

**CARACTERIZACIÓN DE ASTROCITOS A PARTIR DE CÉLULAS MESENQUIMALES
ESTROMALES DE SANGRE MESTRUAL COMO MODELO DE NEUROINFLAMACIÓN
EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

(Para optar el título de Magister en Ciencias Básicas Biomédicas- Énfasis en Neurociencias)

Presentado por:

YULIETH CATHERINE QUINTERO QUINCHIA
Microbióloga y bioanalista.

Tutor:

CARLOS VÉLEZ PARDO, M.Sc. Dsc.

Comité Tutorial:

DORA MARÍA BENJUMEA GUTIÉRREZ, D.Sc.
MARLENE JIMÉNEZ DEL RÍO, M.Sc. D.Sc.
MIGUEL ANGEL MENDIVIL PÉREZ, M.Sc. D.Sc.

CORPORACIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
MEDELLÍN
2021

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS

| | |
|---------------|---|
| RESUMEN ----- | 6 |
|---------------|---|

Palabras claves

| | |
|----------------|---|
| ABSTRACT ----- | 7 |
|----------------|---|

Keywords

| | |
|------------------------|---|
| LISTA DE FIGURAS ----- | 8 |
|------------------------|---|

| | |
|-----------------------|---|
| LISTA DE TABLAS ----- | 8 |
|-----------------------|---|

PARTE I: MARCO TEÓRICO

CAPITULO I: Enfermedad de Alzheimer (EA)

| | |
|---|----|
| 1 1. Definición..... | 9 |
| 1 2. Clasificación | 9 |
| 1.3. Epidemiología | 10 |
| 1 4. Manifestaciones clínicas | 10 |
| 1.5. Neuropatología en la EA Familiar (EAF)----- | 11 |
| 1.5.1. Acumulación del péptido β amiloide----- | 11 |
| 1.5 2. Formación de ovillos neurofibrilares | 12 |
| 1.6. Neuroinflamación en la EAF..... | 13 |
| 1 7. Etiología..... | 15 |
| 1.7.1 Factores genéticos | 15 |
| 1.7.1.1. Mutaciones en la proteína precursora amiloide (PPA)----- | 16 |
| 1.7.1 2. Mutaciones en las presenilinas..... | 17 |
| 1 8. Factores riesgo de la EAF..... | 18 |
| 1.8.1. Gen APOE4 | 18 |
| 1.8.2. Factores modificables | 18 |
| 1.8.3. Edad | 19 |
| 1.9. Tratamiento | 19 |

CAPITULO II: Células Mesenquimales Estromales como modelo de la enfermedad de Alzheimer familiar

| | |
|--|----|
| 2.1. Definición de Células Mesenquimales Estromales (CME)----- | 21 |
| 2.2. Caracterización morfológica e inmunofenotípica ----- | 21 |
| 2.3. Fuentes de obtención..... | 22 |
| 2.4. Características biológicas y moleculares..... | 24 |
| 2.5. Las CME y su capacidad de transdiferenciación ----- | 25 |
| 2.6. Mecanismos de transdiferenciación celular ----- | 25 |
| 2.6.1. Transdiferenciación en neuronas..... | 25 |
| 2.6.2. Transdiferenciación en astrocitos ----- | 26 |
| 2.7. Aplicación de las CME en investigación y clínica----- | 28 |

CAPITULO III: Los astrocitos y la neuroinflamación en la EA

| | |
|---|----|
| 3.1. Descripción de los astrocitos ----- | 29 |
| 3.2. Características morfológicas----- | 29 |
| 3.3. Características inmunofenotípicas..... | 30 |
| 3.4. Los astrocitos en la neuroinflamación..... | 31 |
| 3.4.1. Inducción de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias secretadas por astrocitos ----- | 33 |
| 3.5. Astrocitos y estrés oxidativo..... | 34 |

PARTE II: INVESTIGACIÓN

CAPITULO IV: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE LA INVESTIGACION-----37

CAPITULO V: DESARROLLO DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

| | |
|-----------------------------------|----|
| 4.1. Hipótesis..... | 39 |
| 4.2. Objetivos del proyecto..... | 39 |
| 4.2.1. Objetivo general..... | 39 |
| 4.2.2. Objetivos específicos..... | 39 |

CAPITULO VI: DESARROLLO DE LOS OBJETIVOS Y METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

6.1. MATERIALES Y MÉTODOS.

| | |
|--|----|
| 6.1.1 Aislamiento de CME-SM..... | 40 |
| 6.1.2 Caracterización de CME-SM..... | 40 |
| 6.1.3 Ensayo de transdiferenciación de CME-SM a Células similares a astrocitos (CSA) ----- | 40 |
| 6.1.4 Análisis de citometría de flujo de marcadores astrocíticos ----- | 40 |
| 6.1.5 Evaluación de marcadores astrocíticos mediante Western blot ----- | 41 |
| 6.1.6 Evaluación de marcadores astrocíticos y el factor de NF-κB mediante inmunofluorescencia----- | 41 |
| 6.1.7 Evaluación de calcio intracelular | 41 |
| 6.1.8 Evaluación de secreción de citoquinas por ELISA----- | 42 |
| 6.2.8. Análisis de datos ----- | 42 |

CAPITULO VII: RESULTADOS

| | |
|--|----|
| 7.2.1. Caracterización de CME- SM ----- | 43 |
| 7.2.2. Las CME disminuyen marcadores Mesenquimales (CD 9 Y CD 73) con la exposición al medio de cultivo comercial..... | 44 |
| 7.2.3. Las CME- SM aumentan marcadores astrocíticos con la exposición al medio de cultivo comercial. | 45 |
| 7.2.4. El glutamato favorece la acumulación intracelular de Ca ²⁺ en CSA ----- | 48 |
| 7.2.5 Las CSA aumentan marcadores astrocíticos con la exposición a estímulos proinflamatorios ----- | 49 |
| 7.2.6. Las CSA activan NF-κB en presencia de estímulos proinflamatorios ----- | 52 |
| 7.2.7. Las CSA producen citoquinas proinflamatorias ----- | 52 |

CAPITULO VIII. DISCUSIÓN-----

CAPITULO IX. CONTRIBUCIONES O APORTES CIENTÍFICOS-----

CAPITULO X. CONCLUSIONES -----

CAPITULO XI. PERSPECTIVAS

BIBLIOGRAFIA -----

AGRADECIMIENTOS

“Caminante, son tus huellas el camino y nada más; Caminante, no hay camino, se hace camino al andar. Al andar se hace el camino, y al volver la vista atrás se ve la senda que nunca se ha de volver a pisar. Caminante no hay camino sino estelas en la mar”

Antonio Machado

En este camino que he transitado a lo largo de estos años debo mi profundo agradecimiento a los Drs Vélez- Jiménez, porque en definitiva confiaron en mí y me brindaron la primera oportunidad para comenzar con mi vocación científica, esos hechos jamás se olvidan. Como mentores han guiado y cuidado mi formación, procurando esculpir una buena investigadora.

También agradezco sinceramente al Doctor Miguel por enseñar con suma paciencia, por su disposición y consejo. Mi admiración y respeto porque me has ensañado que un buen maestro, es afable y cercano. Agradezco a Vivi por sus consejos oportunos, su calidez y alegría, llenando los espacios de color y magia. A Diana por sus detalles, buena cocina y conversaciones mañaneras. A Dani por ayudarme con mis conexiones perdidas.

Gracias a Natalia, Cristina, Carolina, por haber transformado las situaciones cotidianas en agradables y porque trabajar en un grupo como este no tiene precio.

Mil gracias a mis compañeros Claudia, Gloria, Mary Luz, Juan Pablo y Santi por su acogida, cariño y apoyo. Los llevo en el corazón.

A mis queridas amigas Anlly y Jazmin, me alegra haber coincidido con ustedes en esta temporalidad y espacio que nos presenta la vida, ustedes me han reconfortado en mis días tristes, acompañado en los momentos más importantes y han compartido mis alegrías. Gracias a mis amigos de siempre: Álvaro, Iván, Esteban, Mar y Camila por su lealtad y generosidad en este proceso.

Dedico este logro a mi familia quien conoce mi lucha y los sacrificios de renuncia por no poder acompañarlos como debería ser, especialmente a mi padre...vez papá, hay esperanza, más importante que las condiciones con que se nacen, es el empuje en los sueños.

A todos mil veces gracias, les deseo buenos vientos y buena mar.

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo y la causa más importante de demencia a nivel mundial. En el departamento de Antioquia, se descubrió la mutación E280A-PSEN1 (mutación Paisa) causal de la EA familiar precoz. Esta mutación aumenta la producción y acumulación del péptido A β promoviendo una respuesta inflamatoria mediada por microglía y astrocitos, activando así las vías de señalización que podrían conducir a la neurodegeneración.

Actualmente, no se han establecido completamente los mecanismos biológicos de la EA, ni el papel que juegan los astrocitos en los procesos de neuroinflamación. Esta limitación, está relacionada con la carencia de modelos naturales adecuados que simulen la fisiopatología de la enfermedad y permitan un enfoque multifactorial en el entendimiento de la patología desde el estudio de otras células de importancia clínica como son los astrocitos, las cuales son las células gliales más abundantes a nivel de sistema nervioso central y que cumplen variadas funciones en la homeostasis, la comunicación celular y la respuesta inmune; además están implicados desde etapas tempranas en procesos neurodegenerativos. Por lo cual, el presente trabajo tiene como finalidad establecer un modelo de neuroinflamación mediante la diferenciación de células mesenquimales estromales (CME) de sangre menstrual (SM) a astrocitos, y posterior evaluación de la capacidad de respuesta inmunológica a través de la estimulación con compuestos proinflamatorios. En este contexto, las células transdiferenciadas a células similares a astrocitos fueron estimuladas con lipolisácarido (LPS), péptido A β 42 y sobrenadante de células colinérgicas (CC) PSEN1- E280A en función de la expresión y activación del marcador NF- κ B, citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 β e IL-6, y los marcadores de linaje, la proteína acida fibrilar glial (por su sigla en inglés, glial fibrilar acidic protein, GFAP) y la proteína S100 β . Como resultado describimos un método rápido y robusto para la diferenciación de CME-SM a células similares a astrocitos, a través de un protocolo de 7 días con la utilización de un medio comercial para el mantenimiento de astrocitos. El análisis reveló que las CME-SM expresan constitutivamente GFAP y S100 β , proteínas que incrementan con el uso del medio para mantenimiento de astrocitos en un 25% y 59% en los días 4 y 7. Además responden a la estimulación con glutamato con el incremento de calcio intracelular, la activación del factor nuclear NF- κ B y la producción de citoquinas proinflamatorias.

Palabras claves: células mesenquimales estromales, sangre menstrual, transdiferenciación, astrocitos, neuroinflamación.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder, and the most important cause of dementia worldwide. In the department of Antioquia, the E280A-PSEN1 mutation ("Paisa mutation"), the cause of early familial AD, was discovered. This mutation increases the production and accumulation of the A β peptide promoting an inflammatory response mediated by microglia and astrocytes, thus activating the signaling pathways that could lead to neurodegeneration. Currently, the biological mechanisms of AD have not been fully established, nor the role that astrocytes play in neuroinflammation processes. This limitation is related to the lack of adequate natural models that simulate the pathophysiology of the disease and allow a multifactorial approach in understanding the pathology from the study of other cells of clinical importance such as astrocytes. These cells are abundant at the central nervous system level and fulfill various functions in homeostasis, cellular communication and the immune response; they are also involved from early stages in neurodegenerative processes. Therefore, the present work aims to establish a model of neuroinflammation through the differentiation of mesenchymal stromal cells (MSCs) from menstrual blood (MenB) to astrocytes, and subsequent evaluation of the immune response capacity through stimulation with pro-inflammatory compounds. In this context, cells transdifferentiated to astrocyte-like cells were stimulated with lipopolysaccharide (LPS), A β 42 peptide and cholinergic cell supernatant (ChCS) PSEN1-E280A as a function of the expression and activation of the marker NF- κ B, pro-inflammatory cytokines such as TNF α , IL-1 β and IL-6, and the marker acidic fibrillar acid protein (for its acronym in English, glial fibrillar acidic protein, GFAP), and the protein S100 β . As a result, we describe a rapid and robust method for the differentiation of MSCs-SM to astrocyte-like cells (ALCs), through a 7-day protocol using a commercial medium for the maintenance of astrocytes. The analysis revealed that the CME- MenB constitutively express GFAP and S100 β , proteins that increase with the use of the medium for astrocyte maintenance by 25% and 59% on days 4 and 7. They also respond to glutamate stimulation with the increase of intracellular calcium, the activation of the nuclear factor NF- κ B and the production of proinflammatory cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figuras introductorias

| | |
|---|----|
| Figura 1. Neuropatología de la EA en cerebro humano ----- | 9 |
| Figura 2. Producción del péptido A β | 11 |
| Figura 3. Patofisiología de la enfermedad de Alzheimer ----- | 14 |
| Figura 3. Visión general sobre los genes que se han visto implicados en la EA a la fecha ----- | 15 |
| Figura 4. Fuentes de obtención y diferenciación de las CME ----- | 21 |
| Figura 5. Funciones de las CME derivadas de sangre menstrual ----- | 23 |

Figuras resultados

| | |
|--|----|
| Figura 1. Caracterización de CME-SM ----- | 42 |
| Figura 2. Análisis de citometría de marcadores de CME-SM tras la transdiferenciación a Células Similares a astrocitos | 45 |
| Figura 3. Las CME-SM aumentan marcadores astrocíticos ----- | 47 |
| Figura 4. Análisis de citometría para la diferenciación de CME-SM a células similares a astrocitos ----- | 46 |
| Figura 5. Las CSA responden al glutamato con transitorios de calcio intracelular. ----- | 47 |
| Figura 6. Las CME-SM aumentan marcadores astrocíticos con la exposición a estímulos proinflamatorios..... | 50 |
| Figura 7. Las CME-SM no presentaron cambios significativos con la exposición a estímulos proinflamatorios..... | 51 |
| Figura 8. Activación del factor de transcripción NF-kB con la exposición de factores proinflamatorios | 53 |
| Figura 9. Las CSA responden a estímulos inflamatorios (LPS) produciendo IL-6 y sobrenadantes de cultivos de neuronas colinérgicas E280A, regulando la concentración de IL-6 ----- | 54 |
| Figura 10. Las CSA responden a sobrenadantes de cultivos de neuronas colinérgicas E280A, regulando la concentración de IL-1 β ----- | 55 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Resumen de la búsqueda bibliográfica de cocteles de diferenciación a astrocitos utilizados en CME de diferentes fuentes..... | 25 |
| Tabla 2. Tipo de astrocitos humanos..... | 29 |

CAPITULO I: ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)

1.1. Definición

La EA es una condición neurodegenerativa progresiva que implica cambios neuropatológicos como la acumulación de placas β amiloide y los ovillos neurofibrilares (Serrano-Pozo et al., 2016; Zhong et al., 2019) (**Figura 1**); además se presenta astrogliosis, activación de células microgliales, pérdida de neuronas, neuropilos y elementos sinápticos (Serrano-Pozo et al., 2011) que conducen al deterioro cognitivo del paciente (Zhong et al., 2019).

