

Metodologías utilizadas en la diferenciación de células madre mesenquimales a linaje neuronal

Methodologies used in the differentiation of mesenchymal stem cells to neuronal lineage

Diana Katherine Garzón-Perdomo (1,2), Lina María De los Reyes (1,2), Liliana Francis Turner (1,2)

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: las células madre mesenquimales son células con la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse a linajes mesenquimales e inclusive a células de origen no mesenquimal, como las del tejido nervioso. Teniendo en cuenta la idoneidad de estas células para diferenciarse en neuronas, han sido utilizadas con propósitos terapéuticos debido a que son capaces de restaurar neuronas que se deterioran en diversas enfermedades neurodegenerativas.

OBJETIVO: informar y comparar los métodos más utilizados para inducir a las células madre mesenquimales a diferenciarse en neuronas, además de mencionar las ventajas y desventajas de cada una de estas.

METODOLOGÍA: la primera metodología para inducir a la diferenciación neural fue utilizada en 1999 y a partir de ese momento, se han empleado compuestos químicos, factores de crecimiento, compuestos sintéticos, entre otros métodos para diferenciar este tipo de células a linaje neuronal. El problema radica en que algunas de estas metodologías son tóxicas para las células, costosas o presentan otro tipo de efecto colateral.

CONCLUSIÓN: la elección de uno de estos métodos depende de los intereses y las condiciones con las que cuenta cada investigador. Además, es indispensable conocer las falencias que tenemos en este campo de la investigación con el propósito de continuar con la búsqueda de alternativas que no tengan desventajas, si no por el contrario, reúna todas las ventajas de los métodos aquí mencionados.

PALABRAS CLAVES: célula, diferenciación celular, enfermedades neurodegenerativas, metodologías, terapia celular, neuronal (DeCS).

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Diana Katherine Garzón Perdomo: búsqueda de información, discusión de resultados, escritura y elaboración de la estructura del manuscrito.

Lina María De los Reyes: Elaboración de la estructura del artículo, revisión y escritura del documento.

Liliana Francis Turner: revisión del artículo.

SUMMARY

INTRODUCTION: Mesenchymal stem cells are cells with the ability to self-renew and differentiate into mesenchymal lineages and even cells of non-mesenchymal origin, such as those of nerve tissue. Taking into account the suitability of these cells to differentiate into neurons, they have been used for therapeutic purposes since they are able to restore neurons that deteriorate in various neurodegenerative diseases.

OBJECTIVE: To inform and to compare the methods most used to induce mesenchymal stem cells to differentiate into neurons and to mention the advantages and disadvantages of each of these.

DEVELOPMENT: The first methodology to induce neural differentiation was used in 1999 and since then, chemical compounds, growth factors, synthetic compounds have been used, among other methods to differentiate this type of cells into neuronal lineage. The problem is that some of these methodologies are toxic to cells, expensive or have other side effects.

(1) Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Universidad del Tolima, Colombia

(2) Grupo de Investigación Modelos Experimentales para las Ciencias Zoológicas, Universidad del Tolima, Ibagué.

CONCLUSION: The choice of one of these methods depends on the interests and the conditions that each researcher has. In addition, it is indispensable to know the shortcomings that we have in this field of research with the purpose of continuing with the search for alternatives that do not have disadvantages, if not by the contrary, gather all the advantages of the methods mentioned here.

KEY WORDS: Cell differentiation, stem cells, methodologies, neural differentiation, neurodegenerative diseases (MeSH).

INTRODUCCIÓN

Las células madre mesenquimales (CMM) denominadas así debido a su vinculación con la formación de tejidos mesenquimales durante el desarrollo embrionario (1), son células multipotenciales cuya fuente principal es la médula ósea (MO) (2,3), tienen la capacidad de autorrenovarse, y diferenciarse a linajes mesenquimales como osteogénico, adipogénico, miogénico y epidérmico, aunque también se ha demostrado su capacidad de diferenciarse a células de origen no mesenquimal, como las del tejido nervioso (1,4-6).

Diversos estudios han demostrado que las células del estroma de la MO pueden ser diferenciadas a células neuronales *in vitro* (7,8), e *in vivo*, en ensayos clínicos de trasplante de células estromales en MO humana para el tratamiento de la paraplejia traumática (9). Para inducir a la diferenciación neural han sido utilizadas diferentes metodologías; que incluyen desde el empleo de compuestos químicos (7), hasta la adición de factores neurotróficos a los cultivos (9).

Dada la capacidad de las CMM para diferenciarse a células neuronales, estas han sido utilizadas con fines terapéuticos en humanos con enfermedades neurodegenerativas (1), encontrándose que las células madre (CM) tienen potencial para restaurar neuronas y estructuras dañadas en enfermedades como Parkinson (10), esclerosis lateral amiotrófica (11-13), Alzheimer (14), esclerosis múltiple y en lesiones medulares (15).

