, la activación de AMPK, que activa la acetil-coA carboxilasa y SIRT1, provocando una mejora en el metabolismo celular (Borra M, 2005) y *iii*, la activación del factor de transcripción Nrf2, responsable de inducir la expresión de la superóxido dismutasa, catalasa y otras enzimas que actúan durante el estrés oxidativo (Yang Y, 2013; Ungvari Z, 2010).



La **curcumina**, otro importante polifenol extraído del rizoma de la *Curcuma longa*, presenta propiedades antivirales, antioxidantes y antiinflamatorias (Tabatabaei-Malazy, 2013). En estudios *in vitro* se ha demostrado que la curcumina suprime la sobreexpresión de mediadores inflamatorios, inhibiendo la vía TLR4-MAPK/NF- $\kappa$ B. También es capaz de bloquear la producción intracelular de ROS (Meng Z, 2013) y de suprimir la activación de la NF- $\kappa$ B inducida por la inhibición de la actividad  $\kappa$ B-Quinasa (Youn HS, 2006). Se ha observado que, en ratones con lesión cerebral traumática, el tratamiento con curcumina reduce la activación de la microglía y la apoptosis neuronal vía TLR4-MAPK/NF- $\kappa$ B (Zhu H, 2014).

Dentro del grupo de las **vitaminas y derivados**, destacan las vitaminas B, C y E, la vitamina K y los carotenoides. Los carotenoides son un grupo de pigmentos presentes en numerosas frutas y vegetales. Existen más de seiscientos tipos, pero sólo unos pocos presentan propiedades biológicas demostradas, como el **licopeno**. En células SH-SY5Y sometidas a la neurotoxina 1-metil-4-fenil piridinio (MPP<sup>+</sup>), el tratamiento con licopeno reduce la producción de ROS en la mitocondria y, de este modo, es capaz de evitar la apertura de poros de transición, restaurar el potencial de membrana mitocondrial e incrementar la producción de ATP (Yi F, 2013).

Un estudio reciente llevado a cabo en ratones C57BL/6 con lesión isquémica cerebral, ha demostrado que la instauración de una dieta suplementada con **vitaminas B** (ácido fólico, riboflavina, vitamina B12 y colina) limita los mecanismos de muerte celular dependientes de p53, incrementa la expresión de BDNF y activa mecanismos de antioxidación, incrementando los niveles de Nrf2 y SOD2 (Jadavji NM, 2017).

La **vitamina C** o ácido ascórbico es conocida por su capacidad para donar electrones, lo cual evita la acumulación de agentes oxidantes y radicales libres. En particular, elimina de forma eficaz los radicales anión superóxido, hidroxilos, peróxido de hidrógeno y RNS (Traber MG, 2011). Se ha demostrado que el tratamiento con vitamina C en ratas a las que se les ha inducido inflamación en el cerebro, reduce los niveles de ROS, citoquinas y nitritos en su hipocampo (Ahmad A, 2016).

La familia de la **vitamina E** incluye a los tocotrienoles y tocoferoles. Estas son moléculas muy lipofílicas que ejercen una acción antioxidante debido a su capacidad para unirse a las membranas, estabilizándolas y protegiéndolas de la peroxidación lipídica (Bennett LL, 2012). Se ha observado, en un modelo *in vitro* de enfermedad de

Alzheimer, que la vitamina E inhibe el daño inducido en la mitocondria por el péptido  $\beta$ -amiloide y la reducción de ATP (Dhitavat S, 2005).

La **vitamina K**, también conocida como fitomenadiona, es una molécula lipofílica y, aunque no es considerada como un antioxidante clásico, diversos estudios han demostrado su capacidad para evitar la reducción del glutatión causado por el estrés oxidativo (Giammanco M, 2012).

Dentro del grupo de los **antioxidantes minerales**, el **selenio** tiene especial importancia porque actúa como cofactor de enzimas antioxidantes, como la glutatión peroxidasa (GPX) y la tioredoxin reductasa, entre otros (Puspitasari IM, 2014). Además, posee la capacidad de inhibir la NADPH oxidasa, la cual cataliza la transformación del oxígeno en oxígeno singlete. También se ha encontrado que el **zinc** previene la peroxidación lipídica y, por lo tanto, protege las membranas celulares (Prasad AS, 2014).

En los últimos años ha aumentado la importancia de la **melatonina** como antioxidante natural. La **melatonina**, principal hormona producida por la glándula pineal, ejerce su efecto antioxidante de una forma directa e indirecta. Así, puede eliminar directamente los radicales libres, como el radical hidroxilo, el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno y el peroxinitrito; a través de un mecanismo indirecto, la melatonina induce la producción de enzimas antioxidantes como la GPX, la glutatión reductasa, la glucosa 6P-DH y la SOD. Entre otras características ventajosas de esta hormona, cabe citar su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, carecer de efectos prooxidantes dosis-dependientes y poseer además propiedades antiinflamatorias (Vijayalaxmi, 2002).

**Tabla 1.** Antioxidantes naturales y sus fuentes.

<b>Antioxidantes naturales</b>	<b>Fuentes</b>
<b>Polifenoles</b>	
<b>Flavonoides</b>	
Quercetina	Frutas, cebollas, vino tinto y vegetales de hoja verde
Flavonoles	Cebolla, brócoli, té y manzanas
Flavonas	Perejil, tomillo, apio y orégano
Catequinas	Té verde, cacao y bayas
Antocianinas	Arándanos, zarzamoras y arándanos azules
<b>Vitaminas y derivados</b>	
<b>Vitamina B</b>	Legumbres, plátanos, huevos y judías verdes
<b>Vitamina C</b>	Bayas, cítricos, algunas especies y legumbres
<b>Vitamina E</b>	Semillas, cacahuetes, nueces y aceites vegetales
<b>Vitamina K</b>	Vegetales de hoja verde, especias y hierbas aromáticas
<b>Carotenoides</b>	
Licopeno	Tomates y sandía
B-Caroteno	Espinacas, zanahorias y frutas (mango o melocotones)
<b>Minerales</b>	
<b>Selenio</b>	Champiñones, cereales, nueces y piñones
<b>Zinc</b>	Cacao, cacahuetes, semillas de calabaza y espinacas

El grupo de los **antioxidantes sintéticos** está formado por compuestos que actúan de forma directa sobre la mitocondria. La **Mitoquinona (Mito Q)** fue diseñada por Kelso y cols. en los años 90. El complejo ubiquinona de la estructura de la Mito Q puede activarse en el interior de la mitocondria (por el complejo II de la cadena respiratoria) y

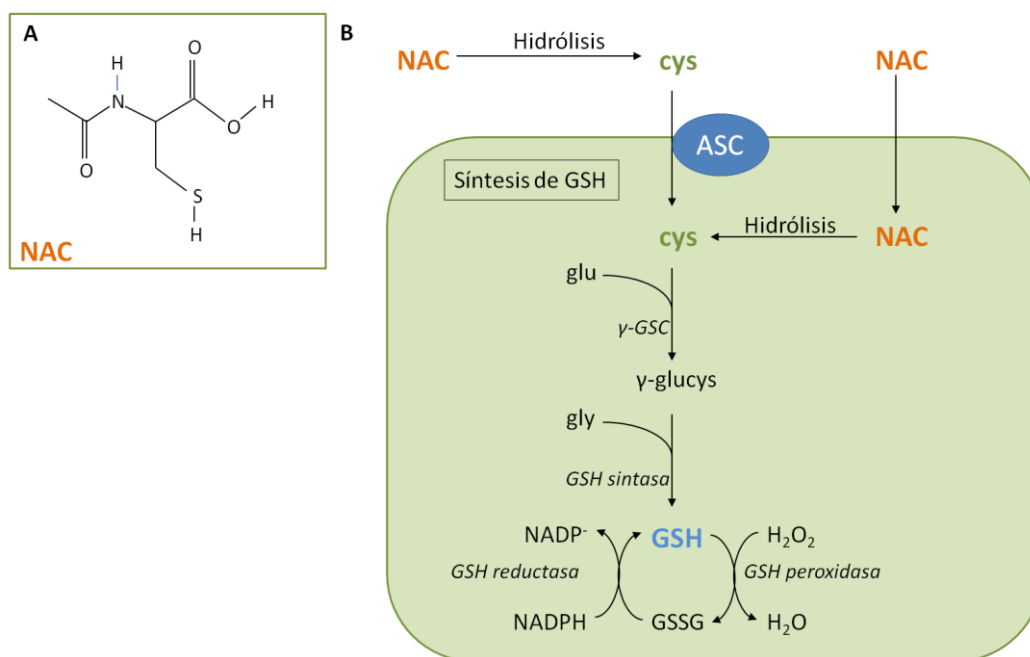
formar el antioxidante ubiquinol, incrementando así la capacidad antioxidante *in situ* y disminuyendo, en consecuencia, el daño oxidativo mitocondrial. La eficacia de este compuesto como tratamiento antioxidante se ha estudiado en modelos *in vitro* e *in vivo* de EP, donde se ha observado que inhibe la traslocación de la proteína proapoptótica Bax a nivel mitocondrial (Jin H, 2014).

La **Coenzima Q10 (CoQ10)**, también conocida como Ubiquinona, es un aceptor de electrones del complejo I y II, actuando también como antioxidante mitocondrial (Hargreaves I, 2012). Las principales funciones de este compuesto son: *i*, transferir electrones (Muller T, 2003); *ii*, intervenir en la producción de ATP (Cleren C, 2008); *iii*, reducir la generación de radicales libres (Kasparova S, 2006) y *iv*, inhibir la activación de la permeabilidad mitocondrial, ejerciendo, de este modo, una actividad antiapoptótica (Matthews R, 1998). En estudios con cultivos primarios de neuronas, se ha observado que la CoQ10, a través de la inhibición de la generación de ROS, es capaz de enlentecer el proceso degenerativo neuronal, (Chaturvedi RK, 2008); por otro lado, en estudios *in vivo*, se ha demostrado que el tratamiento con CoQ10 permite incrementar la concentración de esta coenzima a nivel cerebral, protegiendo, de este modo, frente al estrés oxidativo local (Hargreaves I, 2012) y restaurando significativamente la actividad acetiltransferasa de colina, como se ha observado en un modelo murino (ratas ICV-STZ) de EA (Ishrat T, 2006).

La **latrepirdina** es un inhibidor de los receptores NMDA y de los canales de voltaje de calcio. Esta molécula actúa como neuroprotector manteniendo la función y estructura mitocondrial y la producción de ATP (Sachdeva D, 2011), efecto que ha sido observado en modelos *in vitro* con células SH-SY5Y y cultivos primarios de neuronas murinas (Zhang S, 2010). Además, en un modelo murino de EA, se ha demostrado que la latrepirdina ejerce un efecto protector contra el péptido  $\beta$ A (Leuner K, 2012).

La **MitoVitE** es un compuesto formado por un trifenilfosonio (TPP) conjugado con la vitamina E, que protege la mitocondria frente al estrés oxidativo a través de la inhibición de la peroxidación lipídica. Modelos celulares *in vitro* de EP mostraron su eficacia a través de la reducción de la concentración de peróxidos, evitando la muerte celular por activación de caspasas provocadas por el estrés oxidativo característico de esta enfermedad (Dhanasekaran A, 2004; Hughes G, 2005).

De todos los agentes antioxidantes sintéticos, la **NAC** es el compuesto que ha sido más empleado en los estudios de neuroprotección. La NAC es un derivado de la cisteína, con un grupo acetilo unido a su átomo de nitrógeno y, como la mayoría de los tioles (RSH), puede ser oxidado por una gran cantidad de radicales libres y sirve como nucleófilo. Este compuesto puede actuar mediante un mecanismo directo, al ser transportada la cisteína al interior de la célula por el sistema de aminoácidos básicos (alanina-serina-cisteína), y también puede actuar de forma indirecta al penetrar en la célula y ser rápidamente hidrolizada a cisteína, un precursor del GSH (fig.3). Originalmente empleado como mucolítico y como tratamiento de la intoxicación por paracetamol, se ha demostrado que, dependiendo de la vía de administración, es capaz de atravesar la membrana hematoencefálica de una forma dosis-dependiente. Además, presenta propiedades antiinflamatorias, ya que inhibe la activación de NF- $\kappa$ B y disminuye la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (Nascimento MM, 2010).



**Figura 3.** Fórmula química de la NAC [A]. Mecanismo de acción de la N-acetilcisteína [B]. NAC, N-acetilcisteína; ASC, sistema de transporte alanina-serina-cisteína;  $\gamma$ -GSC,  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa; cys, cisteína; glu, glutamina; gly, glicina; GSH, glutatión.

En relación a la utilización de la NAC en las enfermedades neurodegenerativas, Clark y cols. (2010) observaron que en ratones transgénicos con EP tratados con NAC durante 5-7 semanas, se producía un aumento de los niveles de GSH; sin embargo, este aumento no se mantenía tras un año de tratamiento. Otros estudios llevados a cabo por Tchantchou y cols. (2005) comprobaron que la NAC reduce el estrés oxidativo en

modelos murinos de EA. Más recientemente, Sandhir y cols. (2012) estudiaron el efecto de la NAC sobre un modelo murino de EH, provocada por el tratamiento con ácido nitropropónico (3-NP), observando que la NAC era capaz de revertir la disfunción mitocondrial provocada por el 3-NP.

Las dos tablas siguientes resumen investigaciones recientes *in vitro* (tabla 2) e *in vivo* (tabla 3) llevadas a cabo con los diferentes agentes antioxidantes en enfermedades neurodegenerativas.

**Tabla 2.** Efectos neuroprotectores producidos por los antioxidantes naturales y sintéticos, observados en diferentes modelos experimentales *in vitro*. Modificada de Arrozi AP, 2017.

Antioxidantes	Modelo experimental	Efectos neuroprotectores	Referencias
<b>Vitamina E +estradiol-17β</b>	Neurotoxicidad inducida por el cerebrosterol en células SH-SY5Y diferenciadas	Previene la neurotoxicidad producida por la activación de caspasa-3 y restaura el potencial de membrana mitocondrial	Kolsch y cols. (2001)
<b>Vitamina E + L-carnitina</b>	Daño β-amiloide inducido en células SH-SY5Y	Inhiben el daño β-amiloide inducido en la mitocondria y la reducción de ATP	Dhitavat y cols. (2005)
<b>Vitamina C</b>	Neuronas humanas dopaminérgicas expuestas a glutamato	Atenúa la muerte celular causada por la elevada producción de ROS	Ballaz y cols. (2013)
<b>Epigallocatequina galate (EGCG)</b>	Células SH-SY5Y con expresión de proteína precursora amiloidea	Protege la función mitocondrial neuronal y restaura el potencial de membrana mitocondrial	Dragicevic y cols. (2011)
<b>Resveratrol</b>	Células PC12	Previene la apoptosis celular por el incremento del potencial de membrana y la reducción de la proporción Bx/Bcl-xL	Jang y cols. (2012)

<b>Curcumina</b>	Células HEK-293	Suprime la activación de la NF- $\kappa$ B inducida por la inhibición de la actividad $\kappa$ B-Kinasa	Youn y cols. (2006)
<b>Licopeno</b>	Células SH-SY5Y tratadas con MPP <sup>+</sup>	Reduce la producción de ROS mitocondrial, previene la apertura de poros de transición, restaura el potencial de membrana e incrementa la producción de ATP	Yi y cols. (2013)
<b>Calicopterina</b>	Células P12 tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Previene la reducción del potencial de membrana y evita la liberación de citocromo C al citosol	Sarvestani y cols. (2013)
<b>Melatonina</b>	Astroцитos de cerebro de rata sometidos a estrés con Ca <sup>2+</sup>	Previene la formación de ROS y la apoptosis mediados por Ca <sup>2+</sup>	Jou y cols. (2010)
<b>N-acetil cisteina (NAC)</b>	Células SH-SY5 sometidas a la micotoxina zearalenona	Revierte los ROS generados por la toxina y atenúa la pérdida del potencial de membrana	Venkataramana y cols. (2014)
<b>MitoQ</b>	Modelo celular de EP: células SH-SY5Y tratadas con 6-OHDA	Previene la apoptosis, inhibiendo la traslocación de Bax a la mitocondria	Solesio y cols. (2013)
<b>Latrepirdina</b>	Células SH-SY5Y sometidas a estrés oxidativo	Mejora la función mitocondrial y la producción de ATP	Zhang y cols. (2010)
<b>Coenzima Q10 (CoQ10)</b>	Cultivo primario de neuronas	Inhibe la generación de ROS	Chaturvedi y cols. (2008)
<b>Edaravone</b>	Células N2a con mutación PPA sueca y tau 9	Disminuye la proporción Bax/Bcl-2, atenúa la liberación de citocromo C y suprime la activación de caspasa-3	Yan y cols. (2012)

**Tabla 3.** Efectos neuroprotectores producidos por antioxidantes naturales y sintéticos, observados en diferentes modelos experimentales *in vivo*. Modificada de Arrozi AP, 2017.

Antioxidantes	Modelo experimental	Efectos neuroprotectores	Referencias
<b>Vitamina E (α-tocoferol) + ácido fólico</b>	Modelo murino de EA (ratas tratadas con Beta-amiloide)	Restaura la función mitocondrial al disminuir la producción de NO y previene el incremento en la actividad de los complejos mitocondriales, especialmente el complejo I y IV	Figueiredo y cols. (2011)
<b>Vitamina C</b>	Modelo murino de EA (ratas transgénicas con proteína Tau humana)	Atenúa la oligomerización de la Beta-amiloide, reduciendo así el estrés oxidativo	Murakami y cols. (2011)
<b>Vitamina C</b>	Modelo murino de EA (ratas tratadas con etanol)	Disminución de los niveles de ROS, citoquinas y nitritos en el hipocampo	Ahmad y cols. (2016)
<b>Vitamina B</b>	Modelo daño isquémico (ratones C57BL/6)	Limita los mecanismos de muerte celular dependientes de p53, incrementa la expresión de BDNF y activa mecanismos antioxidación, incrementando los niveles de Nrf2 y SOD2	Jadavji y cols. (2017)
<b>Resveratrol</b>	Modelo murino de EA (ratones transgénicos tratados con neurotoxina MPTP)	Incrementa la expresión de PCG1-α, favoreciendo el metabolismo mitocondrial	Mudo y cols. (2012)



<b>Licopeno</b>	Modelo murino de EP (ratas tratadas con rotenona)	Reduce los niveles de malonildialdehido (MDA), incrementa los de glutatión peroxidasa y catalasa en la sustancia negra, y previene la liberación de citocromo c	Kaur y cols. (2011)
<b>N-acetil cisteina (NAC)</b>	Modelo murino de EP (ratas transgénicas sobreexpresión de $\alpha$ -sinucleína)	Atenúa la pérdida de terminales dopaminérgicos asociados a la sobreexpresión de $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ Syn)	Clark y cols. (2010)
<b>Coenzima Q10 (CoQ10)</b>	Modelo murino de EA (ratas ICV-STZ)	Restaura la actividad de la colina acetiltransferasa	Ishrat y cols. (2006)
<b>Ubisol-Q 10</b>	Modelo murino de EA (ratas expuestas a paraquat)	Bloquea la muerte neuronal	Muthukumaran y cols. (2014)
<b>Latrepirdina</b>	Modelo murino de EA (ratas tratadas con rotenona)	Efecto protector ante la $\beta$ -amiloides	Leuner y cols. (2012)

### II.7. TERAPIA CON CÉLULAS MADRE

La utilización de células madre representa en la actualidad una opción realista en el tratamiento de múltiples enfermedades, algunas de las cuales son incurables hoy en día, como la diabetes tipo I, las enfermedades articulares, cardíacas o hematológicas y las enfermedades neurodegenerativas.

#### II.7.1. Definición y clasificación de las células madre

Para que una célula sea clasificada como célula madre (*Stem Cell*, SC) debe de cumplir dos condiciones fundamentales. En primer lugar, la célula debe tener la propiedad de auto-renovación (Chen S, 2006). Esto significa que tiene la capacidad de preservar el estado desdiferenciado después de numerosos ciclos de división celular (Okano H, 2005; Olsson E, 2011). En segundo lugar, debe cumplir el criterio de plasticidad, que hace referencia a la capacidad de diferenciarse, adoptando la expresión de un perfil genético que con el tiempo conduzca hacia un fenotipo celular específico (Scheel C, 2011).

Las células madre se clasifican en cuatro amplios grupos: células madre embrionarias, células madre fetales, células madre pluripotentes inducidas y células madre del adulto. A continuación se explican las características y aplicaciones de cada categoría.

Las **células madre embrionarias humanas (hESCs)** fueron aisladas por primera vez en 1998 por Thomson de la masa celular del blastocisto (Thomson J, 1998). Estudios más recientes muestran como la mórula y los blastómeros pueden constituir una fuente alternativa de hESCs (Strelchenko N, 2004; Klimanskaya I, 2007).

Dada su alta plasticidad, las hESCs pueden diferenciarse en cualquier tipo de célula que forma un organismo. En la actualidad, las consideraciones éticas y su tendencia a formar teratomas, limitan su uso potencial.

Las **células Madre Fetales (hFCSs)** se presentan como una alternativa a los problemas éticos derivados de la utilización de las hESCs. Las hFCSs se pueden obtener de fuentes prenatales o postnatales (Anker E, 2004; Campagnoli C, 2001; Tsai M, 2004). Las fuentes prenatales de hFCSs incluyen la sangre fetal del cordón umbilical y del líquido amniótico. Así, del cordón umbilical se pueden aislar células madre fetales hematopoyéticas (fHSCs) y células madre fetales mesenquimales (fMSCs) (Gucciardo L, 2009). Las fuentes postnatales de hFCSs se encuentran en las estructuras que forman

la placenta. Aunque su número decrece a lo largo de la gestación, tras su aislamiento son aún más numerosas que las células madre del adulto. En función de la zona de la placenta de la que se han obtenido se clasifican del siguiente modo: células epiteliales amnióticas humanas (hAECs), células madre mesenquimales amnióticas humanas (hAMSCs), células madre mesenquimales coriónicas humanas (hCMSCs) y células trofoblásticas coriónicas humanas (hCTCs) (Cunningham FG, 1997).

De todas las células mencionadas anteriormente, las obtenidas de la sangre del cordón umbilical son las que se han propuesto como las candidatas ideales para la terapia celular debido a sus propiedades inmunosupresoras y a su alta capacidad de diferenciación. Entre sus posibles aplicaciones se han señalado el tratamiento de enfermedades hematológicas y neurológicas.

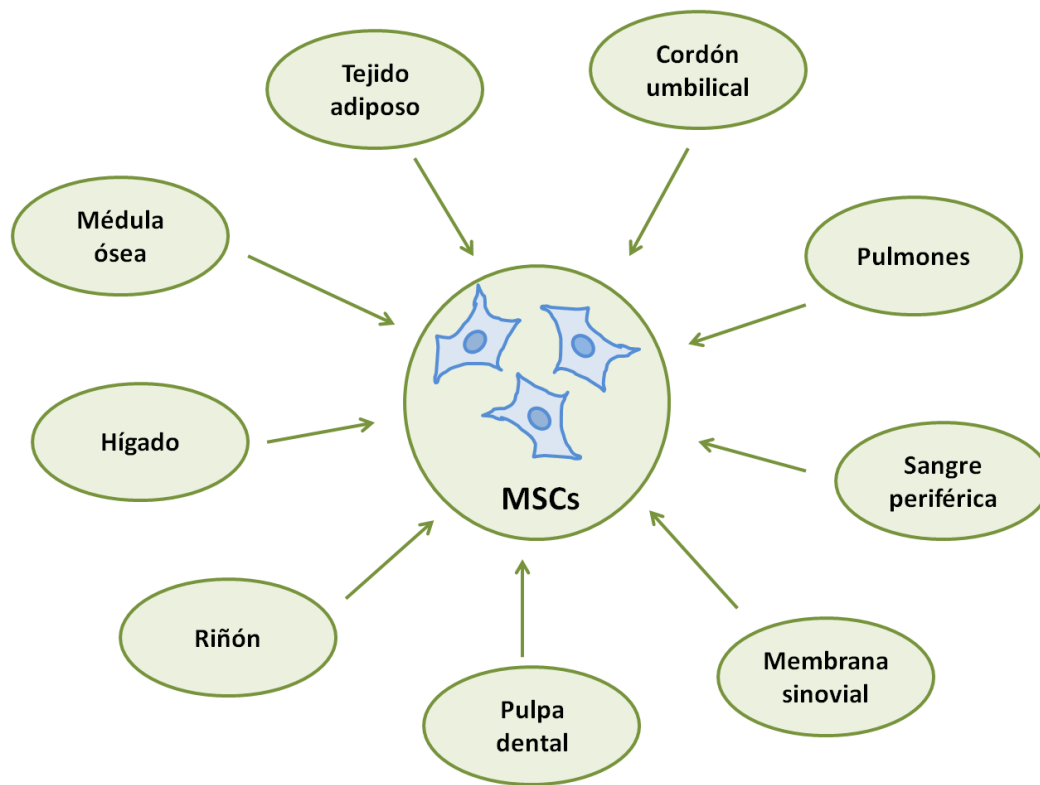
**iPSCs.** Uno de los propósitos de la medicina regenerativa es la generación de células especializadas para cada paciente. Yamanaka en 2007 fue el primero en conseguir reprogramar fibroblastos dérmicos humanos en células madre pluripotentes, a través de una transducción de genes humanos. Las iPSCs son células madre pluripotentes que poseen la capacidad de diferenciarse en células originarias de las tres capas germinales. Diversos estudios demuestran que se pueden obtener miocitos (Citro L, 2014), neuronas (Wheeler HE, 2015), hepatocitos (Jia B, 2014) o islotes pancreáticos (Kuisse T, 2014) a través de la diferenciación de iPSCs. De este modo, este tipo celular brinda nuevas oportunidades terapéuticas en el campo de la medicina, pudiendo resultar una alternativa importante a considerar en el tratamiento de enfermedades como el Parkinson, el Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica (Ross CA, 2014).

Las **células madre del adulto** se pueden clasificar como **células madre hematopoyéticas (HSC)** y **células madre mesenquimales (MSC)**:

Las **HSCs** se aíslan de la médula ósea y de la sangre periférica (Chong P, 2012). Presentan los marcadores de superficie CD34, CD90 y CD133 (Hao Q, 1995; Yin A, 1997; Nielsen JS, 2009), y poseen la capacidad de diferenciarse hacia todas las células de estirpe hematopoyética.

Las **MSCs**, son células multipotentes que pueden aislarse de diferentes tejidos (médula ósea, tejido adiposo, placenta y cordón umbilical; figura 4) y pueden diferenciarse en numerosos tipos celulares. A pesar de que su número decrece con la edad, su potencial

para expandirse *ex vivo* permite conseguir una cantidad suficiente para su uso terapéutico (Ullah I, 2015).



**Figura 4.** Tejidos y órganos de los que se extraen MSCs.

Las MSCs difieren entre sí en la expresión de marcadores de superficie y en su capacidad funcional tras haber sido estimuladas con mediadores proinflamatorios (Cao W, 2015; Laranjeira P, 2015). Por ello la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propone tres criterios mínimos para definir las MSCs (Dominici M, 2006):

- Deben ser adherentes en condiciones de cultivo celular estándar.
- Deben expresar los marcadores CD105, CD73 y CD90 y no expresar los CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79 $\alpha$ /CD19, además de expresar el antígeno leucocitario humano HLA-DR.
- Deben ser capaces de diferenciarse (*in vitro*) en osteoblastos, adipocitos y condroblastos.

Sin embargo, la no especificidad de estos criterios ha sido desde siempre un motivo de discusión (Hematti P, 2016). Por ello, más allá de criterios mínimos, se puede decir que las MSCs son una población de células heterogénea, con gran variedad de perfiles genéticos, cuyo fenotipo y su potencial para diferenciarse y expandirse está

influenciado por el tejido de origen y los procedimientos de aislamiento y expansión (Krampera M, 2013; Uccelli A, 2008).

Las MSCs desempeñan un papel crucial en la homeostasis de los tejidos y órganos y en el mantenimiento del nicho de células madre, debido principalmente al ya mencionado potencial para diferenciarse en varios tipos celulares y a la secreción de numerosos factores de crecimiento (Tolar J, 2010; Zhao S, 2010). La capacidad regenerativa y reparadora de las MSCs está mediada a través de un doble mecanismo: la interacción directa célula-célula a través de sus receptores de membrana y, la acción indirecta a través de factores solubles (efecto paracrino) (Klimczak A, 2016). Gracias a dichas capacidades, existen en la actualidad múltiples ensayos clínicos que analizan la idoneidad de la terapia celular con MSCs para el tratamiento de diversas patologías (tabla 4). De acuerdo a los datos recogidos en la base de datos *clinicaltrials.gov* a día 24 de noviembre de 2017 (fig. 5A), actualmente se están llevando a cabo 781 ensayos clínicos con MSCs en distintas enfermedades. De estos 781 ensayos clínicos, 149 estudian el efecto terapéutico de las MSCs en las enfermedades neurológicas (fig. 5B).

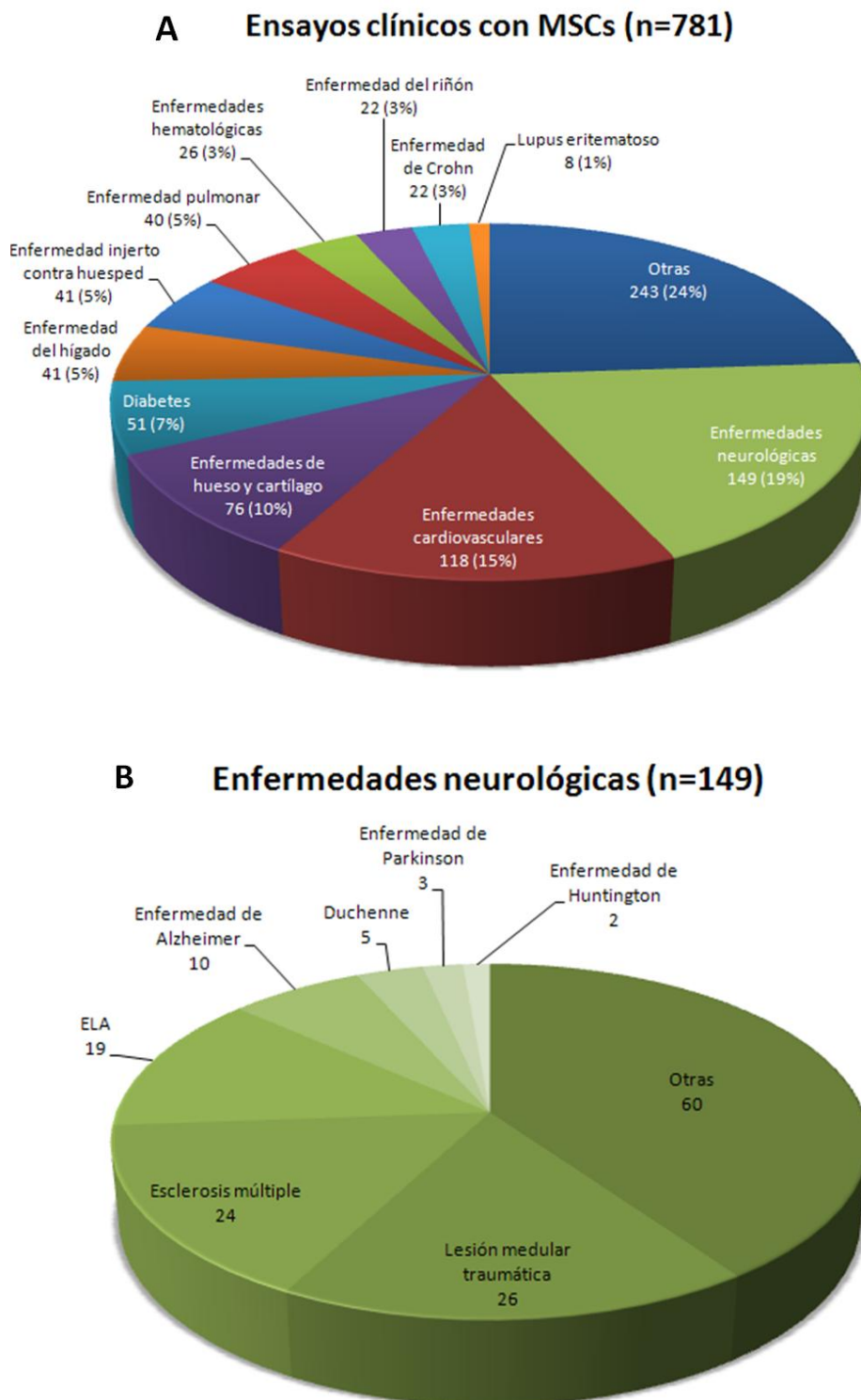
**Tabla 4.** Ensayos clínicos (en marcha o completados) con MSCs.

Tabla tomada de Langrzyk A, 2017.