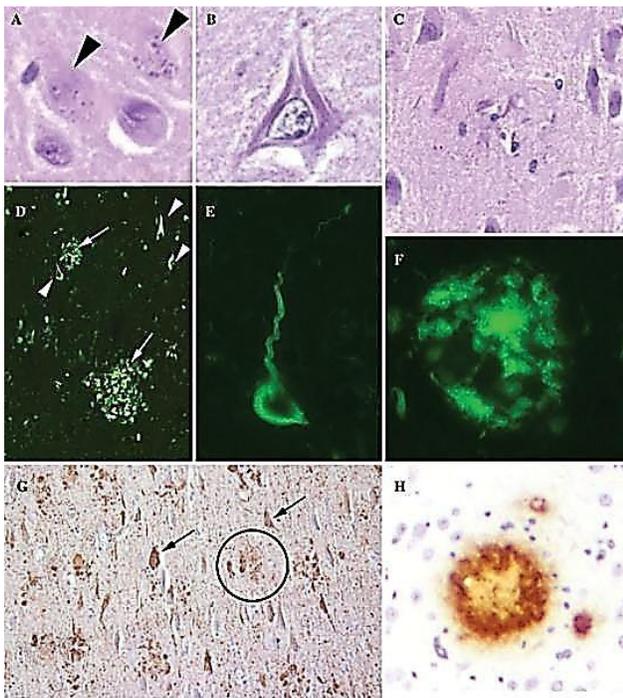


Figura 1. Neuropatología de la EA en cerebro humano. Imágenes de secciones histológicas teñidas con **hematoxilina y eosina** (400X) (A) Degeneración granulovacuolar (puntas de flecha), (B) ovillos neurofibrilares intracelulares (C) placas amiloides extracelulares cerosas. **Tinción tioflavina s** (color verde fluorescente, 100X) abundantes placas amiloides extracelulares (flechas) y ovillos neurofibrilares intraneuronales (puntas de flecha) en neocortex. Las imágenes de mayor potencia (400 X) muestran (E) ovillo neurofibrilar y (F) placa amiloide. (G) ovillos neurofibrilares (flechas, 100 x) se tiñen con anticuerpos que reconocen epítopes de proteína tau fosforilados. Nótese también la presencia de grupos de inmunoreactividad de fosfo-tau (círculos) que marcan neuritas distróficas en asociación con placas amiloides. (H) Las placas amiloides (400 aumentos) (E. B. Lee, 2011).

1.2. Clasificación

La enfermedad se subdivide según la edad de inicio en enfermedad de Alzheimer de inicio temprano que representa aproximadamente entre el 1% y el 6% de todos los casos, con una edad de aparición que oscila entre los 30 a 65 años, y la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío que presenta una edad de inicio posterior a los 60 o 65 años y está relacionada con la enfermedad de Alzheimer esporádica (Dai et al., 2018), es decir aquellos pacientes con EA que no tienen causa conocida; adicionalmente, existe alrededor de 1% de casos que se atribuyen a mutaciones autosómicas dominantes en los genes relacionados con el metabolismo amiloide, por ejemplo, la proteína precursora de amiloide (PPA), presenilina 1 (PSEN-1) y presenilina 2 (PSEN-2) que causan la forma hereditaria llamada enfermedad de Alzheimer familiar de inicio temprano (EAF) (Brickell et al., 2006; Kvartsberg et al., 2019; Lane-Donovan & Herz, 2017).

1.3. Epidemiología

La EA es la causa más común de demencia a nivel mundial, que según la Organización Mundial de la Salud representa entre el 50 al 75% de los casos (Eratne et al., 2018) y se espera un aumento de casos para 2050; por lo tanto, la EA ha alcanzado proporciones epidémicas con importantes implicaciones socioeconómicas. Si bien el envejecimiento, en general, es el mayor factor de riesgo para la EA, se han estudiado varios factores demográficos adicionales que contribuyen al aumento de la EA en los EE. UU. Uno de estos factores está asociado con el crecimiento relativamente rápido de la población latina. Varios informes indican que la EA es más frecuente entre la población afroamericana y los latinos; sin embargo, la razón de la disparidad de EA entre los diferentes grupos étnicos todavía es poco conocida y altamente controvertida (Vega et al., 2017).

En Colombia existen pocos estudios sobre la epidemiología de la enfermedad. Uno de estos fue realizado en el 2010, por la Clínica de la Memoria de la Universidad Javeriana, y el Hospital Universitario de San Ignacio en Bogotá, donde evaluaron 2018 pacientes con demencia, de los cuales 49,56%, se diagnosticaron por consenso con EA, siendo en este centro la principal causa de demencia primaria. De ellos 248 (28.4%) eran mujeres y 626 (71.6%) hombres. La edad en la que se realizó el diagnóstico fue en promedio de 71.5 ± 11.4 años. La mayoría de pacientes con EA consultaron dentro de los primeros 3 años de evolución del cuadro clínico y el mayor porcentaje se encuentra entre los 71 a 80 años. Aproximadamente una tercera parte de los pacientes (177 o 20.25%) con EA tenían entre 4-5 años de escolaridad y 155 (17.73 %) entre 10-11 años de escolaridad (Ruiz de Sánchez et al., 2010). Adicionalmente, en la región de Antioquia se ha identificado el grupo más grande de personas con EA genético de inicio temprano (antes de los 65 años), con cerca de 5.000 miembros distribuidos en 25 familias, de los cuales alrededor de 1.500 portan la mutación PSEN1- E280A asociada al metabolismo amiloide (Fleisher et al., 2012; Lopera et al., 1997).

1.4. Manifestaciones clínicas

Según el Instituto Nacional sobre el Envejecimiento y la Asociación de Alzheimer, existen tres etapas de la EA: La primera etapa se refiere a la EA preclínica, en la que el cerebro de una persona presenta acumulación del péptido β amiloide, disfunción sináptica e hiperfosforilación de tau, sin embargo, no existen signos externos de enfermedad y las habilidades cognitivas permanecen intactas. La segunda etapa corresponde a un deterioro cognitivo leve, la persona tiene modificaciones cerebrales patológicas acompañadas por cambios en la memoria, el lenguaje, la función ejecutiva, la atención o las habilidades de pensamiento que aún no han interferido con el funcionamiento cotidiano. La tercera etapa se llama demencia debido a la EA y se caracteriza por una enfermedad que es lo suficientemente grave como para afectar la capacidad de una persona para completar las tareas diarias de forma independiente (Kumar et al., 2016).

1.5. Neuropatología en la EA familiar (EAF)

1.5.1. Acumulación del péptido β amiloide

La agregación y acumulación del péptido $A\beta$ en el cerebro se considera una característica patológica importante en la enfermedad de Alzheimer (Reiss et al., 2018). El péptido β -amiloide se genera por la escisión proteolítica secuencial de la Proteína Precursora Amiloide (PPA) (Pahrudin Arrozi et al., 2017). La PPA es una proteína transmembrana que es crucial para la plasticidad neuronal y la supervivencia. Esta proteína está compuesta por un gran dominio extracelular, un corto dominio transmembrana y una cola citoplasmática. El procesamiento de PPA depende de tres proteasas ubicadas en distintas zonas intracelulares: α -secretasa que está anclada en la membrana celular, mientras la β -secretasa y γ -secretasa están dentro de compartimentos endocíticos (Janelidze et al., 2016). La escisión de PPA por la α -secretasa impide la generación de $A\beta$, ya que el sitio de escisión está dentro del dominio $A\beta$, el corte libera un gran ectodominio soluble de PPA llamado sPPA α , así como un fragmento de carboxilo terminal (CTF) de PPA llamado α CTF. Después de la escisión α , la α CTF se escindirá adicionalmente por la γ -secretasa para producir péptidos p3 y el dominio intracelular de PPA (AICD). La vía se conoce como "no amiloidogénica", puesto que el procesamiento de la α -secretasa de PPA evita la formación de péptido $A\beta$ intacto (Tiwari et al., 2019).

Una ruta alternativa que está presente en las neuronas, es la "vía amiloidogénica" que implica la escisión de la PPA por la β -secretasa (BACE1). Esta escisión genera una forma secretada de APP truncada (sAPP β) y un fragmento carboxi-terminal anclado a la membrana de 99 aminoácidos (C99) que contiene toda la región $A\beta$. El fragmento C99 es posteriormente escindido por γ -secretasa para generar el C-terminal del péptido $A\beta$, es decir AICD (Tian et al., 2016) (**Figura 2**).

Existen dos tipos principales de polímeros de $A\beta$ que tienen un rol directo con la formación de placas e inducción de neurotoxicidad: $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$. $A\beta_{40}$ es más abundante y menos neurotóxico que el $A\beta_{42}$, el cuál es altamente insoluble, neurotóxico y tiende más a la agregación, actuando como una fracción constructora altamente tóxica en el ensamblaje de $A\beta$. La agregación de $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ resulta la alteración de la homeostasis de calcio, induciendo la deslocalización de la proteína tau, rompiendo los microtúbulos, alterando los procesos de tráfico de membrana y los niveles de expresión en la superficie de los canales iónicos sinápticos, aumento del estrés oxidativo mitocondrial y disminución del metabolismo energético y regulación de la glucosa, que contribuye al deterioro de la salud neuronal y finalmente a la muerte neuronal (Tiwari et al., 2019).

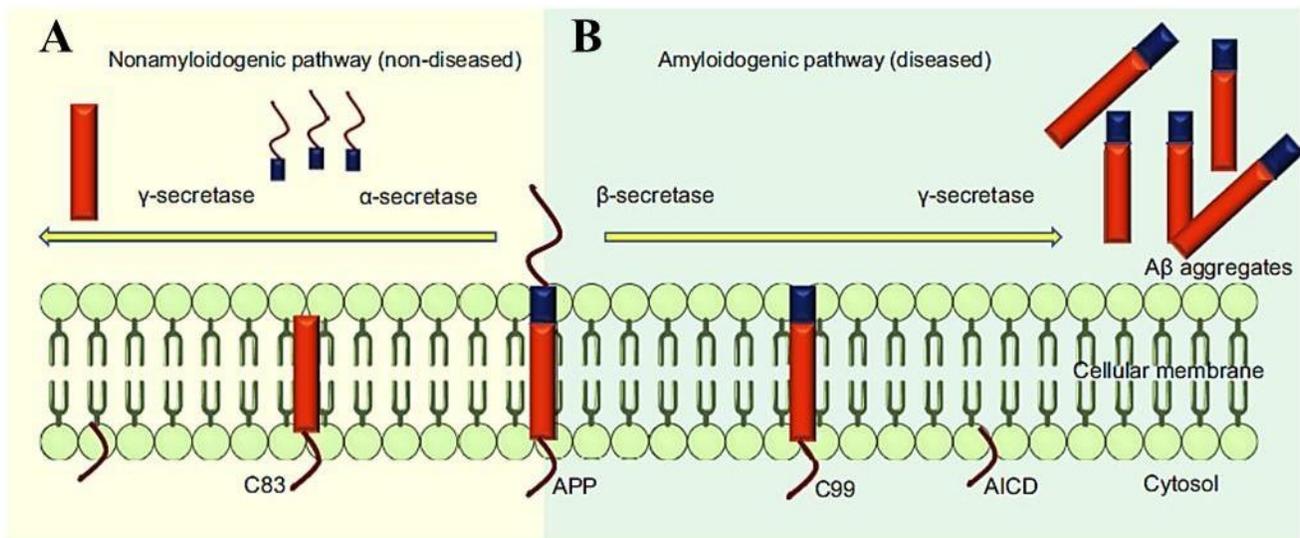


Figura 2. Producción del péptido A β . En la vía no amiloidogénica (izquierda), la PPA se escinde secuencialmente por α -secretetasa y γ -secretetasa, vía que no conduce a la generación de especies A β . En la vía amiloidogénica (derecha), la APP es escindida por BACE seguido de la γ -secretetasa que libera los péptidos A β y el dominio intracelular de PPA (AICD) (Tiwari et al., 2019).