Finalmente, las enfermedades neurodegenerativas ocasionan una significativa pérdida de células nerviosas; por lo que la diferenciación de CMM a neuronas es una alternativa a este problema. El objetivo de esta revisión es informar y comparar los métodos más utilizados para inducir a las CMM a diferenciarse en neuronas, además de mencionar las ventajas y desventajas de cada una de estas.

Estrategia de búsqueda

Se efectuó una búsqueda bibliográfica en Scopus, Science Direct y Google Scholar entre otras bases de datos, utilizando palabras como: “Diferenciación neural”, “Diferenciación celular”, “Células Madre”, “Stem cells”, “Neural Differentiation”. Se utilizaron artículos de hasta 10 años de

antigüedad y cuando se consideró necesario, se utilizaron artículos más antiguos, teniendo en cuenta su importancia. Por último, la lista final de publicaciones fue seleccionada de acuerdo con la pertinencia para el tema tratado.

Concepto y clasificación de células madre

El término “célula madre” tiene un número de diferentes significados dependiendo del sistema analizado y de la perspectiva del investigador que usa el término (16). Sin embargo, de manera general las CM se definen como un tipo especial de células indiferenciadas que, entre otras características, tienen la capacidad de dividirse indefinidamente sin perder sus propiedades (capacidad de autorrenovación) y, a la vez, pueden diferenciarse en múltiples tipos de células especializadas (capacidad de diferenciación) (16-19). Las CM se clasifican según su estado evolutivo y su potencial de diferenciación como se puede apreciar en la figura 1.

Concepto de células madre mesenquimales

Las CMM son el grupo de CM somáticas que no producen linajes sanguíneos, pero tienen la capacidad para diferenciarse en células mesodérmicas; también se pueden diferenciar en células del tejido nervioso. Estas presentan características como la expresión de los antígenos CD73 (glicoproteína relacionada con mecanismos de adhesión celular), CD90 (marcador de precursores mesenquimales tempranos) y CD105 (2,4,20), que permiten identificar las CMM (21,22). Adicionalmente, estas células son adherentes al plástico, lo que facilita su mantenimiento en cultivos celulares (19). Además, tienen propiedades antiinflamatorias y antiapoptóticas, haciéndolas atractivas para su empleo en protocolos de terapia celular (19,23).

Diferenciación celular: el secreto de las células madre mesenquimales

La diferenciación ocurre cuando una célula inmadura se convierte en una madura de su propio linaje, dentro del mismo tipo de células (24). Otros autores consideran que es la capacidad de las CMM de diferenciarse en múltiples células de tipo mesodérmico, como osteoblastos, condroblastos y adipoblastos (25). En el 2012, se afirmó que

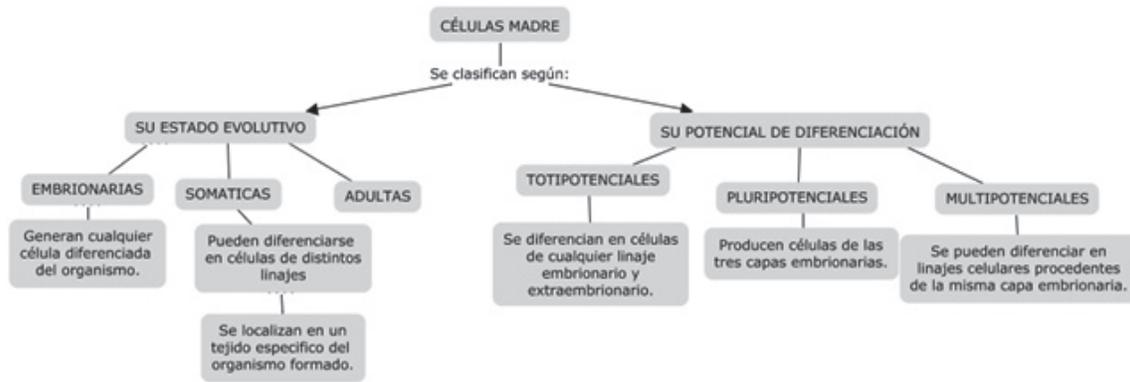


Figura 1. Clasificación de las células madre. Elaborada en: <http://cmap.ihmc.us/>

la diferenciación consiste en que determinados genes se vayan silenciando a lo largo del desarrollo, de forma que la potencialidad de las células se va estrechando, hasta que acaban por pertenecer a un tipo celular concreto, con un programa de expresión génica específico (26).

Diferenciación neural de células madre mesenquimales y su potencial terapéutico

Desde hace más de un década, estudios han señalado que las células del estroma de la MO humana pueden diferenciarse en células neuronales *in vitro* (7,8,27), vislumbrándose el potencial terapéutico de estas células. La capacidad de autorrenovación, la multipotencia y la presencia en el cerebro adulto, son características centrales para la aplicación terapéutica de las CM en la reparación del sistema nervioso central por las siguientes razones (10,28):

- La capacidad de autorrenovación genera nuevas células que reemplazan células perdidas o proporciona apoyo nutritivo al tejido residual.
- Al ser multipotenciales, las CM generan múltiples tipos de células para cualquier tejido dado. Por consiguiente, estas células poseen el beneficio adicional de producir no sólo cualquier célula, sino células neuronales en particular (es decir, neuronas, astrocitos y oligodendrocitos).
- La persistencia de las CM en la edad adulta aumenta las posibilidades pertinentes para la rehabilitación.