Localización	Patologías
Sangre	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hemofilia</li> <li>▪ Síndrome mielodisplásico</li> <li>▪ Shock séptico y neutropenia severa</li> <li>▪ Anemia aplásica severa</li> <li>▪ Anemia de células calciformes</li> </ul>
Sistema cardiovascular	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Infarto agudo de miocardio</li> <li>▪ Enfermedad de Buerger</li> <li>▪ Cardiomiopatía</li> <li>▪ Isquemia crónica de extremidades</li> <li>▪ Insuficiencia cardíaca</li> <li>▪ Hipertensión</li> <li>▪ Encefalopatía hipóxico-isquémica</li> <li>▪ Isquemia de extremidades</li> <li>▪ Hemorragia intraventricular</li> <li>▪ Aneurisma aórtico abdominal</li> </ul>
Enfermedades metabólicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Diabetes mellitus tipo 1</li> <li>▪ Diabetes tipo 2</li> </ul>

<b>Sistema inmune</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Enfermedad de injerto frente a huésped</li> <li>▪ Urticaria crónica autoinmune</li> <li>▪ Inflamación severa o refractaria y/o enfermedades autoinmunes</li> </ul>
<b>Dientes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Defectos infraóseos periodontales</li> </ul>
<b>Infecciones</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Citomegalovirus</li> <li>▪ VIH</li> </ul>
<b>Sistema reproductivo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Disfunción eréctil</li> <li>▪ Insuficiencia ovárica prematura</li> </ul>
<b>Riñones</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Nefropatía crónica del aloinjerto</li> <li>▪ Enfermedad renal crónica</li> <li>▪ Incontinencia urinaria de esfuerzo</li> </ul>
<b>Huesos, cartílago, articulaciones</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tendinopatía aquilea</li> <li>▪ Quiste óseo aneurismático</li> <li>▪ Espondilitis anquilosante</li> <li>▪ Daños degenerativos de menisco</li> <li>▪ Fracturas</li> <li>▪ Gonartrosis</li> <li>▪ Artritis reumatoide</li> <li>▪ Enfermedades del manguito rotador</li> <li>▪ Osteoartritis</li> <li>▪ Osteoartrosis</li> <li>▪ Osteogénesis imperfecta</li> <li>▪ Osteoporosis</li> <li>▪ Lesión osteocondral del astrágalo</li> <li>▪ Fractura diafisaria de la tibia</li> </ul>
<b>Pulmones y sistema respiratorio</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Lesión pulmonar aguda</li> <li>▪ Síndrome de dificultad respiratoria aguda</li> <li>▪ Insuficiencia respiratoria aguda</li> <li>▪ Asma</li> <li>▪ Fístula broncopleurales</li> <li>▪ Enfermedad pulmonar obstructiva crónica</li> <li>▪ Enfisema</li> <li>▪ Fibrosis pulmonar idiopática</li> <li>▪ Bronquiectasia no debida a fibrosis quística</li> <li>▪ Bronquiolitis obliterante después de un trasplante pulmonar</li> <li>▪ Neumonitis</li> <li>▪ Hemosiderosis pulmonar</li> <li>▪ Displasia broncopulmonar grave</li> </ul>

<b>Intestino</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Enfermedad de Crohn</li> <li>▪ Enfermedad inflamatoria intestinal</li> <li>▪ Enterocolitis neutropénica</li> <li>▪ Colitis ulcerosa</li> </ul>
<b>Músculos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Distrofia muscular de Duchenne</li> <li>▪ Distrofia facioescapulohumeral</li> </ul>
<b>Ojos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Glaucoma avanzado</li> <li>▪ Retinitis pigmentosa</li> </ul>
<b>Sistema nervioso</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Adrenoleucodistrofia cerebral avanzada</li> <li>▪ Enfermedad de Alzheimer</li> <li>▪ Esclerosis lateral amiotrófica</li> <li>▪ Daños cerebrales por anoxia o hipoxia</li> <li>▪ Ataxia</li> <li>▪ Autismo</li> <li>▪ Daños del sistema nervioso central</li> <li>▪ Parálisis cerebral</li> <li>▪ Paraplejia crónica</li> <li>▪ Enfermedad degenerativa de disco</li> <li>▪ Neuropatía diabética</li> <li>▪ Epilepsia</li> <li>▪ Enfermedad de Huntington</li> <li>▪ Esclerosis múltiple</li> <li>▪ Neuroblastoma</li> <li>▪ Enfermedades del espectro de la neuromielitis óptica</li> <li>▪ Enfermedad de Parkinson</li> <li>▪ Lesión de la médula espinal</li> <li>▪ Depresión resistente al tratamiento</li> </ul>
<b>Hígado</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Lesiones biliares de tipo isquémico</li> <li>▪ Cirrosis hepática</li> <li>▪ Insuficiencia hepática causada por el virus de la hepatitis B</li> <li>▪ Nefritis lúpica</li> </ul>
<b>Piel</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Quemaduras</li> <li>▪ Cicatrices de cesáreas</li> <li>▪ Úlceras de pie diabético</li> <li>▪ Epidermólisis bullosa distrófica recesiva</li> <li>▪ Psoriasis</li> <li>▪ Defectos en la piel</li> </ul>



**Figura 5.** Ensayos clínicos con MSCs clasificados por enfermedades [A]. Ensayos clínicos en enfermedades neurológicas [B].



### II.7.2. Células Madre Derivadas de Tejido Adiposo

En las últimas décadas se ha considerado el tejido adiposo como una fuente abundante de MSCs. Este tejido está compuesto principalmente por los adipocitos y la fracción vascular estromal que contiene el resto de componentes celulares (preadipocitos, fibroblastos, células endoteliales, células inmunes y células madre). Aunque los adipocitos son el principal componente del tejido adiposo y le confieren un papel inmunomodulador, a través de la secreción de unas proteínas conocidas como adipocinas (la adiponectina, la leptina, el inhibidor del plasminógeno-1, la resistina, los inhibidores de proteasa de serina de tejido adiposo visceral y citoquinas proinflamatorias), la fracción vascular estromal es una fracción importante, ya que es de donde se obtienen las células madre derivadas de tejido adiposo (ADSCs; Makridakis M, 2013).

#### ***Aislamiento de ADSCs***

Una de las principales ventajas de las ADSCs frente a otras células madre adultas es su fácil obtención mediante un método poco invasivo, lo cual las hace una de las principales fuentes de células madre. Se ha observado que influye el tipo de tejido adiposo del que se extraen (Skalska U, 2011). El tejido adiposo blanco es el mejor lugar para aislar ADSCs por varias razones; en primer lugar, por su alto contenido en células madre con alta actividad proliferativa y, en segundo lugar, porque las células madre del tejido blanco adiposo demuestran un mayor potencial de diferenciación que las células madre del tejido adiposo pardo.

Las ADSCs son extraídas del tejido adiposo a partir del contenido de lipoaspirados, principalmente de carácter cosmético. El material extraído es una mezcla de fluido del tejido, sangre y grasa creada por la desintegración de los adipocitos y otros fragmentos de tejido. La muestra se digiere empleando una mezcla de enzimas, entre los que se incluye la colagenasa. Después de la digestión, se centrifuga y la fracción líquida es separada de la fracción estromal que se ha depositado en el fondo. Esta fracción es una mezcla heterogénea de células que contiene ADSCs, las cuales se seleccionan por su capacidad de adhesión en cultivo *in vitro* (Fraser J, 2006).

Por otro lado, se ha comprobado que la técnica empleada para la obtención de tejido tiene un impacto en la calidad de la población de ADSCs obtenidas. Por ejemplo, los

métodos mecánicos para romper el tejido adiposo deberían ser limitados, ya que pueden disminuir un 70% la viabilidad de las ADSCs obtenidas.

La **terapia celular** con ADSCs para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas ha mostrado importantes efectos beneficiosos en estudios llevados a cabo en modelos animales, reduciendo los defectos neurológicos, regulando la respuesta inmune y la inflamación, y promoviendo mecanismos endógenos de reparación en el SNC (Fraser J, 2006; Muraoka K, 2008). Sin embargo, uno de los principales problemas de la administración directa de ADSCs es el reducido porcentaje de células viables que permanecen en el lugar de la inoculación; de hecho, muchas de las células administradas se localizaron en órganos distantes de la zona de inoculación.

Aunque inicialmente se pensó que los efectos de las ADSCs eran el resultado de situar estas células en los tejidos dañados (Nauta AJ, 2007; Zhao S, 2010), posteriormente se ha observado que el efecto terapéutico puede ser ejercido no sólo de forma directa por las mismas, sino por un **efecto paracrino** (secretoma). El secretoma está compuesto por una fracción soluble proteica constituida por factores de crecimiento y citoquinas y, una fracción vesicular compuesta por microvesículas y exosomas, los cuales están involucrados en la transferencia de proteínas y material genético a otras células (Salgado AJ, 2015).

Las ADSCs pueden secretar varios factores neurotróficos como el GDNF, BDNF, factores inductores de la vascularización como el VEGF, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), entre otros (Nakagami H, 2005; Wei X, 2009; Zhao L, 2009; Kim IG, 2013). Estos factores de crecimiento pueden contribuir a frenar la degeneración neuronal y reducir la muerte celular por apoptosis (Wei X, 2009; Zhao L, 2009).

En el secretoma de las ADSCs también pueden encontrarse **exosomas** (vesículas extracelulares de 40–100 nm de diámetro) que actúan como un vehículo de comunicación para el mantenimiento de la homeostasis tisular (Lai RC, 2013). Estas microvesículas son portadoras de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Algunos investigadores han demostrado que la inyección intravenosa de exosomas derivados de ADSCs pueden inducir un aumento de la densidad axonal y de las áreas sinaptofisinas positivas a lo largo de la zona límite del cortex y el cuerpo estriado, confirmando que los exosomas de MSCs podrían contribuir al remodelamiento neurovascular (Xin H,

2013). También se ha observado que las ADSCs expresan niveles altos de neprilisina, enzima que degrada a la proteína  $\beta$ -amiloide en el cerebro; por ello, los exosomas pueden resultar una alternativa terapéutica importante en el tratamiento de la EA (Katsuda T, 2013).

En los ensayos clínicos llevados a cabo mediante el trasplante de ADSCs se han obtenido beneficios moderados, esto podría ser debido más que al origen de las células o a la enfermedad degenerativa investigada, a la limitada viabilidad de las células trasplantadas (fig.6). Por esta razón, con la finalidad de incrementar las capacidades biológicas y terapéuticas de las ADSCs, estas células pueden ser sometidas a una situación de **precondicionamiento**.



**Figura 6.** Esquema sobre las limitaciones más importantes para la supervivencia celular durante el trasplante de ADSCs y posibles estrategias para la mejora de las terapias celulares. Tomado de Baldari S, 2017.

De este modo, es posible conseguir células capacitadas con mayor capacidad de respuesta ante el estrés y, obtener, a su vez, un medio acondicionado por las mismas, rico en diversos factores como VEGF, BDNF o FGF, que posteriormente pueda emplearse como tratamiento en diversas patologías (Kavanagh DPJ, 2014).

En este sentido, se han propuesto diferentes tipos de precondicionamiento, entre los que cabe destacar los siguientes (fig.7):

**Privación de suero bovino fetal.** Generalmente las células en cultivo se mantienen en un medio que contiene suero bovino fetal (SBF). Al someter a estas células a una privación de SBF durante un periodo limitado de tiempo (12-48 horas), se obtiene un

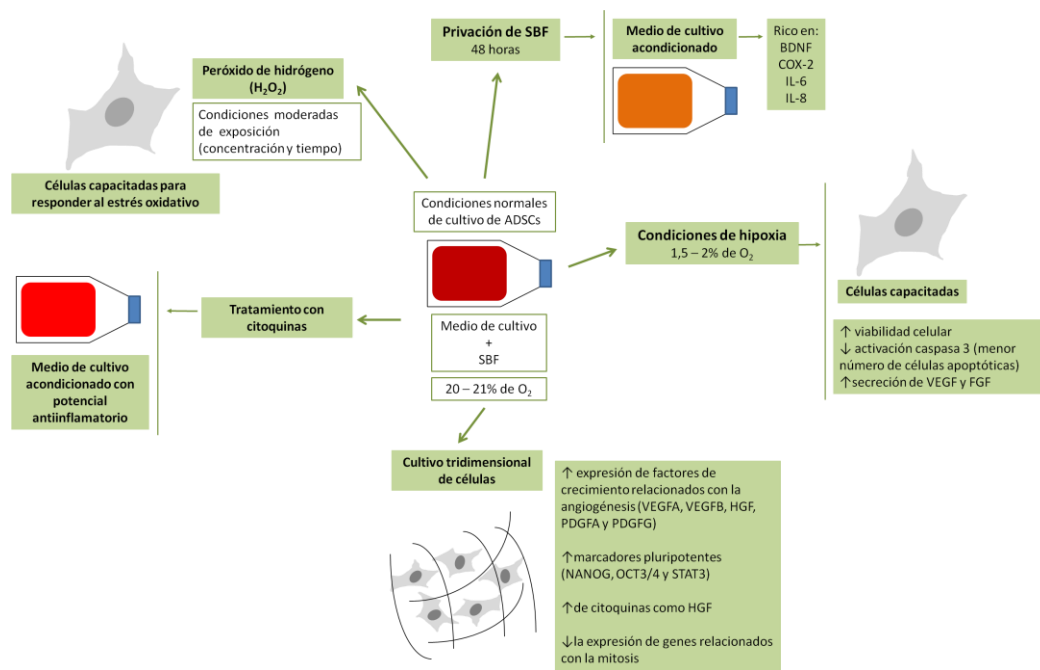
medio acondicionado rico en factores de crecimiento, como el BDNF, y citoquinas como IL-6 o IL-8 (Mei W, 2014).

**Hipoxia.** Las ADSCs provienen de un microambiente con bajo nivel de oxígeno (1-5% de O<sub>2</sub>), sin embargo, suelen ser cultivadas a nivel atmosférico de oxígeno (20-21% O<sub>2</sub>). Recrear su microambiente mediante la hipoxia mejora su funcionalidad a nivel de proliferación, diferenciación y de secreción de citoquinas y factores de crecimiento (Fotia C, 2015). Se ha comprobado que la hipoxia no produce cambios morfológicos en las ADSCs y que siguen expresando los marcadores característicos como son CD73, CD105 o CD90 (Choi JR, 2014; Roemeling-van RM, 2013). El preconditionamiento con hipoxia también las capacita para responder al estrés oxidativo por ausencia de oxígeno, como de hecho ocurre en numerosas condiciones patológicas. Así, se ha observado que, en comparación con ADSCs cultivadas en normoxia, las ADSCs preconditionadas por hipoxia tienen una viabilidad celular superior ante una exposición aguda posterior a ausencia de oxígeno (1,5 – 2%), debido a una menor activación de la caspasa-3 (Choi JR, 2014) y a la secreción autocrina de factores de crecimiento, como el VEGF o FGF (Hsiao ST, 2013) que confiere, a su vez, al medio acondicionado capacidad angiogénica, inmunosupresora y de reparación de tejidos (Choi JR, 2015).

**Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).** Como ya se ha comentado, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es considerado una de las moléculas dañinas que pueden alterar a la célula de diferentes formas. Sin embargo, su utilización adecuada puede fomentar mecanismos de supervivencia celular frente al daño oxidativo. Así, el pretratamiento de las células a concentraciones bajas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante periodos cortos de tiempo, no sólo no produce un efecto dañino, sino que las células pueden movilizar los mecanismos protectores compensatorios con los que protegerse o mitigar los daños causados por una mayor exposición a los ROS. En el preconditionamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es preciso tener en consideración dos condiciones para obtener dicho efecto protector. La primera es la concentración del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a utilizar, ya que si es demasiado baja puede no inducir los mecanismos protectores compensatorios y, por el contrario, si es demasiado elevada se producirá daño celular. Al igual que la concentración, si el tiempo de duración del tratamiento es corto no se conseguirá el efecto protector deseado y, si por el contrario es excesivo, el efecto protector se verá atenuado (Khatibi S, 2016).

**Tratamiento con citoquinas.** El contenido del secretoma de las ADSCs puede ser modulado para obtener una respuesta más efectiva en situaciones de inflamación. Una de las vías para incrementar el potencial antiinflamatorio de las ADSCs es el pretratamiento con citoquinas pro-inflamatorias. Así, se ha observado que el precondicionamiento de las ADSCs con interleucina-1 (IL-1) provoca la secreción del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Este factor actúa como un factor neurotrófico en las células neuronales, incrementando la neurogénesis, la neuroplasticidad y contrarrestando la apoptosis. También se ha observado que, en situaciones de inflamación, el tratamiento de células de la glía con medio acondicionado por ADSCs tratadas con IL-10, causa una reducción en la secreción de marcadores inflamatorios como IL-6, G-CSF y TNF- $\alpha$ . Estos resultados muestran el potencial uso de las citoquinas para intensificar las acciones beneficiosas de las ADSCs en diferentes terapias (Redondo-Castro E, 2017).

Otro método para incrementar la capacitación de las ADSCs, mejorar su supervivencia ante el estrés y facilitar su integración en las zonas dañadas es el **Cultivo tridimensional (3D)** de las mismas. A pesar de que el cultivo de ADSCs en monocapa es el más habitual, está demostrado que el cultivo prolongado de estas células conlleva una disminución en la expresión de los marcadores de pluripotencia y de su capacidad de diferenciación (Baer PC, 2010). Por este motivo, la aplicación de técnicas de cultivo 3D para la formación de esferoides, adquiere cada vez mayor importancia. Estos esferoides o agregados celulares pueden formarse mediante diferentes métodos de cultivos 3D, como son el “*hanging drop*”, frascos de cultivo no adherentes, “*scaffolds*” o geles con componentes de la matriz extracelular (Liu BH, 2013). Estos esferoides, una vez administrados mediante inyección local, pueden disociarse permitiendo a las células migrar hasta el lugar de la lesión, donde intervienen en el proceso de reparación. Distintos estudios muestran que las ADSCs cultivadas en esferoides incrementan la expresión de citoquinas, factores de crecimiento (VEGFA, VEGFB, HGF, PDGFA, PDGFG, entre otros) y de marcadores de pluripotencia (NANOG, OCT3/4 y STAT3) (Kuroda Y, 2014).



**Figura 7.** Resumen de tratamientos para el acondicionamiento de ADSCs.

En el presente estudio hemos combinado diferentes técnicas bioquímicas, electrofisiológicas e inmunohistoquímicas para evaluar el efecto de las ADSCs y del medio condicionado por estas células (ADSC-MA), frente a la neurotoxicidad inducida por estrés oxidativo en un nuevo modelo *in vitro* de células SH-SY5Y diferenciadas con ec23+BDNF (SH-SY5Yd). También, hemos comparado dicho efecto con el obtenido tras el tratamiento con BDNF. Finalmente, hemos investigado si la adición de un agente antioxidante como la NAC al ADSC-MA mejora la recuperación de las células SH-SY5d dañadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**





Teniendo en cuenta, por un lado, la influencia de la inflamación y el estrés oxidativo en la neurotoxicidad, y por otro lado, las propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y antioxidantes que poseen las MSCs, **los Objetivos Generales** de este estudio son, en primer lugar, analizar la posible utilidad terapéutica de la terapia celular con ADSCs para revertir el daño neurotóxico derivado del estrés oxidativo neuronal; en segundo lugar, se pretende comparar la eficacia de dicha terapia celular con la obtenida con agentes antioxidantes, como el NAC, así como con la producida por la combinación de ambas terapias.

Este objetivo general se fundamenta en la siguiente **Hipótesis**: las ADSCs ejercen un efecto neuroprotector frente al estrés oxidativo a través de la liberación al medio extracelular de factores con actividad paracrina.

Para confirmar esta hipótesis se proponen los siguientes **Objetivos Específicos**:

**1. Establecer un modelo de diferenciación neuronal *in vitro*.**

Las neuronas humanas son células muy difíciles de obtener y mantener *in vitro*, por lo que es necesario desarrollar modelos en los que llevar a cabo estudios de neurotoxicidad. Para la realización de este trabajo se ha seleccionado la línea de células de neuroblastoma SH-SY5Y, que puede ser inducida hacia una diferenciación neuronal utilizando una combinación secuencial de retinoide (ec23) y BDNF.

**2. Determinar el efecto del estrés oxidativo sobre el modelo neuronal establecido.**

Este objetivo persigue simular, en el modelo neuronal *in vitro*, un estado de estrés oxidativo similar al que se produce durante las enfermedades neurodegenerativas. Para ello, las células se expondrán, de forma controlada, a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**3. Determinar la eficacia de la terapia antioxidante como estrategia para revertir el efecto del daño oxidativo neuronal.**

Los antioxidantes juegan un papel importante en la prevención del daño causado por el estrés oxidativo, neutralizando los radicales libres e inhibiendo la peroxidación lipídica. Para contrarrestar el efecto dañino del estrés oxidativo, se han propuesto numerosos compuestos antioxidantes y agentes neuroprotectores, siendo la NAC el compuesto más empleado en los estudios de neuroprotección.

**4. Determinar la eficacia de la terapia celular como estrategia para revertir el efecto del daño oxidativo neuronal.**

Existen evidencias de que las ADSCs poseen un efecto terapéutico sobre distintos tipos celulares, en gran medida, debido a su actividad paracrina. Este objetivo persigue analizar la capacidad terapéutica de las propias ADSCs, así como la de su medio acondicionado obtenido en condiciones de cultivo de las células en ausencia de SBF.

**5. Determinar la eficacia de la combinación del medio acondicionado y la NAC como estrategia para revertir el efecto del daño oxidativo neuronal.**

Una vez analizados los efectos terapéuticos de las ADSCs y la NAC, de forma aislada, sobre el modelo neuronal de estrés oxidativo, se estudiará el posible efecto terapéutico de la combinación del medio acondicionado por las ADSCs privadas de SBF y la NAC.

## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**



## IV.1. MATERIAL Y TÉCNICAS

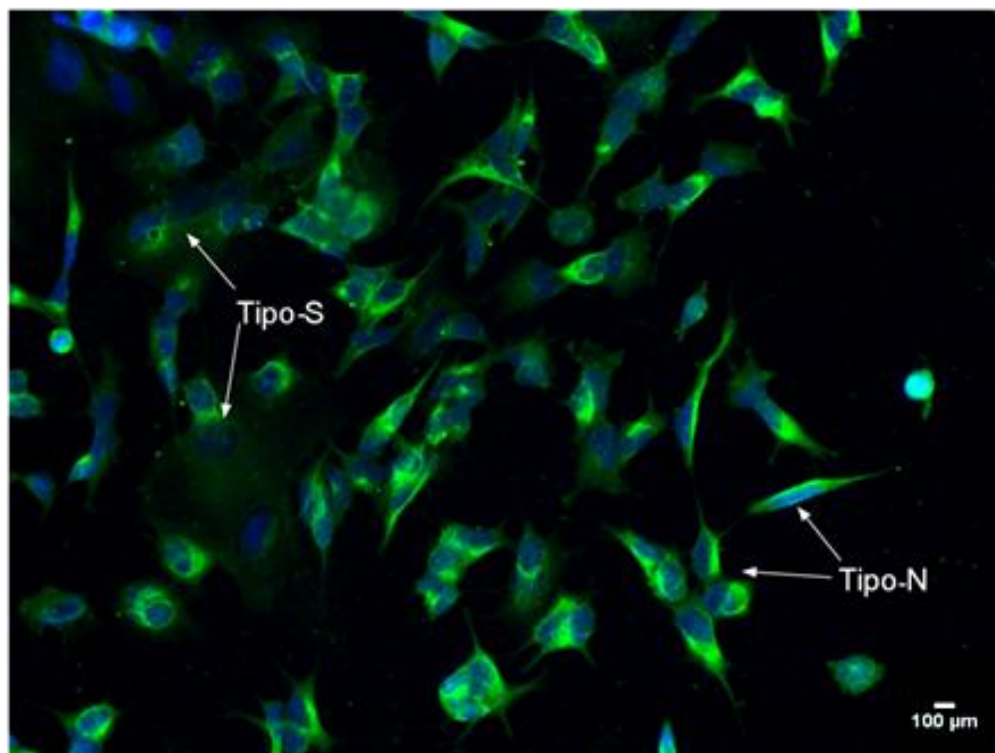
### IV.1.1. Células

#### IV.1.1.1. Línea celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y)

La línea celular SH-SY5Y es un subclón de las células SK-N-SH, las cuales fueron obtenidas a partir de una biopsia de una paciente con neuroblastoma. Estas células son diploides y con características similares a las de las neuronas noradrenérgicas. En los cultivos *in vitro* se identifican dos poblaciones de células, unas con fenotipo neuronal (tipo N) y otras con fenotipo substrato-adherente (tipo S).

Las células SH-SY5Y empleadas en el presente trabajo fueron adquiridas en la *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, USA).

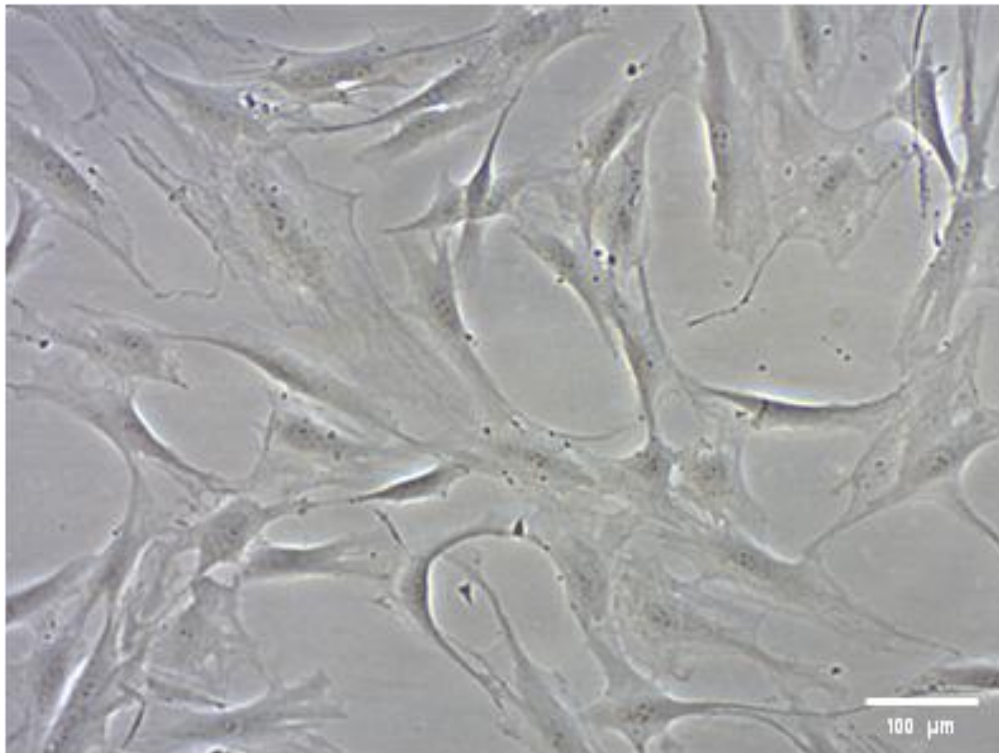
Estas células pueden diferenciarse y madurar adquiriendo un fenotipo neuronal, de acuerdo a criterios morfológicos y bioquímicos, cuando son tratadas con distintos agentes como el ácido *all-trans*-retinoico (ATRA, Sigma-Aldrich Chemical Co.) o el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, Sigma-Aldrich Chemical Co), entre otros.



**Figura 8.** Cultivo de células SH-SY5Y con inmunomarcaje para NF-200 con Alexa Fluor® 488 (verde) y núcleos con Hoechst (azul). Imagen tomada en microscopio de fluorescencia, objetivo 20x. Las flechas identifican los dos tipos celulares S y N.

#### **IV.1.1.2. Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADSC, Adipose-derived Stem Cell)**

Las ADSCs de origen humano fueron donadas por HistoCell S.L. (Parque Científico-Tecnológico de Bizkaia, España). Estas células fueron aisladas a partir de muestras de tejido adiposo procedentes de lipoaspirados. Se consiguió un *stock* que se almacenó en nitrógeno líquido, lo que aseguró una reserva de células suficiente para completar el estudio.



**Figura 9.** Cultivo de células ADSCs en frasco de 75 cm<sup>2</sup>. Imagen tomada en microscopio de contraste de fases, objetivo 20x.

#### **IV.1.2. Cultivos celulares**

##### **IV.1.2.1. Descongelación y mantenimiento del cultivo**

Las células se mantuvieron almacenadas a -180°C en un tanque de nitrógeno líquido y a -80°C en un ultracongelador (MDF-U52V, Sanyo Electric Biomedical Co., Japón). Para llevar a cabo la experimentación se procedió a la descongelación de los crioviales en un baño termostático a 37°C. La manipulación de los cultivos en esterilidad se llevó a cabo en la cabina de flujo laminar vertical Faster Bio 48.

Las células fueron cultivadas en frascos de 25 y 75 cm<sup>2</sup> de superficie (Sarstedt AG & Co, Alemania) en las siguientes condiciones:

- Línea celular SH-SY5Y: densidad de  $4 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (DMEM/F-12, Gibco, Life Technologies™, Carlsbad, CA, EE.UU.), suplementado al 10% con SBF (Biochrom AG, Alemania), 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina (Lonza, Bélgica).
- Línea celular ADSC: densidad de  $4 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en medio de cultivo DMEM-Glutamax™ (Gibco, Life Technologies™), suplementado al 10% con SBF, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina.

Una vez realizada la siembra, los cultivos se mantuvieron en un incubador (CO<sub>2</sub> incubator MCO-18AIC-UV, Sanyo Electric Biomedical Co.) a 37°C, humedad a saturación y un 5% de CO<sub>2</sub>. Alcanzado el estado de semiconfluencia (80-90% de la superficie de cultivo ocupada), se despegaron las células con tripsina y ácido etilendiaminotetraacético (tripsina-EDTA) 0.05% (Gibco, Life Technologies™). La suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 500g (Heraeus Labofuge 400R, Alemania). Por último, se procedió al recuento de las células en un hemocitómetro Bürker (BlauBrand®, Alemania), estimando la viabilidad celular por el método de exclusión del Azul Tripán (Gibco, Life Technologies™). En todos los casos se emplearon células en pases 3 a 5.

#### **IV.1.2.2. Congelación de las células**

Con el fin de crear un *stock* celular, se procedió a congelar las células a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml de solución de congelación, compuesta por SBF con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co.). Una vez distribuidas las células en los viales etiquetados, se introdujeron en un contenedor para congelación sumergido en propanol (Mr. Frosty, Nalgene® Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), el cual se introdujo directamente en el ultracongelador a -80°C. Este sistema indujo una congelación gradual (descenso de 1°C/min) desde la Tª ambiente hasta -80°C.

#### **IV.1.2.3. Siembra de la suspensión celular en placas multipocillos**

Para la experimentación en placa (Sarstedt AG&Co.), se sembraron las células SH-SY5Y a una concentración de  $20 \times 10^3$  células/pocillo, para las placas de 24 pocillos y, de  $12 \times 10^3$  células/pocillo, para las placas de 96 pocillos. Para los experimentos de inmunomarcaje se utilizaron cubreobjetos redondos (Menzel-Gläser, Alemania) como soporte de cultivo. En ellos se sembraron  $15 \times 10^3$  células/cubreobjetos.

#### **IV.1.2.4. Inducción de la diferenciación neuronal de células SH-SY5Y**

Para inducir la diferenciación de las células SH-SY5Y, se llevaron a cabo las siguientes modificaciones en las condiciones de cultivo:

- Recubrimiento de la superficie de cultivo con 1mg/ml de Poli-D-Lisina (Becton, Dickinson and Company, Bedford, MA, EE.UU.) o 10 $\mu$ g/ml de laminina (Sigma-Aldrich Chemical Co.) en agua destilada estéril (12 h de incubación), para facilitar la adhesión celular.
- Tratamiento de las células con agentes inductores de la diferenciación: se utilizaron dos tipos alternativos de agentes diferenciadores, ATRA y ec23 (4-(5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-ylethynyl) benzoic acid) (Reinnervate Ltd, United Kingdom), a concentraciones de 10  $\mu$ M y 1  $\mu$ M respectivamente, aplicando, en ambos casos, dos dosis espaciados con un intervalo de 72 horas.
- Tratamiento con 2 nM de BDNF administrado 48 horas tras el segundo pulso del agente diferenciador ec23.

A lo largo del proceso de diferenciación, los cultivos se mantuvieron a 37°C, humedad a saturación y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **IV.1.2.5. Obtención del medio acondicionado por ADSCs**

La obtención del medio acondicionado por ADSCs (ADSC-MA) se llevó a cabo sembrando  $2,5 \times 10^5$  células en un frasco de 25 cm<sup>2</sup> en medio DMEM-Glutamax™, suplementado al 10% con SBF 50 U/ml de penicilina y 50  $\mu$ g/ml de estreptomina. Una vez adheridas las células a la superficie de cultivo (2 horas), se sustituyó el medio de siembra por el medio a acondicionar, DMEM-Glutamax™ libre de SBF, manteniéndose estas condiciones de cultivo durante 48 horas. Transcurrido este



tiempo se recogió el medio y se filtró a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Sarstedt AG&Co.). Este ADSC-MA se utilizó inmediatamente después de su recogida o se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización.

### **IV.1.3. Técnicas de experimentación**

#### **IV.1.3.1. Inducción de estrés oxidativo**

La inducción del estrés oxidativo en las células SH-SY5Y se realizó mediante la administración del agente oxidante  $\text{H}_2\text{O}_2$  (33% P/V, Panreac Química SLU, España), diluido a diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mM) en medio DMEM/F-12 o Glutamax™, durante un tiempo de 60 minutos.