1.5.1. Formación de ovillos neurofibrilares

La proteína Tau pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) y se expresa principalmente en los axones de las neuronas. El gen *MAPt* que codifica la proteína Tau se encuentra en el locus 17q21, contiene 16 exones y puede someterse a un corte y empalme alternativo de los exones 2, 3 y 10 en el cerebro humano, generando 6 isoformas principales (Laurent et al., 2018). Además presenta múltiples modificaciones postraduccionales, entre las más comunes se encuentra la acetilación, glicosilación, metilación, nitración, truncamiento, ubiquitinación y fosforilación (Laurent et al., 2018), que permiten el correcto funcionamiento de la proteína como estabilizadora de los microtúbulos al promover el ensamblaje de tubulina para regular las funciones normales de las neuronas (F. P. Chong et al., 2018).

En la EA la hiperfosforilación de tau, conduce a cambios conformacionales en los que la conversión de monómeros en oligómeros induce la agregación de Tau, lo que lleva a la formación de ovillos neurofibrilares (Congdon & Sigurdsson, 2018), fibras entrelazadas en forma de remolino que miden alrededor de 10 nm de diámetro, se presentan en pares y están enrolladas de forma helicoidal con una periodicidad regular de 80 nm (Wiśniewski et al., 1976), comprometiendo la supervivencia neuronal y que explican las fuertes correlaciones entre la carga de ovillos neurofibrilares y el deterioro cognitivo en pacientes con EA. Además, el descubrimiento de más 30 mutaciones en el gen *MAPt* en la degeneración lobular frontotemporal familiar, sugiere que las anomalías Tau por sí solas pueden causar neurodegeneración (Iba et al., 2013).

1.6. Neuroinflamación en la EAF

El término neuroinflamación ha sido utilizado para describir diversos fenómenos patológicos, que abarcan desde la alteración en la morfología de las células de la glía hasta la invasión y destrucción de tejidos por leucocitos que migran desde la periferia. Las alteraciones en la homeostasis de los tejidos y el daño neuronal provocado por diferentes factores (microorganismos, lesión, isquemia, agregación proteica, entre otros) inician una respuesta tisular por células residentes del sistema nervioso central (SNC), mediada principalmente por microglía y astrocitos, que involucra una gran producción de factores inmunológicos como son citoquinas o quimioquinas, al igual que la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN) (Becher et al., 2017).

Cuando la microglía se activa por patógenos, proteínas mal plegadas o lesiones, estas células sufren cambios morfológicos visibles, que incluyen la disminución de las ramificaciones, el crecimiento del soma, la adquisición de una forma ameboide (Gyoneva et al., 2016) y la expresión de marcadores de superficie celular específicos como el receptor tipo Toll, polarizando la microglía hacia un fenotipo inflamatorio que induce la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF α , quimioquinas y moléculas del complemento (Bolós et al., 2017). Estudios en modelos animales que sobreexpresan A β , muestran que se da una respuesta inflamatoria en procesos de amiloidosis, durante estos procesos la microglía presenta neuroprotección a través del aclaramiento del péptido A β a través de TLR4; el mismo receptor que reconoce LPS; sin embargo, esta capacidad se ve disminuida, lo que promueve la acumulación del péptido (Bolós et al., 2017). De otro lado, en los monómeros patológicos de tau se presenta opsonización, facilitando la fagocitosis por células de la microglía (Dejanovic et al., 2018).

Las citoquinas secretadas por la microglía también estimulan la activación de los astrocitos con la finalidad de amplificar las señales inflamatorias (Liddelow et al., 2017) y estimular la fagocitosis astrocítica (Sollvander et al., 2016). Los mediadores inflamatorios generados por éstas células del SNC y los oligómeros A β , inducen el reclutamiento de células inmunes periféricas, promoviendo una rápida adhesión, tráfico y extravasación de neutrófilos (Zenaro et al., 2015), monocitos (células fagocíticas que migran a áreas de lesión y se diferencian en macrófagos para eliminar patógenos o desechos celulares) (Koronyo-Hamaoui et al., 2020) y linfocitos T, las células T de los pacientes con EA están enriquecidas con el receptor de quimiocinas CXCR2 que, al unirse a CXCL8, promueve la trans migración de las células T a través de las barreras endoteliales, incluida la barrera hematoencefálica (Calsolaro & Edison, 2016).

Las citoquinas proinflamatorias también pueden estimular la actividad de la γ -secretasa y mejorar el procesamiento de la PPA (W. Wang et al., 2019; Yamamoto et al., 2007) igualmente se ha demostrado que los niveles elevados de IL-1 β aumentan la producción de otras citoquinas, incluida la IL-6, que estimula la activación de CDK5, una quinasa conocida por hiperfosforilar la proteína tau (Quintanilla et al., 2004).

Además de los cambios proinflamatorios que ocurren en la EA, hay evidencia que sugiere una desregulación en las vías antiinflamatorias dependiente de la cronicidad. Los estudios inmunohistoquímicos han revelado que el factor neurotrófico TGF- β 2, localizado en astrocitos reactivos

y microglía ubicada alrededor de las placas neuríticas se encuentra aumentado (Flanders et al., 1995), lo que puede representar un esfuerzo por frenar la respuesta inflamatoria iniciada por la acumulación de amiloide β (Tapella et al., 2018; X. Zhang et al., 2016), además la sobreexpresión de citoquinas antiinflamatorias, como IL-4, IL-13 y TGF- β 1, reduce la placa beta amiloide (Cherry et al., 2015; Kawahara et al., 2012) por ende la microglía y los astrocitos también puede adquirir un fenotipo neuroprotector antiinflamatorio en el contexto de las primeras etapas de la EA (Pereira Diniz et al., 2017)(Ren et al., 2020) que disminuye con el avance de la enfermedad (**Figura 3**).

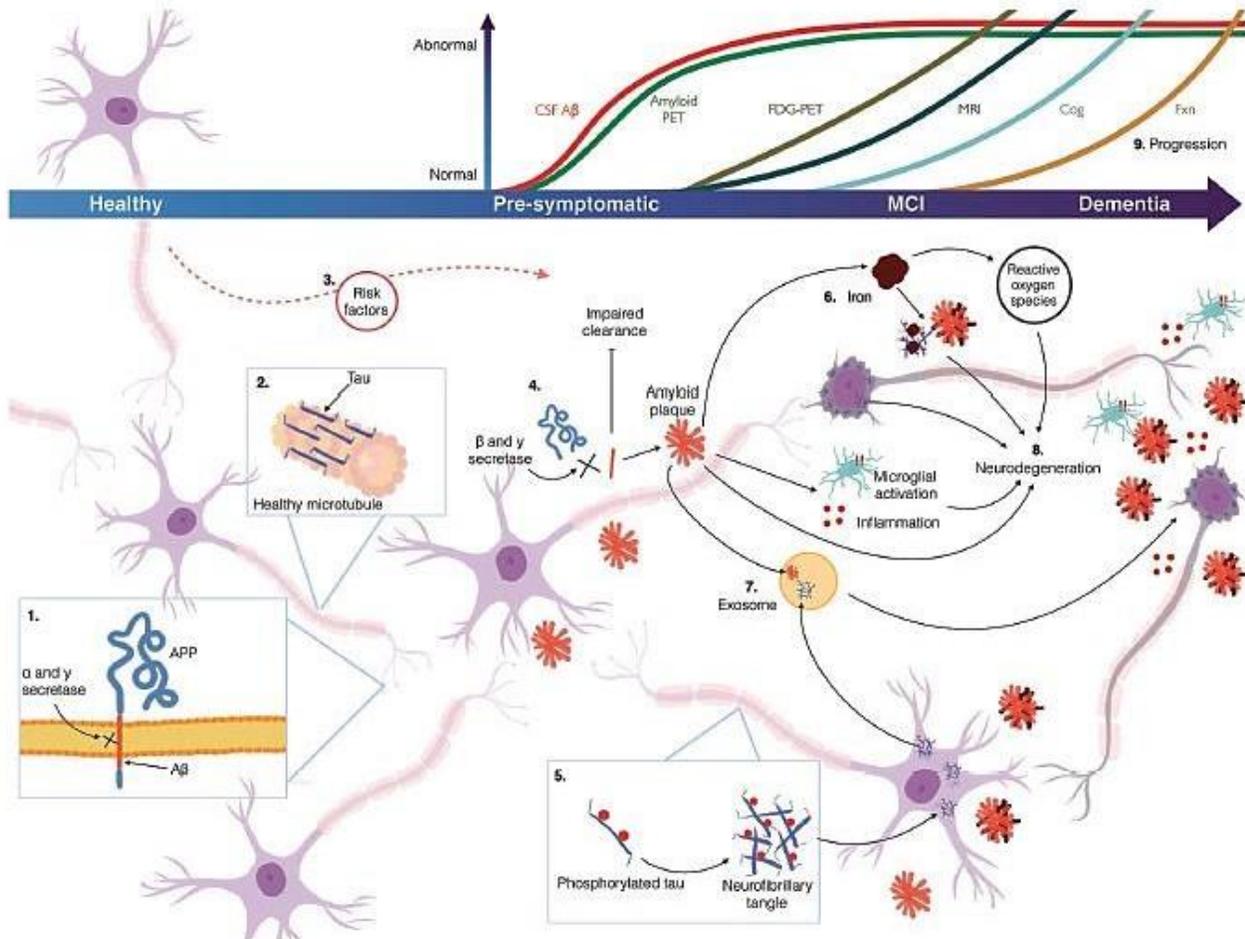


Figura 3. Patofisiología de la enfermedad de Alzheimer. 1. La proteína precursora amiloide (PPA) y el amiloide beta ($A\beta$) existen como proteínas transmembrana encontradas principalmente en las sinapsis. En el procesamiento no amiloidogénico, la PPA es clivada por la α -secretasa seguido de la γ -secretasa, sin consecuencias de acumulación proteica. 2. En personas sanas, la proteína Tau tiene como función la estabilización de los microtúbulos en los axones neuronales. 3. Existen múltiples factores de riesgo genéticos y esporádicos. 4. En un procesamiento amiloidogénico, la APP es cortada inicialmente por la beta secretasa, seguido de la gama secretasa, resultando en los fragmentos $A\beta$ ($A\beta$ 42 en particular). La acumulación, acompañado de las dificultades para su aclaramiento, resulta en la agregación como placas extracelulares. El procesamiento de $A\beta$ anormal, su aclaramiento y acumulación se conoce que ocurre décadas antes de la aparición de los síntomas clínicos. 5. En un estado patológico, la hiperfosforilación de Tau resulta en la desestabilización de los microtúbulos y la formación de ovillos neurofibrilares, que se encuentran principalmente en el cuerpo neuronal. Existe un debate respecto a si la taupatía se da de forma paralela al depósito de $A\beta$, potenciando los efectos tóxicos de cada uno, o si es un efecto cascada debajo de la

acumulación de A β . 6. Existe evidencia que muestra que hay una desregulación y acumulación de hierro en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer, los cuales interactúan de formas complejas con A β y la proteína Tau anormal, resultando en la formación de especies reactivas de oxígeno y daño oxidativo, promoviendo finalmente la neurodegeneración. 7. Se evidencia que los exosomas están involucrados de alguna forma en el transporte de placas y ovillos, resultando en su dispersión a otras áreas del cerebro. 8. La acumulación de estas proteínas patogénicas y radicales libres, resulta en la activación microglial, inflamación, daño mitocondrial, estrés oxidativo, déficit de neurotransmisores (particularmente acetilcolina), disfunción sináptica y finalmente a la muerte neuronal. 9. Los cambios más tempranos en los biomarcadores ocurren décadas antes de la aparición de los síntomas, con una reducida aparición de A β en el fluido cerebroespinal y la evidencia del acumulo de péptido A β en tomografías. A estos eventos le siguen cambios en la imagenología funcional y estructura, antes de que se presenten los síntomas cognitivos y el declive funcional (Eratne et al., 2018).

1.7. Etiología

Aunque la causa de la enfermedad no se comprende completamente, los estudios clínicos y neuropatológicos han planteado que la formación de placas A β y ovillos neurofibrilares es fundamental para la patogenia de la EA, ya que los péptidos A β (A β 40 y A β 42) son los componentes principales de las placas seniles comúnmente presentes en la EA. La PPA es el precursor de la proteína β amiloide, el componente principal de las placas amiloides, y como tal, ha dado lugar a la hipótesis de la cascada amiloide para la EA, que plantea que el mal procesamiento y la regulación anormal de la PPA conducen a la sobreproducción gradual o acumulación de A β en oligómeros y placas extracelulares, iniciando una secuencia de eventos que resulta en EA (Tyan et al., 2012).

En la hipótesis amiloide muchos estudios sugieren que estos péptidos pueden formar oligómeros y fibrillas tóxicas en condiciones fisiológicas relacionándose con el estrés oxidativo acelerado que resultará en la pérdida neuronal (N.-J. Gong et al., 2019), pero el mecanismo por el cual se produce la depósito cerebral de A β relacionado con la edad sigue sin estar claro (Selkoe & Hardy, 2016), al igual que los mecanismos que conducen a la patología de Tau (Vergara et al., 2019). Sin embargo un pequeño porcentaje de los casos de EA se producen por mutaciones genéticas en la PPA, PSEN-1 y PSEN-2 (Gao et al., 2019).