Estudios han corroborado el potencial terapéutico que tienen las CM en enfermedades neurodegenerativas. Este es el caso del estudio llevado a cabo por Tamara en el 2015, quien observó mejoría en pacientes con enfermedad de Parkinson después de recibir tratamiento con CM adultas (29). Por lo tanto, la terapia celular es una estrategia que

puede modificar favorablemente el curso de este tipo de enfermedades (30,31).

Es importante mencionar que varios autores puntualizan que después de más de 10 años de descubrimiento de las CMM, estas continúan ofreciendo inmensas posibilidades en el campo biomédico (32). Esto coincide con lo señalado por otros autores, quienes indican que los resultados obtenidos a partir de los estudios preclínicos y clínicos llevados a cabo en la última década demuestran que las CMM poseen una elevada capacidad inmunomoduladora, regenerativa y de cicatrización, además de actuar en las zonas dañadas como soporte trófico de las células lesionadas (20).

Metodologías para inducir a la diferenciación neuronal de las CMM

Diferenciación de CMM empleando compuestos químicos:

El primer reporte a cerca de la diferenciación neuronal de CMM *in vitro* se publicó en el año 2000, donde los autores utilizaron el 2-beta-mercaptoetanol (BME) como inductor de este proceso (7). A partir de ese momento, otros autores emplearon la misma metodología con algunas modificaciones (33). Vaquero, et al., (9) evaluaron algunos compuestos químicos que se han utilizado para inducir a la diferenciación neuronal de las CMM. Para esto, utilizaron el hidroxianisol butilado (BHA) además del BME, y cuantificaron el porcentaje de células que expresaban marcadores neuronales.

Mu, et al., (34) compararon la efectividad de compuestos como la tretinoína (ATRA), el dimetilsulfóxido (DMSO), el BHA, y la indometacina/3- isobutil - 1 - metilxantina (IBMX) además del BME, sobre la diferenciación neuronal.

Woodbury, et al., (7) cultivaron las CMM en medio de preinducción neural que contenía 1mM de BME y posteriormente en medio de inducción neuronal compuesto de 1-10 mM de BME. En experimentos posteriores, cambiaron el medio de inducción neuronal y utilizaron 2 % de DMSO y 200 mM de BHA. Finalmente, para optimizar la diferenciación eliminaron el BME y adicionaron 10 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) en el medio de preinducción (7). Encontrando que la proporción de células que presentan caracteres neuronales aumentó al usar el bFGF y eliminar el BME. La mayoría de CMM tratadas con esta metodología exhiben morfologías neuronales y expresión de enolasa neuronal específica (NSE) (78,2 % +/- 2,3 %) y neurofilamentos NF-M (79,2 % +/- 2,5 %) (7).

Por otra parte, Sánchez, et al., (33) utilizaron el BME (0,001 %) en el medio de crecimiento para las CMM. Después del segundo pasaje, el medio de cultivo fue reemplazado por medio de cultivo que contenía transferrina (100 mg / ml), putrescina (60 mM), insulina (25 mg / ml), progesterona (0,02 mM), selenio (0,03 mM), ácido trans-retinoico (RA) (0,5 mM) y BDNF (10 ng / ml) (33). Generando que la expresión de la proteína nestina en relación con la α -tubulina disminuyera en los cultivos tratados con RA o RA + BDNF. Y curiosamente, tanto GFAP y NeuN se expresaron bajo todas las condiciones de cultivo, incluido el grupo control (33).

Vaquero, et al., (9) cultivaron las CMM aisladas de la MO en medio con 1mM de BME como medio de preinducción, posteriormente, las células fueron transferidas a medio con 2 % de DMSO y 200 μ M de BHA como medio de inducción neural. Para revertir los efectos de los compuestos químicos, reprodujeron el estudio, pero adicionando 1 ml de LCR humano, en el medio de preinducción neural (9). Evidenciando un 90 % \pm 8 % de células NSE positivas, 88 % \pm 5 % de células NF-200 positivas y 90 % \pm 3 % de células B-tubulina positivas. Respecto al segundo grupo de estudio que contenía LCR, el porcentaje de células que expresaban los marcadores fue similar, (NSE 92 % \pm 4 %, NF-200 90 % \pm 6 % y B-tubulina 86 % \pm 5 %). Por lo tanto, los factores neurotróficos presentes en el LCR, no modificaron el proceso de diferenciación neural de CMM mediado por agentes químicos (9).