#### **IV.1.3.2. Determinación de la viabilidad y proliferación celular**

La determinación de la viabilidad celular se realizó mediante recuento celular directo en cámara Burkler (BlauBrand®). Para obtener la suspensión celular se añadieron 180  $\mu\text{l}$  de tripsina-EDTA en los pocillos, manteniéndolos 1 minuto. Las células despegadas se resuspendieron y se neutralizó la tripsina con 20  $\mu\text{l}$  de SBF. Posteriormente, se tomó una alícuota y, diluida 1:2 con azul tripán, se llevó a cabo el recuento en el microscopio de contraste de fases.

La valoración de la proliferación celular se llevó a cabo mediante el ensayo del MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, Boehringer Mannheim). Este ensayo se basa en la transformación de la sal de tetrazolio en cristales de formazán, proceso inducido por células metabólicamente activas. Para ello, se añadieron 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de MTT en Phosphate Buffered Saline (PBS, Sigma-Aldrich Chemical Co.; 0.5 mg/ml) y se incubaron durante 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Después de este tiempo, se solubilizaron los cristales de formazán, adquiriendo el medio una coloración azul, cuya absorbancia se midió en el lector multiparamétrico de placas Synergy™ HT System (Biotek Instruments Inc, Winooski, VT, EE.UU.), utilizando una  $\lambda = 540 \text{ nm}$ .

#### **IV.1.3.3. Determinación de los niveles intracelulares de ROS**

La medida de los niveles intracelulares de ROS se llevó a cabo mediante un ensayo fluorimétrico, basado en la emisión de fluorescencia de la sonda 2,7-diclorofluoresceína diacetato ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ , Molecular Probes®) tras su oxidación por radicales libres. Esta sonda, que es hidrolizada por las esterasa intracelulares y oxidada

por los ROS, se convierte en diclorofluoresceína (DCF), que emite fluorescencia a una  $\lambda=517-527$  nm cuando se excita a una  $\lambda=492-495$  nm. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, a los que se añadió 100  $\mu$ l de sonda diluida en PBS a concentración 10  $\mu$ M y, se incubó durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Pasado este tiempo, se retiró la sonda de los pocillos y se añadió medio de cultivo. La cuantificación de la fluorescencia se llevó a cabo de forma cinética a lo largo de 60 minutos, realizando un registro cada 10 minutos en el lector multiparamétrico de placas, con la configuración de filtros a 492-495 nm de excitación y 517-527 nm de emisión. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias (u.a.), una vez restado el valor de la autofluorescencia de las células.

#### **IV.1.3.4. Técnicas de inmunodetección de proteínas de citoesqueleto**

Para determinar el efecto de la diferenciación sobre el fenotipo de las células SH-SY5Y, se realizó una inmunodetección de las proteínas de citoesqueleto neurofilamento 200kDa (NF-200) y proteína asociada a microtúbulos (MAP-2), mediante técnicas de inmunofluorescencia según el siguiente procedimiento:

- *Fijación de las células y bloqueo de uniones inespecíficas*

Se fijaron las células con metanol (-20°C durante 10 minutos). Tras un lavado con PBS de 5 minutos a Tª ambiente, se bloqueó la inespecificidad de la reacción Ag-Ac con SBF al 10% en PBS durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se hicieron dos lavados con PBS.

- *Incubación con el anticuerpo primario*

La dilución para el anticuerpo mouse Anti-MAP2 (Sigma-Aldrich, Chemical Co.) fue de 1:100 y la del anticuerpo Rabbit Anti-NF-200 (Sigma-Aldrich, Chemical Co.) de 1:160, ambos en SBF al 5% en PBS. Se añadió un volumen de 50  $\mu$ l sobre las células cultivadas en cubreobjetos y se incubaron en una cámara húmeda durante toda la noche a 4°C.

- *Incubación con el anticuerpo secundario*

Tras tres lavados de 5 min con PBS a Tª ambiente, se incubaron las células durante 1 hora con Alexa Fluor® 488 Goat antiMouse (Invitrogen™ Life Technologies™) diluido 1:2000 y con Alexa Fluor® 488 Goat antiRabbit (Invitrogen™ Life Technologies™) diluido 1:200, en SBF al 5% en PBS, para NF-200 y MAP-2, respectivamente.

- *Montaje de las muestras*

Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBS a T<sup>a</sup> ambiente. Con el objetivo de marcar los núcleos, las muestras se incubaron con Hoechst 33342 0,5µg/ml (Sigma-Aldrich, Chemical Co.) diluido en PBS durante 20 minutos. Por último, tras dos lavados con PBS, las preparaciones se montaron con Fluoromount™ (Sigma-Aldrich, Chemical Co.) para su observación al microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioskop; Alexa Fluor® 488  $\lambda_{ex} = 495$  y  $\lambda_{em} = 519$ , Hoechst 33342  $\lambda_{ex} = 350$  y  $\lambda_{em} = 461$ ).

#### **IV.1.3.5. Determinación de la presencia y concentración de factores de crecimiento en el ADSC-MA, mediante ELISA**

La determinación del contenido en factores neurotróficos (*Brain derived Neurotrophic factor*, BDNF y *Glial cell-derived Neurotrophic factor*, GDNF) del ADSC-MA, se llevó a cabo mediante la técnica de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), empleando los kits comerciales RAB0026 y RAB0205 (Sigma-Aldrich, Chemical Co). Este ensayo utiliza una placa de 96 pocillos cuyo fondo está recubierto por anticuerpos que se unen a BDNF o GDNF. La recta patrón se obtuvo a partir de las concentraciones de 16, 6.4, 2.56, 1.02, 0.41, 0.16, 0.066 y 0 ng/ml de BDNF/GDNF. Para la cuantificación de estos factores en el ADSC-MA, se añadieron 100 µl de este medio a cada pocillo, se cubrió la placa y se incubó durante 2 horas 30 minutos a T<sup>a</sup> ambiente, para que el BDNF y GDNF presentes en la muestra se uniesen al anticuerpo inmovilizado en los pocillos. Transcurrido este tiempo, se lavaron los pocillos cuatro veces con el tampón lavador, se secaron y se añadieron 100 µl de estreptavidina-peroxidasa. Tras una incubación de 45 minutos, en agitación y a T<sup>a</sup> ambiente y después de cuatro lavados, se añadió el cromógeno 3, 3',-5,5-tetramethylbenzidine (TMB) durante 30 minutos con agitación en oscuridad. Por último, se añadieron 50 µl de la solución *stop* a cada pocillo y el líquido viró del color azul al amarillo. La absorbancia se midió a una  $\lambda=450$  nm en el lector multiparamétrico de placas. Los valores se representan en relación a los valores de absorbancia y, por lo tanto, a las concentraciones de BDNF o GDNF utilizadas en la recta patrón (ng/ml).

#### **IV.1.3.6. Electrofisiología – Registros de *patch clamp***

El registro electrofisiológico de las células SH-SY5Y se realizó mediante la técnica de *patch clamp*. Las células se sembraron a una concentración de  $15 \times 10^3$  células en

cubreobjetos de 12 mm de diámetro. Los cultivos se sometieron a un proceso de diferenciación según se describe en el apartado IV.1.2.4.

Para llevar a cabo los registros electrofisiológicos, los cubreobjetos fueron transferidos a la cámara de registro y perfundidos con una solución de líquido cefalorraquídeo artificial que contenía NaCl 125 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM, NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 26 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.4 mM y D-glucosa, saturada con un 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> (pH 7.3 – 7.4, 295 – 300 mOsm). Las células fueron visualizadas con un microscopio con óptica infrarroja (Eclipse E600FN, Nikon). Las medidas se llevaron a cabo a T<sup>a</sup> ambiente empleando pipetas de vidrio con una resistencia de 4 – 7 MΩ (PC-10, Narishige CO., LTD) y rellenas con una solución interna compuesta por gluconato potásico 130 mM, NaCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, EDTA 1 mM, HEPES 10 mM, Mg-ATP 2 mM, Na-GTP 0.5 mM y fosfocreatina 10 mM (290 – 295 mOsm). Para medir las corrientes, los experimentos se llevaron a cabo fijando el voltaje a -50 mV (V<sub>h</sub> = -50 mV). Las corrientes voltaje-dependientes fueron desencadenadas por la despolarización del potencial de membrana desde -70 a +50 mV (300 ms). Los potenciales de acción espontáneos y provocados, inducidos por la inyección de corrientes desde 0 a 120 pA (500 ms), fueron grabados en modo *current-clamp*. Las medidas fueron tomadas con un amplificador Axopatch-200B, filtrado a 5 kHz, y digitalizadas con Digidata 1322A (Axon Instruments). Los datos fueron mostrados a 10 kHz y analizados con el software Clampex 10.2 (Molecular Devices).

## IV.2. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

### IV.2.1. Estudio del efecto del estrés oxidativo sobre las células SH-SY5Y no diferenciadas

Para determinar el efecto del estrés oxidativo, inducido mediante la adición al medio de cultivo de diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.01, 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mM) durante 1 hora, se realizaron los siguientes experimentos:

- Determinación de los niveles intracelulares de ROS: se llevó a cabo la medida cinética a intervalos de 10 minutos durante la primera hora tras la oxidación, utilizando la sonda según el protocolo descrito en el apartado IV.1.3.3.
- Determinación de la viabilidad celular a las 24, 48 y 72 horas tras la oxidación, siguiendo el protocolo descrito en el apartado IV.1.3.2.

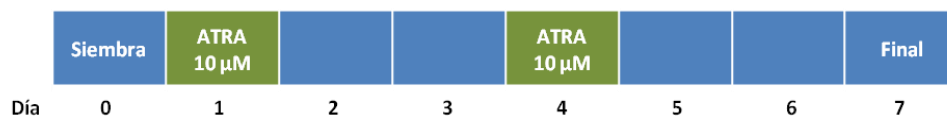
### IV.2.2. Determinación del protocolo de diferenciación de las células SH-SY5Y

#### IV.2.2.1. Protocolos de diferenciación empleados

Para la diferenciación de las células SH-SY5Y se siguieron tres pautas diferentes:

- **Pauta 1: diferenciación con ATRA**

El proceso de diferenciación se inició con la siembra de las células SH-SY5Y sobre la superficie de cultivo tratada con laminina (10µg/ml). Transcurridas 24 horas (día 1), se añadió un primer pulso de ATRA, a una concentración de 10 µM en DMEM/F-12 + 10% SBF; 72 horas después (día 4), se añadió un segundo pulso de ATRA (10 µM). Se consideró finalizada la diferenciación una vez transcurridas 72 horas a partir del segundo pulso (día 7; fig.10).

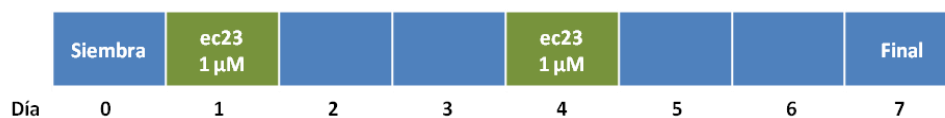


**Figura 10.** Secuencia de diferenciación de las células SH-SY5Y con ATRA.

- **Pauta 2: diferenciación con ec23**

De la misma forma que en el caso anterior, el proceso de diferenciación comenzó con la siembra de las células sobre superficies de cultivo tratadas con laminina. Esto se llevó a cabo en diferentes tipos de sustrato como frascos T25, placas de 24 y 96

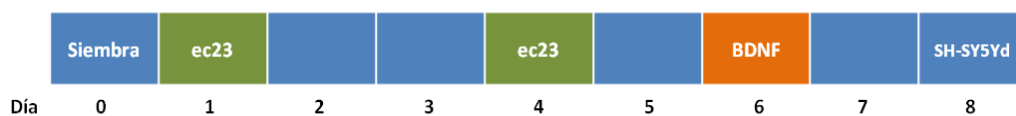
pocillos o cubreobjetos. Siguiendo la misma secuencia que para el ATRA, el ec23 (1  $\mu$ M) se administró 24 horas tras la siembra (día 1) y 72 horas después del primer pulso (día 4). Se consideró finalizado el proceso de diferenciación transcurridas 72 horas del segundo pulso (día 7; fig. 11).



**Figura 11.** Secuencia de diferenciación de las células SH-SY5Y con ec23.

- **Pauta 3: diferenciación con ec23 + BDNF**

La inducción de la diferenciación celular se inició de la misma forma que en el caso anterior (dos pulsos de ec23, administrada a una concentración de 1  $\mu$ M en los días 1 y 4) incorporando un pulso de BDNF (2 nM), 48 horas después del segundo pulso de ec23 (día 6). Se consideró finalizado el proceso de diferenciación el día 8 (fig.12).



**Figura 12.** Secuencia de diferenciación de las células SH-SY5Y con ec23 + BDNF

Una vez finalizada la diferenciación celular, se llevó a cabo la **selección de la población tipo N** de la línea celular SH-SY5Y. Esta población es la que tiene unas características fenotípicas más próximas a las de las neuronas y se caracteriza por tener una menor adhesividad al sustrato que las células tipo S. Para obtener un cultivo enriquecido en células N (90% de la población), las SH-SY5Y se cultivaron en frasco T75 hasta alcanzar el 80% de confluencia, momento en el que se sometió el cultivo a una incubación breve (10 segundos) con tripsina. Este proceso se repitió dos veces consecutivas, finalizando así la selección de la población celular tipo N.

#### IV.2.2.2. Estudio de la eficacia de los diferentes protocolos de diferenciación empleados

En las tres pautas de diferenciación se llevó a cabo un estudio de parámetros funcionales y morfológicos de las células diferenciadas. Así, se valoró la expresión de NF-200, la generación de ROS intracelulares y la capacidad proliferativa de las células.

Todos los estudios se llevaron a cabo en los siguientes grupos experimentales:

- SH-SY5Y control, analizadas el día 7.
- SH-SY5Y diferenciadas con dos pulsos de ATRA 10  $\mu\text{M}$  (**pauta 1**) y analizadas en el día 7 (secuencia de diferenciación fig. 10).
- SH-SY5Y diferenciadas con dos pulsos de ec23 1  $\mu\text{M}$  (**pauta 2**) y analizadas en el día 7 (secuencia de diferenciación fig. 11).
- SH-SY5Y diferenciadas con dos pulsos de ec23 (1  $\mu\text{M}$ ) + un pulso de BDNF (2 nM) (**pauta 3**) y analizadas en el día 8 (secuencia de diferenciación fig. 12).

- **Efecto del proceso de diferenciación sobre la expresión de NF-200**

El efecto de la diferenciación sobre la expresión de NF-200 se analizó mediante las técnicas de inmunodetección descritas en el apartado IV.1.3.4.

- **Efecto del proceso de diferenciación sobre los niveles intracelulares de ROS**

Tras los diferentes procesos de diferenciación, las células fueron sometidas a oxidación (0.25 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 60 minutos), determinándose los niveles intracelulares de ROS a los 30 y 60 minutos, según se describe en el apartado IV.1.3.3.

- **Efecto del proceso de diferenciación sobre la proliferación celular**

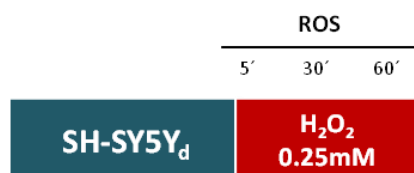
La proliferación se estimó valorando la viabilidad celular de los cultivos en los días 7 y 10 del proceso de diferenciación.

**Tras el análisis de los resultados se decidió utilizar el modelo de diferenciación que combina ec23+BDNF (pauta 3), denominando a las células diferenciadas según este protocolo SH-SY5Yd.**

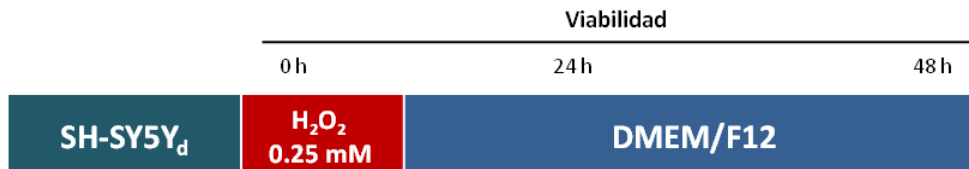
### IV.2.3. Estudio del efecto del estrés oxidativo sobre las células SH-SY5Yd

Las SH-SY5Yd, cultivadas sobre laminina en condiciones de semiconfluencia, fueron sometidas a estrés oxidativo mediante la incubación con 0.25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 60 minutos, cuyo efecto se valoró mediante el análisis de los siguientes parámetros biológicos:

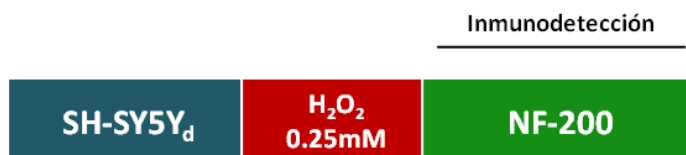
- **Niveles intracelulares de ROS:** se determinaron a los 5, 30 y 60 minutos tras la adición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



- **Medida de la viabilidad celular:** se llevó a cabo a las 24 y 48 horas tras la oxidación.



- **Expresión de NF-200:** se determinó fijando las células inmediatamente después de la oxidación y llevando a cabo el proceso de Inmunodetección según el protocolo descrito en el apartado IV.1.3.4.



- **Electrofisiología:** se llevó a cabo a las 48 horas tras la oxidación según el protocolo descrito en el apartado IV.1.3.6.





#### IV.2.4. Estudio del efecto de las ADSCs sobre las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo

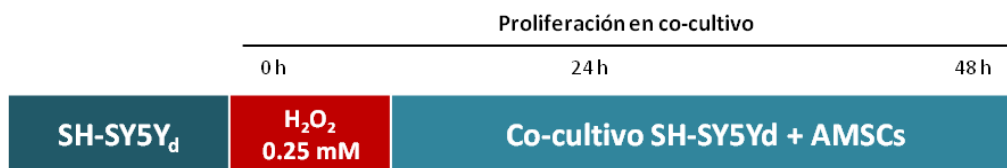
##### IV.2.4.1. Efecto del co-cultivo con ADSCs sobre la proliferación de las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo

Para llevar a cabo el co-cultivo se emplearon insertos Transwell® (Corning Incorporated, Nueva York, EE.UU.), constituidos por un soporte que posee una membrana de poliestireno de 0.4 µm de poro, de forma que se puede llevar a cabo el co-cultivo de células en los diferentes compartimentos, permitiendo la difusión del medio de cultivo entre los compartimentos contiguos.

Inicialmente se sembraron las SH-SY5Y (2x10<sup>4</sup> células/pocillo) en placas de 24 pocillos para inducir su diferenciación neuronal, según el protocolo descrito previamente (ec23 + BDNF). Una vez obtenidas las células SH-SY5Yd, se procedió a la inducción del estrés oxidativo mediante la administración de una dosis de 0.25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo se renovó el medio con DMEM-Glutamax™ libre de suero.

De forma simultánea se prepararon los insertos Transwell®, donde se sembraron 7x10<sup>3</sup> ADSCs en un volumen de 200 µl de medio de cultivo específico para estas células, añadiendo 800 µl de medio en los pocillos de la placa donde se colocaron los insertos. Tras 2 horas de aclimatación de las ADSCs, los *transwell* se transfirieron a la placa donde previamente se habían sembrado y oxidado las células SH-SY5Yd. El co-cultivo se mantuvo en DMEM-Glutamax™ libre de suero durante un periodo de 72 horas.

El efecto de las ADSCs sobre las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo se determinó mediante la medida de la proliferación de estas células a las 24 y 48 horas, comparando los valores obtenidos con los de la población control.



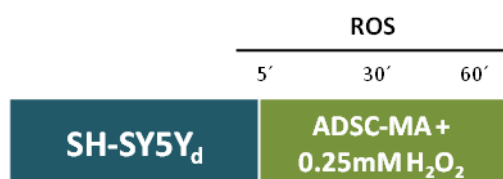
#### IV.2.4.2. Determinación de la presencia de factores de crecimiento en el ADSC-MA

Una vez obtenido el ADSC-MA de ADSCs como se explica en el apartado IV.1.2.5, se analizó el contenido en BDNF y GDNF en dicho medio, mediante la técnica ELISA según el protocolo descrito en el apartado IV.1.3.5. Los resultados obtenidos se expresaron en ng/ml.

#### IV.2.4.3. Efecto del ADSC-MA sobre las células SH-SHY5Yd sometidas a estrés oxidativo

- **Efecto sobre los niveles intracelulares de ROS**

En una placa de 96 pocillos pretratados con laminina se sembraron  $12 \times 10^3$  células/pocillo. Al finalizar el proceso de diferenciación según la **pauta 3**, se retiró el medio de cultivo, siendo sustituido por 100  $\mu$ l de ADSC-MA en cada pocillo. La oxidación se llevó a cabo con la dosis y tiempo descritos previamente (0.25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 60 minutos). Los niveles de ROS generados fueron medidos a los 5, 30 y 60 minutos.



- **Efecto sobre la viabilidad celular**

Utilizando el mismo proceso de siembra, diferenciación y oxidación referidos en el apartado anterior, se añadieron 100  $\mu$ l de ADSC-MA en cada pocillo. La viabilidad celular se determinó a las 24 y 48 horas.



- **Efecto sobre la expresión de NF-200**

Transcurrida 1 hora de la oxidación, se añadieron 500 µl de ADSC-MA en cada pocillo. Tras 48 horas se fijaron las células y se llevó a cabo el proceso de inmunodetección según el protocolo descrito en el apartado IV.1.3.4.



- **Efecto sobre la electrofisiología**

Del mismo modo señalado en los apartados anteriores, tras la oxidación y posterior adición de 500 µl de medio estándar o del ADSC-MA en cada pocillo, se procedió al análisis de las propiedades electrofisiológicas a las 48 horas, según el protocolo descrito en el apartado IV.1.3.6.



#### IV.2.5. Efecto del tratamiento con NAC y BDNF sobre las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo, aislados o en combinación con ADSC-MA

Los **tratamientos** empleados para el estudio del efecto del estrés oxidativo sobre las células SH-SY5Yd oxidadas fueron: **NAC 5 mM**, **BDNF 2 nM** y los tratamientos combinados **NAC+ADSC-MA** y **BDNF+ADSC-MA**.

- **Efecto sobre los niveles de ROS**

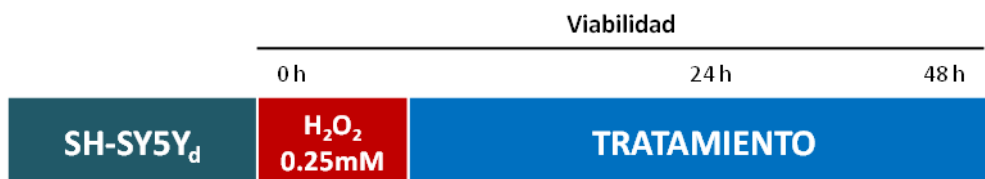
Partiendo de  $12 \times 10^3$  células/pocillo sembradas en una placa de 96 pocillos pretratados con laminina, se obtuvieron SH-SY5Yd según la **pauta 3**. Al finalizar este proceso se

retiró el medio y se añadieron 100 µl de medio con el tratamiento correspondiente (NAC, BDNF, NAC+ADSC-MA o BDNF+ADSC-MA) en cada pocillo. La oxidación se llevó a cabo con la dosis y tiempo descrito previamente (0.25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 60 minutos), tras lo cual se procedió a la cuantificación de los niveles de ROS generados a los 5, 30 y 60 minutos.



- **Efecto sobre la viabilidad celular**

Las células se sembraron, diferenciaron y oxidaron del mismo modo señalado en el apartado anterior, a continuación se añadieron 100 µl de medio suplementado con el tratamiento en cada pocillo (NAC, BDNF, NAC+ADSC-MA o BDNF+ADSC-MA). La viabilidad celular se determinó a las 24 y 48 horas.



- **Efecto sobre la expresión de NF-200**

Se fijaron las células 48 horas después del inicio del tratamiento, llevando a cabo el proceso de inmunodetección según el protocolo descrito en el apartado IV.1.3.4.



- **Efecto sobre la electrofisiología**

Del mismo modo que en los casos anteriores, las propiedades electrofisiológicas se analizaron a las 48 horas según el protocolo descrito en el apartado IV.1.3.6.



### IV.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las experiencias se repitieron, al menos, tres veces, y en cada una de ellas se realizaron un mínimo de tres réplicas por ensayo.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa GraphPad Prism v5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.). Los estadísticos empleados para la significación fueron la *t-Student* y el análisis de la varianza (ANOVA).

#### Media aritmética y desviación estándar

La *media aritmética* ( $\bar{x}$ ) es el valor característico de una serie de datos cuantitativos obtenidos de la suma de todos los valores observados ( $x_i$ ), dividido entre el número de observaciones ( $N$ ).

$$\bar{x} = \sum x_i / N$$

La *desviación estándar* ( $DE$ ) es un indicador de la dispersión de variables que se expresa como la raíz cuadrada de la *varianza* ( $S^2$ ), la cual se obtiene del promedio de los cuadrados de las desviaciones de cada valor con respecto a su media, por lo tanto:

$$DE = \sqrt{[\sum (x_i - \bar{x})^2 / N]}$$

#### Análisis de la prueba t-Student

El *Test-t*, es una prueba analítica utilizada para la comparación de medias de dos categorías cuantitativas dentro de una variable dependiente o las medias de dos grupos diferentes. Es una prueba paramétrica, es decir, sirve para comparar variables numéricas de distribución normal.

La prueba *t-Student* establece el valor del estadístico  $t$ , según el cual corresponderá a un valor de significación estadística determinado.

#### Análisis de la varianza (ANOVA)

El *ANOVA* es un análisis estadístico que permite la comparación entre grupos a través de la  $S^2$  de la variable numérica en cada grupo de la variable categórica  $x$ . El objetivo es comprobar si las diferencias entre las  $\bar{x}$  de distintos grupos son significativas.

La cifra estadística obtenida con el ANOVA es la razón *F de Snedecor*, determinada mediante la siguiente relación:

$$F = S_E^2 / S_D^2 \rightarrow F_{t-1, N-t}$$

$$\text{Donde } S_E^2 = x \sum_{i=1}^t n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2 / t - 1$$

$$\text{Y } S_D^2 = \sum (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 / N - t$$

Así, para un nivel de significación  $\alpha$ , si  $F \rightarrow F_{t-1, N-t}$  las medias de los grupos no son iguales, indicando, por lo tanto, que existen diferencias significativas entre los niveles.

### **Nivel de significación**

Los resultados de un experimento requieren un tratamiento estadístico que permita orientar acerca de si la hipótesis de investigación debe ser rechazada o no, para lo cual se deberá establecer convencionalmente un determinado nivel de significación que permita diferenciar resultados estadísticamente significativos de aquellos que no lo son.

El *nivel de confianza* utilizado en los experimentos es del 95%, es decir, las valoraciones son estadísticamente significativas cuando la probabilidad ( $p$ ) debida al azar es menor que 0.05 ( $p < 0.05$ ).





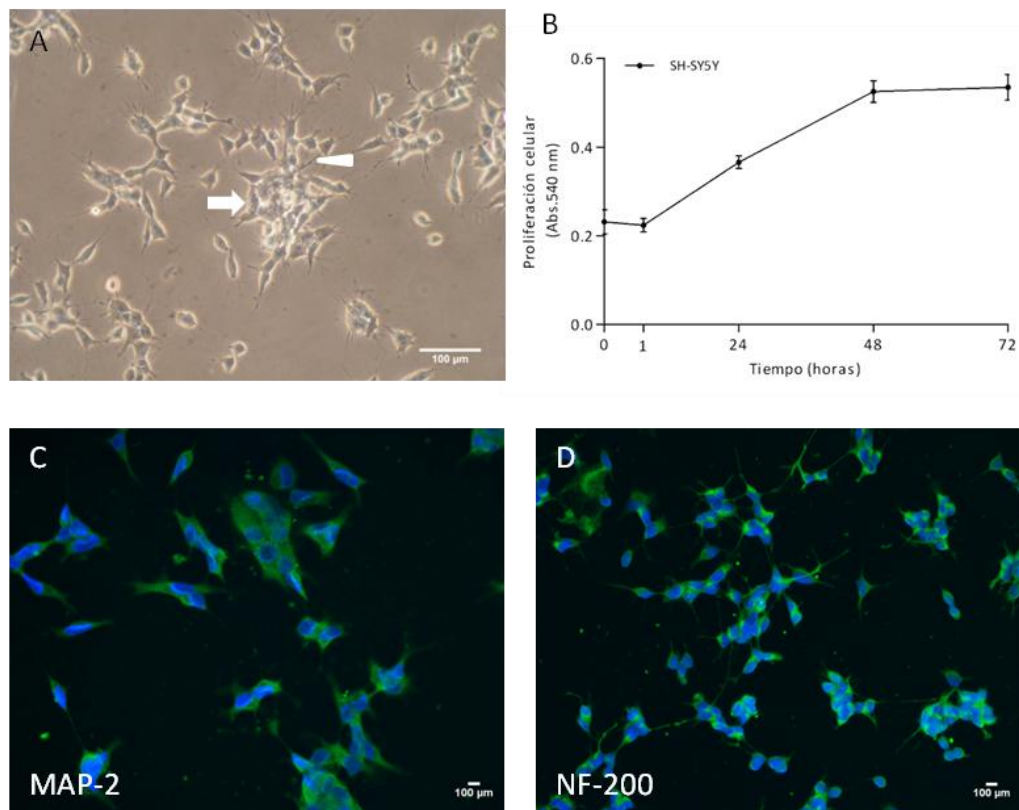
## **V. RESULTADOS**



## V.1. NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y: CARACTERIZACIÓN Y RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO

### V.1.1. Caracterización celular

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y establecida en cultivo *in vitro*, corresponde a una población celular heterogénea en la que se identifican dos fenotipos morfológicos distintos que se diferencian por su adhesividad al sustrato. La población tipo epitelial (tipo S) presenta una mayor adhesividad que la de tipo neuroblástico (tipo N). En cultivos en fase de crecimiento exponencial tienden a formar agregados celulares, mostrando las células situadas en los bordes de dichos agregados prolongaciones cortas y gruesas (fig.13A).



**Figura 13.** Células SH-SY5Y en frasco de cultivo T25 obtenidas con microscopía óptica (objetivo 20x). Las células sin diferenciar forman agregados (flecha) y muestran prolongaciones cortas y gruesas (punta de flecha) [A]. Gráfica que expresa el número de células totales obtenidas mediante recuento directo a 1, 24, 48 y 72 horas [B]. Imágenes de inmunofluorescencia de las células marcadas con MAP-2-Alexa Fluor® 488 (verde) [C] y NF-200- Alexa Fluor® 488 (verde)[D]. Los núcleos se marcaron con Hoechst (azul) (objetivo 20x).

La cinética proliferativa de estas células registrada durante 72 horas muestra un crecimiento exponencial de la población (fig.13B), estimándose el tiempo de duplicación en 55 horas.

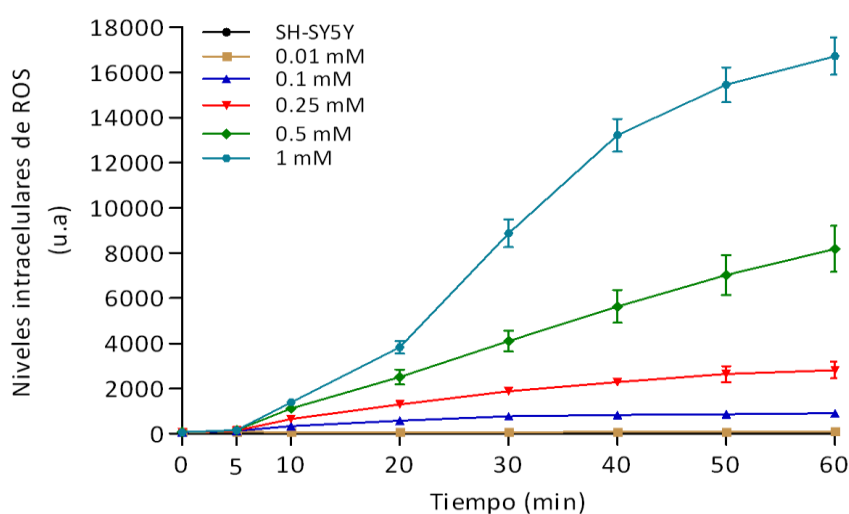
Las imágenes de inmunofluorescencia utilizando los marcadores de diferenciación neuronal NF-200 y MAP-2, muestran un débil marcaje citoplasmático, que corresponde a poblaciones celulares con bajo nivel de diferenciación neuronal (fig.13C y 13D).