1.7.1. Factores genéticos

Aproximadamente, el 1% de los casos de EA se producen por mutaciones autosómicas dominantes en los genes de *APP*, *PSEN-1* y *PSEN-2*. La EA autosómica dominante tiene un fenotipo clínico variable, que incluye la disminución del rendimiento en las pruebas de memoria, los síntomas extrapiramidales atípicos y otras características neurológicas (Gao et al., 2019). Existen algunas variables que resultan comunes, pero representan un riesgo bajo de desarrollar la enfermedad. No obstante, algunas menos típicas, producida por alelos raros, como las que trataremos a continuación, representan un alto riesgo del desarrollo de la enfermedad (**Figura 4**).

Adicionalmente, se han relacionado errores al momento realizar la reparación del ADN, mutaciones debido a estrés oxidativo y otros factores genéticos relacionados con una inestabilidad genética, que repercute en un aumento de probabilidad de padecer la EA (Hou et al., 2017).

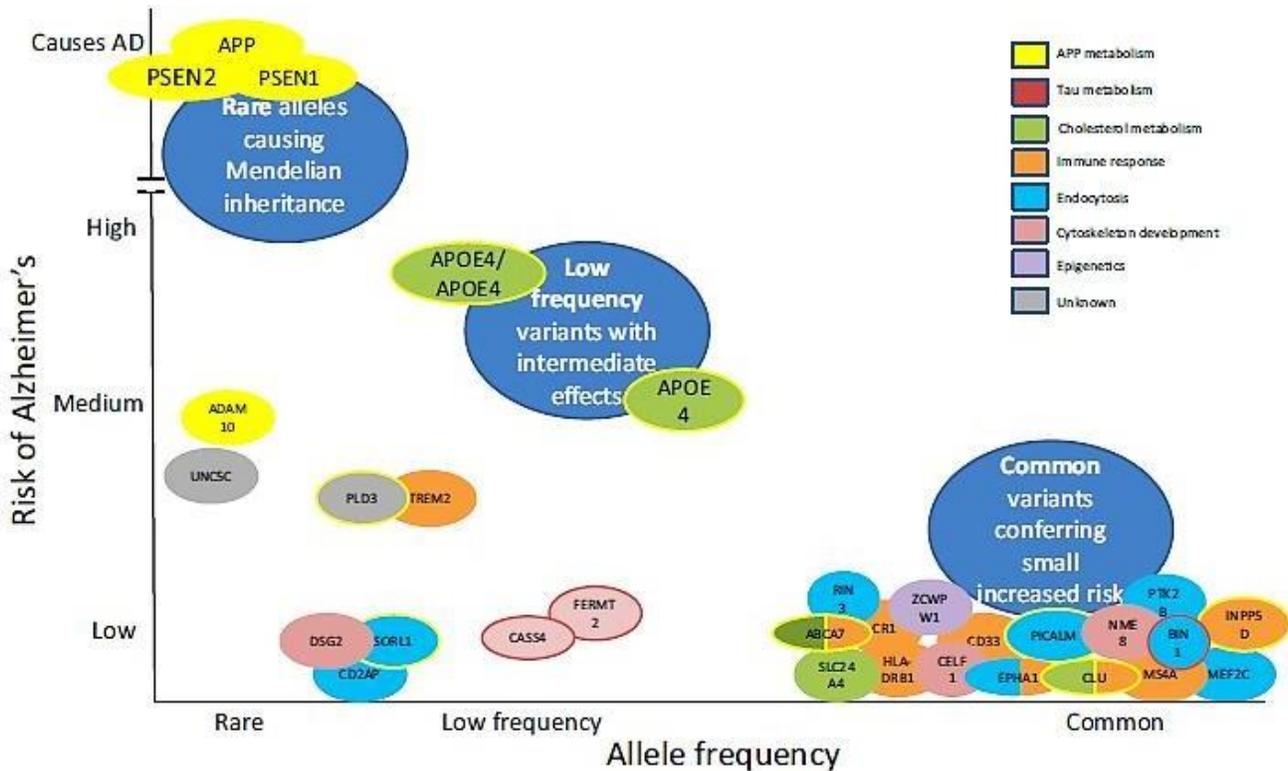


Figura 4: Esquema general sobre los genes que se han visto implicados en la enfermedad de Alzheimer. El color interno corresponde a su función entendida. Cuando hay más de un color interno, el gen está involucrado en más de una vía. Los genes que están encerrados en un círculo amarillo podrían también influir en el metabolismo de la PPA, los genes encerrados en círculos rojos se piensan que influyen en el metabolismo de Tau (Lane-Donovan & Herz, 2017).

1.7.1.1. Mutaciones en la proteína precursora amiloide (PPA)

La PPA es una proteína transmembrana tipo I altamente expresada en dendritas y axones neuronales. Las funciones de PPA no se comprenden completamente; sin embargo, la evidencia actual respalda roles importantes para la PPA y sus metabolitos en la regulación de la dinámica del axón, la adhesión sináptica y el neurotropismo (Swaminathan et al., 2016).

La PPA madura puede procesarse mediante una de las dos vías de escisión mutuamente excluyentes: α -secretasa (procesamiento no amiloidogénico) en membrana plasmática o β -secretasa (procesamiento amiloidogénico) en el endosoma, seguido de escisión por γ -secretasa. La escisión no amiloidogénica se produce principalmente en la superficie celular, mientras que el procesamiento amiloidogénico se lleva a cabo en compartimentos intracelulares, incluidos los endosomas, lisosomas y autofagosomas. El procesamiento amiloidogénico libera el péptido $A\beta$ que posteriormente puede ser secretado por las células. Además, los fragmentos C-terminales de la PPA (PPA-CTF) de ambas vías de escisión pueden translocarse al núcleo e inducir señalización nuclear. Tanto $A\beta$ como PPA-CTF contribuyen potencialmente a la patología de EA y pueden exhibir propiedades neurotóxicas a través de múltiples vías (Sun et al., 2019).

Según Alzforum, en la actualidad hay 68 mutaciones registradas para la proteína PPA. La mayoría de estas mutaciones están ubicadas en el exón 16 y 17, cerca de los sitios de reconocimiento por las α , β y γ -secretasas (<https://www.alzforum.org/mutations/app>) afectando el procesamiento y el metabolismo normal de la proteína, del mismo modo que la producción de $A\beta$ y su tendencia a agregarse. Estas mutaciones generalmente representaban un patrón autosómico dominante, sin embargo, una mutación en PPA, A673V, se asoció con una herencia autosómica recesiva (J. Park et al., 2017).

La EAF también puede ser causada por la duplicación del locus PPA. En el síndrome de Down, una copia adicional del cromosoma 21, que alberga el gen *PPA*, conduce a la sobreexpresión de la proteína PPA, niveles elevados de $A\beta$, depósito de placa y a la EA en los pacientes síndrome de Down mayores de edad (Jaeger et al., 2010).

1.7.1.2 Mutaciones en las presinilinas

En humanos, hay dos genes homólogos, *PSEN-1* y *PSEN-2*, ubicados en los cromosomas 14 y 1, respectivamente. Las proteínas codificadas *PSEN-1* y *PSEN-2* son proteínas transmembrana de múltiples pasos sintetizadas en el retículo endoplásmico, que se encuentran expresadas ubicuamente entre los tejidos y son reguladas en diferentes etapas del desarrollo, además, se han mostrado diversos estudios que evidencian que la disminución de la expresión de *PSEN-1* causa una regulación positiva de la expresión de *PSEN-2*, lo que puede interpretarse como un mecanismo regulatorio (Escamilla-Ayala et al., 2020). Después de la síntesis y durante el transporte desde el retículo endoplásmico hasta los compartimentos de Golgi, las presinilinas de longitud completa se someten a endoproteólisis y se ensamblan con las proteínas adicionales nicastrina (NCT), faringe anterior defectuosa-1 (APH1) y presenilina 2 (*PSEN-2*) para formar el complejo de γ -secretasa catalíticamente activo en la membrana plasmática (Pimenova & Goate, 2020).

Las presinilinas también se encuentran en sistemas de membrana subcelular incluyendo endosomas, lisosomas, envoltura nuclear, y mitocondrias. Sin embargo, mientras que *PSEN-1* se localiza principalmente en el compartimento de Golgi, en la membrana plasmática y en los endosomas, la *PSEN-2* se localiza predominantemente en endosomas y lisosomas, además no solo se expresan en neuronas y células gliales sino también en tejidos fuera del cerebro (Oikawa & Walter, 2019).

Dentro de las funciones biológicas, la *PSEN2* / γ -secretasa se encuentra asociada a la pigmentación. Los melanocitos humanos deficientes en *PSEN2* / γ -secretasa tienen un defecto en la maduración de melanosomas (Jiang et al., 2018). Además, la *PSEN2* / γ -secretasa es importante en la diferenciación epidérmica. En la capa epidérmica suprabasal, las células diferenciadas tienen *PSEN-2*, pero no *PSEN-1*, localizado específicamente en los cilios, necesario para la correcta diferenciación mediante el control de la señalización de Notch (Ezratty et al., 2016) y por último la deficiencia de *PSEN-2* también afecta el funcionamiento normal de las mitocondrias (Contino et al., 2017).

De otro lado, la *PSEN-1* cumple funciones en el desarrollo embrionario. En ratones la ausencia de *PSEN-1* es letal, mientras que *PSEN-2* no tiene ningún efecto, lo que subraya un papel crítico para *PSEN-1* en

el desarrollo embrionario, probablemente al estar vinculada con la señalización de Notch (Pluta et al., 2016).

Las mutaciones de *PSEN-1* tienen una mayor frecuencia en la EA, ya que se informaron aproximadamente 322 mutaciones diferentes, mientras que para *PSEN-2* se ha reportado 64 mutaciones de *PSEN-2* (<https://www.alzforum.org/mutations>)

Las mutaciones de *PSEN* podrían alterar la conformación del complejo γ -secretasa, bloquear la endoproteólisis inicial y favorecer la liberación de productos intermediarios, incluido los péptidos largos de A β (A β 42, A β 43, A β 48, A β 49). La generación de péptidos amiloides más largos puede estar asociada con fenotipos EA agresivos, pero se necesitan más estudios sobre su correlación con la edad de inicio (J. Park et al., 2017).

En Colombia, concretamente en el departamento de Antioquia se descubrió en 1995 la mutación *E280A-PSEN1* (mutación Paisa) que consiste en el cambio de un ácido glutámico por una alanina en el codón 280 (g.50024 A > C, c.839A>C, exón 8) en la *PSEN-1*, causal de la EA familiar precoz o temprana con un patrón de herencia autosómica dominante en una de las más grandes familias del mundo con 5.000 miembros de los cuales aproximadamente 1.800 tienen esta mutación que causa la EA (Alzheimer's Disease Collaborative Group, 1995) Los hallazgos de 15 años de estudios observacionales de 1995 a 2010 en 449 portadores de la mutación *E280A* de *PSEN1* mostraron un curso clínico predecible con una edad media de 44 años al inicio del deterioro cognitivo leve (MCI) y 49 años al inicio de la demencia (Fleisher et al., 2012).

1.8. Factores de riesgo para la EA

1.8.1. Gen APO E4

Otro gen implicado en la EA es el gen de susceptibilidad *APOE* (alelo E4). Se encontró que las personas con 1 o 2 copias del alelo E4 tenían, respectivamente, un riesgo 3 o 12 veces mayor de padecer de EA, además de presentar edades más tempranas de inicio en comparación con los no portadores del alelo E4. El riesgo de EA a los 85 años de edad se estimó en un 18% -35% para los portadores de una copia E4 y en un 51% a 68% para los portadores de dos copias E4, en relación con el riesgo estimado de 4% -12% para portadores no E4 en una población de ascendencia europea (Lo et al., 2019). Se han propuesto varias hipótesis para explicar cómo la proteína ApoE influye en el riesgo de EA, incluidos los efectos sobre el metabolismo de los lípidos, el metabolismo del A β , la función mitocondrial, la integridad cerebrovascular y la inflamación. Sin embargo, el mecanismo por el cual la variación alélica en el gen *APOE* influye en el riesgo de EA sigue sin estar claro (Dai et al., 2018).

1.8.2. Factores modificadores de la EA

Los estudios de observación han identificado varios factores de riesgo modificables para la EA. Con base en una revisión sistemática integral de factores de riesgo para el deterioro cognitivo y la EA, los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU. destacaron que la diabetes mellitus, el tabaquismo, la depresión, la inactividad mental, la inactividad física y la mala alimentación se asocian con un mayor riesgo de

deterioro cognitivo, EA, o ambos (A Armstrong, 2019). Más tarde, esta lista se amplió aún más para incluir hipertensión, obesidad y bajo nivel educativo (Silva et al., 2019). A pesar de que algunos de estos factores aún están en debate se ha estimado que hasta un tercio de los casos de EA esporádica se atribuyen potencialmente a estos factores y en consecuencia, podrían prevenirse (de Bruijn et al., 2015).

Dentro de éstos factores, la diabetes podría aumentar fuertemente el riesgo de tener EA al afectar directamente la acumulación de A β en el cerebro, ya que en la hiperinsulinemia interrumpe la eliminación de A β cerebral al competir por la enzima que degrada la insulina (A Armstrong, 2019) y en la hipertensión arterial la evidencia sugiere que en la mitad de la vida, y no en la edad avanzada, se asocia con un aumento del 50% en el riesgo de EA y demencia, además la presión sanguínea elevada puede aumentar el riesgo de EA al disminuir la integridad vascular de la barrera hematoencefálica, lo que da como resultado una extravasación de proteínas en el tejido cerebral, provocando daño celular, apoptosis y un aumento en la acumulación de A β (A Armstrong, 2019).