En otra investigación, las CMM fueron cultivadas en el medio de preinducción que contenía 10 ng/ml de bFGF y 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF). Después, las CMM se cultivaron en medio de inducción con diferentes inductores de diferenciación neural (1mM de BME, 10-3 mM de ATRA, 0,2 % DMSO/ 0,2 mM BHA, y 0,12 mM de indometacina / 0,3 mM de IBMX) durante 48 horas (34). Las CMM inducidas con indometacina / IBMX expresaron los niveles más altos de marcadores neurales respecto a las CMM inducidas por BME, ATRA y DMSO/

BHA. Finalmente, los resultados mediante Western blot confirmaron que las CMM inducidas con indometacina / IBMX expresaron MAP2 y GFAP en mayor cantidad, aunque se evidenció un ligero decrecimiento en la expresión de Nestina (34).

Diferenciación de CMM usando factores de crecimiento:

Chen, et al., (35) evaluaron el efecto del factor de crecimiento nervioso (NGF), el BDNF y el bFGF en combinación para promover la proliferación y diferenciación de CMM in vitro (35). Además, Huat, et al., (36) analizaron cuatro combinaciones de factores de crecimiento en la diferenciación neural de CMM que incluía el factor inhibidor de leucemia (LIF), el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), el EGF, el bFGF y el BDNF.

Chen, et al., (35) utilizaron diferentes combinaciones de factores neurotróficos formando los siguientes grupos: grupo 1 (NGF (100 g / L)), grupo 2 (BDNF (100 g / L)), grupo 3 (bFGF (20 g / L)), grupo 4 (bFGF+NGF), grupo 5 (BDNF+ bFGF), grupo 6 (BDNF+ NGF), grupo 7 (bFGF+ NGF+BDNF) y al grupo 8, no se le añadió ningún factor neurotrófico. Los autores encontraron que la combinación de NGF+BDNF+ bFGF diferenció el 50,39 % de células a linaje neural mediante la expresión de NSE y el 23, 29 % expresó GFAP diferenciándose a linaje glial. En cambio, en el grupo control, el 15,02 % de células expresaron NSE y el 14,75 % expresó GFAP. En los grupos en los que se les adicionó dos factores neurotróficos, se halló un mayor número de células que expresaban NSE, en comparación a los grupos que solo contenían un factor neurotrófico (35).

Por su parte, Huat, et al., (36) formaron 4 grupos experimentales: grupo A (EGF + bFGF + LIF), grupo B (EGF + bFGF + IGF-1), grupo C (EGF+bFGF+ LIF), grupo D (EGF + bFGF + BDNF) y grupo control (sin factores de crecimiento) y hallaron que el 94 % de células del grupo A (EGF+ bFGF +LIF), el 93,7 % del grupo B (EGF + bFGF + IGF-1), el 94,7 % del grupo C (EGF+bFGF+ LIF), el 95,7 % del grupo D (EGF + bFGF + BDNF) y el 53,4 % de las células del grupo control expresaron nestina (36).

Diferenciación de CMM usando otras metodologías:

La galanina es un neuropéptido ampliamente expresado en el sistema nervioso, desempeña funciones en diversas funciones fisiológicas y actúa como factor neurotrófico y neuroprotector para varias poblaciones neuronales (37). Por esta razón, Cordero, et al.,(37) trataron de determinar el papel de la galanina en las CMM, y su contribución a la

plasticidad del sistema nervioso cultivando estas células en 10 nM de galanina(37)

Después de la diferenciación, los cultivos tratados con galanina mostraron un marcado aumento en el número de células Tuj1 + (el $3,31 \pm 0,73$ % de células en el grupo control y el $13,77 \pm 2,00$ % de células en el grupo tratado con 100 nM de galanina expresaron Tuj1). El número de neuronas recién generadas (Tuj1+ / BrdU+) también fue incrementado por la galanina (el $1,94 \pm 0,19$ % de células en el grupo control y el $7,28 \pm 0,49$ % de células tratadas con 100 nM de galanina expresaron Tuj1 / BrdU) (37).

Por otra parte, Gong, et al.,(38) consideran que aunque el ácido retinoico (RA) desempeña un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso, sus efectos en la diferenciación neuronal de CMM y los mecanismos a través de los cuales esta diferenciación tiene lugar, todavía son poco conocidos (38). De igual forma, Xu, et al., (39) afirman que el RA tiene un rol importante en muchos aspectos del sistema nervioso, lo que implica la diferenciación y el patrón neural .

Gong, et al.,(38) sembraron las CMM y al alcanzar tercer y sexto pasaje, adicionaron medio de cultivo DMEM-F12 que contenía 1 μ M de RA durante 24 horas. Finalmente, el medio fue sustituido por medio neuronal modificado (1,6 % DMSO, 160 μ M de BHA, 20 mM KCl, 1,6 mM de ácido valproico, 8 μ M de forskolin, 0,8 μ M de hidrocortisona, 4 μ g/ml de insulina) durante 24 horas (38).