### V.1.2. Efecto del estrés oxidativo inducido en las células SH-SY5Y mediante su exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Con el objetivo de inducir un estrés oxidativo controlado sometimos a las células a concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.01 mM, 0.1 mM, 0.25 mM, 0.5 mM y 1 mM) durante 60 minutos, analizando los siguientes parámetros:

#### V.1.2.1. Efecto del estrés oxidativo sobre los niveles intracelulares de ROS

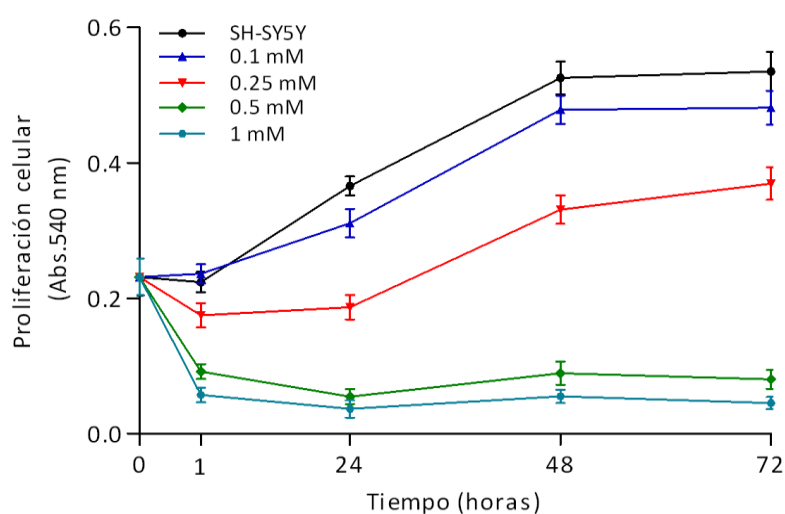
En la figura 14 se observa un aumento dosis-dependiente de los niveles intracelulares de ROS generados tras la adición del oxidante. Así, a bajas concentraciones (0.01 mM), se observó un incremento no significativo de los niveles intracelulares de ROS de 1.3 veces respecto al control a los 30 minutos. Con las concentraciones moderadas (0.25 mM), las células experimentaron un incremento significativo ( $p < 0.001$ ) en los niveles de ROS, llegando a ser 34 veces superiores a los valores del control, tanto a los 30 como a los 60 minutos. La exposición de las células a concentraciones altas (0.5 y 1 mM) produjo un incremento significativo respecto al control de 75 y 95 veces con la concentración de 0.5 mM, y de 162 y 196 veces con 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a los 30 y 60 minutos respectivamente ( $p < 0.001$ ).



**Figura 14.** Niveles intracelulares de ROS en las células SH-SY5Y sometidas a concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.01, 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mM). Los valores están expresados en unidades arbitrarias de fluorescencia. La cinética fue llevada a cabo con medidas a intervalos de 10 minutos durante 1 hora.

### V.1.2.2. Efecto del estrés oxidativo sobre la proliferación celular

La adición de la dosis de  $H_2O_2$  más baja ensayada (0.1 mM) únicamente produjo diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) en la proliferación celular respecto al control a las 24 horas, no encontrándose diferencias en el resto de los tiempos. Sin embargo, a ese mismo tiempo, la exposición a concentraciones moderadas de peróxido (0.25 mM) produjo una reducción de 2 veces la proliferación celular con respecto al control, siendo dicha reducción de 7.2 y 10.4 veces a las concentraciones de 0.5 y 1 mM de  $H_2O_2$ , respectivamente ( $p < 0.001$ , fig.15).



**Figura 15.** Proliferación de las células SH-SY5Y sometidas a concentraciones crecientes de  $H_2O_2$ . Valores de absorbancia a 540 nm a tiempos 0, 1, 24 y 48 horas.

A partir de los resultados obtenidos se calculó la concentración inhibitoria  $IC_{50}$  a las 24 horas, cuyo valor corresponde a 0.244 mM de  $H_2O_2$ .

**A partir de este momento se estableció una única dosis de 0.25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inducir el estrés oxidativo.**

**La determinación de esta concentración se estableció según los siguientes criterios:**

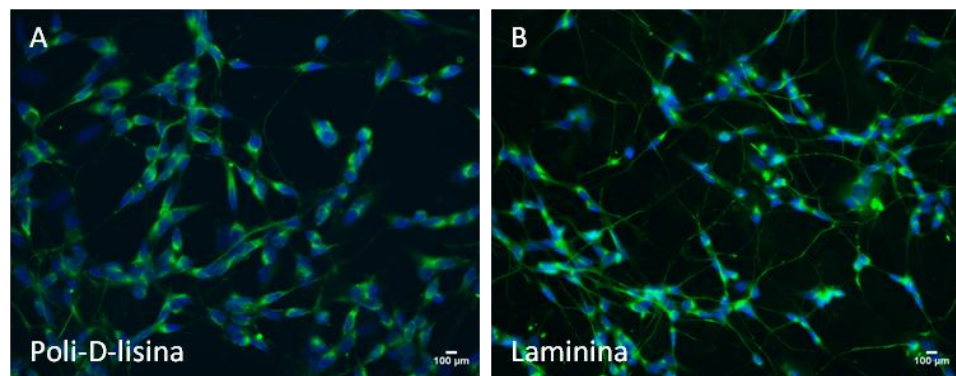
- **Una concentración que induzca una mortalidad inferior al 50% de la población.**
- **Una concentración que represente el nivel de oxidación detectado en procesos inflamatorios según se recoge en la literatura científica (Jain M, 2000; Roy S, 2006).**

## V.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS AGENTES DIFERENCIADORES SOBRE LAS CÉLULAS SH-SY5Y

Dado el carácter poco diferenciado de la línea celular SH-SY5Y, se procedió a inducir la diferenciación neuronal en dichas células.

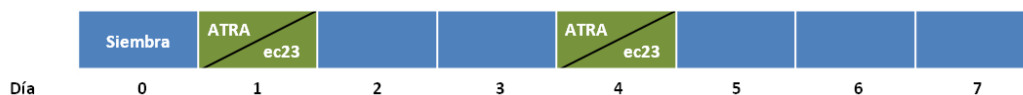
Para definir el modelo de diferenciación se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

- **Sustrato:** con el objetivo de facilitar la adhesión de las células a las superficies de cultivo, se utilizaron dos sustratos diferentes, la Poli-D-lisina y la laminina. En ambos casos se incrementó la adhesión de las células. Sin embargo, observamos un ligero efecto tóxico en la Poli-D-lisina que no se produjo con la laminina. Así, recubriendo las superficies de cultivo con 10 $\mu$ g/ml de laminina obtuvimos cultivos viables y un incremento en la adhesión y la diferenciación celular (fig.16).



**Figura 16.** Imágenes de células SH-SY5Y diferenciadas con ec23 1 $\mu$ M, marcadas con anticuerpo anti-NF-200- Alexa Fluor® 488 (verde) y núcleos con Hoechst (azul), sobre sustrato Poli-D-lisina [A] y sobre laminina [B] (objetivo 20x).

- **Medios de cultivos específicos:** la diferenciación neuronal en las células SH-SY5Y puede ser inducida empleando medios de cultivo a los que se añade agentes diferenciadores apropiados, como los retinoides. En nuestro caso empleamos ATRA (10 $\mu$ M) o ec23 (1 $\mu$ M), aplicando en ambos casos dos pulsos con un intervalo de 72 horas (fig.17), según se describe en detalle en el apartado IV.1.2.4 de material y métodos. Se comprobó el nivel de diferenciación en función de varios parámetros biológicos, tales como la proliferación celular, los niveles intracelulares de ROS y la expresión de NF-200.

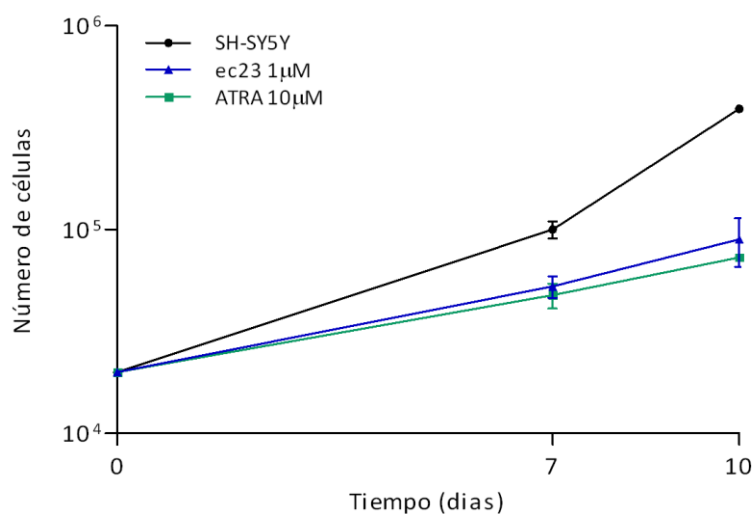


**Figura 17.** Protocolo de diferenciación de las células SH-SY5Y con ATRA o ec23

### V.2.1. Efecto de los agentes diferenciadores sobre las células SH-SY5Y en la proliferación celular

La actividad proliferativa se determinó a las 72 horas después del último pulso de agente diferenciador (día 7) y en el día 10 tras el inicio del cultivo.

La diferenciación de las células SH-SY5Y con ATRA o ec23 produjo una reducción de la proliferación respecto a las células sin diferenciar. Como se observa en la figura 18, en el día 7, las células tratadas con ambos retinoides reducen la proliferación dos veces el valor del control. Esta reducción fue mayor en las medidas obtenidas en el día 10 (4.3 veces para el ATRA 10 $\mu$ M y 5 veces para el ec23 1 $\mu$ M;  $p < 0.001$ ).



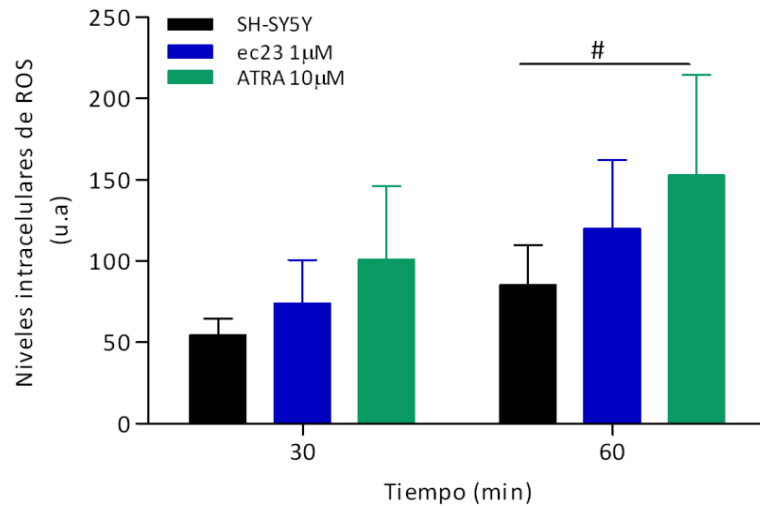
**Figura 18.** Proliferación de células SH-SY5Y sin diferenciar, diferenciadas con ATRA o con ec23. Los valores se expresan en número de células medidas a tiempos 7 y 10 días.

### V.2.2. Efecto de los agentes diferenciadores sobre las células SH-SY5Y en los niveles intracelulares de ROS

La inducción de la diferenciación con ATRA o ec-23 ocasiona, en ambos casos, un incremento de los niveles intracelulares de ROS (fig.19). Así, en comparación a las células no diferenciadas, la exposición celular a 10 $\mu$ M de ATRA aumentó 1.8 veces los niveles intracelulares de ROS ( $p < 0.05$ ); en el caso de las células expuestas a 1 $\mu$ M de



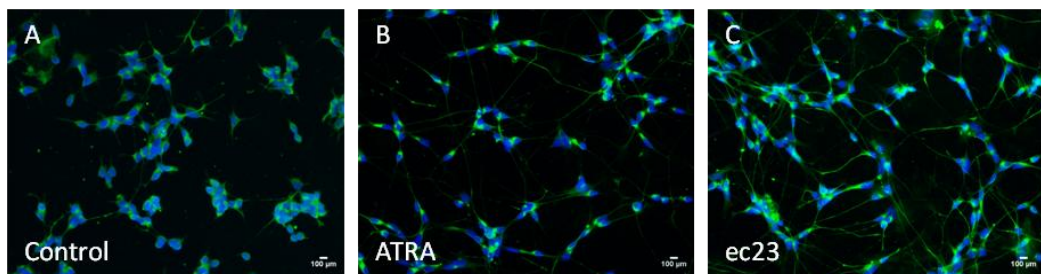
ec23, dicho incremento fue de 1.4 veces, aumento que, sin embargo, no alcanzó significación estadística ( $p=0.84$ ).



**Figura 19.** Niveles intracelulares de ROS en SH-SY5Y diferenciadas y sin diferenciar. Valores expresados en unidades arbitrarias de fluorescencia a los 30 y 60 minutos (# $p < 0.05$ ).

### V.2.3. Efecto de los agentes diferenciadores en el fenotipo de las células SH-SY5Y

Las células SH-SY5Y cultivadas en medio de cultivo estándar (en ausencia de agentes diferenciadores) muestran forma poligonal con proyecciones citoplasmáticas cortas y gruesas (fig.20A). Tras someter a las células a la acción de los agentes diferenciadores ATRA 10µM o ec23 1µM durante 7 días (dos pulsos con intervalo de 72 horas), se observó un cambio en la forma de las células, adquiriendo éstas un aspecto fusiforme y un incremento del número y de la longitud de las prolongaciones citoplasmáticas (neuritas; figuras 20B y 20C).

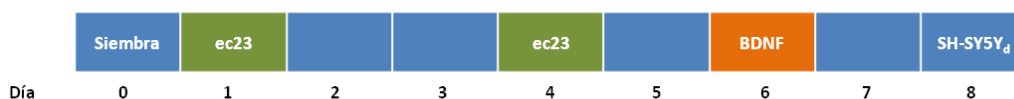


**Figura 20.** Imágenes de microscopía de fluorescencia con marcaje NF-200 con Alexa Fluor® 488 (verde) y núcleos con Hoechst (azul) en células SH-SY5Y sin diferenciar [A], tratadas con ATRA [B] o con ec23 [C] (objetivo 20x).

En cuanto a la inmunodetección de NF-200, las imágenes de microscopía de fluorescencia muestran una intensidad de marcaje similar en el citoplasma de las células tratadas con ATRA o con ec23, lo que demuestra la utilidad del nuevo retinoide como agente inductor de la diferenciación neuronal.

#### V.2.4. Estudio del efecto de la adición de BDNF al medio diferenciador de las células SH-SY5Y

Con el objetivo de mejorar el proceso de diferenciación de las células SH-SY5Y, además del tratamiento con retinoides, incluimos en el protocolo la adición de BDNF 2nM en un solo pulso el día 6 de la experiencia (fig.21). A las células diferenciadas según este protocolo las denominamos SH-SY5Y<sub>d</sub>.

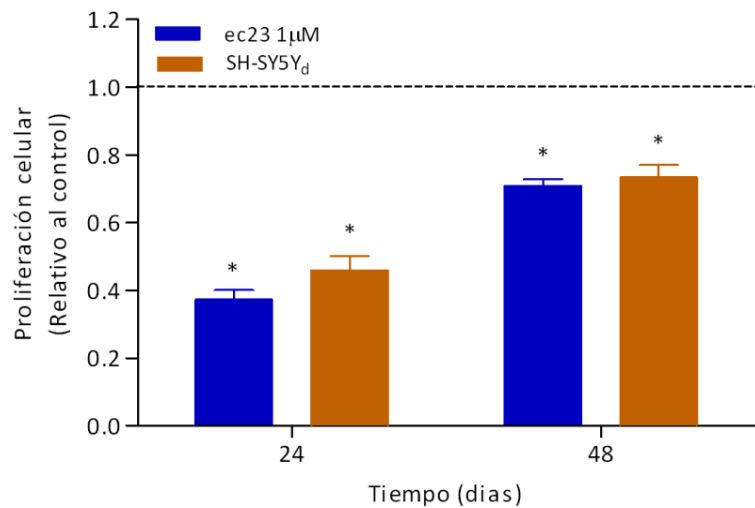


**Figura 21.** Protocolo de diferenciación de las células SH-SY5Yd

Tras someter a los cultivos a un tratamiento con ec23 1 $\mu$ M y BDNF 2 nM, según el protocolo descrito en el apartado IV.1.2.4 de material y métodos, se comprobó el nivel de diferenciación obtenido en el día 8 analizando parámetros tales como la proliferación celular y tasa proliferativa, los niveles intracelulares de ROS y la expresión de NF-200.

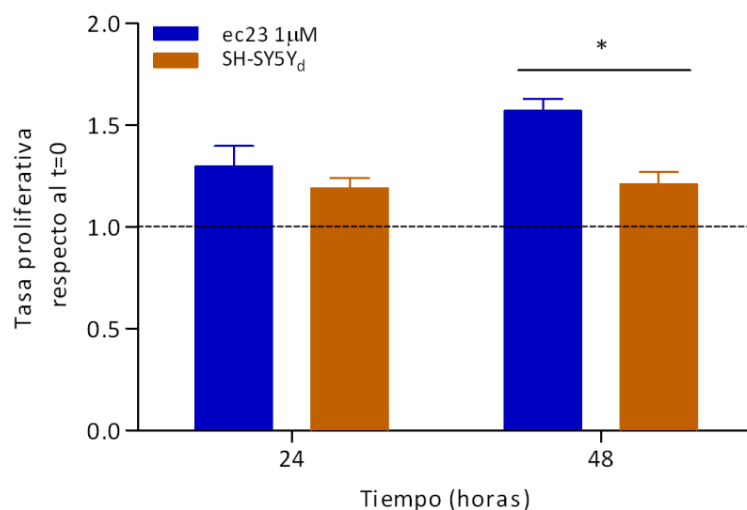
##### V.2.4.1. Estudio del efecto de la adición de BDNF sobre la proliferación celular

Como se observa en la figura 22, en ambas condiciones de diferenciación (ec23 1 $\mu$ M vs. ec23 1 $\mu$ M + BDNF 2nM), se reduce la proliferación celular respecto al control sin diferenciar. En el caso de las células diferenciadas con ec23, la proliferación respecto a las células control sin diferenciar se redujo 2.7 y 1.4 veces, a las 24 y 48 horas respectivamente ( $p < 0.001$ ), mientras que las células tratadas con ec23 + BDNF (SH-SY5Y<sub>d</sub>) muestran una reducción de la proliferación de 2.2 y 1.4 veces respecto al control, a las 24 y 48 horas respectivamente ( $p < 0.001$ ).



**Figura 22.** Proliferación de las células SH-SY5Y diferenciadas con ec23 y con ec23+BDNF. Valores relativos al control a las 24 y 48 horas (\* $p < 0.001$ ).

Una vez finalizado el proceso de diferenciación de 8 días, se analizó la tasa proliferativa de las células SH-SY5Yd en comparación con las SH-SY5Y diferenciadas sólo con ec23, en un ensayo de 48 horas de duración. Como muestra la figura 23, a las 24 horas las células SH-SY5Yd registraron una tasa proliferativa menor (1.2) que la de las SH-SY5Y diferenciadas con ec23 1µM (1.3). En el tiempo 48 horas, esta diferencia se incrementó significativamente ( $p < 0.001$ ), siendo los valores obtenidos de 1.2 para las SH-SY5Yd y de 1.6 para las diferenciadas con ec23.

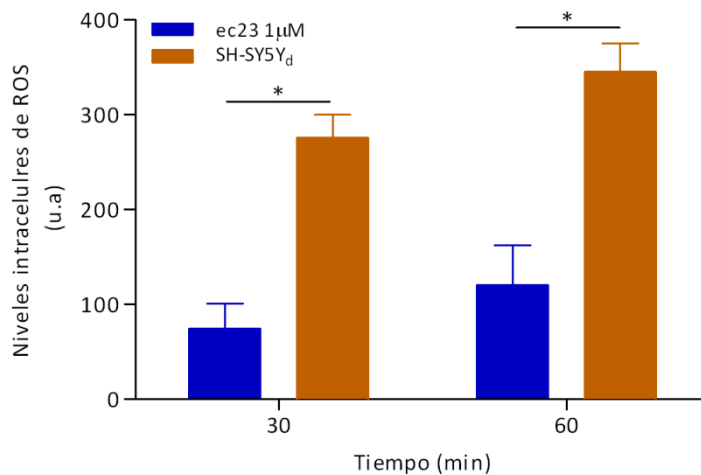


**Figura 23.** Tasa proliferativa de las células SH-SY5Y diferenciadas con ec23 y con ec23+BDNF. Valores relativos al tiempo 0 a las 24 y 48 horas (\* $p < 0.001$ ).

### V.2.4.2. Estudio del efecto de la adición de BDNF sobre los niveles intracelulares de ROS

Los niveles intracelulares de ROS en las células diferenciadas con ec23 aumentaron 1.4 veces respecto al control sin diferenciar a los 60 minutos. En este mismo tiempo, en las células SH-SY5Yd estos niveles se incrementaron 4.0 veces ( $p < 0.01$ ).

Comparando los dos métodos de diferenciación, se observa que en las células SH-SY5Yd los niveles intracelulares de ROS son más elevados (3.7 y 2.9 veces a los 30 y 60 minutos, respectivamente) que los obtenidos en las células diferenciadas con ec23  $1\mu\text{M}$ , tal y como se puede observar en la figura 24 ( $p < 0.001$ ).



**Figura 24.** Niveles intracelulares de ROS en las células SH-SY5Y diferenciadas con ec23 y SH-SY5Yd. Valores expresados en unidades arbitrarias de fluorescencia a los 30 y 60 minutos ( $*p < 0.001$ ).

### V.2.4.3. Selección de población tipo N

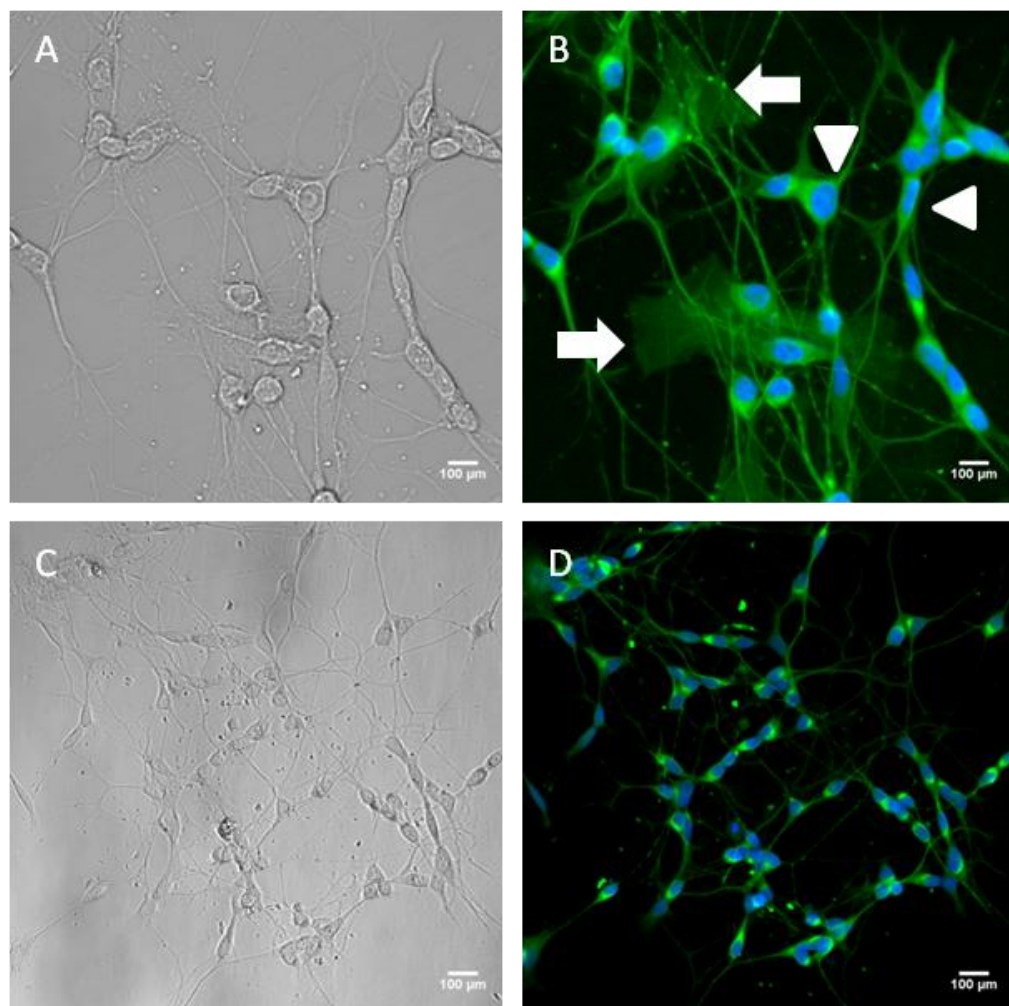
Como se ha señalado previamente, en la línea celular del neuroblastoma SH-SY5Y se han identificado dos fenotipos celulares diferentes: el fenotipo neuroblástico (células tipo N) y las sustrato-adherentes (células tipo S). Con el protocolo de diferenciación utilizado, después del tratamiento con ec23 y BDNF, las células tipo N se diferencian a un fenotipo neuronal, desarrollando un número elevado de neuritas largas y finas (fig. 25B, punta de flecha), mientras que las células tipo S se diferencian a un fenotipo epitelial, mostrando una gran adhesión al sustrato y formando pequeños agregados (fig.25B, flecha).

El hecho de haber identificado estas dos poblaciones celulares en los cultivos de células tratadas con ec23 y BDNF para inducir su diferenciación, planteó la necesidad de llevar

a cabo un proceso de selección que excluyera de los cultivos a la población de células que no cumpliera los criterios de diferenciación morfológica que habíamos establecido.

De este modo, la separación de células tipo N y tipo S se realiza en función de su diferente adhesión al sustrato. Las células tipo S son más grandes y más planas que las de tipo N y presentan fuerte adhesión al sustrato.

La subpoblación tipo N se seleccionó mediante tripsinización rápida (tripsina-EDTA), ligera agitación del frasco durante 2 segundos y transfiriendo la suspensión celular enriquecida de células tipo N a un nuevo frasco (fig.25C y D). De esta forma, las células tipo S permanecieron adheridas al frasco y fueron desechadas.



**Figura 25.** Imágenes de las células SH-SY5Yd, microscopía de contraste de fases [A] y [C] y microscopia confocal con inmunomarcaje del NF-200 con Alexa Fluor® 488 (verde) y núcleos con Hoechst (azul) [B] y [D] (objetivo 40x). Población heterogénea con células tipo S (flecha) y células tipo N (punta de flecha) [B]. Células tipo N seleccionadas [D].

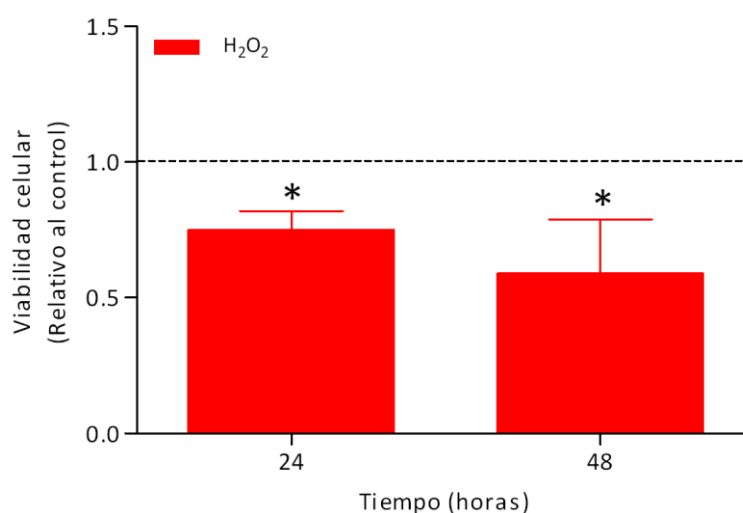
**Los resultados obtenidos en relación al efecto del ec23 sobre los niveles de ROS, la proliferación y el fenotipo celular, junto con las características físico-químicas de estabilidad de este compuesto, permiten afirmar que el retinoide ec23 es un buen agente inductor de la diferenciación de las SH-SY5Y.**

**Así mismo, añadir un pulso de BDNF mejora el efecto diferenciador del ec23 en los cultivos, obteniendo el máximo grado de diferenciación en el día 10, momento en el cual las células expresan un mayor número y extensión de neuritas.**

### V.3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LAS CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS (SH-SY5Hd)

#### V.3.1. Efecto del estrés oxidativo sobre la viabilidad celular

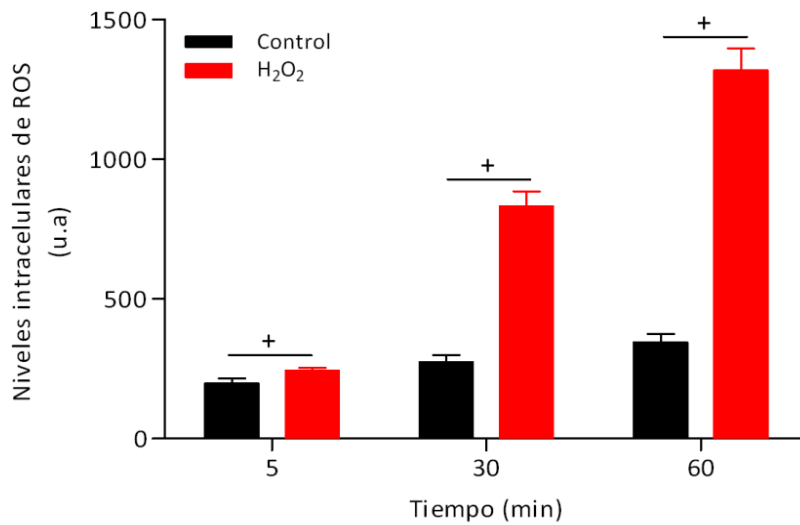
El tratamiento con 0.25mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produjo una disminución significativa de la viabilidad de las células SH-SY5Yd. Como se observa en la figura 26, la exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> redujo 1.3 veces la viabilidad celular con respecto al control a las 24 horas. De la misma forma, la viabilidad se redujo 1.7 veces con respecto al control, en el tiempo 48 horas ( $p < 0.001$ ).



**Figura 26.** Viabilidad de células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo. Valores relativos al control a las 24 y 48 horas ( $*p < 0.001$ ).

#### V.3.2. Efecto del estrés oxidativo sobre los niveles intracelulares de ROS

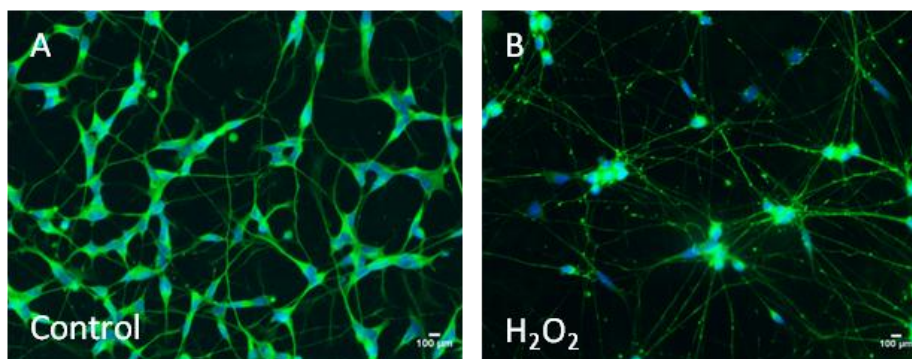
La oxidación de las células SH-SY5Yd con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce un incremento significativo de los niveles intracelulares de ROS comparado con los del control. Como muestra la figura 27, transcurridos 5 minutos desde el inicio de la oxidación, este incremento es de 1.2 veces en relación a los valores del control, llegando a ser de 3.0 y 3.8 veces a los tiempos 30 y 60 minutos respectivamente ( $p < 0.01$ ).



**Figura 27.** Niveles intracelulares de ROS en SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo. Valores expresados en unidades arbitrarias de fluorescencia a los 5, 30 y 60 minutos (+p <0.01).

### V.3.3. Efecto del estrés oxidativo sobre la expresión de NF-200

La figura 28 muestra el inmunomarcaje de cultivos SH-SY5Yd control y SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo. El registro se tomó transcurridas 48 horas desde la oxidación. La figura 28A muestra un cultivo en semiconfluencia, en el que las células presentan morfología típica de neuronas multipolares con neuritas largas que están marcadas positivamente para el NF-200. La imagen 28B corresponde a un cultivo en el que las células han sido expuestas a 0.25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 48 horas antes. En este caso, se observa una densidad celular menor del cultivo, constituido por células cuyos somas tienden a agregarse y mantienen las neuritas con marcaje positivo para NF-200. Estas neuritas presentan vesículas axonales, características de cultivos primarios de neuronas sometidas a estrés oxidativo, que también son positivas para el NF-200.