1.8.3 Edad

El envejecimiento, en esencia, es el principal factor de riesgo para enfermedades neurodegenerativas y durante mucho tiempo estas enfermedades fueron consideradas como resultados naturales del envejecimiento cerebral. Ahora se considera que el envejecimiento cerebral saludable no está asociado con una pérdida notable de neuronas (Rodríguez-Arellano et al., 2016), por lo tanto, aunque la edad es el principal factor de riesgo de demencia, la enfermedad no es una consecuencia inevitable del envejecimiento. Además, la demencia no afecta exclusivamente a personas mayores. La demencia de inicio temprano (aparición de los síntomas antes de los 65 años) representa hasta un 9% de los casos (Organización Mundial de la Salud, s. f.).

1.9. Tratamiento

El manejo terapéutico de la EA se centra en el tratamiento sintomático del deterioro cognitivo o de los problemas de comportamiento afectivo. En la actualidad, los inhibidores de la acetilcolinesterasa están indicados para el tratamiento de la EA de intensidad leve a moderado (Epperly et al., 2017), teniendo en cuenta que el deterioro clínico está asociado con una pérdida profunda de neuronas colinérgicas que surgen en los núcleos del cerebro anterior y una reducción asociada en la neurotransmisión mediada por acetilcolina (Chase et al., 2017). Los medicamentos que tienden a normalizar los niveles del transmisor de acetilcolina incluyen la tacrina (autorizada el año 1993), aunque actualmente está fuera del mercado farmacéutico por las reacciones de hepatotoxicidad asociadas a su uso; donepezilo (año 1998), rivastigmina (año 2000), galantamina (año 2001). En el año 2003 se autorizó la memantina, un antagonista no competitivo del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), siendo en la actualidad el único medicamento antidemencia con la indicación de EA de intensidad moderada a grave (Chase et al., 2017). Sin embargo, todos estos medicamentos son paliativos, mejorando temporalmente los síntomas, disminuyendo la presión arterial y equilibrando el estado de ánimo, y no representan una cura de la EA.

Además, es importante tener en cuenta que, si los pacientes recibieron estos medicamentos por un tiempo prolongado, también traerán eventos adversos (Cummings et al., 2018).

CAPITULO II: Células Mesenquimales Estromales (CME) como modelo de la enfermedad de Alzheimer familiar

2.1 Definición de CME

Las células madre mesenquimales, también conocidas como células mesenquimales estromales (CME) se definen como células madre adultas multipotentes, que poseen capacidad de auto renovación y potencial de diferenciación a múltiples linajes (Leite et al., 2014), según la Sociedad de Terapia Celular Internacional, las CME deben ser adherentes al plástico cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar, expresar marcadores celulares para CD105, CD73 y CD90 y carecer de la expresión de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y moléculas de superficie HLA-DR y finalmente deben diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos *in vitro* (Kobolak et al., 2016).

2.2 Caracterización Morfológica e inmunofenotípica

Las CME fueron caracterizadas por Friedenstein, quien las aisló de la médula ósea, describiéndolas como células adherentes de morfología fibroblastoide (Friedenstein et al., 1974). Estas células expresan una variedad de proteínas de superficie, incluidas numerosas integrinas, receptores del factor de crecimiento (bFGFR, PDGFR, EGFR, TGF β IR / IIR), receptores de quimioquinas (algunas interleuquinas, receptores de CC y CXC) y moléculas de adhesión celular (VCAM-1, ICAM-1/2, ALCAM-1, L-selectina, CD105, CD44). Además, producen una amplia gama de moléculas de matriz que incluyen fibronectina, colágeno tipo I, III, IV, laminina, hialuronano y proteoglicanos (Docheva et al., 2007).

El marcador CD73 o 5'-ectonucleotidasa es una glicoproteína de 70 kDa que ha sido identificado en diferentes células de mamíferos que tiene como función catabolizar el ATP a adenosina (Minor et al., 2019). La adenosina en los tejidos normales ejerce funciones protectoras tisulares, mientras que los niveles crónicos de adenosina en los tejidos expuestos a la quimioterapia o radioterapia, que dañan el ADN, promueven procesos de remodelación patológica y fibrosis, por ejemplo, en la piel y el pulmón (de Leve et al., 2019). En las CME se ha observado que la adenosina convertida por la actividad ectonucleotidasa de CD73 puede ser responsable de la inhibición plaquetaria y contribuye a la actividad inmunomoduladora (Netsch et al., 2018).

El marcador CD 105 o endoglina es una glicoproteína homodimérica transmembranal de 180 kDa que contiene un dominio extracelular de 561 residuos y una región citoplasmática rica en serina y treonina de 47 residuos y forma parte del complejo receptor del TGF-beta. La proteína tiene como funciones la fibrogénesis, angiogénesis y en la señalización del TGF-beta, al igual que la adhesión (Meurer & Weiskirchen, 2020). Aunque no se conoce su función en CME, un estudio demostró que al combinar las CME con células formadoras de colonias endoteliales aceleran la recuperación muscular en un modelo de ratón de isquemia de la extremidad posterior, a través de un mecanismo dependiente de endoglina (Rossi et al., 2017).

La molécula CD90 o Thy-1 es el gen que codifica para una glicoproteína de la superficie celular y es miembro de la superfamilia de proteínas de las inmunoglobulinas. La proteína codificada está involucrada en la adhesión celular y la comunicación celular en numerosos tipos de células, pero

particularmente en las células de los sistemas inmunológico y nervioso. Este gen puede funcionar como un supresor de tumores en el carcinoma nasofaríngeo (Kumar et al., 2016).

2.3. Fuentes de obtención

La primera fuente de obtención de CME fue la médula ósea. En este tejido, las CME ocupan una población minoritaria (0.001–0.01% de células nucleadas) encargada del soporte estructural, pero también pueden identificarse en músculo, periostio, tejido adiposo y otros tejidos conectivos adultos (Frausin et al., 2015). A nivel fetal pueden derivarse del líquido amniótico, la sangre del cordón umbilical, el compartimento perivascular (PVC) o la gelatina de Wharton (CME-GW) (Barilani et al., 2018). Las CME de sangre menstrual se aislaron por primera vez en el 2007 (Meng et al., 2007), muestran ventajas con respecto al procedimiento de recolección no invasivo, alta tasa de proliferación, multipotencia, baja inmunogenicidad y riesgo de anomalías cariotípicas, en comparación con los otros tipos de células madre (Y. Liu et al., 2018) (**Figura 4**).

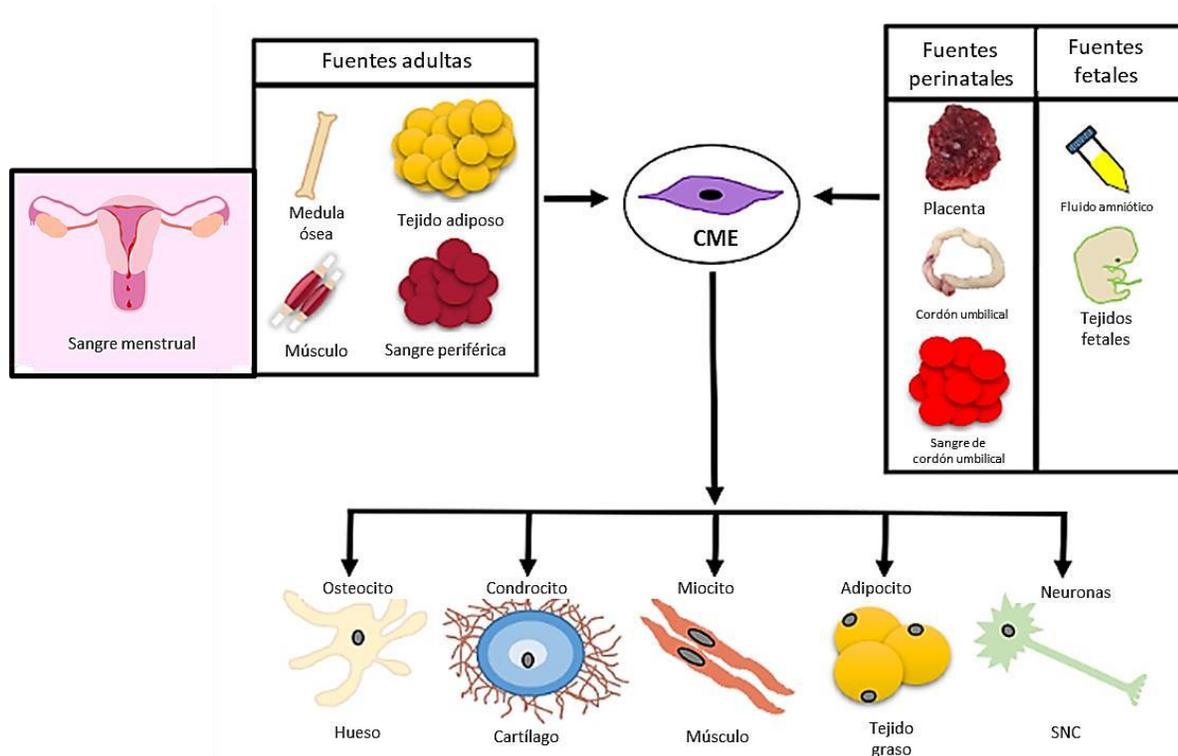


Figura 4. Fuentes de obtención y diferenciación de las CME. Tomado y modificado (Brown et al., 2019).

Las CME derivadas de sangre menstrual han llamado la atención en la actualidad como una de las fuentes de más fácil obtención, que presenta propiedades similares o mejores a otras fuentes, como

inmunomoduladoras del sistema inmune innato y adaptativo (Bozorgmehr et al., 2020). Además, las CME derivadas de sangre menstrual se han utilizado como plataforma para usos novedosos como modificación genética a través del sistema CRISPR, Cas, como modelo base para la entrega de medicamentos, la obtención de exosomas para la implementación de terapias libres de células y la adecuación y mejoramiento de nichos celulares (L. Chen et al., 2019) (Figura 5).

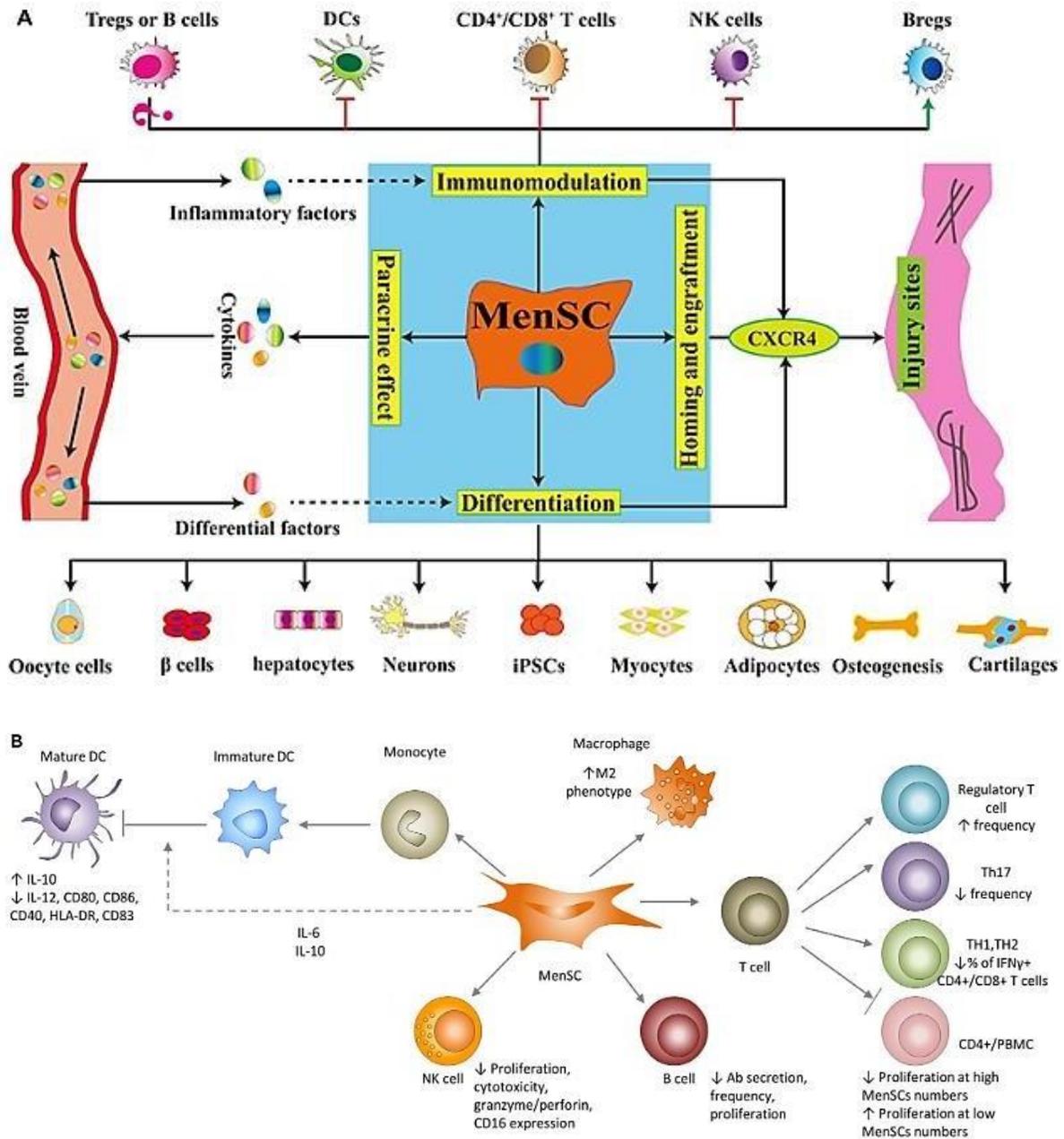


Figura 5. A. Funciones de las CME derivadas de sangre menstrual. Las CME derivadas de sangre menstrual cumplen funciones de diferenciación a diversos linajes del mesodermo y transdiferenciación a linajes de endodermo y ectodermo, cumplen funciones de inmunomodulación, facilitan el alojamiento y trasplante de células debido a su característica de células privilegiadas inmunológicamente y la producción de factores solubles que permite una comunicación paracrina. **B.** Efectos y moléculas inmunomoduladoras generadas a partir de las CME derivadas de sangre menstrual y su función en cada una de las

células inmunes específicas. (MenSC por sus siglas en inglés) Tomado y modificado de (Bozorgmehr et al., 2020; L. Chen et al., 2019)

2.4. Características biológicas y moleculares

Las CME secretan un amplio espectro de factores de crecimiento y citoquinas que promueven la angiogénesis, la neurogénesis y la cicatrización de heridas (K. Yang et al., 2015) como el factor 1 inducible por la hipoxia (HIF-1), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), Angiopoyetina 1 (ANG 1), interleuquina-11 (IL-11), prostaglandina 2 (PGE 2), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), factor derivado de plaquetas (PDGF), factor derivado de células estromal-1 (SDF-1), proteína 6 del gen estimulado por TNF (TSG-6) (Spees et al., 2016).