Este método generó que la expresión de mRNA de marcadores neuronales (nestin, NSE, MAP-2 y Tau) en las células de tipo neural derivadas de CMM tratadas con RA fuera mayor que en CMM sin el RA ($P < 0,05$). Finalmente, en la inmunofluorescencia, el 70 % de las células tratadas con RA expresaron NSE a comparación del 10 % de las células del grupo control (38).

DISCUSIÓN

En bases de datos como Scopus se puede apreciar que el tema de la diferenciación neuronal ha venido aumentando el interés en varios investigadores, a pesar de esto en Colombia son pocas las investigaciones con este propósito; por lo que se hace importante las investigaciones en este campo. Anteriormente se mencionan algunas de las metodologías utilizadas, pero ¿Qué ventajas y/o desventajas tienen cada una de éstas?

Woodbury, et al., (7) indican, que la metodología que ejecutaron, lleva a que las CMM se diferencien a neuronas, e incluso sugieren que este estudio debe tenerse en cuenta para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, respecto a esta metodología es importante resaltar que al reemplazar el BME por el bFGF, se aumentó

el número de células neuronales, de un 50 hasta un 78 %. Esto se puede deber a lo mencionado por otros autores, quienes indican que los compuestos químicos como el BME son tóxicos, y cuestionan la posibilidad de que este tipo de sustancias generen estrés celular y a su vez, una morfología similar a la neuronal (9,40–43), pero no genera respuestas electrofisiológicas en dichas células (40). Sin embargo, otros autores mencionan que el BME es un agente reductor que contribuye en la diferenciación y proliferación celular, e incluso, aumenta de 6 a 200 veces la supervivencia celular (44).

El uso del BME inició en el año 2000 y se ha extendido hasta los últimos años. Por ejemplo, Shu, et al., (45) usaron este compuesto químico para inducir a la diferenciación neural de CM y Tyagi, et al., (46) emplearon además de BME, la misma metodología de Woodbury, et al., (7) para el mantenimiento y diferenciación de CMM pero agregando nuevas variables (7,45,46).

Adicionalmente, Vaquero, et al., (9) usaron el LCR con el propósito de mitigar el impacto negativo generado por los agentes químicos, pero al finalizar su estudio se dieron cuenta que cuando las CMM son administradas en el espacio subaracnoideo, los factores neurotróficos del LCR no influyen significativamente en el proceso de diferenciación neural. Esto puede ser debido a la baja concentración del BDNF en el LCR (9).

Por otra parte, el problema principal del uso de los factores neurotróficos para inducir a la diferenciación neural es el elevado costo que tiene estos productos (47–49), convirtiéndose en una desventaja para la metodología de Chen, et al., (35), para la de Cordero – Llana, et al., (37) y para todas las metodologías en las que se utilicen estos factores .

La combinación de EGF, bFGF y BDNF en la metodología de Huat, et al.,(36) genera la mayor cantidad de células neuronales respecto a las demás metodologías mencionadas en esta revisión (tabla 1). Lo que no coincide con lo mencionado por Barnabé, et al., (40) quienes afirman que en la inducción química el porcentaje de diferenciación excede el 70 %, lo que es demasiado alto en comparación a la diferenciación neural usando factores de crecimiento. Además, estos autores señalan que el uso de compuestos químicos solo requieren pocas horas para inducir las CMM a adquirir características morfológicas y expresar marcadores específicos de las neuronas (40).

Por otra parte, aunque la metodología de Cordero-Llana et al., (37) tiene la ventaja de usar la galanina, que es un neuropéptido altamente distribuido en el sistema nervioso, que no va a causar problemas de toxicidad en las células, también emplea factores neurotróficos, que como se menciona anteriormente, son costosos (42,52-54). Los resultados obtenidos por Cordero, et al, (37) coinciden

Tabla 1. Efectividad de algunas de las metodologías utilizadas para inducir a la diferenciación neural respecto al porcentaje de células positivas a marcadores neuronales.

Compuesto utilizado	Marcador neuronal	% células	Autores
BME	NSE NF-M	78,2 ± 2,3 79,2 ± 2,5	Woodbury, et al., (7)
BME, DMSO, BHA	NSE NF-M	90 ± 8 88 ± 5	Vaquero, et al., (9)
Indometacina/IBMX	NESTINA NSE	2,2 ± 0,1 4.9 ± 0.8	Mu, et al., (34)
NGF, BDNF, bFGF	NSE	50,39	Chen, et al., (35)
EGF, bFGF, BDNF	NESTINA	95,7	Huat, et al., (36)
Galanina	TUJ1	13,77±2,00	Cordero, et al., (37)
Ácido retinoico	NSE	72	Gong, et al., (38)

BME: 2-beta-mercaptoetanol; DMSO: dimetilsulfóxido; BHA: hidroxianisol butilado; IBMX: 3- isobutil - 1 – metilxantina; NGF: factor de crecimiento nervioso; BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro; bFGF: factor de crecimiento fibroblástico básico; EGF: factor de crecimiento epidérmico; NSE: enolasa neuronal específica; NF-M: neurofilamentos; TUJ1: BIII tubulina.

con los obtenidos por Agasse, et al., (50) quienes señalan que la galanina es un inductor eficaz en la diferenciación neuronal de CMM y por lo tanto, mejora la neurogénesis debido a que promueve la proliferación de células precursoras neuronales.