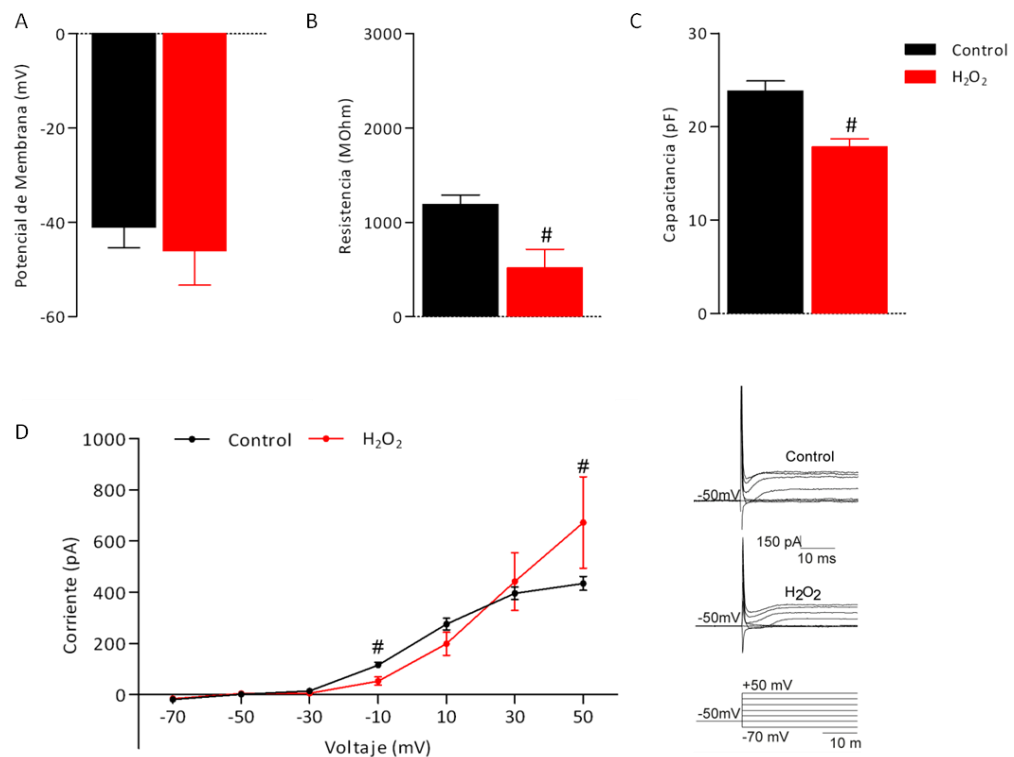


**Figura 28.** Imágenes de microscopía de fluorescencia de inmunodetección de NF-200 con Alexa Fluor® 488 (verde) y núcleos con Hoechst (azul) en células SH-SY5Yd control [A] y oxidadas [B] (objetivo 20x).



### V.3.4. Efecto del estrés oxidativo sobre los parámetros de electrofisiología

Después de la exposición al  $H_2O_2$  de las células SH-SY5Yd se examinaron sus propiedades electrofisiológicas empleando registros de patch clamp. Se observó que el valor del potencial de membrana registrado en reposo de las células SH-SY5Yd oxidadas era similar al de las células control (fig. 29A). Sin embargo, el valor de la resistencia de membrana registrado en las células oxidadas se redujo significativamente respecto al de las células control (fig. 29B, #p < 0.05). Además, la capacitancia de la membrana medida en las células oxidadas se redujo significativamente respecto al valor obtenido en las células control (fig. 29C, #p < 0.05). Por último, la exposición al  $H_2O_2$  de las células SH-SY5Yd alteró la amplitud de las corrientes voltaje dependientes de  $K^+$ , siendo la diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control cuando el potencial de membrana era -10 mV y 50 mV (#p < 0.05, fig. 29D).



**Figura 29.** Análisis electrofisiológico de células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo. Medida del potencial de membrana [A], resistencia [B], capacitancia [C] y corriente vs voltaje [D] (#p < 0.05).

El estrés oxidativo inducido por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en nuestro modelo neuronal SH-SY5Yd ocasiona unos cambios morfológicos (aparición de vesículas axonales) y funcionales (electrofisiológicos) característicos de un estado inicial de neurodegeneración, tal y como han descrito algunos autores (Fukui K, 2011).

Una vez estudiado el estrés oxidativo en las SH-SY5Yd, se plantearon varias estrategias terapéuticas: a) terapia celular basada en el empleo de ADSCs y, b) terapia basada en el uso de antioxidantes (NAC). Además, se estudió el efecto de la adición de la NAC y de la neurotrofina BDNF al medio acondicionado por ADSCs.

#### **V.4. ESTUDIO DEL EFECTO MODULADOR DE LAS ADSCs SOBRE LAS CÉLULAS SH-SY5Hd SOMETIDAS A ESTRÉS OXIDATIVO**

En la actualidad, la terapia celular con ADSCs en medicina regenerativa es uno de los hitos más importantes en investigación biomédica. En el siguiente estudio se analiza el potencial terapéutico de las ADSCs sobre las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo.

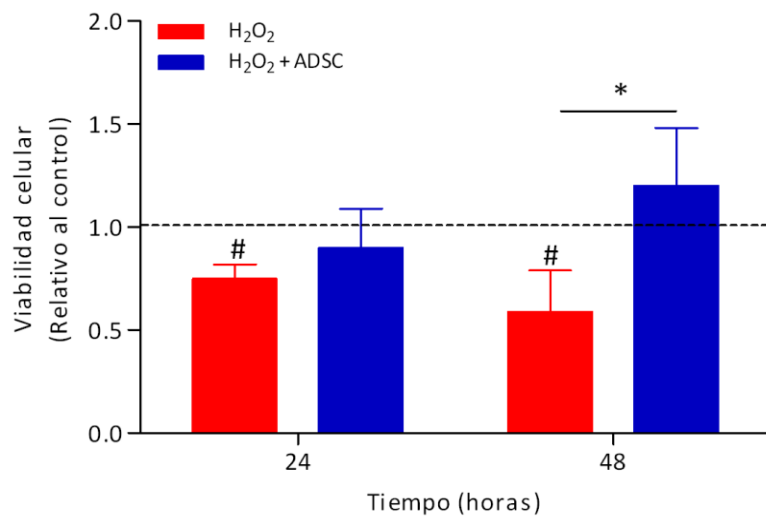
##### **V.4.1. Efecto del co-cultivo con ADSCs sobre las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo**

El efecto modulador de las ADSCs se analizó mediante su co-cultivo con SH-SY5Yd previamente oxidadas con 0.25mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En primer lugar, se observó que las ADSCs mantuvieron una actividad proliferativa normal en los soportes *transwell* durante las 48 horas del cultivo.

Con respecto a las células SH-SY5Yd, la oxidación redujo de forma significativa la viabilidad celular ( $p < 0.05$ ), llegando a ser ésta 1.7 veces menor que la del control a las 48 horas (fig.30).

Cuando las células SH-SY5Yd oxidadas fueron co-cultivadas con ADSCs, mostraron una recuperación de la actividad proliferativa, llegando incluso a superar los valores de las SH-SY5Yd no oxidadas. Así, a las 48 horas, la viabilidad de las SH-SY5Yd oxidadas y en co-cultivo con ADSCs fue 1.2 veces superior a la de los controles y 2.0 veces mayor a la de las células SH-SY5Yd oxidadas ( $p < 0.001$ , fig.30).



**Figura 30.** Viabilidad de las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo y en co-cultivo con las ADSCs. Valores expresados en número de células relativo al control a las 24 y 48 horas (\*p <0.001, #p <0.05).

#### V.4.2. Análisis del contenido del ADSC-MA y de su efecto sobre las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo

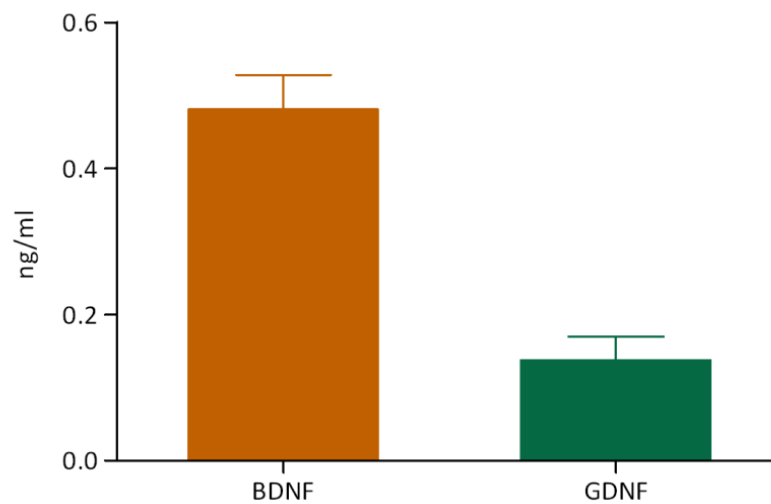
El método de co-cultivo empleado (*transwell*) implica que ambos tipos celulares comparten exclusivamente el medio de cultivo, lo que sugiere que el efecto inductor de la proliferación de las SH-SY5Yd oxidadas es debido al acondicionamiento de este medio por las ADSCs.

Con el objetivo de determinar la posible presencia de factores de crecimiento relacionados con la proliferación de las SH-SY5Yd, se llevó a cabo un análisis del contenido en BDNF y GDNF en el ADSC-MA. Para ello, se obtuvo dicho medio tal y como se describe en el apartado IV.1.2.5. del material y métodos.

##### V.4.2.1. Análisis del contenido del ADSC-MA

El análisis del contenido en BDNF y GDNF en el ADSC-MA se llevó a cabo según el protocolo descrito en el apartado IV.1.3.8. del material y métodos.

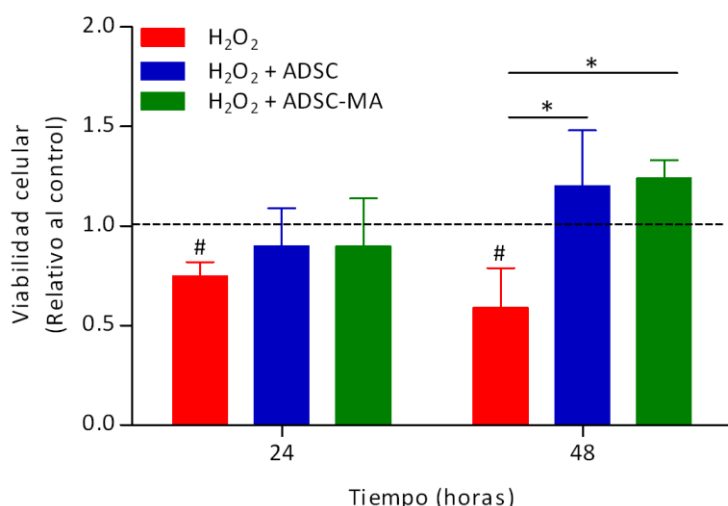
El análisis de la muestra control (DMEM) mostró la ausencia de BDNF y GDNF. Sin embargo, como se observa en la figura 31, en el ADSC-MA se detectaron 0.481ng/ml de BDNF y de 0.138 ng/ml de GDNF.



**Figura 31.** Análisis del contenido en BDNF y GDNF mediante ELISA, en el ADSC-MA. Valores expresados en ng/ml.

#### **V.4.3. Efecto del ADSC-MA sobre la proliferación celular**

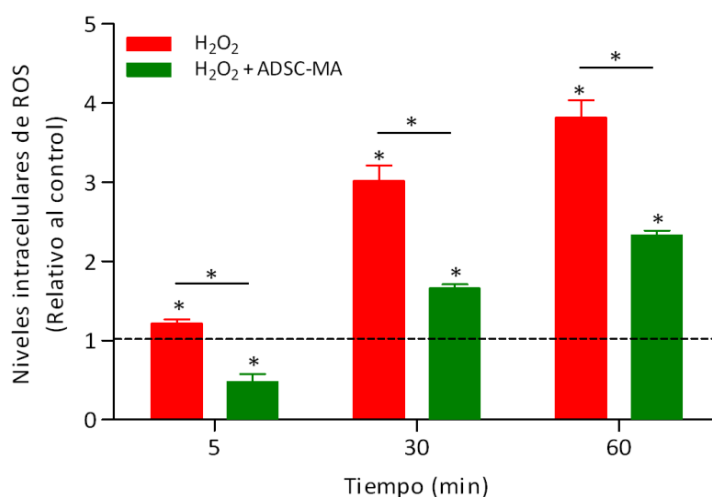
El tratamiento de las SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo con ADSC-MA indujo un incremento de la viabilidad celular a las 48 horas respecto a las células control, similar al observado en las condiciones de co-cultivo descritas en el apartado V.4.1. De hecho, no existieron diferencias significativas entre la viabilidad de las células co-cultivadas con ADSCs y las células tratadas con ADSC-MA. Así, se observó un aumento de 1.2 y 2.0 veces en el número de células oxidadas y tratadas con ADSC-MA respecto a las células SH-SY5Yd oxidadas y no tratadas, a las 24 y 48 horas respectivamente (\* $p < 0.001$ ; fig.32).



**Figura 32.** Viabilidad de las células SH-SY5Yd, sometidas a estrés oxidativo, en tratamiento con ADSC-MA y en co-cultivo. Valores expresados en número de células relativo al control a las 24 y 48 horas (\*p <0.001, #p <0.05).

#### V.4.4. Efecto del ADSC-MA sobre los niveles intracelulares de ROS

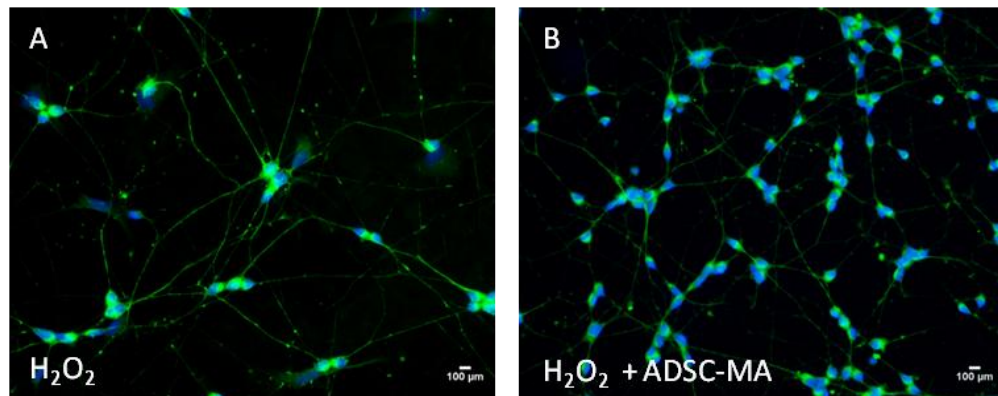
El tratamiento de las células SH-SY5Yd oxidadas con ADSC-MA incrementó en 1.7 y 2.3 veces los niveles intracelulares de ROS respecto a las células sin oxidar a los 30 y 60 minutos respectivamente. Por otro lado, los niveles intracelulares de ROS de las células SH-SY5Yd oxidadas y tratadas con ADSC-MA se redujeron 1.8 y 1.6 veces respecto a las células oxidadas sin tratar a los 30 y 60 minutos respectivamente (p <0.001, fig.33).



**Figura 33.** Niveles intracelulares de ROS en las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo y tratadas con ADSC-MA. Valores relativos al control a los 5, 30 y 60 minutos (\*p <0.001).

#### V.4.5. Efecto del ADSC-MA sobre la expresión de NF-200

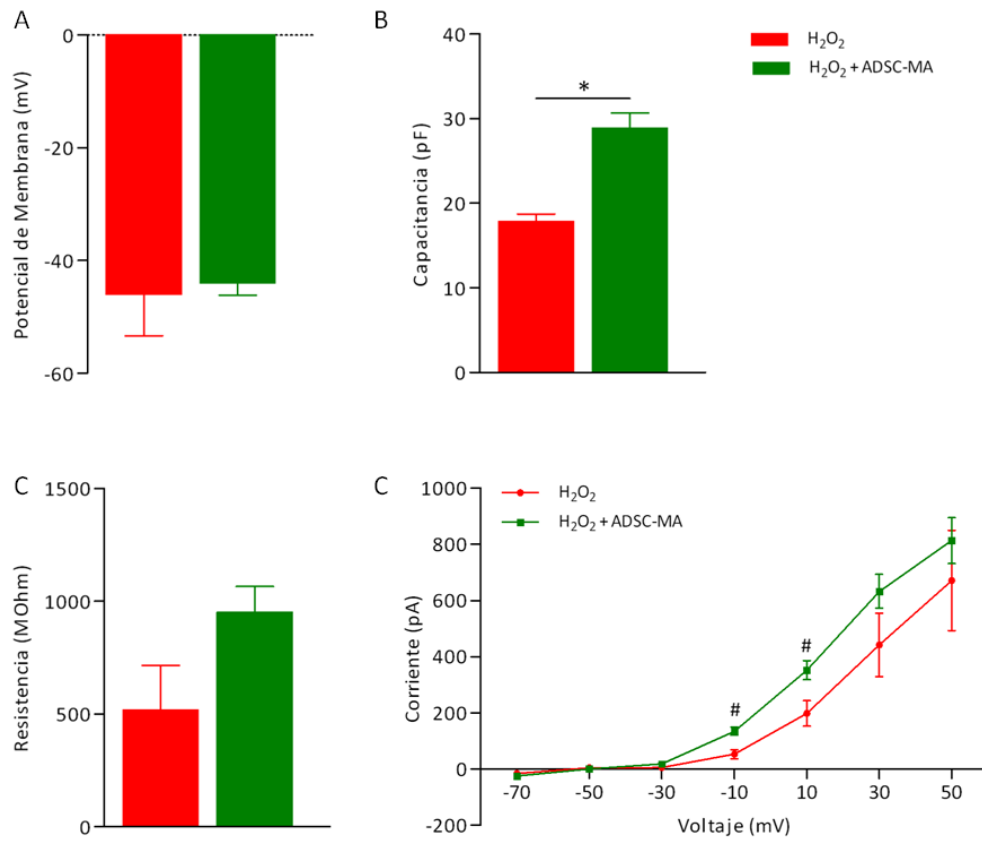
La figura 34 muestra el inmunomarcaje de cultivos SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo y SH-SY5Yd oxidadas y tratadas con MA. El registro se tomó transcurridas 48 horas desde la oxidación. La imagen 34A muestra un cultivo con baja densidad celular, formado por células cuyos somas tienden a agregarse y que presentan un marcaje positivo para NF-200, tanto en sus neuritas como en las vesículas axonales característicos de éstas. La imagen 34B corresponde a un cultivo en el que las células han sido expuestas a 0.25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tratadas con ADSC-MA durante 48 horas. En este caso la micrografía muestra un cultivo en semiconfluencia en el que las células presentan morfología típica de neuronas multipolares, con neuritas largas carentes de vesículas axonales y marcadas positivamente para el NF-200.



**Figura 34.** Imágenes de microscopía de fluorescencia con inmunomarcaje del NF-200 con Alexa Fluor® 488 (verde) y núcleos con Hoechst (azul) en células SH-SY5Yd oxidadas [A] y, oxidadas y tratadas con ADSC-MA [B] (objetivo 20x).

#### V.4.6. Efecto del ADSC-MA sobre la electrofisiología

Tras el tratamiento de las células oxidadas con ADSC-MA, se empleó la técnica del *patch clamp* para estudiar sus propiedades electrofisiológicas. Se observó que el valor del potencial de membrana registrado en reposo de las células SH-SY5Yd oxidadas era similar al de las células tratadas con ASC-MA (fig. 35A). Sin embargo, la capacitancia de la membrana (\*p < 0.001, fig. 35B) y la resistencia de membrana en las células tratadas con ADSC-MA se vieron aumentadas (fig. 35C). Por último, el tratamiento de las células oxidadas con ADSC-MA incrementó la amplitud de las corrientes voltaje dependientes de K<sup>+</sup> desde -70 mV hasta +50 mV, con respecto al grupo sin tratar (#p < 0.05; fig.35D).



**Figura 35.** Análisis electrofisiológico de las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo y tratadas con ADSC-MA. Medida del potencial de membrana [A], resistencia [B], capacitancia [C] y corriente vs voltaje [D] (\*p < 0.001).



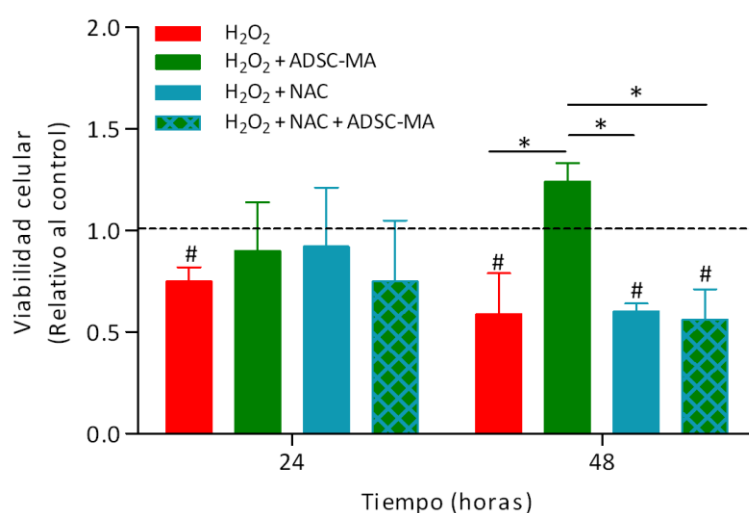
## V.5. ESTUDIO DEL POSIBLE EFECTO MODULADOR DE LA NAC SOBRE SH-SY5Yd SOMETIDAS A ESTRÉS OXIDATIVO, AISLADO O EN COMBINACIÓN CON ADSC-MA

El empleo de fármacos antioxidantes puede prevenir daños ocasionados por el estrés oxidativo. Uno de los empleados con mayor frecuencia es la NAC, cuya administración aporta cisteína a la célula para facilitar la síntesis de GSH.

Resultados obtenidos en estudios previos de nuestro grupo de investigación, determinaron la concentración de 5 mM de NAC como la idónea para el tratamiento de diferentes tipos celulares. Teniendo en cuenta estos datos, se evaluó el efecto aislado de la NAC, así como el efecto de la adición de dicho agente al ADSC-MA para el tratamiento de SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo. El efecto se analizó a través de los siguientes parámetros: viabilidad celular, niveles intracelulares de ROS, expresión de NF-200 y actividad electrofisiológica.

### V.5.1. Efecto sobre la viabilidad celular

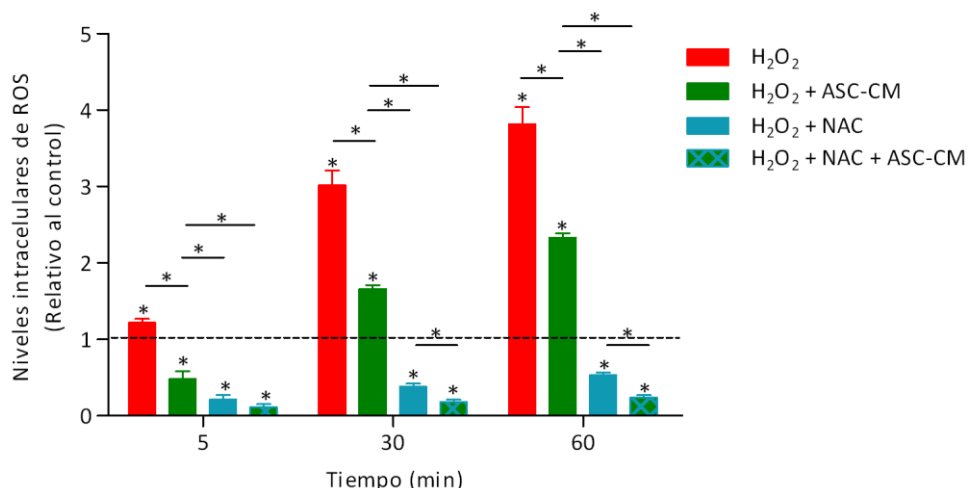
El tratamiento con 5 mM de NAC no ejerció ningún beneficio terapéutico sobre las células SH-SY5Yd oxidadas a ninguno de los dos tiempos medidos, 24 y 48 horas. Además, la combinación de la NAC con el ADSC-MA tampoco supuso una mejora de la viabilidad, reduciendo incluso los valores con respecto a las SH-SY5Yd oxidadas y tratadas con ADSC-MA (\* $p < 0.001$ , # $p < 0.05$ ; fig.36).



**Figura 36.** Viabilidad de las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo, tratadas con ADSC-MA, NAC o NAC+ADSC-MA. Valores relativos al control a las 24 y 48 horas (\* $p < 0.001$ , # $p < 0.05$ ).

### V.5.2. Efecto sobre los valores intracelulares de ROS

El tratamiento con 5 mM de NAC disminuyó los niveles de ROS de las SH-SY5Yd oxidadas, con respecto a los valores de células no tratadas (5.8, 7.9 y 7.2 veces a los 5, 30 y 60 minutos, respectivamente). La combinación de NAC y ADSC-MA produjo una disminución aún mayor de los niveles intracelulares de ROS (16.8 y 16.0 veces a los 30 y 60 minutos, respectivamente;  $p < 0.001$ , fig.37).

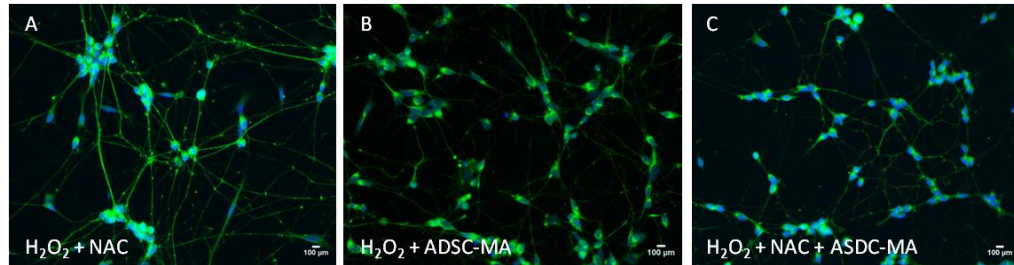


**Figura 37.** Niveles intracelulares de ROS en SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo y tratadas con ADSC-MA, NAC y NAC+ADSC-MA. Valores relativos al control medidos a 5, 30 y 60 minutos (\* $p < 0.001$ ).

### V.5.3. Efecto sobre la expresión de NF-200

La figura 26 muestra el inmunomarcaje de SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo y tratadas con NAC, ADSC-MA y NAC+ADSC-MA. El registro se tomó transcurridas 48 horas desde la oxidación. Las células expuestas a 0.25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tratadas con NAC durante 48 horas, presentan una morfología típica de neuronas con un marcaje positivo para el NF-200, tanto en sus neuritas como en las vesículas axonales, las cuales, a pesar del tratamiento con el agente antioxidante, permanecen presentes en proporción similar a la de las células SH-SY5Yd control sin tratar (fig.38A). En el caso de los cultivos expuestos a 0.25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tratados con ADSC-MA durante 48 horas, las células tienen la característica morfología neuronal, con largas y abundantes neuritas marcadas positivamente para el NF-200, y con una práctica ausencia de las vesículas axonales anteriormente citadas (fig.38B). Por último, los cultivos expuestos a 0.25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tratados con NAC+ADSC-MA muestran una densidad celular similar

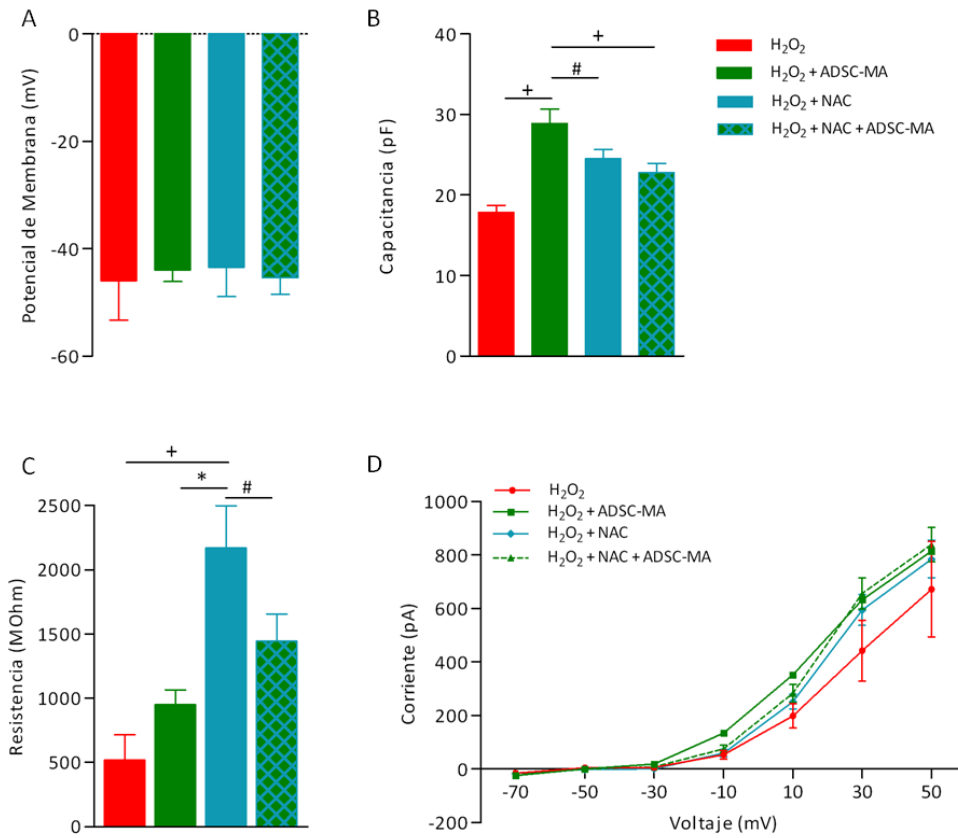
a las células de la figura 38A, presentando igualmente morfología neuronal, con neuritas largas y abundantes marcadas con NF-200, y también con una clara reducción del número de vesículas axonales (fig.38C).



**Figura 38.** Imágenes de microscopía de fluorescencia con inmunomarcaje para el NF-200 con Alexa Fluor® 488 (verde) y núcleos con Hoechst (azul), en células SH-SY5Yd oxidadas y tratadas con NAC [A], oxidadas y tratadas con ADSC-MA [B] oxidadas y tratadas con ADSC-MA + NAC [C] (objetivo 20x).

#### V.5.4. Efecto sobre los parámetros de electrofisiología

El tratamiento con la NAC no afectó significativamente el potencial de membrana ni la capacitancia celular medidas en las SH-SY5Yd oxidadas (fig. 39A y 39B). Por el contrario, provocó un incremento en la medida de la resistencia (\* $p < 0.001$ , + $p < 0.01$ , # $p < 0.05$ , fig. 39C). Además, la adición de NAC al ADSC-MA no alteró significativamente los parámetros medidos en las células oxidadas y tratadas con NAC. Por último, ni el tratamiento con NAC ni la combinación de NAC con ADSC-MA modificaron la amplitud de las corrientes voltaje dependientes de K<sup>+</sup> registradas desde -70 mV hasta +50 mV (fig. 39D).



**Figura 39.** Análisis electrofisiológico de las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo y tratadas con NAC y NAC+ADSC-MA. Medida del potencial de membrana [A], resistencia [B], capacitancia [C] y corriente vs voltaje [D] (\*p < 0.001, +p < 0.01, #p < 0.05).

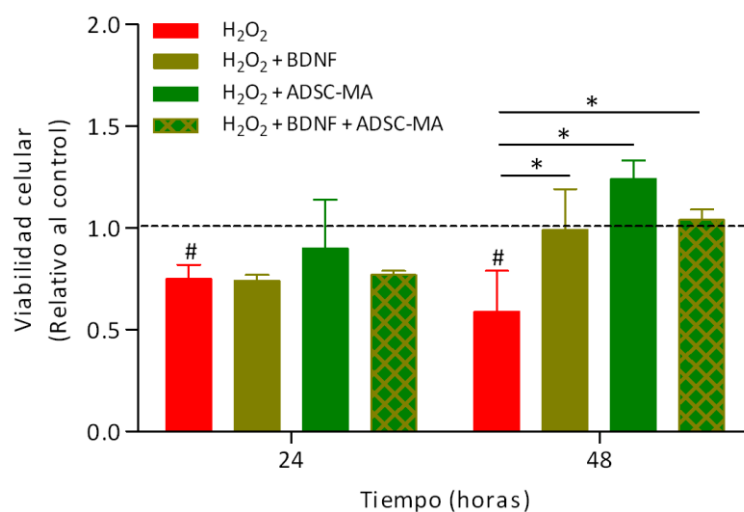
## V.6. ESTUDIO DEL EFECTO DEL BDNF, AISLADO O EN COMBINACIÓN CON ADSC-MA, SOBRE LAS CÉLULAS SH-SY5Yd SOMETIDAS A ESTRÉS OXIDATIVO

La neurotrofina BDNF regula funciones cruciales en el sistema nervioso, como son inducir la diferenciación de las células madre neuronales, intervenir en la supervivencia de las neuronas ya existentes y en el aumento de las conexiones sinápticas. Se ha demostrado en estudios *in vitro* que el BDNF mejora la supervivencia y la diferenciación de distintos tipos de neuronas (Benninger, 2000).

Teniendo en cuenta estos datos, se evaluó el efecto del BDNF, administrado de forma aislada y en combinación con ADSC-MA, sobre las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo, analizando para ello los siguientes parámetros: viabilidad celular, niveles intracelulares de ROS, expresión de NF-200 y la actividad electrofisiológica.