Los efectos paracrinos también pueden ser mediados por vesículas extracelulares (VE), fragmentos de membrana extracelular que están compuestos principalmente por exosomas, pequeñas vesículas homogéneas (50–150 nm) y por microvesículas, con un perfil de dimensión más heterogéneo, producido por la extrusión directa de la membrana plasmática celular. Las VE transportan proteínas, factores de transcripción y diferentes especies de ARN. Entre las moléculas transportadas se encuentra las quimiocinas de origen celular, moléculas pro-angiogénicas y promigratorias (Collino et al., 2017). Un estudio demostró que la administración de vesículas extracelulares de CME derivadas de medula ósea redujeron la muerte de las células cerebrales, mejoraron la supervivencia, la regeneración neuronal y la función motora en comparación con la administración de medios de cultivo libres de VE (Lu et al., 2019).

Otro mecanismo involucra la comunicación intercelular mediante túneles de nanotubos para la transferencia de organelos, por ejemplo, las mitocondrias y/o moléculas mediado por la polimerización de actina. La formación de estas estructuras podría representar un mecanismo de defensa y rescate a través de las fosfatidilserinas expuestas en la superficie de las células endoteliales apoptóticas y el reconocimiento por parte de las CME, lo que resulta en el rescate de la respiración aeróbica y la protección de las células endoteliales de la apoptosis (K. Liu et al., 2014, 2019).

En el ámbito inmunológico, las CME tienen efectos inhibitorios sobre las células T efectoras, células dendríticas y células asesinas naturales (NK) *in vitro*. Las CME inhiben fuertemente la proliferación de linfocitos T a través de la producción de factores solubles, incluido el factor de crecimiento de hepatocitos, PGE₂, hemociclooxigenasa-1 (HO-1), factor de crecimiento TGFβ₁, adenosina y óxido nítrico, aunque pueden promover la regulación positiva de las células reguladoras Treg FoxP3 + (M. Chen et al., 2013) mientras que el efecto inmunomodulador en las células B es todavía una materia de controversia (Rosado et al., 2015).

2.5. Las CME y su capacidad de transdiferenciación.

La transdiferenciación es un proceso celular en el cual las células maduras de un tipo de célula especializada se convierten en otra al variar los patrones de expresión génica. Estos patrones de expresión

están controlados por factores de transcripción, proteínas reguladoras que se unen a las regiones promotoras del ADN para activar la transcripción de genes clave del desarrollo. La expresión ectópica de estos factores de transcripción en células somáticas puede cambiar los destinos celulares sin la necesidad de inducir un estado pluripotente (Robinson et al., 2018).

Las CME poseen la capacidad de diferenciarse en células de otras capas germinales, como ectodermo y el endodermo. Estudios recientes indican que las CME pueden ser expandidas *in vitro* para que den lugar a múltiples linajes, por definición pueden diferenciarse en adipocitos, osteocitos, condrocitos, cardiomiocitos y transdiferenciarse en neuronas. Los trasplantes de animales con injertos de múltiples órganos también demuestran que estas células contribuyen a las tres capas germinales, especialmente a tejidos derivados del ectodermo como el sistema nervioso (Jin et al., 2015).

2.6. Mecanismos de transdiferenciación celular

La transdiferenciación implica la reprogramación genética de la célula que se especula puede ocurrir directamente o a través de múltiples pasos. Se ha propuesto que esta conversión celular puede suceder por la activación directa de un programa de diferenciación que altere la especificidad del linaje original, o mediante un proceso de pérdida de la diferenciación (dediferenciación) de una célula de un tejido específico a un estado más primitivo, seguido de la rediferenciación hacia un nuevo linaje celular. Por lo tanto, es probable que el microambiente induzca una reprogramación genética por la exposición a factores inductores. Existe evidencia biológica de procesos de dediferenciación y rediferenciación en la capacidad de regeneración tisular de los anfibios y la transferencia nuclear en la clonación de seres vivos; sin embargo, la transdiferenciación como mecanismo que explique la plasticidad debe seguir siendo analizada a través de herramientas y pruebas experimentales realizadas con rigor científico (Beltrán et al., 2005).

2.6.1 Transdiferenciación en neuronas

Durante un período de tiempo, varios grupos de investigación han presentado evidencias sobre la diferenciación *in vitro* de CME en células neuronales, utilizando diversas estrategias como sustancias químicas, factores de crecimiento, medios condicionados, co-cultivo, programación genética directa, diferenciación inducida por células madre pluripotentes y la utilización andamios para imitar la matriz (M. Singh et al., 2017). Dentro de las quimioquinas más importantes utilizadas en los medios condicionados se encuentran el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Zhao et al., 2016) y compuestos como el SHH (Sonic Headhog), ácido retinoico y la heparina (Mendivil-Perez et al., 2019). La transdiferenciación a neuronas pueden involucrar la generación de neuroesferas conocidas como Células Precursoras Neuronales (NPC) que conservan su capacidad para diferenciarse en neuronas o células gliales (Bonilla-Porras et al., 2017) o la conversión directa de CME a células similares a neuronas que expresan marcadores de linaje neural como Neu-N, Tuc-4, MAP 2 y β -tubulina III de tipo colinérgico (Mendivil-Perez et al., 2019) o dopaminérgico (Marei et al., 2018).

Las vías bioquímicas que actualmente inducen la transdiferenciación de las CME involucran (i) el aumento de AMPc activando la vía clásica de PKA, (ii) la señalización por MEK-ERK y (iii) La actividad CaM KII (Ca²⁺/Calmodulina Proteína quinasa II) que parece prescindible para la diferenciación neuronal y su inhibición podría contribuir a rescatar a las células diferenciadas de la muerte (Jori et al., 2005).

2.6.2 Transdiferenciación a Astrocitos

Los astrocitos son un grupo heterogéneo en morfología celular, perfiles de expresión génica, orígenes de desarrollo, propiedades fisiológicas, funciones y respuestas a lesiones y enfermedades (Tcw et al., 2017). En la literatura se ha reportado diversos métodos para la transdiferenciación de CME a astrocitos. Estos procedimientos requieren un cultivo prolongado (14 o 28 días) o un medio de diferenciación complejo. Algunos de los cocteles y condiciones de cultivo más repetitivas y con mejores resultados se presentan a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen de la búsqueda bibliográfica de cocteles de diferenciación a astrocitos utilizados en CME de diferentes fuentes.

| Publicación | Procedencia | Pasos | Coctel reportado | Tiempo | Población celular |
|----------------------------|--|--------------|---|---------------|--|
| (Avola et al., 2017) | Células estromales mesenquimales de tejido adiposo/ humano | 2 | DMEM/F12 +SFB 10% FGF (Factor de crecimiento fibroblástico) 40 ng / ml EGF (factor de crecimiento epidérmico) 20 ng / ml Medio neurobasal SFB 10% forskolina 4 mM heregulina β-1 10 ng / ml | 28 días | Astrocitos GFAP Neuronas Nestina |
| (Shahbazi et al., 2016) | Células estromales del Cordón umbilical específicamente de la Gelatina Wharton | 1 | DMEM/LG SFB 10% forskolina 10 μM 3-isobutil-1-metilxantina 200 μM | 8 horas | Neuronas Nestina TUI-1 MAP 2 NSE Astrocitos GFAP |
| (Jang et al., 2010) | Células estromales de tejido adiposo | 1 | DMEM/LG SFB 1% FGF 100 ng / ml forskolina 10 μM | 7 días | Neuronas Nestina TUI-1 MAP 2 NSE, NeuN NFM, NFH Astrocitos GFAP |
| (Salehinejad et al., 2015) | Células mesenquimales estromales de | 1 | DMEM/LG SFB 10% DMSO (0.5%) FGF 20 ng / ml Heparina 5 μg/ mL | 14 días | Neuronas Nestina B-Tubulina III Neurofilamento |

| | | | | | |
|-------------------------------|---|---|--|---------|--|
| | cordón umbilical matriz | | EGF (factor de crecimiento epidérmico) 20 ng / ml | | Astrocitos GFAP |
| (Bahat-Stroomza et al., 2009) | Células mesenquimales de la Médula ósea | 2 | DMEM/LG FGF 20 ng / ml Heparina: 5 µg/ mL EGF 20 ng / ml N2 (5 µg/ mL de insulina, 20 nM de progesterone, 100 µM putrescina, 30 nM de selenio, 100 µg/mL de transferrina) Dibutiril-ciclismo AMP (dbcAMP) 1 mM isobutilmetilxantina 1 mM factor de crecimiento derivado de plaquetas humano 5 ng / ml FGF 20 ng / ml Neuregulina humana 1-β 150 ng / ml | 48 hrs | Astrocitos GFAP S100β No cuantificación de marcadores neuronales |
| (Y. Liu et al., 2018) | Células Mesenquimales de Sangre Menstrual | 3 | DMEM/HG +β-mercaptoetanol 1 mM por 1 día DMEM/HG + 35 ng / ml de ácido trans-retinoico por 3 días DMEM/HG + 5 ng / ml de factor de crecimiento derivado de plaquetas + 10 ng / ml FGF + 14 µM forskolina + 126 ng / ml de factor de crecimiento glial (GGF - 2) , durante 14 días. | 18 días | Astrocitos GFAP |

Como puede observarse con lo reportado en la literatura que ha sido resumido en la tabla anterior, la mayoría de los cocteles que han sido utilizados hasta la actualidad requieren de una mezcla compleja de moléculas, algunas de ellas con costos elevados, y en la mayoría de los reportes se requiere de un tiempo largo de cultivo (entre 7 y 28 días), lo que representa una alta utilización del medio preparado, para poder mantener las células sometidas al estímulo sostenido en este tiempo, aumentando también la posibilidad de contaminación y mortalidad del cultivo, sin garantizar alta eficiencia en el proceso de transdiferenciación a astrocitos. Es de resaltar, además, que en la mayoría de estos reportes no se presenta una cuantificación o eficiencia del proceso respecto a la cantidad de células que efectivamente presentan marcadores gliales y astrocíticos positivos. Finalmente, a pesar que la fuente de CME proveniente de sangre menstrual fue reportada hace una década, no se han realizado muchos estudios donde se utilicen, como fuente para la transdiferenciación a ectodermo, especialmente para astrocitos.

2.7. Aplicaciones en la investigación y en la clínica

Las CME son una herramienta terapéutica atractiva para la medicina regenerativa debido a su capacidad de autorenovación y diferenciación en una variedad de linajes mesodérmicos. Se ha postulado que debido a su inherente multipotencialidad, las CME pueden integrarse directamente en órganos y tejidos enfermos. En este contexto, se ha informado que el trasplante de CME es beneficioso en la regeneración del cartílago, la regeneración del tejido óseo y en los modelos agudos y crónicos de degeneración muscular (Mitchell et al., 2019) principalmente a través de la secreción local de factores bioactivos y la modulación de las células inmunitarias, además las CME de donantes alogénicos o autólogos se pueden usar de manera segura, puesto que no provocan respuestas inmunitarias dañinas dentro del huésped receptor. Los estudios preclínicos han demostrado su eficacia con las CME modificadas genéticamente para llevar a cabo diversas terapias que alcanzaron su objetivo en el tratamiento incluso en el entorno xenogénico (Brown et al., 2019).

Las CME se obtienen fácilmente de varios tejidos adultos, se expanden rápidamente y se almacenan *ex vivo*, sin alteración en sus capacidades celulares y además pueden transdiferenciarse en diferentes tipos celulares como células β pancreáticas (Shivakumar et al., 2019), queratinocitos (Dos Santos et al., 2019), neuronas dopaminérgicas y colinérgicas (Marei et al., 2018), células del músculo liso (Bharti et al., 2019), endotelio (S.-H. Wang et al., 2009) y astrocitos (Bahat-Stroomza et al., 2009), lo cual representa un gran potencial para el modelamiento *in vitro* de diferentes patologías.