Xu, et al., (39) y Gong, et al., (38) permiten confirmar que el RA juega un papel importante en la diferenciación de CMM al linaje neuronal. Sin embargo, el porcentaje de células diferenciadas a neuronas tampoco supera el porcentaje de células que expresan marcadores neurales en las metodologías en las que se usa compuestos químicos (7,9,38). De todas maneras, el RA debe tomarse en cuenta como una vitamina fundamental para la diferenciación neural. Es importante resaltar que Xu, et al., (39) recomiendan que la mejor concentración de RA para la diferenciación neural es 1µM(39).

Finalmente, como se puede apreciar a lo largo de esta revisión, son varias las metodologías que se han empleado para inducir a la diferenciación de CMM a neuronas, con el propósito de buscar tratamientos a enfermedades neurodegenerativas. Cada metodología presenta ventajas y desventajas, pero la elección de una u otra depende de las necesidades de cada autor. Es importante tener en cuenta, que se debe confirmar mediante diferentes métodos que las

células obtenidas sean neuronas, debido a que la plasticidad de las CM requiere una cuidadosa validación. También, se sugiere la búsqueda de alternativas naturales que no requieran de compuestos químicos, factores neurotróficos y/o cultivos costosos teniendo en cuenta de que varias especies de plantas prometen un efecto positivo sobre la diferenciación (51).

CONCLUSIÓN

No se encontró una metodología que además de generar un alto porcentaje de CMM diferenciadas a neuronas, no cause problemas de toxicidad, y tampoco genere elevados costos. Todas las metodologías mencionadas presentan desventajas por lo que el uso de cualquiera depende principalmente de las condiciones con las que cuente cada investigador y de las necesidades de la investigación. También es importante evaluar la diferenciación de CMM a neuronas empleando características morfológicas, moleculares y electrofisiológicas para garantizar los resultados.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan no tener conflictos de intereses en este estudio.