### V.6.1. Efecto sobre la viabilidad celular

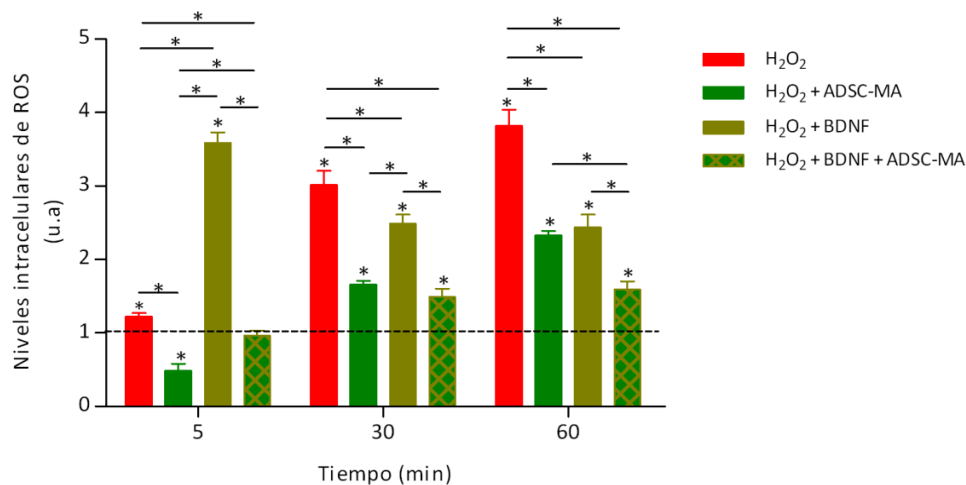
La viabilidad celular se analizó a las 24 y 48 horas tras el tratamiento con BDNF. Así, a las 24 horas no se observó ningún beneficio terapéutico del tratamiento con BDNF o BDNF+ADSC-MA sobre las células oxidadas. Sin embargo, a las 48 horas, los tratamientos con BDNF y BDNF+ADSC-MA indujeron un incremento significativo de la viabilidad respecto a las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo no tratadas (\* $p < 0.001$ ; # $p < 0.05$ ), viabilidad que llegó incluso a alcanzar los valores del control no oxidado (fig.40).



**Figura 40.** Viabilidad de las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo, sin tratar, tratadas con ADSC-MA, con BDNF y con BDNF+ADSC-MA. Valores relativos al control a las 24 y 48 horas (\* $p < 0.001$ , # $p < 0.05$ ).

### V.6.2. Efecto sobre los niveles intracelulares de ROS

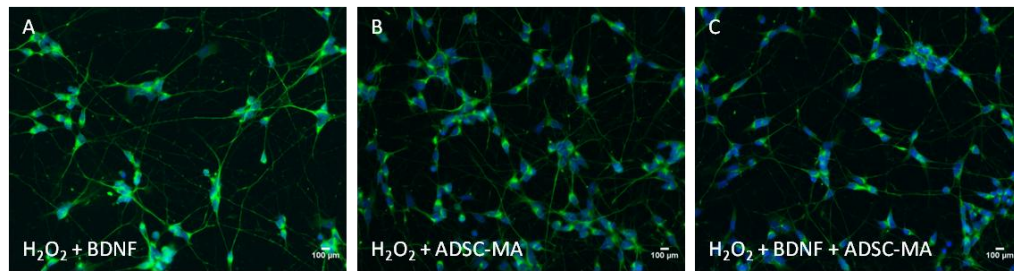
El tratamiento de las células SH-SY5Yd oxidadas con 2nM de BDNF provocó un aumento de los niveles intracelulares de ROS de 3.6, 2.5 y 2.4 veces respecto al control a los 5, 30 y 60 minutos, respectivamente. El tratamiento combinado BDNF + ADSC-MA también aumentó los niveles intracelulares de ROS a los 30 y 60 minutos, pero sin alcanzar valores tan elevados (1.5 y 1.6) como con el tratamiento aislado con BDNF ( $p < 0.001$ , fig.41).



**Figura 41.** Niveles intracelulares de ROS en células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo, tratadas con ADSC-MA, BDNF o BDNF + ADSC-MA. Valores relativos al control (0.25mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) medidos a los 5, 30 y 60 minutos (\* $p < 0.001$ ).

### V.6.3. Efecto sobre el fenotipo neuronal NF-200

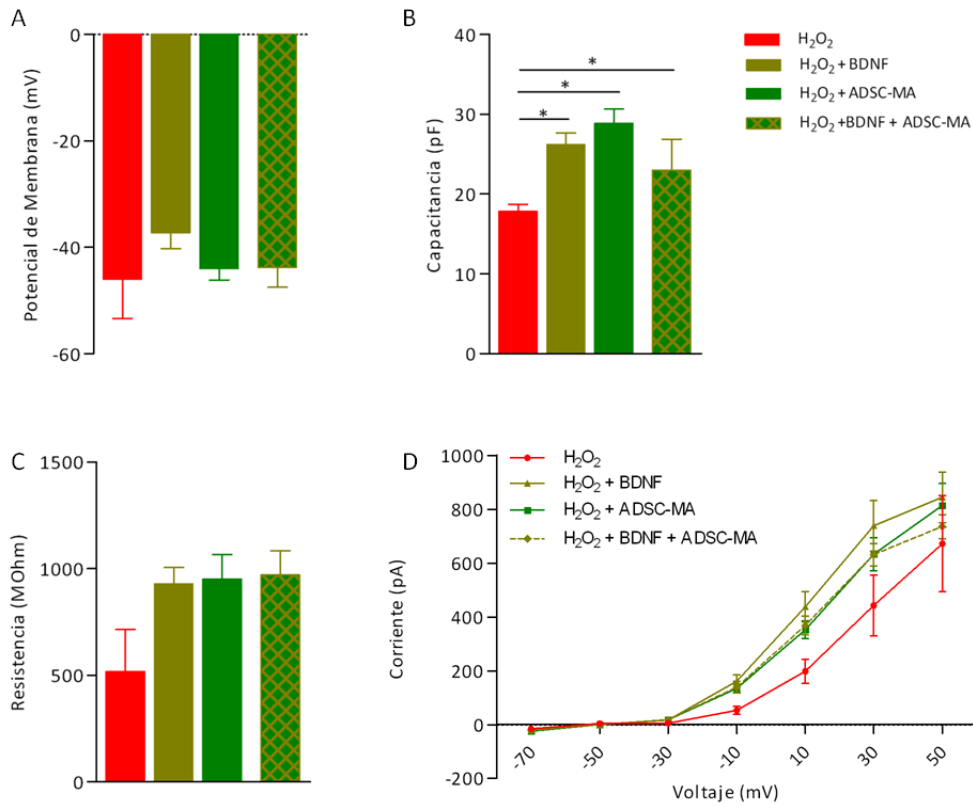
La figura 42 muestra el inmunomarcaje para NF-200 de las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo y tratadas con BDNF, ADSC-MA o BDNF + ADSC-MA. El registro se tomó transcurridas 48 horas desde la oxidación. En los tres casos, las células presentan la característica morfología neuronal y un óptimo nivel de marcaje NF-200 de sus largas y abundantes neuritas. Así mismo, se observa una disminución significativa de las vesículas axonales en las células tratadas sólo con BDNF (fig.42A), las cuales están prácticamente ausentes en las células tratadas con ADSC-MA (fig.42B) y BDNF + ADSC-MA (fig.42C).



**Figura 42.** Imágenes de microscopía de fluorescencia con inmunomarcaje de NF-200 con Alexa Fluor® 488 (verde) y núcleos con Hoechst (azul), en células SH-SY5Yd oxidadas y tratadas con BDNF [A], oxidadas y tratadas con ADSC-MA [B] y oxidadas y tratadas con BDNF + ADSC-MA [C] (objetivo 20x).

#### V.6.4. Efecto sobre los parámetros de electrofisiología

Tras el tratamiento de las células oxidadas con BDNF, se estudiaron sus propiedades electrofisiológicas. Se observó que el valor del potencial de membrana, registrado en reposo, de las células SH-SY5Yd oxidadas era similar al de las células tratadas con BDNF (fig. 43A). Sin embargo, se produjo un aumento de la capacitancia (\* $p < 0.001$ ; fig. 43B) y de la resistencia de la membrana en las células tratadas con BDNF (fig. 43C). Además, se registró un aumento de la amplitud de las corrientes voltaje dependientes de  $K^+$  desde  $-70$  mV hasta  $+50$  mV, siendo los valores de las SH-SY5Yd oxidadas y tratadas mayores que los obtenidos en las células no tratadas. Por otro lado, la combinación del BDNF con ADSC-MA no modificó los valores registrados con el tratamiento con BDNF aislado. Por último, no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos tratados con ADSC-MA y BDNF.



**Figura 43.** Análisis electrofisiológico de las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo y tratadas con ADSC-MA, BDNF y BDNF+ADSC-MA. Medida del potencial de membrana [A], resistencia [B], capacitancia [C] y corriente vs voltaje [D] (\*p < 0.001, # p < 0.05).



## **VI. DISCUSIÓN**



El estrés oxidativo y la neuroinflamación juegan un papel fundamental en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas. Estas patologías se caracterizan por un daño neuronal y una pérdida progresiva de neuronas, que conduce a la disminución de las funciones cognitivas y motoras. Debido a la irreversibilidad degenerativa de estos trastornos crónicos, no existe en la actualidad ningún medicamento eficaz o método de terapia que pueda mitigar los síntomas por completo.

Durante los últimos años se han propuesto nuevas terapias que tienen por objetivo ralentizar la progresión de estas enfermedades y paliar la pérdida funcional neuronal que afecta gravemente a la vida diaria del paciente. En este sentido, la terapia celular con MSCs ha surgido como una de las estrategias más prometedoras para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Tanna T, 2014). La utilización terapéutica de las MSCs en modelos preclínicos ha mostrado importantes efectos beneficiosos, reduciendo los defectos neurológicos, regulando la inflamación y promoviendo mecanismos endógenos de reparación del SNC (Feisst V, 2015; Squillaro T, 2016; Ullah I, 2015), lo que ha motivado que, en la actualidad, se esté evaluando la eficacia de este tipo de terapia en, cerca de, un centenar de ensayos clínicos con pacientes afectados por enfermedades neurológicas, incluidas las neurodegenerativas (EA, EP, esclerosis múltiple y esclerosis lateral amiotrófica). De hecho, existen en la actualidad compañías biotecnológicas que han desarrollado patentes relacionadas con productos para trasplantes de MSCs derivadas de médula ósea para su aplicación futura en enfermedades neurodegenerativas (Giordano A, 2007). En la actualidad, si bien la infusión y la administración de las MCS parecen ser bien toleradas, todavía existe un amplio abanico de incertidumbres y, hasta el momento, los beneficios a largo plazo siguen siendo inciertos (Squillaro T, 2016; Lo Furno D, 2017).

En el presente trabajo se ha estudiado la capacidad neuroprotectora de las ADSCs y de la NAC, de forma aislada y en combinación, sobre un modelo *in vitro* de estrés oxidativo inducido en células SH-SY5Y. La justificación de la elección de ambos agentes terapéuticos se debe a diversas razones. Por un lado, la NAC es una sustancia con gran capacidad para incrementar la capacidad antioxidante celular, reducir de forma significativa los niveles de ROS y ser uno de los agentes antioxidantes que ha sido más ampliamente utilizados en experimentación, no sólo por nuestro grupo de investigación, sino también por múltiples autores, en su aplicación antiinflamatoria,

antitumoral y neuroprotectora (Palomares T, 2017; Karalija A, 2014; Rushworth GF, 2014). Por otro lado, las ADSCs es uno de los tipos de MSCs que están suscitando actualmente un mayor interés clínico debido a su fácil obtención y a sus propiedades biológicas (antioxidante, antiinflamatoria e inmunomoduladora). De hecho, se están llevando a cabo ya diversos ensayos clínicos aplicados a enfermedades cardiovasculares, pulmonares y, también, neurodegenerativas, correspondiendo a este último un total de seis ensayos clínicos, algunos en proceso de reclutamiento y uno ya completado, si bien aún no se dispone de conclusiones al respecto (*clinicaltrial.gov*, 25 de noviembre de 2017).

El estudio del efecto neurológico del estrés oxidativo, su implicación en las enfermedades neurodegenerativas, así como el análisis de la eficacia de nuevas propuestas terapéuticas, requiere de un buen modelo neuronal adaptado a las condiciones *in vitro*. El alto grado de diferenciación de las neuronas, hace que se caractericen por ser una población celular muy difícil de mantener en cultivo, con una supervivencia muy limitada. Además, su aislamiento de tejidos animales para la obtención de cultivos primarios resulta, igualmente dificultoso, por la presencia de otras poblaciones celulares del sistema nervioso central. Como alternativa a los cultivos primarios, uno de los recursos utilizados para conseguir cultivos homogéneos que permitan obtener resultados reproducibles, es la utilización de líneas celulares derivadas de tumores neuronales.

Para el desarrollo de este trabajo se ha seleccionado la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Esta es una de las líneas más empleadas como modelo celular para el estudio *in vitro* de neurotoxicidad inducida por el estrés oxidativo y para la evaluación de diferentes tratamientos neuroprotectores (Shipley MM, 2016). Dicha línea se describe como una población celular en la que se identifican dos fenotipos morfológicos diferentes, uno de tipo neuroblástico (tipo N) y otro epitelial (tipo S). Estos dos tipos celulares se distinguen por su diferente adhesividad al sustrato, presentando la población tipo S una mayor adhesividad que la tipo N (Encinas M, 2000).

De forma preliminar, estudiamos el efecto del estrés oxidativo en las células SH-SY5Y. Se han descrito diferentes métodos de inducción de estrés oxidativo; entre ellos, destacan la exposición de las células a bajas concentraciones de oxígeno (Snyder B,

2017) o bien a compuestos químicos para inducir, en ambos casos, un ambiente de hipoxia (Chen H, 2017; Sigalov E, 2001), y el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uno de los ROS más importantes relacionados con la neuroinflamación y las enfermedades neurodegenerativas (Imlay JA, 2008). Para nuestro estudio, seleccionamos este último método inductor de estrés oxidativo y, basándonos en lo descrito por otros autores (Ramful D, 2010; Wei J, 2012), administramos un único pulso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio de cultivo, a concentraciones crecientes (0.01 – 1 mM), durante un periodo de 60 minutos. Como era previsible, observamos que la exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produjo un descenso dosis-dependiente de la proliferación celular. A partir de los datos obtenidos se calculó el valor IC<sub>50</sub>, valor que indica la dosis de oxidante que causa la muerte al 50% de la población celular. Según nuestro estudio, para las células SH-SY5Y, dicho valor corresponde a una concentración de 0.244 mM, la cual es muy similar a la obtenida por otros autores (Esmaeili MA, 2015).

A continuación, establecimos el modelo de diferenciación de las células SH-SY5Y hacia fenotipo neuronal. Para ello, primeramente se determinó el sustrato y el medio de cultivo adecuados para obtener una diferenciación óptima.

Con el objetivo de facilitar la adhesión de las células a las superficies de cultivo, se emplearon dos sustratos diferentes, la Poli-D-lisina y la laminina. Con ambos compuestos se incrementó la adhesión de las células, pero observamos un cierto efecto tóxico en la Poli-D-lisina que no se produjo con la laminina. Además, al igual que otros autores, obtuvimos un mayor crecimiento de neuritas en las células cultivadas sobre este último sustrato. Esto se debe a que la laminina es la principal proteína presente en la matriz extracelular del cerebro en desarrollo y estimula el crecimiento de células neuronales en cultivos *in vitro* (Dwane S, 2013).

Respecto al medio de cultivo adecuado para obtener una diferenciación óptima de las células SH-SY5Y, a lo largo de los años se han ido publicando diversos protocolos de diferenciación. En 1981, Pahlman y cols. demostraron que la exposición durante cuatro días a ésteres de forbol, como el 12-O-tetradecanoforbol-13-acetato (TPA), inducía cambios morfológicos característicos de diferenciación, como el crecimiento de neuritas e, inhibía parcialmente la proliferación celular de las células SH-SY5Y. Otro protocolo de diferenciación basado en la exposición durante tres días de las células SH-SY5Y a dibutilil-cAMP (dbcAMP), disminuía la agregación celular e inducía un

aumento en la longitud de las neuritas y su ramificación. Pero, sin duda, uno de los métodos mejor implementados y caracterizados para inducir la diferenciación de las células SH-SY5Y, es a través del tratamiento con ATRA. Este compuesto es un derivado de la vitamina A, cuyas propiedades promotoras de la diferenciación celular y de la inhibición del crecimiento celular son bien conocidas. Generalmente, el ATRA se administra a una concentración 10  $\mu$ M durante un mínimo de tres a cinco días (Kovalevich J, 2013). Sin embargo, este retinoide natural es inestable y muy susceptible a la fotoisomerización, pudiendo llegar a degradarse. Debido a esto, la concentración de ATRA activo en el medio de cultivo puede no ser estable, obteniéndose una respuesta celular variable e impredecible. Por esta razón, se han diseñado nuevos retinoides sintéticos como el ec23. Este compuesto posee mayor estabilidad química y física que el ATRA, manteniendo su actividad biológica y obteniendo una mayor precisión en el proceso de diferenciación neuronal. El ec23 se ha empleado durante la diferenciación de neuronas humanas y células madre embrionarias, demostrando una potente actividad biológica en la inducción de la neurogénesis *in vitro* (Christie VB, 2010; Clemens G, 2013).

En nuestro estudio, con el objetivo de optimizar la diferenciación de las células SH-SY5Y, comparamos el efecto diferenciador del ATRA con el del ec23, analizando para ello el efecto en diversos parámetros biológicos, como la proliferación celular, la generación de ROS y los cambios morfológicos de las células SH-SY5Y hacia un fenotipo neuronal.

Nuestros resultados muestran que, en el día siete a partir del inicio del tratamiento, ambos retinoides provocan una reducción similar de la proliferación de las células diferenciadas respecto al control, siendo mayor esta diferencia en el día diez. Respecto a los niveles intracelulares de ROS, sólo en las células tratadas con ATRA se encontró un incremento significativo de los niveles de ROS respecto al control, lo que sugiere que el retinoide natural induce un mayor estado de estrés oxidativo que el sintético. Por último, ambos retinoides indujeron cambios morfológicos similares hacia un fenotipo neuronal, como demuestra una similar expresión de NF-200, objetivada mediante técnicas de inmunofluorescencia, y la presencia de extensiones tipo neurita de las células SH-SY5Y diferenciadas.

Una vez analizados todos estos resultados, decidimos emplear el nuevo retinoide sintético ec23 para la diferenciación de las células SH-SY5Y, por poseer, como ya se ha indicado previamente, mayor estabilidad física y química que el ATRA.

Sin embargo, ninguno de estos retinoides permitió alcanzar un cultivo homogéneo de células con un nivel óptimo de diferenciación a fenotipo neuronal. Diversos autores han señalado la importancia de añadir factores neurotróficos, en particular el BDNF, para lograr dicho grado de diferenciación neuronal de estas células.

Las neurotrofinas como el BDNF, el NGF, o la NT-3, son factores de crecimiento que regulan el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central y periférico, y cuyos efectos biológicos están mediados por la interacción y activación de dos receptores transmembrana: los receptores de neurotrofinas p75 y los receptores tirosina quinasa Trk, siendo TrkA, TrkB y TrkC los receptores específicos para NGF, BDNF y NT-3, respectivamente (Kang SS, 2017). Se ha descrito, por un lado, que el tratamiento con ATRA induce la expresión de TrkB en las células SH-SY5Y (Encinas M, 2000) y, por otro, que el tratamiento con BDNF activa el receptor TrkB, desencadenando la fosforilación de tirosinas de proteínas celulares que, a su vez, activan las vías de señalización mediadoras de la diferenciación neuronal, la supervivencia celular y la neurogénesis (Kang SS, 2017). Por estas razones, se han establecido protocolos de diferenciación de la línea celular SH-SY5Y combinando ATRA y BDNF (Encinas M, 2000).

El BDNF es una molécula relacionada con la proliferación y diferenciación de células madre neuronales y, como han demostrado diversos autores, su combinación con ATRA incrementa la expresión de genes sinápticos (Goldie BJ, 2014).

Basándonos en estos datos, realizamos un segundo grupo de experimentos, donde se analizó el efecto de la adición de BDNF al tratamiento con ec23 en el grado de diferenciación neuronal, evaluando los tres parámetros biológicos señalados anteriormente. Pudimos observar que la proliferación de las células tratadas con ec23+BDNF se redujo en mayor medida que la de las células tratadas sólo con ec23. Este efecto se correlacionó con un incremento de los niveles intracelulares de ROS inducido por el BDNF, no habiendo encontrado en la bibliografía ninguna referencia en este sentido.

Tras aplicar el protocolo de diferenciación ec23+BDNF, se observó que una considerable proporción de células tipo N se diferenciaron hacia un fenotipo neuronal, mostrando cuerpos con morfología piramidal y desarrollando un elevado número de neuritas largas y finas con amplia arborización. Sin embargo, las células tipo S formaron pequeños agregados de células redondeadas y refringentes, pero sin presentar cambios morfológicos de diferenciación. Además, el porcentaje de dichas células tipo S se fue incrementando progresivamente durante el periodo de diferenciación, dando lugar a cultivos con una excesiva proporción de células de este tipo. Aunque este comportamiento celular durante la diferenciación de las células SH-SY5Y ha sido descrito previamente por otros autores (Encinas M, 2000), para nuestro estudio supuso una verdadera limitación. Por este motivo, con la finalidad de obtener una población de células diferenciadas homogénea y, siguiendo las consideraciones descritas previamente por otros autores (Kovalevich J, 2013), se sometió a los cultivos celulares a una ligera tripsinización, lo que permitió seleccionar las células menos adherentes (tipo N) y eliminar así las células tipo epitelial (tipo S).

De este modo, podemos concluir que nuestro modelo de diferenciación ec23 + BDNF es un modelo reproducible y válido para estudios *in vitro* de toxicidad neuronal (Cordero M, 2015) y que constituye una buena alternativa al modelo clásico de diferenciación ATRA+BDNF, no habiendo encontrado en la bibliografía ninguna otra referencia publicada con dicho tipo de modelo de diferenciación.

Una vez establecido nuestro protocolo de diferenciación y obtenido un cultivo enriquecido en células tipo N, procedimos al estudio del efecto del estrés oxidativo sobre las SH-SY5Yd. Las neuronas son células muy sensibles al estrés oxidativo debido a su elevado consumo de oxígeno durante su metabolismo, la presencia en sus membranas de ácidos grasos poliinsaturados que actúan como sustrato durante la peroxidación lipídica y sus bajos niveles de antioxidantes endógenos, como el GSH (Souza Ferreira ME, 2015; Wang X, 2010). Basándonos en nuestros resultados previos –tomando como referencia el valor de  $IC_{50}$  obtenido en nuestros experimentos– y los valores detectados en diferentes estudios sobre procesos inflamatorios (Jain M, 2000; Roy S, 2006), utilizamos como modelo de inducción de estrés oxidativo la administración de una única dosis de 0.25 mM  $H_2O_2$ , durante 60 minutos.



Al igual que lo descrito por otros investigadores (Ramalingam M, 2016), el tratamiento de las SH-SY5Yd con  $H_2O_2$  provocó un descenso en la viabilidad celular, descenso que está en concordancia con un incremento significativo de los niveles de ROS. Además, mediante técnicas de inmunohistoquímica, observamos que el incremento de ROS inducido por el  $H_2O_2$  estaba asociado con una tendencia a la agrupación celular y a la formación de vesículas axonales, lo cual coincide con la degeneración axonal en cultivos primarios de neuronas descrita en otros estudios (Fukui K, 2011). Diversos autores han señalado que la exposición a  $H_2O_2$  induce la inhibición del transporte de las vesículas derivadas del aparato de Golgi y, más aún, del transporte mitocondrial. Este efecto es dosis-dependiente y, a concentraciones altas, como la que empleamos en nuestro estudio (0.25 mM de  $H_2O_2$ ), dicha inhibición es rápida y severa, contribuyendo, según Fang y cols., a la degeneración axonal y a la consecuente muerte celular (Fang C, 2012).

En los estudios de electrofisiología llevados a cabo mediante la técnica de *patch clamp* se registró una menor capacitancia en las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo. La capacitancia es un indicador del área de la superficie de membrana celular (Castano J, 2014), por lo que dichos resultados concuerdan con las alteraciones morfológicas observadas en las SH-SY5Yd dañadas por el  $H_2O_2$ . Estos resultados demuestran que los niveles elevados de ROS también afectan a las propiedades electrofisiológicas de las neuronas diferenciadas. De acuerdo con esto, la menor amplitud de la corriente medida en los canales de  $K^+$  voltaje-dependientes de las células SH-SY5Yd dañadas por el  $H_2O_2$ , podría ser una consecuencia de la disminución de la arborización neuronal, ya que dichos canales se encuentran distribuidos a través de toda la membrana celular (Tosetti P, 1998). Por otro lado, también se midieron los potenciales de membrana en reposo de las células SH-SY5Yd oxidadas, no observándose diferencias significativas con los valores obtenidos en las SH-SY5Yd control. Sin embargo, los valores de la resistencia de membrana registrados en las células SH-SY5Yd oxidadas fueron menores que los registrados en las células control. Este resultado puede explicarse porque, aunque la disminución de la actividad de los canales iónicos está relacionada con una mayor resistencia de la membrana, la peroxidación lipídica resultado del estrés oxidativo generado por el  $H_2O_2$ , debilita la membrana celular (Radak Z, 2011).

El conjunto de todos estos datos indica que los cambios morfológicos y fisiológicos inducidos por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en este modelo neuronal, pueden ser un buen reflejo del estado inicial de un proceso neurodegenerativo. En particular, incidiendo en lo señalado previamente, se ha sugerido también por otros autores que la formación de vesículas axonales es una señal temprana de daño celular y degeneración neuronal (Fukui K, 2011).

Después de estudiar el efecto del estrés oxidativo sobre las células SH-SY5Yd, se planteó la utilización de la terapia celular con MSCs, considerada una de las potenciales estrategias terapéuticas más relevantes para paliar las patologías neurodegenerativas, como se ha indicado previamente (Tolar J, 2010; Zhao S, 2010). Se ha descrito que el posible carácter neuroprotector de estas células estaría relacionado con su capacidad antioxidante y la actividad paracrina de su secretoma, secreción bioactiva de un amplio panel de moléculas, entre las que se encuentran citoquinas anti-inflamatorias (como la interleucina 10, factor estimulante de colonias granulocito-macrófago e interferón alfa), factores de crecimiento neurotróficos (NGF, neurotrofina 3, GDNF y BDNF, entre otros) y otros factores tróficos (VEGF, HGF, FGF-2, FGF-20, etc), microRNAs y componentes de la matriz extracelular (como el colágeno y la fibronectina (Tanna T, 2014; Klimczak A, 2016)).

En nuestro estudio trabajamos con las ADSCs, que presentan la ventaja de ser fácilmente accesibles mediante métodos de obtención poco invasivos (Konno M, 2013). Además, se han descrito algunas diferencias entre las características específicas de las MSC y las ADSCs, tales como la existencia de pequeñas diferencias en su inmunofenotipo, capacidad de diferenciación, propiedades inmunomoduladoras, proteoma y transcriptoma. Las ADSCs parecen ser más estables en cultivos a largo plazo, muestran una viabilidad importante y senescencia menor, tienen una mayor capacidad de proliferación y mantienen una alta tasa de diferenciación en el cultivo a largo plazo con respecto a las MSCs (Kern S, 2006; Izadpanah R, 2006).

Estudiamos el efecto de las ADSCs sobre las SH-SY5Yd oxidadas mediante dos estrategias: *i*, el co-cultivo de ambos tipos celulares y *ii*, el tratamiento con medio acondicionado (ADSC-MA) de las neuronas oxidadas. En el primer caso, en presencia de ADSCs, la población de SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo recuperó su viabilidad hasta niveles similares a los de las células control. Teniendo en cuenta que las ADSCs

ejercieron su efecto neuroprotector en condiciones de co-cultivo, en ausencia de SBF y sin contacto celular, se puede concluir que las ADSCs actuaron mediante el mencionado mecanismo paracrino. Este efecto pudo ser comprobado con el subsiguiente tratamiento con ADSC-MA, el cual indujo la recuperación de la viabilidad de las SH-SY5Yd estresadas hasta niveles similares a los del control, de igual manera que el efecto obtenido mediante el co-cultivo con ADSCs. Este efecto promotor de la supervivencia de dichas células neuronales se correlacionó con una reducción significativa de sus niveles de ROS derivado de la acción antioxidante del ADSC-MA. Otra evidencia de dicho efecto neuroprotector del ADSC-MA es la mejora significativa de la morfología de las células SH-SY5Yd oxidadas, demostrado mediante la técnica inmunohistoquímica para la detección de NF-200. De hecho, se observó una morfología axonal normal, con ausencia de vesículas axonales y sin presencia de agrupaciones celulares –características de las SH-SY5Yd oxidadas no tratadas–, lo cual es fruto del efecto neurotrófico de dicho MA.

Con el objetivo de estudiar los mecanismos que explican el efecto regenerador del MA por ADSCs, se procedió al análisis de su contenido mediante ELISA, observándose la presencia de BDNF a una concentración similar a la descrita por otros autores (Liang C, 2014). Este resultado concuerda con datos previos, según los cuales la supervivencia de las células SH-SY5Y depende de la presencia de factores de crecimiento neurotróficos, en particular de BDNF, cuya eliminación del medio de cultivo conduce a las células a la apoptosis (Encinas M, 2000).

Por otro lado, los estudios electrofisiológicos mostraron que el tratamiento con ADSC-MA indujo un incremento de la capacitancia celular y de la amplitud de las corrientes de  $K^+$  voltaje dependientes respecto a la obtenida en las células SH-SY5Yd oxidadas sin tratamiento. Estos datos permiten concluir que el efecto neuroprotector del ADSC-MA restaura las propiedades funcionales de las células SH-SY5Yd después de su exposición al  $H_2O_2$ .

En definitiva, nuestros resultados muestran que el empleo terapéutico del ADSC-MA, es una estrategia eficaz para la recuperación morfológica y funcional de las SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo.

En el presente estudio, además de demostrar el papel del ADSC-MA en la neuroprotección de las células SH-SY5Yd, exploramos si la adición de agentes

antioxidantes pudiera posibilitar un mayor grado de recuperación de estas células tras su exposición al estrés oxidativo.

La utilización de agentes antioxidantes es una estrategia terapéutica, *a priori*, plausible que tiene como finalidad contrarrestar el daño neuronal mediado por el estrés oxidativo ocasionado por el incremento de los ROS que, como ya ha sido señalado previamente, es una característica fisiopatológica común en múltiples enfermedades neurológicas. Numerosos estudios *in vitro* y preclínicos *in vivo* de modelos de patología neuroinflamatoria y neurodegenerativa han obtenido resultados prometedores con la aplicación de la terapia antioxidante (Kim GH, 2015). Sin embargo, a pesar de los esperanzadores efectos observados en dichos estudios preclínicos, no se ha observado una eficacia significativa de estos agentes en los ensayos clínicos realizados con pacientes con diferentes enfermedades neurodegenerativas. Entre las posibles causas de la ausencia de eficacia clínica de estos productos se han descrito las siguientes: la existencia de múltiples rutas del metabolismo de los ROS, las cuales interactúan entre sí; una señalización redox común, tanto en estado de salud como de enfermedad; la dificultad que puede suponer la barrera hematoencefálica para el paso de estas sustancias al cerebro; la administración de una dosis insuficiente y la utilización de pautas de administración inapropiadas (Carvalho AN, 2017). En la actualidad, se siguen llevando a cabo estudios con compuestos naturales y sintéticos con actividad antioxidante y neuroprotectora (Chiurciu V, 2016), entre los que destacan los siguientes: inductores de la síntesis de GSH, como la N-acetilcisteína (Deepmala D, 2015); inhibidores NOX, como la apocinina, el celastrol y el difeneleneiodonium (Sorice S, 2012; Jaquet V, 2009; Jaquet V, 2011; Wind S, 2010), y compuestos que estimulan la expresión de antioxidantes endógenos a través de la activación del factor de transcripción nuclear derivado de eritrocitos tipo 2 (Nrf2), como los polifenoles (resveratrol y curcumina), el sulforano (Rege SD, 2015) y el dimetil fumarato (recientemente aprobado por la FDA y la EMA; Wang Q, 2015). Sin embargo, todavía son necesarios más estudios para valorar su potencial terapéutico y posible aplicación clínica (Chiurciu V, 2016).

En nuestro estudio seleccionamos la NAC, un precursor de la cisteína que, además de incrementar la síntesis de glutatión (el mayor antioxidante endógeno en el cerebro), interacciona directamente con los radicales libres. Numerosos autores han investigado, en modelos murinos (Pandya JD, 2014) y en ensayos clínicos limitados (Deepmala D,

2015; Rushworth GF, 2014), la capacidad de la NAC para neutralizar el desequilibrio redox en neuronas, sugiriendo su empleo como un agente antioxidante en varias enfermedades neurológicas, incluida la enfermedad de Alzheimer (Adair J, 2001). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que el tratamiento aislado con NAC, aunque reduce el estrés oxidativo mediante un marcado y significativo descenso de los niveles de ROS, no evita la presencia de vesículas axonales, ni restablece la viabilidad celular. Desde un punto de vista de la actividad electrofisiológica, la NAC tampoco modifica la capacitancia celular, ni la amplitud de las corrientes de  $K^+$  voltaje dependientes registradas en las células SH-SY5Yd después de su exposición al  $H_2O_2$ . Nuestros datos sugieren que el uso de este antioxidante, administrado de forma aislada, es insuficiente para reparar el daño causado por el estrés oxidativo, siendo necesarios mecanismos adicionales que promuevan la recuperación de la funcionalidad de las neuronas dañadas.