El uso de CME en la investigación como plataforma para posibles terapias novedosas para las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Cui et al., 2017; Kim et al., 2018; X. Wang et al., 2018) y Parkinson (Jamali et al., 2017; Kim et al., 2018) muestran la importancia del uso de este tipo de estrategias y la importancia de su investigación. Duncan y Valenzuela en el 2017 realizaron una revisión donde muestran el amplio espectro de posibilidades, no solo con CME sino con otro tipo de células madres (células madre embrionarias, células reprogramadas iPSCs) para el tratamiento de demencias, en especial el Alzheimer, concluyendo que tiene un gran potencial, presentándose como una estrategia prometedora que requiere aún de desarrollo (Duncan & Valenzuela, 2017).

Los estudios enfocados en el entendimiento de las CME derivadas de sangre menstrual para su utilización en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer apuntan a que estas tienen un potencial de transdiferenciación a neuronas similar al que presentan las CME derivadas de médula ósea (Azedi et al., 2014), además de presentar un aumento de marcadores de compromiso con el linaje glial (OLIG2 y GFAP). Más recientemente, Azedi y colaboradores en el 2016 muestran la capacidad de estas dos poblaciones celulares para expresar marcadores neuronales (Nestina, β III Tubulina, GABBR1, MAP2, entre otros) y astrocíticos (GFAP) (Azedi et al., 2017).

CAPITULO III: Los astrocitos y la neuroinflamación en la EA

3.1 Descripción de astrocitos

Los astrocitos (Del griego *αστρον* y *κύτος*; *astron*, estrella y *kytos*, un vaso hueco, célula posterior, es decir, célula similar a una estrella) son células gliales de origen ectodérmico y neuroepitelial que sostienen la homeostasis y proporcionan defensa inmunitaria en el SNC. Los astrocitos son altamente heterogéneos en forma y función y demuestran una notable plasticidad adaptativa que define el mantenimiento funcional del SNC en el desarrollo y el envejecimiento (Verkhatsky & Nedergaard, 2018).

En el SNC realizan diversas funciones como a) el soporte en el metabolismo de lípidos y carbohidratos a las neuronas (Camargo et al., 2017; Müller et al., 2018); b) el mantenimiento homeostático de iones extracelulares, pH y agua (Denizot et al., 2019; Formaggio et al., 2019; Y. Song & Gunnarson, 2012); c) absorción y eliminación de neurotransmisores tales como glutamato y GABA (Flanagan et al., 2018; Ishibashi et al., 2019; H. Park et al., 2013); d) regulación del flujo sanguíneo (Huang et al., 2019) y participación en procesos inmunológicos (Belkacemi et al., 2017; Cekanaviciute & Buckwalter, 2016; Proust et al., 2017). Aunque los astrocitos no generan potenciales de acción, son células excitables con capacidad de comunicarse a través de la activación de señales internas o externas, enviando mensajes a sus células vecinas. Los astrocitos presentan aumentos transitorios de calcio intracelular, estos son responsables de la comunicación astrocito-astrocito y astrocito-neurona (Guillamón-Vivancos et al., 2015).

Las disfunciones en astrocitos pueden contribuir o desempeñar roles primarios en las enfermedades neurológicas como la Enfermedad de Alzheimer (Fong et al., 2018; Lane-Donovan & Herz, 2017), Parkinson (K. Singh et al., 2018; Tong et al., 2015) y enfermedades psiquiátricas (Eusemann et al., 2015; Plitman et al., 2016; Xu et al., 2016).

3.2. Características morfológicas

La estructura y morfología que poseen los astrocitos humanos se ha caracterizado claramente de mamíferos como el ratón. Una gran cantidad de investigadores desde 1893 comenzaron a realizar observaciones que permitieron la categorización de los astrocitos que se utiliza en la actualidad y con los avances en la tecnología de imagen, se pudo dar un reporte más comprensivo de la cantidad de tipos de astrocitos estudiando tejidos humanos post-mortem. Actualmente se reconocen cuatro categorías de astrocitos estructural y anatómicamente diferentes: interlaminares, localizado en las capas I y II, protoplásmicos, ubicados en las capas III y IV, de proyecciones varicosas, encontrados en las capas V y VI y finalmente la astroglia fibrosa de la materia blanca (Vasile et al., 2017). Algunas características de cada una de las clases se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Tipos de astrocitos humanos. Imagen y texto tomado y adaptado de Vasile et al., 2017

| Morfología de los astrocitos | Tipo de astrocito | Características |
|------------------------------|---|---|
| | Astrocito interlaminar (Capas 1 y 2) | Largas proyecciones citoplasmáticas. Su cuerpo celular mide aproximadamente de 10 μm ; Sus funciones siguen siendo desconocidas, podrían apoyar la comunicación a distancia. |
| | Astrocito protoplasmático (3 y 4) | Son el tipo de astrocito más abundante en el cerebro. Sus ramificaciones son de aproximadamente 100 μm y son numerosas, dando una apariencia voluminosa a los astrocitos humanos vs los de roedor. |
| | Astrocito de proyecciones varicosas (5 y 6) | Células específicas de primates, tienen cinco proyecciones citoplasmáticas muy largas (≤ 1 mm) que son con frecuencia rectas, sin ramificar. |
| | Astrocitos fibrosos (materia blanca) | Son grandes (185 μm) y más simples que los astrocitos protoplasmáticos, prolongaciones largas y menos ramificadas. Sus funciones podrían estar relacionadas al soporte metabólico. |

3.3. Características inmunofenotípicas

Aunque en la literatura se reportan gran variedad de proteínas para marcar diferentes componentes celulares y subpoblaciones, como ALDH1L1, CD44, NDRG2 y transportadores de aminoácidos, ninguno de estos marcadores identifica a toda la población de astrocitos. Se reconoce una heterogeneidad creciente en la población de astrocitos, una complejidad que es relevante tanto para su función normal como para sus funciones patogénicas (Garwood et al., 2017), sin embargo, en inmunohistoquímica las proteínas más utilizadas son el GFAP y el S100 β .

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es una proteína de filamento intermedio III que se encuentra en los astrocitos, las células Schwann amielínicas y las células gliales entéricas, aunque es considerado el marcador típico para identificar astrocitos inmunohistoquímicamente. Es responsable de la estructura del citoesqueleto y el mantenimiento de la fuerza mecánica (Z. Yang & Wang, 2015).

El GFAP está codificado por un solo gen ubicado en el cromosoma humano 17q21 y hasta la fecha, se han identificado 10 isoformas. El GFAP- α (isoforma 1) es la mayor predominante en el cerebro y la médula espinal (Eng et al., 2000), seguido de la GFAP- δ , también llamada GFAP- ϵ (Isoforma 2) que se expresa preferentemente por astrocitos neurogénicos en la zona subventricular (Roelofs et al., 2005). La expresión de GFAP está regulada por varios factores de crecimiento, hormonas y lipopolisacáridos (Z. Yang & Wang, 2015).

En el contexto de la EA, la regulación del GFAP en astrocitos reactivos puede ser tan dramático que, en las etapas avanzadas, la proteína se deposita en las ramificaciones primarias de los astrocitos formando estructuras alargadas eosinofílicas llamadas fibras Rosenthal. Aunque los astrocitos reactivos no son exclusivos de la EA, la relación entre los astrocitos reactivos y las señas de identidad patológicas de EA, particularmente las placas amiloides, es la más íntima en cualquier enfermedad neurodegenerativa. De hecho, las placas amiloides seniles se definen entre otras características por la presencia de un grupo de astrocitos reactivos que penetran y abrazan depósitos amiloides con sus procesos, fragmentando y aislando las placas de los neuropilos circundantes (Perez-Nievas & Serrano-Pozo, 2018).

La proteína S100 β , también llamada proteína de unión a calcio β , es un miembro de la familia S100, que se distribuye en el citoplasma y en el núcleo, además puede ser secretado. La proteína se expresa ampliamente en astrocitos (Formaggio et al., 2019; J. Zhang & Jiao, 2015), específicamente en astrocitos maduros que envuelven los vasos sanguíneos; también marca oligodendrocitos, células endociliales, células de Schwann, entre otras (Camargo et al., 2017; Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Es interesante resaltar que este marcador es propio de células que tienen funciones relacionadas al sistema inmunológico, lo que lo hace particularmente útil para células de carácter glial a nivel cerebral.

El S100 β secretado en concentración nanomolares se comporta como una neurotrofina que protege a las células neuronales contra estímulos neurotóxicos a través de la regulación positiva mediada por NF- κ B, mientras que a dosis micromolares conlleva a muerte neuronal a través de la estimulación y producción de especies reactivas del oxígeno y/o potenciación de los efectos neurotóxicos de β amiloide, igualmente promueve actividades inflamatorias en astrocitos a dosis altas, mientras que a dosis bajas atenúa la activación de la microglía; también favorece la proliferación y migración celular (Benesova et al., 2012; Denizot et al., 2019; Yardan et al., 2011).

3.4. Los astrocitos en la neuroinflamación.

Los datos genéticos muestran que la mayor parte del riesgo de desarrollar la EA se asocia principalmente con genes expresados en células gliales. Entre estos, Clusterina (ApoJ), receptor 1 relacionado con Sortilin, el homólogo 2 de la familia de las fermitinas, y el principal factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer, ApoE, se expresan principalmente por astrocitos, lo que sugiere un papel crucial de la astrogliosis en la patogénesis de la enfermedad (Arranz & De Strooper, 2019). En la EA los astrocitos presentan una serie de cambios morfológicos frente a proteínas mal plegadas, moleculares y en casos graves la formación de cicatrices gliales, además de un aumento en la expresión de GFAP y vimentina (Olsen et al., 2018). En conjunto estos fenómenos se conocen como astrogliosis reactiva y es un estado altamente heterogéneo en el que las actividades de los astrocitos se alteran para responder a la lesión específica desempeñando papeles beneficiosos o perjudiciales (Acosta et al., 2017; Arranz & De Strooper, 2019).

Una de las alteraciones que se puede dar en las etapas iniciales del Alzheimer es la disfunción metabólica; es ampliamente conocido que los astrocitos tienen un rol crucial proveyendo energía al cerebro a través de la implementación de una serie de pasos metabólicos como glicólisis, producción de lactato, entre otros, los cuales apoyan las necesidades energéticas del cerebro. Se ha reportado que la actividad de

enzimas glucolíticas fundamentales se ven alteradas en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer, conduciendo a un aumento de la piruvato quinasa y la lactato deshidrogenasa en la corteza frontal y temporal, además de una disminución de la actividad de la glucosa-6 fosfato en el hipocampo (Mamelak, 2017). La disfunción metabólica de los astrocitos puede desencadenar el aumento de los depósitos de A β y una disminución de su aclaramiento que a su vez puede involucrarse con el aumento de la fosforilación de la proteína Tau y el estrés oxidativo, lo que finalmente desencadena la neuroinflamación (Cai et al., 2017).

Los astrocitos pueden ser inducidos por IL-1 α , el factor de necrosis tumoral (TNF α) y c1q secretados por la microglía activada en un subconjunto neurotóxico de astrocitos reactivos llamado A1 (Liddelow et al., 2017). Los astrocitos reactivos A1 de ratón aumenta la expresión de genes de la cascada del complemento, incluido el componente 3 del complemento (C3) y liberación de una neurotoxina no identificada que induce la muerte de neuronas y oligodendrocitos. Además, muestran una capacidad disminuida para promover la supervivencia y crecimiento neuronal, fagocitar elementos sobrantes de la sinapsis y restos de mielina (Hong et al., 2016). Alrededor del 60% de los astrocitos en la corteza prefrontal de cerebros post mortem de pacientes con EA expresan C3 al igual que cerebros post mortem de pacientes de enfermedad de Huntington, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y esclerosis múltiple, por lo tanto, el fenotipo A1 podría representar una vía de neurodegeneración común (Liddelow et al., 2017). Además, los astrocitos pueden activarse directamente por la exposición a oligómeros A β , mediante receptores de insulina, receptores ionotrópicos de glutamato NMDA y AMPA, receptores Wnt, receptor PrP^C (Pereira Diniz et al., 2017) y receptores de reconocimiento de patrones (PRR) incluidos los receptores carroñeros, los receptores para productos finales de glicación avanzada (RAGE) y los receptores de tipo toll (TLR) (Frederiksen et al., 2019). Ambas vías inducen la secreción de TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β y óxido nítrico sintasa inducible (Frederiksen et al., 2019), además los astrocitos activados producen numerosas moléculas proinflamatorias, una de ellas es la S100 β , la cual es altamente expresada por astrocitos reactivos en estrecha proximidad a los depósitos β amiloides (Mori et al., 2009).

En los astrocitos, el NF- κ B controla significativamente la secreción de éstas citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión, favoreciendo la infiltración de linfocitos periféricos y aumentando la respuesta inflamatoria; éste proceso se convierte en un mecanismo autorregulador que conduce a la neurodegeneración (Carrero et al., 2012; Meraz-Ríos et al., 2013, p.); además el NF- κ B desempeña un papel importante en la regulación de la transcripción de la enzima 1 de escisión de APP de sitio β (BACE1), ya que se han identificado numerosos sitios de unión a NF- κ B cerca del promotor BACE1 (Kinney et al., 2018) (Olsen et al., 2018), esta proteína también se encuentra en astrocitos, por tanto estos pueden contribuir en la formación de la placa β amiloide (W. Wang et al., 2019), aunque durante las primeras etapas de la EA se ha demostrado que los astrocitos son más eficientes que la microglía en el aclaramiento de A β (Nielsen et al., 2010). El hecho de que los astrocitos reactivos con alta carga de A β en su interior se encuentren con frecuencia en el cerebro con EA confirma aún más la importancia de los astrocitos en la eliminación de A β (Sollvander et al., 2016).