REFERENCIAS

- Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013;45(11):e54. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3849579&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Arévalo JA, Paéz DM, Rodríguez VM. Células madre mesenquimales : características biológicas y aplicaciones clínicas . *NOVA* [Internet]. 2007;5:177–84. Available from: http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/nova8_artrevis1.pdf
- Rodríguez-Fontan F, Chahla J, Piuzzi N, Payne K, Muschler G, La Prade R, et al. Células madre y progenitoras para la reparación de cartílago articular. *Rev Latinoam cirugía ortopédica* [Internet]. 2016;2(46):66–76. Available from: http://ac.els-cdn.com/S2444972516300262/1-s2.0-S2444972516300262-main.pdf?_tid=5e482762-fd67-11e6-81d5-00000aab0f01&acdnat=1488253288_6cd7178f6523b8129a81ed95585b7683
- Espinoza F, Aliaga F, Crawford P. Escenario actual y perspectivas de la terapia con células madre mesenquimales en medicina intensiva. *Rev Med Chile*. 2016;144:222–31.
- Knol A, Dréno B. Terapia celular en dermatología : inmunoterapia del melanoma y reparación cutánea. *EMC Dermatología*. 2015;49(15):1–15.
- Linero IM, Doncel A, Chaparro O. Proliferación y diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales en hidrogeles de plasma sanguíneo humano. *Biomédica*. 2014;34:67–78.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000;61:364–70.
- Zurita M, Vaquero J, Oya S, Aguayo C. Transdiferenciación neuronal de células madre mesenquimales de médula ósea humana. *MAPFRE-MEDICINA*. 2005;16:167–73.
- Vaquero J, Bonilla C, Otero L, Aguayo C, Oya S, Zurita M. Diferenciación neural de células del estroma de médula ósea humana en presencia de líquido cefalorraquídeo. *Trauma Fund MAPFRE*. 2008;19:212–7.
- Ross HH, Ambrosio F, Trumbower RD, Reier PJ, Behrman AL, Wolf SL. Neural Stem Cell Therapy and Rehabilitation in the Central Nervous System: Emerging Partnerships. *Phys Ther* [Internet]. 2016;96(5):734–42. Available from: <http://ptjournal.apta.org/content/96/5/734>
- Mazzini L, Fagioli F, Boccaletti R, Mareschi K, Oliveri G, Olivieri C, et al. Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans. *Rightlink*. 2003;4:158–61.
- Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, et al. Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Patients with ALS Can Be Differentiated into Motor Neurons. *Science (80-)* [Internet]. 2012;1218(2008):1218–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18669821>
- Petrou P, Gothelf Y, Argov Z, Gotkine M, Levy YS, Kassis I, et al. Safety and Clinical Effects of Mesenchymal Stem Cells Secreting Neurotrophic Factor Transplantation in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol* [Internet]. 2016;73(3):1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26751635>
- Tanna T, Sachan V. Mesenchymal stem cells: potential in treatment of neurodegenerative diseases. *Curr Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2014;9(6):513–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25248677>
- Prósper F, Gaviria J, Herreos J, Rábago G, Luquin R, Moreno J, et al. Transplante celular y terapia regenerativa con células madre. *An Sist Sanit Navar*, 29(Suplemento 2) [Internet]. 2006;29:16. Available from: [http://dSPACE.SI.UNAV.ES/dSPACE/bitstream/10171/17546/2/2006_ASSN_Proesper_Cell transplant and regenerative therapy with stem cells.pdf](http://dSPACE.SI.UNAV.ES/dSPACE/bitstream/10171/17546/2/2006_ASSN_Proesper_Cell%20transplant%20and%20regenerative%20therapy%20with%20stem%20cells.pdf)
- Temple S. Defining neural stem cells and their role in normal development of the nervous system. *Humana Press. Neural Development and Stem Cells* [Internet]. 2006. p. 1–28. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4614-3801-4_1#page-1
- Prósper F, Herreos J. Células madre adultas. *An Sist Sanit Navar*. 2004;26(3):345–56.
- Bulnes S, García-Blanco Á, Bengoetxea H, Ortuzar N, Argandoña EG, Lafuente J V. Células madre gliales y su relación en el proceso de angiogénesis tumoral. *Rev Neurol*. 2011;52(12):743–50.
- Sánchez-Cruz G, Milián-Rodríguez L. Potential terapeutico de las celulas madre derivadas de la medula ósea en el infarto cerebral. *Rev Neurol*. 2015;60(10):464–72.
- Guadix JA, Zugaza JL, Gálvez-Martín P. Características, aplicaciones y perspectivas de las células madre mesenquimales en terapia celular. *Med Clin (Barc)* [Internet]. Elsevier España, S.L.U.; 2017;(xx):1–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025775316306820>
- Arbos A, Nicolaua F, Quetglasa M, Ramisb JM, Monjob M, Muncunillc J, et al. Obtención de células madre mesenquimales a partir de cordones umbilicales procedentes de un programa altruista de donación de sangre de cordón. *Inmunología* [Internet]. Sociedad Española de Inmunología; 2013;32(1):3–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.inmuno.2012.11.002>
- Macías-Abraham C, del Valle-Pérez LO, Galván Cabrera JA, de la Cuétara Bernal K, Socarrás Ferrer BB, Hernández Ramírez P, et al. Caracterización fenotípica de células madre mesenquimales humanas de médula ósea y tejido adiposo. Resultados preliminares. *Rev Cuba Hematol Inmunol y Hemoter*. 2014;30(2):162–70.
- Hamidouche Z, Rother K, Przybilla J, Krinner A, Clay D, Hopp L, et al. Bistable Epigenetic States Explain Age-Dependent Decline in Mesenchymal Stem Cell Heterogeneity. *Stem Cells*. 2016;1:694–704.
- Aznar J. Diferenciación , transdiferenciación y reprogramación celular . Situación actual del tema. *Neuroscience* [Internet]. Valencia; 2011;12(3):79–89. Available from: <http://www.nature.com/nrn/journal/v12/n3/index.html>
- Fuentes Lacouture MF. Optimización del Sistema de Cultivo y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Obtenidas a partir de Medula Osea Humana [Internet]. Universidad Javeriana; 2008. Available from: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8349/tesis318.pdf;sequence=1>
- Franco Vera L. El apasionante mundo de las células madre. *Rev Acad Cienc Exact Fís Nat (Esp)*. 2012;105:327–52.