Por otra parte, quisimos evaluar el efecto de la adición de la NAC al ADSC-MA sobre las neuronas dañadas. Se ha descrito que el pretratamiento de MSCs con NAC incrementa su capacidad antioxidante para reducir los niveles de ROS, sugiriendo que este fármaco podría potenciar su actividad frente al estrés oxidativo (Wang Q, 2013). En nuestro estudio, esta combinación produjo un efecto contraproducente, reduciendo la eficacia terapéutica del ADSC-MA, de modo que se mantuvo la presencia de las vesículas axonales, las alteraciones electrofisiológicas y una menor viabilidad celular, en comparación con las células tratadas exclusivamente con dicho ADSC-MA. Este efecto se correlacionó con una reducción muy significativa de los niveles de ROS, lo que sugiere que la reducción drástica de dichos niveles, ejercida por la adición de NAC, podría neutralizar la acción neuroregeneradora del ADSC-MA.

Nuestros resultados coinciden con el moderno concepto de mitohormesis (Ristow M, 2014), según el cual, niveles altos de ROS causan efectos perjudiciales en las células, mientras que niveles moderados de ROS permiten el desarrollo de procesos celulares críticos para proteger a las mismas contra el estrés oxidativo inducido por los ROS (Valko M, 2007). En este sentido, el ADSC-MA podría favorecer la homeostasis redox con unos niveles de ROS adecuados que favorezcan el proceso de regeneración celular, como han sugerido también otros autores (Conti V, 2016).

Además, se ha demostrado que, como moléculas señalizadoras, los ROS resultan fundamentales para inducir la fosforilación de los receptores de factores de crecimiento como el BDNF (Li J, 2013). Por esta razón, una estrategia de disminución dramática de los niveles de ROS, como la que producen ciertos antioxidantes exógenos, podría ser un enfoque terapéutico equivocado (Xiong W, 2015). De hecho, los ROS son necesarios para activar la vía de señalización Nrf2-ARE, una de las principales rutas de transcripción en la defensa celular contra el estrés oxidativo y que promueve la supervivencia neuronal (Xiong W, 2015; Prasad KN, 2016). Entre los genes cuya expresión parece verse afectada por Nrf2, se encuentran los relacionados con la homeostasis redox celular, la proliferación celular, la apoptosis y la respuesta inflamatoria (Kwak M, 2003; Thimmulappa R, 2002). Además, el eje tiorredoxina/Nrf2 se encuentra regulado positivamente por la sobreexpresión de BDNF, factor neurotrófico que, como hemos señalado anteriormente, está presente en el ADSC-MA (Chen T, 2017). Por lo tanto, es plausible hipotetizar que el efecto neuroprotector del ADSC-MA pudiera estar mediado, al menos en parte, por la activación de Nrf2, la cual podría ser inhibida por la adición de NAC.

Por estos motivos, y basándonos en otros modelos de daño oxidativo en neuronas, en los que se ha encontrado que el pretratamiento con BDNF atenúa el daño celular a través de mecanismos antioxidantes y antiapoptóticos (Hachem LD, 2015; Koh E, 2017), decidimos emplear el BDNF como tratamiento para comprobar su capacidad de revertir el estrés oxidativo generado por el  $H_2O_2$ , y observar si éste pudiera ser una de las razones de la capacidad neuroprotectora del ADSC-MA. Observamos que el efecto de la administración de BDNF sobre la recuperación de las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo, fue muy similar al observado con el tratamiento con ADSC-MA, obteniéndose unos parámetros morfológicos, electrofisiológicos y unos niveles de ROS muy semejantes. Si bien, la viabilidad celular fue ligeramente superior en el caso del ADSC-MA, no se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos. La ligera ventaja del tratamiento con ADSC-MA frente al BDNF, puede deberse a la presencia en dicho MA de otros factores neurotróficos, como GDNF y TGF $\beta$ 1, los cuales también ejercen un efecto neuroprotector, según han descrito otros autores (Ribeiro CA, 2011; Cova L, 2010; Mctigue D, 2000). Tanto estos como otros factores de crecimiento (factor de crecimiento endotelial, factor de crecimiento hepatocitario, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento insulínico tipo 1, factor de

crecimiento nervioso y factor de células madre) han sido identificados previamente en el ADSC-MA (Salgado AJ, 2015).

Por último, analizamos el efecto del tratamiento combinado ADSC-MA+BDNF, con la finalidad de conocer si la adición de BDNF al ADSC-MA pudiera incrementar la actividad terapéutica de dicho MA. Nuestros resultados mostraron que la viabilidad de las SH-SY5Yd oxidadas y tratadas con ADSC-MA + BDNF alcanzó niveles biológicos similares a los obtenidos con el tratamiento aislado con ADSC-MA y que los niveles de ROS también se redujeron hasta niveles semejantes. Del mismo modo, el análisis electrofisiológico también mostró características parecidas a las obtenidas con el tratamiento aislado de ADSC-MA, produciéndose un aumento significativo de la capacitancia celular y de la amplitud de las corrientes de  $K^+$  voltaje dependiente respecto a las células SH-SY5Yd oxidadas sin tratamiento. Además, la técnica inmunohistoquímica para la detección de NF-200 mostró una mejora significativa de las células SH-SY5Yd oxidadas y tratadas con ADSC-MA + BDNF, observándose una morfología axonal normal (sin presencia de vesículas axonales) y ausencia de agrupaciones celulares.

Los resultados obtenidos sugieren que la adición de BDNF al ADSC-MA no supone ninguna ventaja terapéutica, probablemente debido a que en la composición del ADSC-MA la concentración de BDNF es suficiente y, el incremento de la misma no añade mayor beneficio.

En resumen, la secreción paracrina de las ADSCs hace de ellas y de su secretoma unas buenas candidatas para revertir el daño neuronal ocasionado por el estrés oxidativo, así como el mantenimiento de un estado redox específico, lo cual puede ser clave para preservar la funcionalidad neuronal. Además, consideramos que la estrategia terapéutica que incluye sustancias antioxidantes puede ser un enfoque clínico útil para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, pero puede presentar dos limitaciones: en primer lugar, como terapia aislada puede ser insuficiente y, en segundo lugar, la adición de dichas sustancias al tratamiento con ADSC/ADSC-MA puede limitar el efecto regenerador de la terapia celular.





## **VII. CONCLUSIONES**



1. La exposición de las células SH-SY5Y a los agentes ec23 + BDNF induce una óptima diferenciación hacia un fenotipo neuronal, con una amplia arborización de neuritas largas y finas, lo que constituye un modelo reproducible y válido para estudios *in vitro* de toxicidad neuronal.
2. La exposición de las células SH-SY5Yd a 0.25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoca un aumento significativo de los niveles de ROS, que se correlaciona con la alteración de los patrones morfológico — vesículas axonales relacionadas con la degeneración neuronal — y electrofisiológico característicos de dicha población diferenciada.
3. Las ADSCs, en condiciones de co-cultivo en ausencia de suero, inducen la recuperación de la viabilidad de las células SH-SY5Yd previamente sometidas a estrés oxidativo.
4. Las ADSCs, privadas de suero bovino fetal durante 48 horas, acondicionan el medio de cultivo, cuyo contenido incluye las neurotrofinas BDNF y el GDNF.
5. El tratamiento con ADSC-MA de las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo, disminuye de forma moderada los niveles intracelulares de ROS e induce la recuperación de los patrones morfológico — reducción significativa de vesículas axonales — y electrofisiológico normales, y la viabilidad de dichas células.
6. En las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo, el tratamiento con NAC provoca un descenso significativo de los niveles de ROS, pero no permite recuperar los patrones biológicos anteriormente mencionados, ni restablece la viabilidad celular.
7. La eficacia terapéutica del ADSC-MA sobre las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo, se ve reducida por la adición de NAC a dicho tratamiento, lo cual se correlaciona, al menos en parte, con una drástica reducción de los niveles intracelulares de ROS producida por dicha combinación terapéutica.
8. En las células SH-SY5Yd sometidas a estrés oxidativo, la adición de BDNF al tratamiento con ADSC-MA no supone ningún beneficio terapéutico adicional respecto al obtenido con el tratamiento único con dicho MA.



## **VIII.BIBLIOGRAFÍA**



- Acker H, Xue D. Mechanisms of O<sub>2</sub> Sensing in the Carotid-Body in Comparison with Other O<sub>2</sub>-Sensing Cells. *News Physiol Sci* 1995; 10:211-216.
- Adair J, Knoefel J, Morgan N. Controlled trial of N-acetylcysteine for patients with probable Alzheimer's disease. *Neurology* 2001; 57(8):1515-1517.
- Ahmad A, Shah SA, Badshah H, Kim MJ, Ali T, Yoon GH, et al. Neuroprotection by Vitamin C Against Ethanol-Induced Neuroinflammation Associated Neurodegeneration in the Developing Rat Brain. *Cns Neurol Disord-Dr* 2016; 15(3):360-370.
- Ahmadinejad F, Moller SG, Hashemzadeh-Chaleshtori M, Bidkhorri G, Jami M. Molecular Mechanisms behind Free Radical Scavengers Function against Oxidative Stress. *Antioxidants* 2017; 6(3):51.
- Andrews PW. Human Teratocarcinomas. *Biochim Biophys Acta* 1988; 948(1):17-36.
- Anker E, Scherjon S, Devlieger R, Deprest J, Claas F, Fibbe W, et al. Human fetal membranes as a novel source of mesenchymal stem cells. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11(2):282-283.
- Anthonyamuthu TS, Kenny EM, Bayir H. Therapies targeting lipid peroxidation in traumatic brain injury. *Brain Res* 2016; 1640:57-76.
- Aoyama K, Watabe M, Nakaki T. Regulation of Neuronal Glutathione Synthesis. *J Pharmacol Sci* 2008; 108(3):227-238.
- Arrozi AP, Ngah WZW, Yusof YAM, Damanhuri MHA, Makpol S. Antioxidant modulation in restoring mitochondrial function in neurodegeneration. *Int J Neurosci* 2017; 127(3):218-235.
- Awasthi A, Matsunaga Y, Yamada T. Amyloid-beta causes apoptosis of neuronal cells via caspase cascade, which can be prevented by amyloid-beta-derived short peptides. *Exp Neurol* 2005; 196(2):282-289.
- Aylward E, Sparks B, Field K, Yallapragada V, Shpritz B, Rosenblatt A, et al. Onset and rate of striatal atrophy in preclinical Huntington disease. *Neurology* 2004; 63(1):66-72.
- Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Intl* 2012; (12):812693.
- Baldari S, Di Rocco G, Piccoli M, Pozzobon M, Muraca M, Toietta G. Challenges and Strategies for Improving the Regenerative Effects of Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapies. *Int J Mol Sci* 2017; 18(10):2087.

Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 2009; 390(3):191-214.

Ballaz S, Morales I, Rodriguez M, Obeso JA. Ascorbate Prevents Cell Death From Prolonged Exposure to Glutamate in an In Vitro Model of Human Dopaminergic Neurons. *J Neurosci Res* 2013; 91(12):1609-1617.

Barhwal K, Hota SK, Jain V, Prasad D, Singh SB, Ilavazhagan G. Acetyl-L-Carnitine (Alcar) Prevents Hypobaric Hypoxia-Induced Spatial Memory Impairment through Extracellular Related Kinase-Mediated Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Phosphorylation. *Neuroscience* 2009; 161(2):501-514.

Bastow EL, Peswani AR, Tarrant DSJ, Pentland DR, Chen X, Morgan A, et al. New links between SOD1 and metabolic dysfunction from a yeast model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Cell Sci* 2016; 129(21):4118-4129.

Beal M. Coenzyme Q(10) as a possible treatment for neurodegenerative diseases. *Free Radic Res* 2002; 36(4):455-460.

Bennett LL, Rojas S, Seefeldt T. Role of antioxidants in the prevention of cancer. *Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2012; 4(4):215-222 Bhandary B, Marahatta A, Kim H, Chae H. An Involvement of Oxidative Stress in Endoplasmic Reticulum Stress and Its Associated Diseases. *Int J Mol Sci* 2013; 14(1):434-456.

Biedler J, Helson L, Spengler B. Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture. *Cancer Res* 1973; 33(11):2643-2652.

Bolanos JP, Moro MA, Lizasoain I, Almeida A. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61(14):1299-1315.

Bolisetty S, Jaimes EA. Mitochondria and Reactive Oxygen Species: Physiology and Pathophysiology. *Int J Mol Sci* 2013; 14(3):6306-6344.

Bonda DJ, Wang X, Perry G, Nunomura A, Tabaton M, Zhu X, et al. Oxidative stress in Alzheimer disease: A possibility for prevention. *Neuropharmacology* 2010; 59(4-5):290-294.

Borra M, Smith B, Denu J. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem* 2005; 280(17):17187-17195.

Bossy-Wetzell E, Petrilli A, Knott AB. Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci* 2008; 31(12):609-616.



Bulat N, Widmann C. Caspase substrates and neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* 2009; 80(4-5):251-267.

Butterfield DA. The 2013 SFRBM discovery award: Selected discoveries from the butterfield laboratory of oxidative stress and its sequela in brain in cognitive disorders exemplified by Alzheimer disease and chemotherapy induced cognitive impairment. *Free Radical Bio Med* 2014; (74):157-174.

Campagnoli C, Roberts I, Kumar S, Bennett P, Bellantuono I, Fisk N. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001; 98(8):2396-2402.

Cao W, Cao K, Cao J, Wang Y, Shi Y. Mesenchymal stem cells and adaptive immune responses. *Immunol Lett* 2015; 168(2):147-153.

Carocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* 2013; (51):15-25.

Carvalho AN, Firuzi O, Gama MJ, van Horsen J, Saso L. Oxidative Stress and Antioxidants in Neurological Diseases: Is There Still Hope?. *Curr Drug Targets* 2017; 18(6):705-718.

Castano J, Menendez P, Bruzos-Cidon C, Straccia M, Sousa A, Zabaleta L, et al. Fast and Efficient Neural Conversion of Human Hematopoietic Cells. *Stem Cell Rep* 2014; 3(6):1118-1131.

Cernaianu G, Brandmaier P, Scholz G, Ackermann OP, Alt R, Rothe K, et al. All-trans retinoic acid arrests neuroblastoma cells in a dormant state. Subsequent nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor treatment adds modest benefit. *J Pediatr Surg* 2008; 43(7):1284-1294.

Chae H, Kim I, Kim K, Rhee S. Cloning, Sequencing, and Mutation of Thiol-Specific Antioxidant Gene of *Saccharomyces-Cerevisiae*. *J Biol Chem* 1993; 268(22):16815-16821.

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. *Physiol Rev* 1979; 59(3):527-605.

Chang K, Lee-Chen G, Wu Y, Chen Y, Lin J, Li M, et al. Impairment of proteasome and anti-oxidative pathways in the induced pluripotent stem cell model for sporadic Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2016; (24):81-88.

Chang Y, Chang W, Hung K, Yang D, Cheng Y, Liao Y, et al. The generation of induced pluripotent stem cells for macular degeneration as a drug screening platform: identification of curcumin as a protective agent for retinal pigment epithelial cells against oxidative stress. *Front Aging Neurosci* 2014; 6:191.

Chaturvedi RK, Beal MF. Mitochondrial Approaches for Neuroprotection. *Ann NY Acad Sci* 2008; 1147:395-412.

Chelikani P, Fita I, Loewen P. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61(2):192-208.

Chen H, Huang R, Yu X, Ye Q, Pan L, Shao G, et al. Emodin protects against oxidative stress and apoptosis in HK-2 renal tubular epithelial cells after hypoxia/reoxygenation. *Exp Ther Med* 2017; 14(1):447-452.

Chen S, Do JT, Zhang Q, Yao S, Yan F, Peters EC, et al. Self-renewal of embryonic stem cells by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(46):17266-17271.

Chen T, Wu Y, Wang Y, Zhu J, Chu H, Kong L, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Increases Synaptic Protein Levels via the MAPK/Erk Signaling Pathway and Nrf2/Trx Axis Following the Transplantation of Neural Stem Cells in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *Neurochem Res* 2017; 42(11):3073-3083.

Chiurciu V. Novel Targets in Multiple Sclerosis: To Oxidative Stress and Beyond. *Curr Top Med Chem* 2014; 14(22):2590-2599.

Chiurciu V, Orlacchio A, Maccarrone M. Is Modulation of Oxidative Stress an Answer? The State of the Art of Redox Therapeutic Actions in Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 7909380.

Choi JR, Pinguan-Murphy B, Abas WABW, Azmi MAN, Omar SZ, Chua KH, et al. Impact of low oxygen tension on stemness, proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 448(2):218-224.

Choi Y, Jeong Y, Lee Y, Kwon H, Kang Y. (-)Epigallocatechin gallate and quercetin enhance survival signaling in response to oxidant-induced human endothelial apoptosis. *J Nutr* 2005; 135(4):707-713.

Chong P, Selvaratnam L, Abbas AA, Kamarul T. Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 2012; 30(4):634-642.

- Christie VB, Maltman DJ, Henderson AP, Whiting A, Marder TB, Lako M, et al. Retinoid supplementation of differentiating human neural progenitors and embryonic stem cells leads to enhanced neurogenesis in vitro. *J Neurosci Methods* 2010; 193(2):239-245.
- Citro L, Naidu S, Hassan F, Kuppusamy ML, Kuppusamy P, Angelos MG, et al. Comparison of Human Induced Pluripotent Stem-Cell Derived Cardiomyocytes with Human Mesenchymal Stem Cells following Acute Myocardial Infarction. *Plos One* 2014; 9(12):116281.
- Clagett-Dame M, McNeill E, Muley P. Role of all-Trans retinoic acid in neurite outgrowth and axonal elongation. *J Neurobiol* 2006; 66(7):739-756.
- Clark J, Clore EL, Zheng K, Adame A, Masliah E, Simon DK. Oral N-Acetyl-Cysteine Attenuates Loss of Dopaminergic Terminals in alpha-Synuclein Overexpressing Mice. *Plos One* 2010; 5(8):12333.
- Clausen A, Doctrow S, Baudry M. Prevention of cognitive deficits and brain oxidative stress with superoxide dismutase/catalase mimetics in aged mice. *Neurobiol Aging* 2010; 31(3):425-433.
- Clemens G, Flower KR, Henderson AP, Whiting A, Przyborski SA, Jimenez-Hernandez M, et al. The action of all-trans-retinoic acid (ATRA) and synthetic retinoid analogues (EC19 and EC23) on human pluripotent stem cells differentiation investigated using single cell infrared microspectroscopy. *Mol Biosys* 2013; 9(4):677-692.
- Cleren C, Yang L, Lorenzo B, Calingasan NY, Schomer A, Sireci A, et al. Therapeutic effects of coenzyme Q(10) (CoQ(10)) and reduced CoQ(10) in the MPTP model of Parkinsonism. *J Neurochem* 2008; 104(6):1613-1621.
- Coffey ET. Nuclear and cytosolic JNK signalling in neurons. *Nature Reviews Neuroscience* 2014; 15(5):285-299.
- Conti V, Izzo V, Corbi G, Russomanno G, Manzo V, De Lise F, et al. Antioxidant Supplementation in the Treatment of Aging-Associated Diseases. *Front Pharmacol* 2016; 7:24.
- Cordero M, Palomares T, Alonso-Varona A. Neuronal differentiation model of human SH-SY5Y cell line using ec23 y BDNF. XVII Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular. Bilbao, España.2015.
- Coulthard LR, White DE, Jones DL, McDermott MF, Burchill SA. p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends Mol Med* 2009; 15(8):369-379.

Cova L, Armentero M, Zennaro E, Calzarossa C, Bossolasco P, Busca G, et al. Multiple neurogenic and neurorescue effects of human mesenchymal stem cell after transplantation in an experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res* 2010; 1311:12-27.

Covarrubias-Pinto A, Moll P, Solis-Maldonado M, Acuna AI, Riveros A, Paz Miro M, et al. Beyond the redox imbalance: Oxidative stress contributes to an impaired GLUT3 modulation in Huntington's disease. *Free Radical Bio Med* 2015; 89:1085-1096.

Cunningham FG, MacDonald PC, Gant MF et al. The placenta and fetal membranes. In: Williams Obstetrics. 20th ed. Stamford, CT; Appleton and Lange 1997; 95–125.

Datki Z, Juhasz A, Galfi M, Soos K, Papp R, Zadori D, et al. Method for measuring neurotoxicity of aggregating polypeptides with the MTT assay on differentiated neuroblastoma cells. *Brain Res Bull* 2003; 62(3):223-229.

Deepmala, Slattery J, Kumar N, Delhey L, Berk M, Dean O, et al. Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*; 55:294-321.

Dhanasekaran A, Kotamraju S, Kalivendi S, Matsunaga T, Shang T, Keszler A, et al. Supplementation of endothelial cells with mitochondria-targeted antioxidants inhibit peroxide-induced mitochondrial iron uptake, oxidative damage, and apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279(36):37575-37587.

Dhitavat S, Ortiz D, Rogers E, Rivera E, Shea T. Folate, vitamin E, and acetyl-L-carnitine provide synergistic protection against oxidative stress resulting from exposure of human neuroblastoma cells to amyloid-beta. *Brain Res* 2005; 1061(2):114-117.

Dias V, Junn E, Mouradian MM. The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *JParkinson Dis* 2013; 3(4):461-491.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4):315-317.

Donahue A, Aschner M, Lash L, Syversen T, Sonntag W. Growth hormone administration to aged animals reduces disulfide glutathione levels in hippocampus. *Mech Ageing Dev* 2006; 127(1):57-63.

Dragicevic N, Smith A, Lin X, Yuan F, Copes N, Delic V, et al. Green Tea Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) and Other Flavonoids Reduce Alzheimer's Amyloid-Induced Mitochondrial Dysfunction. *J Alzheimer Dis* 2011; 26(3):507-521.

Drew B, Leeuwenburgh C. Aging and the role of reactive nitrogen species. Increasing Healthy Life Span: Conventional Measures and Slowing the Innate Aging Process 2002; 959:66-81. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82(1):47-95.

Dumont M, Wille E, Stack C, Calingasan NY, Beal MF, Lin MT. Reduction of oxidative stress, amyloid deposition, and memory deficit by manganese superoxide dismutase overexpression in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Faseb J* 2009; 23(8):2459-2466.

Dwane S, Durack E, Kiely PA. Optimising parameters for the differentiation of SH-SY5Y cells to study cell adhesion and cell Migration. *BMC Res Notes* 2013, 6:366.

Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Cena V, et al. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem* 2000; 75(3):991-1003.

Esmaeili MA, Alilou M, Sonboli A. Neuroprotective effects of *Salvia aristata* Aucher ex Benth. on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Res J Pharmacogn* 2015; 2(4):17-26.

Fagerstrom S, Pahlman S, Gestblom C, Nanberg E. Protein kinase C-epsilon is implicated in neurite outgrowth in differentiating human neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ* 1996; 7(6):775-785.

Fang C, Bourdette D, Banker G. Oxidative stress inhibits axonal transport: implications for neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener* 2012; 7:29.

Feisst V, Meidinger S, Locke MB. From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Cloning* 2015; 8:149-162.

Ferreiro E, Oliveira CR, Pereira CMF. The release of calcium from the endoplasmic reticulum induced by amyloid-beta and prion peptides activates the mitochondrial apoptotic pathway. *Neurobiol Dis* 2008; 30(3):331-342.

Figueiredo CP, Bicca MA, Latini A, Prediger RDS, Medeiros R, Calixto JB. Folic Acid Plus alpha-Tocopherol Mitigates Amyloid-beta-Induced Neurotoxicity through Modulation of Mitochondrial Complex Activity. *J Alzheimer Dis* 2011; 24(1):61-75.

Foerstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012; 33(7):829.

Fotia C, Massa A, Boriani F, Baldini N, Granchi D. Hypoxia enhances proliferation and stemness of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cytotechnology* 2015; 67(6):1073-1084.

Fraser J, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick M. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006; 24(4):150-154.

Frenette P, Wagner D. Adhesion molecules .2. Blood vessels and blood cells. *N Engl J Med* 1996; 335(1):43-45.

Fridovich I. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64:97-112.

Fukui K, Takatsu H, Koike T, Urano S. Hydrogen peroxide induces neurite degeneration: Prevention by tocotrienols. *Free Radic Res* 2011; 45(6):681-691.

Gamez J, Corbera-Bellalta M, Nogales G, Ragner N, Garcia-Arumi E, Badia-Canto M, et al. Mutational analysis of the Cu/Zn superoxide dismutase gene in a Catalan ALS population: Should all sporadic ALS cases also be screened for SOD1?. *J Neurol Sci* 2006; 247(1):21-28.

Ganguly G, Chakrabarti S, Chatterjee U, Saso L. Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Drug Des Dev Ther* 2017; 11:797-810.

Giammanco M, Majo D, Leto G, Flandina C, Piazza MD, Guardia ML. The role of vitamin k in bone remodeling and osteoporosis. *J Food Res* 2012; 1(4)106

Gil-Mohapel J, Brocardo PS, Christie BR. The Role of Oxidative Stress in Huntington's Disease: Are Antioxidants Good Therapeutic Candidates?. *Curr Drug Targets* 2014; 15(4):454-468.

Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patients bedside: An update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2007; 211(1):27-35.

Giraldo E, Lloret A, Fuchsberger T, Vina J. A beta and tau toxicities in Alzheimer's are linked via oxidative stress-induced p38 activation: Protective role of vitamin E. *Redox Biol* 2014; 2:873-877.

Goldie BJ, Barnett MM, Cairns MJ. BDNF and the maturation of posttranscriptional regulatory networks in human SH-SY5Y neuroblast differentiation. *Front Cell Neurosci* 2014; 8:325.

Gonzalez-Burguera I, Ricobaraza A, Aretxabala X, Barrondo S, Garcia del Cano G, Lopez de Jesus M, et al. Highly efficient generation of glutamatergic/cholinergic NT2-derived postmitotic human neurons by short-term treatment with the nucleoside analogue cytosine beta-D-arabinofuranoside. *Stem Cell Res* 2016; 16(2):541-551.

Gordillo G, Fang H, Park H, Roy S. Nox-4-Dependent Nuclear H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Drives DNA Oxidation Resulting in 8-OHdG as Urinary Biomarker and Hemangioendothelioma Formation. *Antioxi Redox Sign* 2010; 12(8):933-943.

Gordon J, Amini S, White MK. General Overview of Neuronal Cell Culture. *Methods Mol Biol* 2013; 1078:1-8.

Graf B, Milbury P, Blumberg J. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: Epidemiological evidence. *J Med Food* 2005; 8(3):281-290.

Gucciardo L, Lories R, Ochsenbein-Koelble N, Done E, Zwijsen A, Deprest J. Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potential use in perinatology and regenerative medicine. *Int J Obstet Gyn* 2009; 116(2):166-172.

Guerra-Araiza C, Alvarez-Mejia AL, Sanchez-Torres S, Farfan-Garcia E, Mondragon-Lozano R, Pinto-Almazan R, et al. Effect of natural exogenous antioxidants on aging and on neurodegenerative diseases. *Free Radic Res* 2013; 47(6-7):451-462.

Gutierrez H, Davies AM. Regulation of neural process growth, elaboration and structural plasticity by NF-kappa B. *Trends Neurosci* 2011; 34(6):316-325.

Hachem LD, Mothe AJ, Tator CH. Effect of BDNF and Other Potential Survival Factors in Models of In Vitro Oxidative Stress on Adult Spinal Cord-Derived Neural Stem/Progenitor Cells. *Biores Open Access* 2015; 4(1):146-159.

Halliwell B, Gutteridge J. Role of Free-Radicals and Catalytic Metal-Ions in Human-Disease - an Overview. *Meth Enzymol* 1990; 186:1-85.

Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *J Neurochem* 2006; 97(6):1634-1658.

Hamuro J, Murata Y, Suzuki M, Takatsuki F, Suga T. The triggering and healing of tumor stromal inflammatory reactions regulated by oxidative and reductive macrophages. *Gann Mg Cancer Res* 1999; 48:153-164.

Haas RH, Parikh S, Falk MJ, Saneto RP, Wolf NI, Darin N, et al. Mitochondrial disease: A practical approach for primary care physicians. *Pediatrics* 2007; 120(6):1326-1333.

Hao Q, Shah A, Thiemann F, Smogorzewska E, Crooks G. A Functional Comparison of Cd34(+)cd38(-) Cells in Cord-Blood and Bone-Marrow. *Blood* 1995; 86(10):3745-3753.

Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin - Multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005; 27(2):119-130.

Hargreaves I, Land J. Multiple mitochondrial electron transport chain enzyme deficiencies associated with a decrease in skeletal muscle coenzyme Q10 status. *Mitochondrion* 2012; 12(5):590-591.

Heman-Ackah SM, Bassett AR, Wood MJA. Precision Modulation of Neurodegenerative Disease-Related Gene Expression in Human iPSC-Derived Neurons. *Sci Rep* 2016; 6:28420.

Hematti P. Characterization of mesenchymal stromal cells: potency assay development. *Transfusion* 2016; 56(4):32S-35S.

Hengartner M. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407(6805):770-776.

Hou R, Huang H, Tzen J, Jeng K. Protective effects of sesamin and sesamol on hypoxic neuronal and PC12 cells. *J Neurosci Res* 2003; 74(1):123-133.

Hsiao ST, Lokmic Z, Peshavariya H, Abberton KM, Dusting GJ, Lim SY, et al. Hypoxic Conditioning Enhances the Angiogenic Paracrine Activity of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells Dev* 2013; 22(10):1614-1623.

Hughes G, Murphy M, Ledgerwood E. Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor kappa B to modulate tumour necrosis factor-induced apoptosis: evidence from mitochondria-targeted antioxidants. *Biochem J* 2005; 389:83-89.

Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* 2008; 77:755-776.

Ingre C, Roos PM, Piehl F, Kamel F, Fang F. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Epidemiol* 2015; 7:181-192.

Ishrat T, Khan M, Hoda M, Yousuf S, Ahmad M, Ansari M, et al. Coenzyme Q10 modulates cognitive impairment against intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats. *Behav Brain Res* 2006; 171(1):9-16.

Ishihara I, Minami Y, Nishizaki T, Matsuoka T, Yamamura H. Activation of calpain precedes morphological alterations during hydrogen peroxide-induced apoptosis in neuronally differentiated mouse embryonal carcinoma P19 cell line. *Neurosci Lett* 2000; 279(2):97-100.

Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 2006; 99(5):1285-1297.



- Jadavji NM, Emmerson JT, MacFarlane AJ, Willmore WG, Smith PD. B-vitamin and choline supplementation increases neuroplasticity and recovery after stroke. *Neurobiol Dis* 2017; 103:89-100.
- Jain M, Aneja S, Mehta G, Ray GN, Batra S, Randhava VS. CSF interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha and free radicals production in relation to clinical outcome in acute bacterial meningitis. *Indian Pediatr* 2000; 37(6):608-614.
- Jakel R, Schneider B, Svendsen C. Using human neural stem cells to model neurological disease. *Nature Rev Gen* 2004; 5(2):136.
- Jang J, Surh Y. Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death. *Free Rad Biol Med* 2012; 34(8):1100-1110.
- Jaquet V, Marcoux J, Forest E, Leidal KG, McCormick S, Westermaier Y, et al. NADPH oxidase (NOX) isoforms are inhibited by celastrol with a dual mode of action. *Br J Pharmacol* 2011; 164(2B):507-520.
- Jembrek MJ, Vukovic L, Puhovic J, Erhardt J, Orsolic N. Neuroprotective Effect of Quercetin Against Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Injury in P19 Neurons. *J Mol Neurosci* 2012; 47(2):286-299.
- Jia B, Chen S, Zhao Z, Liu P, Cai J, Qin D, et al. Modeling of hemophilia A using patient-specific induced pluripotent stem cells derived from urine cells. *Life Sci* 2014; 108(1):22-29.
- Jiang H, Ren Y, Zhao J, Feng J. Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis. *Hum Mol Genet* 2004; 13(16):1745-1754.
- Jin H, Kanthasamy A, Ghosh A, Anantharam V, Kalyanaraman B, Kanthasamy AG. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: Preclinical and clinical outcomes. *BBA-Mol Basis Dis* 2014; 1842(8):1282-1294.
- Jones S, O'Donnell V, Wood J, Broughton J, Hughes E, Jones O. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *AM J Physiol-Heart C* 1996; 271(4):1626-1634.
- Jou M, Peng T, Hsu L, Jou S, Reiter RJ, Yang C, et al. Visualization of melatonin's multiple mitochondrial levels of protection against mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-mediated permeability transition and beyond in rat brain astrocytes. *J Pineal Res* 2010; 48(1):20-38.
- Kang SS, Zhang Z, Liu X, Manfredsson FP, Benskey MJ, Cao X, et al. TrkB neurotrophic activities are blocked by alpha-synuclein, triggering dopaminergic cell death in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114(40):10773-10778.

Kaplan D, Miller F. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10(3):381-391.

Karalija A, Novikova LN, Kingham PJ, Wiberg M, Novikov LN. The Effects of N-Acetyl-Cysteine and Acetyl-L-Carnitine on Neural Survival, Neuroinflammation and Regeneration Following Spinal Cord Injury. *Neuroscience* 2014; 269:143-151.

Kasparova S, Sumbalova Z, Bystricky P, Kucharska J, Liptaj T, Mlynarik V, et al. Effect of coenzyme Q(10) and vitamin E on brain energy metabolism in the animal model of Huntington's disease. *Neurochem Int* 2006; 48(2):93-99.

Katsuda T, Tsuchiya R, Kosaka N, Yoshioka Y, Takagaki K, Oki K, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *Sci Rep* 2013; 3:1197.

Kaur H, Chauhan S, Sandhir R. Protective Effect of Lycopene on Oxidative Stress and Cognitive Decline in Rotenone Induced Model of Parkinson's Disease. *Neurochem Res* 2011; 36(8):1435-1443.

Kavanagh DPJ, Robinson J, Kalia N. Mesenchymal Stem Cell Priming: Fine-tuning Adhesion and Function. *Stem Cell Rev ReP* 2014; 10(4):587-599.

Keller J, Kindy M, Holtsberg F, St Clair D, Yen H, Germeyer A, et al. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: Suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 1998; 18(2):687-697.

Kelso G, Porteous C, Coulter C, Hughes G, Porteous W, Ledgerwood E, et al. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells - Antioxidant and antiapoptotic properties. *J Biol Chem* 2001; 276(7):4588-4596.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klueter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24(5):1294-1301.

Khatibi S, Taban ZF, Halabian R, Roushandeh AM. Combined preconditioning with hypoxia and Hydrogen Peroxide Improved efficiency of Mesenchymal Stem Cell in cell culture. *Entomol Appl Sci Lett* 2016; 3(5):89-96.

Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neuro* 2015; 24(4):325-340.

Kim IG, Piao S, Lee JY, Hong SH, Hwang T, Kim SW, et al. Effect of an Adipose-Derived Stem Cell and Nerve Growth Factor-Incorporated Hydrogel on Recovery of Erectile Function in a Rat Model of Cavernous Nerve Injury. *Tissue Eng Pt a* 2013; 19(1-2):14-23.

Kim S, Park S, Cho-Chung Y, Hong S. Participation of type II protein kinase A in the retinoic acid-induced growth inhibition of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Cell Physiol* 2000; 182(3):421-428.

Kim S, Hwang CN, Sun H, Jin M, Han Y, Lee H, et al. Peroxiredoxin I is an indicator of microglia activation and protects against hydrogen peroxide-mediated microglial death. *Biol Pharm Bull* 2008; 31(5):820-825.

Kime C, Mandegar MA, Srivastava D, Yamanaka S, Conklin BR and Rand TA. Efficient CRISPR/Cas9-Based genome engineering in human pluripotent stem cells. *Curr Protoc Hum Genet* 2016; 88.

Kipps C, Duggins A, Mahant N, Gomes L, Ashburner J, McCusker E. Progression of structural neuropathology in preclinical Huntington's disease: a tensor based morphometry study. *J Neurol Neurosur Psy* 2005; 76(5):650-655.

Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu S, Lanza R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 2007; 446(7133):342.

Klimczak A, Kozłowska U. Mesenchymal Stromal Cells and Tissue-Specific Progenitor Cells: Their Role in Tissue Homeostasis. *Stem Cells Int* 2016; 4285215.

Koh E, Seo Y, Choi J, Lee HY, Kang D, Kim K, et al. Spirulina maxima Extract Prevents Neurotoxicity via Promoting Activation of BDNF/CREB Signaling Pathways in Neuronal Cells and Mice. *Molecules* 2017; 22(8):1363.

Kolsch H, Ludwig M, Lutjohann D, Rao M. Neurotoxicity of 24-hydroxycholesterol, an important cholesterol elimination product of the brain, may be prevented by vitamin E and estradiol-17 beta. *J Neural Transm* 2001; 108(4):475-488.

Konno M, Hamabe A, Hasegawa S, Ogawa H, Fukusumi T, Nishikawa S, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells and regenerative medicine. *Dev Growth Diff* 2013;55(3):309-318.

Kou W, Luchtman D, Song C. Eicosapentaenoic acid (EPA) increases cell viability and expression of neurotrophin receptors in retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cells. *Eur J Nutr* 2008; 47(2):104-113.

Kovalevich J, Langford D. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods Mol Biol* 2013; 1078:9-21.

Kraft R, Grimm C, Grosse K, Hoffmann A, Sauerbruch S, Kettenmann H, et al. Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *AM J Physiol-Cell Physiol* 2004; 286(1):129-137.

Krampera M, Galipeau J, Shi Y, Tarte K, Sensebe L, ISCT. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells-The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy* 2013; 15(9):1054-1061.

Kuise T, Noguchi H, Tazawa H, Kawai T, Iwamuro M, Saitoh I, et al. Establishment of a pancreatic stem cell line from fibroblast-derived induced pluripotent stem cells. *Biomed Eng Online* 2014; 13:64.

Kuroda Y, Dezawa M. Mesenchymal Stem Cells and Their Subpopulation, Pluripotent Muse Cells, in Basic Research and Regenerative Medicine. *Anat Rec* 2014; 297(1):98-110.

Kwak M, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler T. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway - Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem* 2003; 278(10):8135-8145.

Labbadia J, Morimoto RI. Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends Biochem Sci* 2013; 38(8):378-385.

Lai RC, Yeo RWY, Tan KH, Lim SK. Exosomes for drug delivery - a novel application for the mesenchymal stem cell. *Biotechnol Adv* 2013; 31(5):543-551.

Landete JM. Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health (Retracted article. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2012; 52(10):936-948.

Langrzyk A, Nowak WN, Stepniewski J, Jazwa A, Florczyk-Soluch U, Jozkowicz A, et al. Critical View on Mesenchymal Stromal Cells in Regenerative Medicine. *Ant redox sig* 2017.

Laranjeira P, Gomes J, Pedreiro S, Pedrosa M, Martinho A, Antunes B, et al. Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Differentially Inhibit Cytokine Production by Peripheral Blood Monocytes Subpopulations and Myeloid Dendritic Cells. *Stem Cells Int* 2015; 819084.

Lavenius E, Parrow V, Nanberg E, Pahlman S. Basic Fgf and Igf-i Promote Differentiation of Human Sh-Sy5y Neuroblastoma-Cells in Culture. *Growth Fact* 1994; 10(1):29-39.

Lee J, Koo N, Min D. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Compr Rev Food Sci Food* 2004; 3(1):21-33.

Lee J, Hyeon SJ, Im H, Ryu H, Kim Y, Ryu H. Astrocytes and Microglia as Non-cell Autonomous Players in the Pathogenesis of ALS. *Exp Neurobiol* 2016; 25(5):233-240.

Lee M, Hyun D, Halliwell B, Jenner P. Effect of overexpression of wild-type and mutant Cu/Zn-superoxide dismutases on oxidative stress and cell death induced by hydrogen peroxide, 4-hydroxynonenal or serum deprivation: potentiation of injury by ALS-related mutant superoxide dismutases and protection by Bcl-2. *J Neurochem* 2001; 78(2):209-220.

Leuner K, Schuett T, Kurz C, Eckert SH, Schiller C, Occhipinti A, et al. Mitochondrion-Derived Reactive Oxygen Species Lead to Enhanced Amyloid Beta Formation. *Ant Redox Sig* 2012; 16(12):1421-1433.

Li J, O W, Li W, Jiang Z, Ghanbari HA. Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. *Int J Mol Sci* 2013; 14(12):24438-24475.

Li K, Hala TJ, Seetharam S, Poulsen DJ, Wright MC, Lepore AC. GLT1 overexpression in SOD1(G93A) mouse cervical spinal cord does not preserve diaphragm function or extend disease. *Neurobiol Dis* 2015; 78:12-23.

Li Q, Spencer NY, Pantazis NJ, Engelhardt JF. Alsin and SOD1(G93A) Proteins Regulate Endosomal Reactive Oxygen Species Production by Glial Cells and Proinflammatory Pathways Responsible for Neurotoxicity. *J Biol Chem* 2011; 286(46):40151-40162.

Liang C, Weng S, Tsai T, Li I, Lu P, Ma K, et al. Neurotrophic and neuroprotective potential of human limbus-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2014; 16(10):1371-1383.

Liot G, Valette J, Pepin J, Flament J, Brouillet E. Energy defects in Huntington's disease: Why "in vivo" evidence matters. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 483(4):1084-1095.

Liu BH, Yeh HY, Lin YC, Wang MH, Chen DC, Lee BH, Hsu SH. Spheroid formation and enhanced cardiomyogenic potential of adipose-derived stem cell grown on chitosan. *Biores Open Access* 2013; 2(1):28-39.

Liu R, Liu I, Bi X, Thompson R, Doctrow S, Malfroy B, et al. Reversal of age-related learning deficits and brain oxidative stress in mice with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(14):8526-8531.

Llesuy S, Evelson P, Gonzalezflecha B, Peralta J, Carreras M, Poderoso J, et al. Oxidative Stress in Muscle and Liver of Rats with Septic Syndrome. *Free Rad Biol Med* 1994; 16(4):445-451.

Lo Furno D, Tamburino S, Mannino G, Gili E, Lombardo G, Tarico MS, et al. Nanofat 2.0: Experimental Evidence for a Fat Grafting Rich in Mesenchymal Stem Cells. *Physiol Res* 2017; 66(4):663-671.

Los M, Droge W, Stricker K, Baeuerle P, Schulzeosthoff K. Hydrogen-Peroxide as a Potent Activator of T-Lymphocyte Functions. *Eur J Immunol* 1995; 25(1):159-165.

Makridakis M, Roubelakis MG, Vlahou A. Stem cells: Insights into the secretome. *BBA-Proteins Proteom* 2013; 1834(11):2380-2384.

Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: A vicious cycle or a double-edged sword?. *Ant Redox Sig* 2007; 9(12):2277-2293.

Mancuso M, Coppede F, Migliore L, Siciliano G, Murri L. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. *J Alzheimer Dis* 2006; 10(1):59-73.

Mani S, 2015. Production of Reactive Oxygen Species and Its Implication in Human Diseases. *Free Radical Health Dis* 2015; 3-15.

Martin-Aragon Baudel MAS, Rae MT, Darlison MG, Poole AV, Fraser JA. Preferential activation of HIF-2 $\alpha$  adaptive signalling in neuronal-like cells in response to acute hypoxia. *PLoS one* 2017; 12(10):0185664-0185664.

Massaad CA, Washington TM, Pautler RG, Klann E. Overexpression of SOD-2 reduces hippocampal superoxide and prevents memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(32):13576-13581.

Matthews R, Yang L, Browne S, Baik M, Beal M. Coenzyme Q(10) administration increases brain mitochondrial concentrations and exerts neuroprotective effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(15):8892-8897.

Mattson M. NF-kappa B in the survival and plasticity of neurons. *Neurochem Res* 2005; 30(6-7):883-893.

McLean C, Mirochnitchenko O, Claus C, Noble-Haeusslein L, Ferriero D. Overexpression of glutathione peroxidase protects immature murine neurons from oxidative stress. *Dev Neurosci* 2005; 27(2-4):169-175.

McTigue D, Popovich P, Morgan T, Stokes B. Localization of transforming growth factor-beta 1 and receptor mRNA after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* 2000; 163(1):220-230.

Mehan S, Meena H, Sharma D, Sankhla R. JNK: A Stress-Activated Protein Kinase Therapeutic Strategies and Involvement in Alzheimer's and Various Neurodegenerative Abnormalities. *J Mol Neurosci* 2011; 43(3):376-390.

Meng Z, Yan C, Deng Q, Gao D, Niu X. Curcumin inhibits LPS-induced inflammation in rat vascular smooth muscle cells in vitro via ROS-relative TLR4-MAPK/NF-kappa B pathways. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34(7):901-911.

Moniczewski A, Gawlik M, Smaga I, Niedzielska E, Krzek J, Przegalinski E, et al. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 1. Chemical aspects and biological sources of oxidative stress in the brain. *Pharmacol Rep* 2015; 67(3):560-568.

Morris-Blanco KC, Cohan CH, Neumann JT, Sick TJ, Perez-Pinzon MA. Protein kinase C epsilon regulates mitochondrial pools of Nampt and NAD following resveratrol and ischemic preconditioning in the rat cortex. *J Cerebr Blood F Met* 2014; 34(6):1024-1032.

Mudo G, Makela J, Di Liberto V, Tselykh TV, Olivieri M, Piepponen P, et al. Transgenic expression and activation of PGC-1 alpha protect dopaminergic neurons in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(7):1153-1165.

Muller T, Buttner T, Gholipour A, Kuhn W. Coenzyme Q(10) supplementation provides mild symptomatic benefit in patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2003; 341(3):201-204.

Murakami K, Murata N, Ozawa Y, Kinoshita N, Irie K, Shirasawa T, et al. Vitamin C Restores Behavioral Deficits and Amyloid-beta Oligomerization without Affecting Plaque Formation in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer Dis* 2011; 26(1):7-18.

Muraoka K, Shingo T, Yasuhara T, Kameda M, Yuen WJ, Uommi T, et al. Comparison of the therapeutic potential of adult and embryonic neural precursor cells in a rat model of Parkinson disease - Laboratory investigation. *J Neurosurg* 2008; 108(1):149-159.

Murugaiyah V, Mattson MP. Neurohormetic phytochemicals: An evolutionary-bioenergetic perspective. *Neurochem Int* 2015; 89:271-280.

Muthukumaran K, Leahy S, Harrison K, Sikorska M, Sandhu JK, Cohen J, et al. Orally delivered water soluble Coenzyme Q(10) (Ubisol-Q(10)) blocks on-going neurodegeneration in rats exposed to paraquat: potential for therapeutic application in Parkinson's disease. *Bmc Neuroscience* 2014; 15:21.

Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscl Throm Vas* 2005; 25(12):2542-2547.

Nakajima Y, Nishida H, Matsugo S, Konishi T. Cancer Cell Cytotoxicity of Extracts and Small Phenolic Compounds from Chaga [*Inonotus obliquus* (persoon) Pilat]. *J Med Food* 2009; 12(3):501-507.

Nakamura T, Lipton SA. Preventing Ca<sup>2+</sup>-mediated nitrosative stress in neurodegenerative diseases: Possible pharmacological strategies. *Cell Calcium* 2010; 47(2):190-197.

Nakamura T, Lipton SA. Redox modulation by S-nitrosylation contributes to protein misfolding, mitochondrial dynamics, and neuronal synaptic damage in neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ* 2011; 18(9):1478-1486.

Nascimento MM, Suliman ME, Silva M, Chinaglia T, Marchioro J, Hayashi SY, et al. Effect of Oral N-Acetylcysteine Treatment on Plasma Inflammatory and Oxidative Stress Markers in Peritoneal Dialysis Patients: a Placebo-Controlled Study. *Perit Dial Int* 2010; 30(3):336-342.

Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007; 110(10):3499-3506.

Nielsen JS, McNagny KM. CD34 is a Key Regulator of Hematopoietic Stem Cell Trafficking to Bone Marrow and Mast Cell Progenitor Trafficking in the Periphery. *Microcirculation* 2009; 16(6):487-496.

Niki E. Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products?. *FEBS Lett* 2012; 586(21):3767-3770.

Okano H. Identification of neural stem cells in adult human brain: its implication in the strategy for repairing the damaged central nervous system. *Clin Neurol* 2005; 45(11):871-3.

Olsson E, Honeth G, Bendahl P, Saal LH, Gruvberger-Saal S, Ringner M, et al. CD44 isoforms are heterogeneously expressed in breast cancer and correlate with tumor subtypes and cancer stem cell markers. *BMC Cancer* 2011; 11:418.

Palomares T, Cordero M, Bruzos-Cidon C, Torrecilla M, Ugedo L, Alonso-Varona A. The neuroprotective effect of Conditioned Medium from Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells is impaired by N-acetyl cysteine supplementation. *Mol Neurobiol* 2017.

Pandya JD, Readnower RD, Patel SP, Yonutas HM, Pauly JR, Goldstein GA, et al. N-acetylcysteine amide confers neuroprotection, improves bioenergetics and behavioral outcome following TBI. *Exp Neurol* 2014; 257:106-113.



- Paquet D, Kwart D, Chen A, Sproul A, Jacob S, Teo S, et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature* 2016; 533(7601):125.
- Pahlman S, Odelstad L, Larsson E, Grotte G, Nilsson K. Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Int J Cancer* 1981; 28(5):583–589.
- Popova D, Karlsson J, Jacobsson SOP. Comparison of neurons derived from mouse P19, rat PC12 and human SH-SY5Y cells in the assessment of chemical- and toxin-induced neurotoxicity. *Bmc Pharmacol Toxicol* 2017;18:42.
- Prasad AS. Zinc: An antioxidant and anti-inflammatory agent: Role of zinc in degenerative disorders of aging. *J Trace Elem in Med Bio* 2014; 28(4):364-371.
- Prasad KN. Simultaneous activation of Nrf2 and elevation of antioxidant compounds for reducing oxidative stress and chronic inflammation in human Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* 2016; 153:41-47.
- Presgraves S, Ahmed T, Borwege S, Joyce J. Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotox Res* 2004; 5(8):579-598.
- Puspitasari IM, Abdulah R, Yamazaki C, Kameo S, Nakano T, Koyama H. Updates on clinical studies of selenium supplementation in radiotherapy. *Radiat Oncol* 2014; 9:125.
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew Chem Int Ed* 2011; 50(3):586-621.
- Radak Z, Zhao Z, Goto S, Koltai E. Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. *Mol Aspects Med* 2011; 32(4-6):305-315.
- Ramalingam M, Kim S. The Neuroprotective Role of Insulin Against MPP+-Induced Parkinson's Disease in Differentiated SH-SY5Y Cells. *J Cell Biochem* 2016; 117(4):917-926.
- Ramful D, Tarnus E, Rondeau P, Da Silva CR, Bahorun T, Bourdon E. Citrus Fruit Extracts Reduce Advanced Glycation End Products (AGEs)- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress in Human Adipocytes. *J Agric Food Chem* 2010; 58(20):11119-11129.
- Ramsey CP, Glass CA, Montgomery MB, Lindl KA, Ritson GP, Chia LA, Hamilton RL, Chu CT, Jordan-Sciutto KL. Expression of Nrf2 in neurodegenerative disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66(1):75-85.

Redondo-Castro E, Cunningham C, Miller J, Martuscelli L, Aoulad-Ali S, Rothwell NJ, et al. Interleukin-1 primes human mesenchymal stem cells towards an anti-inflammatory and pro-trophic phenotype in vitro. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8:79.

Rege SD, Geetha T, Broderick TL, Babu JR. Resveratrol Protects beta Amyloid-Induced Oxidative Damage and Memory Associated Proteins in H19-7 Hippocampal Neuronal Cells. *Curr Alzheimer Res* 2015; 12(2):147-156.

Reiter R, Tan D, Leon J, Kilic U, Kilic E. When melatonin gets on your nerves: Its beneficial actions in experimental models of stroke. *Exp Biol Med* 2005; 230(2):104-117.

Reynolds B, Weiss S. Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central-Nervous-System. *Science* 1992; 255(5052):1707-1710.

Ribeiro CA, Salgado AJ, Fraga JS, Silva NA, Reis RL, Sousa N. The secretome of bone marrow mesenchymal stem cells-conditioned media varies with time and drives a distinct effect on mature neurons and glial cells (primary cultures). *J Tissue Eng Reg Med*; 5(8):668-672.

Ristow M, Schmeisser K. Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (Ros). *Dose-Response* 2014; 12(2):288-341.

Roemeling-van Rhijn M, Mensah FKF, Korevaar SS, Leijns MJ, van Osch GJVM, IJzermans JNM, et al. Effects of hypoxia on the immunomodulatory properties of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Front Immunol* 2013; 4:203.

Ross CA, Akimov SS. Human-induced pluripotent stem cells: potential for neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 2014; 23:17-26.

Roy S, Lado B, Khanna S, Sen C. Vitamin E sensitive genes in the developing rat fetal brain: a high-density oligonucleotide microarray analysis. *FEBS Lett* 2002; 530(1-3):17-23.

Roy S, Khanna S, Nallu K, Hunt TK, Sen CK. Dermal wound healing is subject to redox control. *Mol Ther* 2006; 13(1):211-220.

Rubio A, Luoni M, Giannelli SG, Radice I, Iannielli A, Cancellieri C, et al. Rapid and efficient CRISPR/Cas9 gene inactivation in human neurons during human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Sci Rep* 2016; 6:37540.

Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol Ther* 2014; 141(2):150-159.

Sacson RA, Bunton-Stasyshyn RKA, Fisher EMC, Fratta P. Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis?. *Brain* 2013; 136:2342-2358.

Sachdeva D, Burns A. Dimebolin in Dementia. *Cns Neurosci Ther* 2011; 17(3):199-205.

Saharan S, Mandal PK. The Emerging Role of Glutathione in Alzheimer's Disease. *J Alzheimer Dis* 2014; 40(3):519-529.

Salgado AJ, Sousa JC, Costa BM, Pires AO, Mateus-Pinheiro A, Teixeira FG, et al. Mesenchymal stem cells secretome as a modulator of the neurogenic niche: basic insights and therapeutic opportunities. *Front Cellular Neurosci* 2015; 9:249.

Salman KA, Ashraf S. Reactive oxygen species: A link between chronic inflammation and cancer. *Asia-Pacific J Mol Biol Biotech* 2013; 21(2):42-49.

Sandberg M, Patil J, D'Angelo B, Weber SG, Mallard C. NRF2-regulation in brain health and disease: Implication of cerebral inflammation. *Neuropharmacology* 2014; 79:298-306.

Sandhir R, Sood A, Mehrotra A, Kamboj SS. N-Acetylcysteine Reverses Mitochondrial Dysfunctions and Behavioral Abnormalities in 3-Nitropropionic Acid-Induced Huntington's Disease. *Neurodegener Dis* 2012; 9(3):145-157.

Sarvestani NN, Khodagholi F, Ansari N, Farimani MM. Involvement of p-CREB and phase II detoxifying enzyme system in neuroprotection mediated by the flavonoid calycopterin isolated from *Dracocephalum kotschyi*. *Phytomedicine* 2013; 20(10):939-946.

Scheel C, Weinberg RA. Phenotypic plasticity and epithelial-mesenchymal transitions in cancer and normal stem cells?. *Int J Cancer* 2011; 129(10):2310-2314.

Schrader M, Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. *BBA Mol Cell Res* 2006; 1763(12):1755-1766.

Schwab L, Goroncy L, Palaniyandi S, Gautam S, Triantafyllopoulou A, Mocsai A, et al. Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage. *Nat Med* 2014; 20(6):648-654.

Sentman M, Granstrom M, Jakobson H, Reaume A, Basu S, Marklund S. Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J Biol Chem* 2006; 281(11):6904-6909.

Sharma M, Gupta Y. Effect of chronic treatment of melatonin on learning, memory and oxidative deficiencies induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2001; 70(2-3):325-331.

Shahrani MA, Heales S, Hargreaves I, Orford M. Oxidative Stress: Mechanistic Insights into Inherited Mitochondrial Disorders and Parkinson's Disease. *J Clin Med* 2017; 6(11).

Shelat PB, Chalimoniuk M, Wang J, Strosznajder JB, Lee JC, Sun AY, et al. Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A(2) in cortical neurons. *J Neurochem* 2008; 106(1):45-55.

Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *Jove-Journal of Visualized Experiments* 2016; (108):53193.

Sigalov E, Fridkin M, Brenneman DE, Gozes I. VIP-Related protection against Iodoacetate toxicity in pheochromocytoma (PC12) cells: a model for ischemic/hypoxic injury. *J Mol Neurosci* 2000; 15: 147–154.

Skalska U, Kontny E. Regenerative and Immunomodulatory Properties of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Postepy Biologii Komorki* 2011; 38(3):363-378.

Snyder B, Shell B, Cunningham JT, Cunningham RL. Chronic intermittent hypoxia induces oxidative stress and inflammation in brain regions associated with early-stage neurodegeneration. *Physiol Rep* 2017; 5(9):13258.

Solesio ME, Prime TA, Logan A, Murphy MP, del Mar Arroyo-Jimenez M, Jordan J, et al. The mitochondria-targeted anti-oxidant MitoQ reduces aspects of mitochondrial fission in the 6-OHDA cell model of Parkinson's disease. *BBA Mol Basis Dis* 2013; 1832(1):174-182.

Song P, Zou M. Roles of reactive oxygen species in physiology and pathology in: atherosclerosis: risks, mechanisms, and therapies. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ 2015; 379-392

Sorce S, Krause K, Jaquet V. Targeting NOX enzymes in the central nervous system: therapeutic opportunities. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(14):2387-2407.

Souza Ferreira ME, de Vasconcelos AS, Vilhena TdC, da Silva TL, Barbosa AdS, Quadros Gomes AR, et al. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Should We Keep Trying Antioxidant Therapies?. *Cell Mol Neurobiol* 2015; 35(5):595-614.

Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant* 2016; 25(5):829-848.

Storch A, Burkhardt K, Ludolph A, Schwarz J. Protective effects of riluzole on dopamine neurons: Involvement of oxidative stress and cellular energy metabolism. *J Neurochem* 2000; 75(6):2259-2269.

Strelchenko N, Verlinsky O, Kukharenko V, Verlinsky Y. Morula-derived human embryonic stem cells. *Repro Biomed Online* 2004; 9(6):623-629.

- Suzuki T, Kunchala S, Matsui M, Murayama A. Molecular flexibility of retinoic acid under white fluorescent light. *J Nutr Sci Vitaminol* 1998; 44(6):729-736.
- Svendsen C, ter Borg M, Armstrong R, Rosser A, Chandran S, Ostenfeld T, et al. A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells. *J Neurosci Methods* 1998; 85(2):141-152.
- Tabatabaei-Malazy, O, Larijani, B, Abdollahi, M. A novel management of diabetes by means of strong antioxidants' combination. *J. Med. Hypothes.* 2013; (1):25–30.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5):861-872.
- Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, Hardeland R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem* 2002; 2(2):181-97.
- Tanna T, Sachan V. Mesenchymal Stem Cells: Potential in Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Curr Stem Cell Res Ther* 2014; 9(6):513-521.
- Tchantchou F, Graves M, Rogers E, Ortiz D, Shea T. N-acetyl cysteine alleviates oxidative damage to central nervous system of ApoE-deficient mice following folate and vitamin E-deficiency. *J Alzheimer Dis* 2005; 7(2):135-138.
- Thannickal V, Fanburg B. Activation of an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1. *J Biol Chem* 1995; 270(51):30334-30338.
- Thimmulappa R, Mai K, Srisuma S, Kensler T, Yamamoto M, Biswal S. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res* 2002; 62(18):5196-5203.
- Thomson J, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S, Waknitz M, Swiergiel J, Marshall V, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391):1145-1147.
- Tolar J, Le Blanc K, Keating A, Blazar BR. Concise Review: Hitting the Right Spot with Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells* 2010; 28(8):1446-1455.
- Tosetti P, Taglietti V, Toselli M. Functional changes in potassium conductances of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y during in vitro differentiation. *J Neurophysiol* 1998; 79(2):648-658.

Traber MG, Stevens JF. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radl Biol Med* 2011; 51(5):1000-1013.

Tsai M, Lee J, Chang Y, Hwang S. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Human Reprod* 2004; 19(6):1450-1456.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Rev Immuno* 2008; 8(9):726-736.

Uemura K, Kitagawa N, Kohno R, Kuzuya A, Kageyama T, Shibasaki H, et al. Presenilin 1 mediates retinoic acid-induced differentiation of SH-SY5Y cells through facilitation of Wnt signaling. *J Neurosci Res* 2003; 73(2):166-175.

Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep* 2015; 35:00191.

Ungvari Z, Bagi Z, Feher A, Recchia FA, Sonntag WE, Pearson K, et al. Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *Am J Physiol-Heart Physiol* 2010; 299(1):18-24.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1):44-84.

Venkataramana M, Nayaka SC, Anand T, Rajesh R, Aiyaz M, Divakara ST, et al. Zearalenone induced toxicity in SHSY-5Y cells: The role of oxidative stress evidenced by N-acetyl cysteine. *Food Chem Tox* 2014; 65:335-342.

Vescovi A, Parati E, Gritti A, Poulin P, Ferrario M, Wanke E, et al. Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. *Exp Neurol* 1999; 156(1):71-83.

Vijayalaxmi, Thomas C, Reiter R, Herman T. Melatonin: From basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Onco* 2002; 20(10):2575-2601.

Voet D, Voet JG, and Pratt CW (Eds). *Fundamentals of Biochemistry. Life at the Molecular Level*. New York: John Wiley and Sons 2008.

Wang Q, Zhu H, Zhou W, Guo X, Wu M, Xu Z, et al. N-Acetylcysteine-Pretreated Human Embryonic Mesenchymal Stem Cell Administration Protects Against Bleomycin-Induced Lung Injury. *Am J Med Sci* 2013; 346(2):113-122.

Wang Q, Chuikov S, Taitano S, Wu Q, Rastogi A, Tuck SJ, et al. Dimethyl Fumarate Protects Neural Stem/Progenitor Cells and Neurons from Oxidative Damage through Nrf2-ERK1/2 MAPK Pathway. *Int J Mol Sci* 2015; 16(6):13885-13907.

Wang X, Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci* 2010;2:12.

Wei J, Liu Y, Chang M, Sun C, Li D, Liu Z, et al. Proteomic analysis of oxidative modification in endothelial colony-forming cells treated by hydrogen peroxide. *Int J Mol Med* 2012; 29(6):1099-1105.

Wei X, Du Z, Zhao L, Feng D, Wei G, He Y, et al. IFATS Collection: The Conditioned Media of Adipose Stromal Cells Protect Against Hypoxia-Ischemia-Induced Brain Damage in Neonatal Rats. *Stem Cells* 2009; 27(2):478-488.

Wheeler HE, Wing C, Delaney SM, Komatsu M, Dolan ME. Modeling Chemotherapeutic Neurotoxicity with Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neuronal Cells. *Plos One* 2015; 10(2):e0118020.

Wind S, Beuerlein K, Eucker T, Mueller H, Scheurer P, Armitage ME, et al. Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors. *Br J Pharmacol* 2010; 161(4):885-898.

Winner B, Winkler J. Adult Neurogenesis in Neurodegenerative Diseases. *CSH Perspect Biol* 2015; 7(4):a021287.

Wolin M, Burke-Wolin T, Mohazzab-H K. Roles for NAD(P)H oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms. *Respir Physiol* 1999; 115(2):229-238.

Xin H, Li Y, Cui Y, Yang JJ, Zhang ZG, Chopp M. Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats. *J Cerebr Blood F Met* 2013; 33(11):1711-1715.

Xiong W, Garfinkel AEM, Li Y, Benowitz LI, Cepko CL. NRF2 promotes neuronal survival in neurodegeneration and acute nerve damage. *J Clin Invest* 2015; 125(4):1433-1445.

Yan Y, Gong K, Ma T, Zhang L, Zhao N, Zhang X, et al. Protective effect of edaravone against Alzheimer's disease-relevant insults in neuroblastoma N2a cells. *Neurosci Lett* 2012; 531(2):160-165.

Yan Y, Li S, Li H, Lin Y, Yang J. Osthole Protects Bone Marrow-Derived Neural Stem Cells from Oxidative Damage through PI3K/Akt-1 Pathway. *Neurochem Res* 2017; 42(2):398-405.

Yang Y, Duan W, Li Y, Yan J, Yi W, Liang Z, et al. New role of silent information regulator 1 in cerebral ischemia. *Neurobiol Aging* 2013; 34(12):2879-2888.

Yi F, He X, Wang D. Lycopene Protects Against MPP+-Induced Cytotoxicity by Maintaining Mitochondrial Function in SH-SY5Y Cells. *Neurochem Res* 2013; 38(8):1747-1757.

Yin A, Miraglia S, Zanjani E, AlmeidaPorada G, Ogawa M, Leary A, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; 90(12):5002-5012.

Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, Miyake K, Kang KW, Choi YJ, et al. Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of toll-like receptor by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea. *Biochem Pharmacol* 2006; 72(7):850-859.

Zhang S, Hedskog L, Petersen CAH, Winblad B, Ankarcrona M. Dimebon (Latrepidine) Enhances Mitochondrial Function and Protects Neuronal Cells from Death. *J Alzheimer Disease* 2010; 21(2):389-402.

Zhang T, Yang X, Liu T, Shao J, Fu N, Yan A, et al. Adjudin-preconditioned neural stem cells enhance neuroprotection after ischemia reperfusion in mice. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8:248.

Zhao L, Wei X, Ma Z, Feng D, Tu P, Johnstone BH, et al. Adipose stromal cells-conditional medium protected glutamate-induced CGNs neuronal death by BDNF. *Neurosci Lett* 2009; 452(3):238-240.

Zhao S, Wehner R, Bornhaeuser M, Wassmuth R, Bachmann M, Schmitz M. Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells and Their Therapeutic Consequences for Immune-Mediated Disorders. *Stem Cells Dev* 2010; 19(5):607-614.

Zheng Y, Liu J, Wang J, Xu L. Effects of crocin on reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia. *Brain Res* 2007; 1138:86-94.

Zhu H, Bian C, Yuan J, Chu W, Xiang X, Chen F, et al. Curcumin attenuates acute inflammatory injury by inhibiting the TLR4/MyD88/NF-kappa B signaling pathway in experimental traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* 2014; 11:59.

Zuccato C, Valenza M, Cattaneo E. Molecular Mechanisms and Potential Therapeutical Targets in Huntington's Disease. *Physiol Rev* 2010; 90(3):905-981.

Zuo L, Motherwell MS. The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease. *Gene* 2013; 532(1):18-23.