27. Zurita M, Bonilla C, Otero L, Aguayo C, Vaquero J. Neural transdifferentiation of bone marrow stromal cells obtained by chemical agents is a short-time reversible phenomenon. *Neurosci Res*. 2008;60:275–80.
28. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* [Internet]. 2014;21(2):216–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2013.158>
29. Tamara J. Terapia celular en la enfermedad de Parkinson y los factores que influyen en su éxito. *Horiz Med* [Internet]. 2015;4:44–51. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/hm/v15n4/a07v15n4.pdf>
30. Moraleda JM, Blanquer M, Gómez-espuch J, Iñiesta F, Hurtado V, Pérez-espejo MA, et al. Terapia con células madre en enfermedades neurodegenerativas. *Rev Hematol*. 2011;12(3):144–8.
31. Velázquez F, Caputto B. Aspectos generales de las células madre y su potencial aplicación en la medicina regenerativa (General overview of stem cells and their potential application in. *Bitácora Digit* [Internet]. 2013;1–6. Available from: <http://www.revistas.unc.edu.ar/index.php/Bitacora/article/view/4619>
32. Aznar J, Tudela J. Diez años desde el descubrimiento de las células iPS: estado actual de su aplicación clínica. *Rev Clínica Española* [Internet]. Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI); 2016;(xx). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rce.2016.08.003>
33. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 2000;164(2):247–56.
34. Mu MW, Zhao ZY, Li CG. Comparative study of neural differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by different induction methods. *Genet Mol Res* [Internet]. 2015;14(4):14169–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26535734>
35. Chen S-Q, Cai Q, Shen Y-Y, Cai X-Y, Lei H-Y. Combined use of NGF/BDNF/bFGF promotes proliferation and differentiation of neural stem cells in vitro. *Int J Dev Neurosci* [Internet]. International Society for Developmental Neuroscience; 2014;38:74–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0736574814001324>
36. Huat TJ, Khan AA, Pati S, Mustafa Z, Abdullah JM, Jaafar H. IGF-1 enhances cell proliferation and survival during early differentiation of mesenchymal stem cells to neural progenitor-like cells. *BMC Neurosci* [Internet]. 2014;15(1):91. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/15/91>
37. Cordero-Llana O, Rinaldi F, Brennan P a., Wynick D, Caldwell M a. Galanin promotes neuronal differentiation from neural progenitor cells in vitro and contributes to the generation of new olfactory neurons in the adult mouse brain. *Exp Neurol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014;256:93–104. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.04.001>
38. Gong M, Bi Y, Jiang W, Zhang Y, Chen L, Hou N, et al. Retinoic acid receptor beta mediates all-trans retinoic acid facilitation of mesenchymal stem cells neuronal differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;45(4):866–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23318218>
39. Xu J, Wang H, Liang T, Cai X, Rao X, Huang Z, et al. Retinoic acid promotes neural conversion of mouse embryonic stem cells in adherent monoculture. *Mol Biol Rep*. 2012;39(2):789–95.
40. Barnabé GF, Schwindt TT, Calcagnotto ME, Motta FL, Martínez G, de Oliveira AC, et al. Chemically-induced RAT mesenchymal stem cells adopt molecular properties of neuronal-like cells but do not have basic neuronal functional properties. *PLoS One*. 2009;4(4):1–11.
41. Borkowska P, Kowalska J, Fila-Daniłow A, Bielecka AM, Paul-Samojedny M, Kowalczyk M, et al. Affect of antidepressants on the in vitro differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into neuronal cells. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;73:81–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.03.016>
42. Krabbe C, Zimmer J, Meyer M. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells. A critical review. *APMIS* [Internet]. 2005;113(11–12):831–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16480453>
43. Scintu F, Reali C, Pillai R, Badiali M, Sanna MA, Argioli F, et al. Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments. *BMC Neurosci*. 2006;7(14):1–12.
44. Hernández A, Juárez E. Evolución del medio de cultivo en el estudio de las células madre neuronales. *Rev Med UV*. 2009;1(228):17–22.
45. Shu T, Pang M, Rong L, Zhou W, Wang J, Liu C, et al. Effects of *Salvia miltiorrhiza* on neural differentiation of induced pluripotent stem cells. *J Ethnopharmacol* [Internet]. Elsevier; 2014;153(1):233–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.02.028>
46. Tyagi J, Shah K, Sastri B, Sharma M, Rawal R. in-Vitro Model Showing Differentiation of Wharton ' s Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells (Mscs) to Neuronal Phenotype Through Supplementation of Bacopa Monneri : an in-Vitro Approach Jyotsana Tyagi Krupa Shah Bhoomi Sastri Mahesh Sharma Rakesh Rawal B. *Int J Sci Res* [Internet]. 2015;4(6):778–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23327619>
47. Constantinescu R, Constantinescu AT, Reichmann H, Janetzky B. Neuronal differentiation and long-term culture of the human neuroblastoma line SH-SY5Y. *J Neural Transm Suppl*. 2007;(72):17–28.
48. Li H, Liu H, Corrales CE, Risner JR, Forrester J, Holt JR, et al. Differentiation of neurons from neural precursors generated in floating spheres from embryonic stem cells. *BMC Neurosci* [Internet]. 2009 Jan [cited 2015 Apr 14];10(1):122. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/10/122>
49. Jung-Keug Park, Moon Young Yoon, Hyun Jin Cho, Young-Kwon Seo, Song Hee Jeon HHY. Method for inducing differentiation of mesenchymal stem cells to nerve cells using sonic waves [Internet]. 2011. Available from: <https://www.google.com.co/patents/WO2012053719A1?cl=en&dq=Method+for+inducing+differentiation+of+mesenchymal+stem+cells+to+nerve+cells+using+sound+waves&hl=es&sa=X&ei=h0QtVdLfDeaHsQTDxoHYDA&ved=0CCMQ6AEwAQ>
50. Agasse F, Xapelli S, Coronas V, Christiansen SH, Rosa AI, Sarda-Arroyo L, et al. Galanin promotes neuronal differentiation in murine subventricular zone cell cultures. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2013;22(11):1693–708. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23327619>
51. Reynertson KA, Charlson ME, Gudas LJ. Induction of murine embryonic stem cell differentiation by medicinal plant extracts. *Exp Cell Res* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;317(1):82–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.10.010>