En el cerebro con inflamación, los astrocitos retraen sus pies de los vasos sanguíneos, aumentando la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, mediante el aumento de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular proangiogénico A (VEGF-A) que activa la enzima óxido nítrico

endotelial (eNOS) para regular negativamente la expresión de proteínas de uniones estrechas, lo que conduce a la interrupción de las uniones endoteliales y a la infiltración de células inmunes (H. J. Park et al., 2015).

Aunque las funciones estructurales y de comunicación de los astrocitos se han caracterizado bien, algunas evidencias sugieren que los astrocitos también tienen la capacidad de actuar como células inmunocompetentes. Se ha observado que, bajo ciertas condiciones como tratamiento con IFN- γ , la activación de astrocitos se caracteriza por una versión mejorada del complejo principal de histocompatibilidad clase II, sugiriendo que pueden actuar de manera similar a las células presentadoras de antígeno y, por lo tanto, activar linfocitos (Vardjan et al., 2012).

De otro lado, también en la literatura, se encuentra el papel beneficioso de los astrocitos durante las primeras etapas de EA, por ejemplo los astrocitos reactivos liberan grandes cantidades de GABA (neurotransmisor inhibitorio), lo que se cree puede ayudar a regular la función proinflamatoria de la microglía (M. Lee et al., 2011)(Le Meur et al., 2012), al igual que la expresión de TGF- β 1, un ligando para los receptores que se encuentran en las neuronas, los astrocitos y la microglía; TGF- β 1 es neuroprotector contra la producción, depósito y daño de A β , regula la neuroinflamación e inhibe la vía de una de las enzimas que fosforila tau, GSK-3 β (Hu et al., 2019). Estos datos revelan un papel complejo de los astrocitos, que puede ser protector durante las primeras fases de la neuroinflamación, pero perjudicial durante la inflamación crónica del SNC.

3.4.1. Inducción de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias secretadas por los astrocitos

En condiciones normales, el ambiente del SNC es fuertemente antiinflamatorio, con presencia alta de IL-10 y el factor de crecimiento transformante (TGF)- β ; la mayoría de las citoquinas proinflamatorias se expresan a niveles muy bajos o indetectables. Varias de estas moléculas están involucradas en la función normal del cerebro, pero cuando se produce una invasión de patógenos u otro daño en el SNC, se regula una gama de citoquinas para instigar la respuesta inmune adecuada. Las citoquinas proinflamatorias pueden originarse de células dañadas, microglía activada, astrocitos, neuronas o linfocitos activados, una respuesta al peligro incluirá la elevación de las principales citoquinas proinflamatorias TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-6 que activan los astrocitos, células del SNC y células del sistema inmune (Jensen et al., 2013).

La IL-1 β ha sido descrita como un "regulador maestro" dentro de la cascada inflamatoria cerebral debido a su papel integral en la regulación de la expresión de otras citoquinas proinflamatorias, incluidas TNF- α e IL-6 (Mendiola & Cardona, 2018). Es producida principalmente por microglía, no obstante, también por astrocitos. Hay once miembros de la superfamilia, sin embargo, la mayor parte de la atención en neuroinflamación se presta a IL-1 β debido al potente efecto en la inflamación (Dinarello, 2011).

En pacientes con deterioro cognitivo leve y EA se encuentra elevada, lo que sugiere que el aumento de la producción de IL-1 β comienza temprano y permanece elevado a medida que la enfermedad progresa (Forlenza et al., 2009). Se ha evidenciado que la IL-1 β aumenta la secreción de APP en células gliales y

el procesamiento amiloidogénico de PPA a través de la activación de la proteína quinasa C y el aumento de la actividad γ -secretasa (Y.-F. Liao et al., 2004).

La IL-6 es una citoquina multifuncional importante que puede considerarse proinflamatoria o antiinflamatoria según la cantidad y el estado de liberación. La IL-6 es crucial para la homeostasis normal del tejido neuronal, y la eliminación de esta vía de señalización conduce a una activación microglial reducida, aunque la sobreproducción de IL-6 conduce a neuroinflamación crónica y neurodegeneración (Guzman-Martinez et al., 2019). En la EA, los estudios han demostrado que la tinción de IL-6 en el hipocampo y la corteza cerebral está fuertemente asociada con las placas A β (Hampel et al., 2005). Además el péptido A β estimula la síntesis y liberación de IL-6 por las células gliales (Y. Chong, 1997), mejora la transcripción y expresión de APP y el complejo del receptor- ligando soluble en el suero y en el LCR (Ringheim et al., 1998). También se ha demostrado que la IL-6 da como resultado la hiperfosforilación de varios epítopes de tau al aumentar la actividad de CDK5 a través del activador de CDK5 p35, que puede servir como un puente importante entre las patologías centrales de EA (Quintanilla et al., 2004).

El TNF- α , está implicado en la inflamación sistémica y es producido principalmente por macrófagos activados, linfocitos T CD4 y células Natural killer. TNF- α interactúa con dos receptores de factor de necrosis tumoral el TNFR1 y TNFR2 (CD120a y CD120b respectivamente). TNFR1 se expresa en la mayoría de las células y responde al TNF- α soluble y unido a la membrana, y transmite las funciones más proinflamatorias y proapoptóticas del TNF- α . El TNFR2 se encuentra en las células inmunes y responde solo al TNF- α unido a la membrana, y es más responsable de las respuestas de supervivencia y pro-crecimiento (Decourt et al., 2017). Los astrocitos expresan TNFR1 constitutivamente y expresan TNFR2 en respuesta a la estimulación por TNF- α , IL-1 β o IFN- γ (Ng et al., 2018). Los estudios demuestran que el tratamiento con TNF- α en cultivo de astrocitos conduce a la regulación positiva leve de IL-6 y a moléculas antivirales IFN- α e IFN- β . Además, existe una leve regulación positiva de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) generado por la microglía que genera una vía de activación a astrocitos cruzada, produciendo radicales libres que son tóxicos para los patógenos (Xie et al., 2020).

El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) participa en la regulación del crecimiento celular, la diferenciación celular y la inmunosupresión. Los estudios han demostrado que el TGF- β está elevado en el LCR, el suero y las células endoteliales microvasculares cerebrales de pacientes con EA (Tominaga & Suzuki, 2019), pero se encuentra disminuido en el plasma de los pacientes con EA, lo que podría contribuir a la muerte neuronal y la exacerbación de la neuroinflamación. Además, se han reportado déficits en las vías de TGF- β en cerebros con EA (Diniz et al., 2017).

Dentro de esta familia de citoquinas, la isoforma más abundante es TGF- β 1, que es secretada por los astrocitos y es un ligando para los receptores que se encuentran en las neuronas, los astrocitos y la microglía. TGF- β 1 es neuroprotector contra la producción, depósito y daño de A β , regula la neuroinflamación e inhibe la vía de la enzima quinasa encargada de fosforilar tau, GSK-3 β (Diniz et al., 2019).

La IL-10 es una citoquina antiinflamatoria que se encuentra en el tejido cerebral sano, pero está regulada por aumento en pacientes con EA (Magalhães et al., 2017; Ouyang & O'Garra, 2019). Existe una correlación entre los niveles de IL-10 y la progresión de EA, lo que sugiere que IL-10 podría servir como un biomarcador para el diagnóstico y / o progresión de EA. La IL-10 es liberada tanto por microglía como por astrocitos en respuesta al aumento de citoquinas proinflamatorias para intentar mantener la homeostasis en el sistema inmune (Elahi et al., 2020). Se ha demostrado que IL-10 inhibe las citoquinas proinflamatorias, incluidas IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6 y la quimioquina MCP-1 (Wang M. et al., 2018).

Varias cascadas de señalización intracelular regulan la producción de IL-10 por microglía y astrocitos. Entre ellos se encuentran la quinasa regulada por señal extracelular (ERK) que regula al alza la producción de IL-10 por las células microgliales tras la activación de TLR4 y en astrocitos por la estimulación de TLR3 (Lobo-Silva et al., 2016).

3.5. Astrocitos y estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un estado crónico transitorio en el que se pierde el balance entre los oxidantes y antioxidantes (enzimáticos o no enzimáticos) en favor de los oxidantes, conllevando a una disrupción de la señalización redox, control y/o daño molecular (Sies, 2015). El metabolismo produce especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS / RNS) como subproductos naturales. Entre los ROS más importantes están los radicales peroxilo (ROO \cdot), el óxido nítrico (ON), el anión radical superóxido (O $_2$ $^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (OH \cdot) y algunas otras especies no radicales como el peroxinitrito (ONOO \cdot), el oxígeno simple (O $_2$) y el peróxido de hidrógeno (H $_2$ O $_2$). Estas especies a niveles moderados pueden actuar como segundos mensajeros (Lushchak, 2014).

Los astrocitos, desempeñan un papel principal en la producción de antioxidantes, la desintoxicación de especies reactivas y el mantenimiento del equilibrio redox en el cerebro, sin embargo, la sobreproducción de ROS / RNS, los defectos en la desintoxicación, la lesión o enfermedad del SNC como la EA pueden provocar astrogliosis reactiva (Rizor et al., 2019).

El péptido A β altera la actividad de NADPH oxidasa (NOX), enzima productora del radical superóxido, mediante la acción de varios sustratos como calcio, lo que a su vez resulta en la generación de ROS (Tarafdar & Pula, 2018), aumento de calcio intracelular y astrogliosis (Wyszenbach et al., 2016). Aunque, los astrocitos también pueden activar las vías ERK1/2 y la fosforilación de la fosfolipasa A2 citosólica, independientemente de la activación de NOX, que a su vez causa disfunción al disminuir el potencial de membrana mitocondrial, mejorar la actividad de NOX y la sobreproducción de ROS (González-Reyes et al., 2017).

Además, durante la neuroinflamación, el aumento de las concentraciones de ROS / RNS puede conducir a la activación del factor de transcripción NF- κ B que induce la sobreexpresión de óxido nítrico sintasa en los astrocitos y microglía, en particular NOX2 e iNOS, lo que resulta en la producción de peroxinitrito. También, la activación de NF- κ B induce la expresión de ciclooxigenasa (COX-2) y la fosfolipasa A2 citosólica, que a su vez estimulan la generación de prostaglandinas, promoviendo la inflamación (González-Reyes et al., 2017). Por lo tanto, se ha propuesto que la vía de señalización NF- κ B está

involucrada en reacciones inflamatorias y en la señalización redox, ya que se ha informado una diafonía directa entre ROS y NF- κ B (Turillazzi et al., 2016).

La capacidad antioxidante de los astrocitos también se ve afectada con la exposición del péptido β amiloide que induce un agotamiento de Glutación (GSH) en astrocitos, pero es más grave en neuronas mostrando una mayor tasa de muerte celular, lo que sugiere que la neurotoxicidad refleja la dependencia neuronal de los astrocitos para el soporte antioxidante, puesto que los astrocitos son los productores de los elementos primarios necesarios para la producción de GSH en neuronas, como la glicina y la cisteína (S.-F. Huang et al., 2020).

PARTE II: INVESTIGACIÓN

CAPITULO IV: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

La EA es el trastorno neurodegenerativo más común, causante del 60 a 70 % de las demencias a nivel mundial. De hecho, cada 3 segundos se presenta un nuevo caso de demencia (Christina Patterson, 2018) y se ha estimado que para el 2050, al menos 152 millones de personas estarán afectadas por dicha patología convirtiéndose en una epidemia a nivel mundial (Organización Mundial de las Salud, s. f.) (Sepulveda-Falla et al., 2014).

Colombia no es ajena a esta problemática, en el departamento de Antioquia se ha identificado el mayor grupo familiar con la EA de inicio temprano, personas que presentan la mutación en el dominio de Presenilina de la gamma secretasa *PSEN1* E280A (Glu280Ala); existen aproximadamente 5.000 miembros vivos, entre ellos, 1800 portadores de la mutación, de los cuales el 30% experimentan síntomas de la EA, con edades promedio de 44 años (IC del 95%, 43 - 45) para el inicio del deterioro cognitivo leve y 49 años (49-50) al inicio del desarrollo de la demencia (Lemere et al., 1996), lo que representa fuerte impacto negativo en su edad productiva (Acosta-Baena et al., 2011).

Este panorama plantea varios desafíos para la salud pública mundial y para el país, representando un reto para la ciencia médica, donde uno de los mayores problemas en la investigación actual sobre la EA reside en la falta de un paradigma conceptual integrado y coherente que explique su patogénesis. Esta carencia ha dificultado la búsqueda de nuevos medicamentos para una adecuada terapia farmacológica, considerando que toda nueva droga debe orientarse hacia blancos terapéuticos relevantes para la fisiopatología de la EA desde sus estadios iniciales (Morales G et al., 2010).

Es por ello que se hace necesario generar nuevos enfoques y modelos que permitan una mayor comprensión de la EA, ya que la mayoría son modelos animales, generalmente ratones transgénicos que expresan genes humanos para la patología amiloidea y la taupatía, pero no recapitulan completamente la patología (Pavoni et al., 2018; Vidal & Ghetti, 2012). El uso clínico del cerebro fetal y del tejido cerebral adulto post mortem es problemático debido a preocupaciones éticas que se presentan también con el uso de células madre embrionarias. Estas últimas células pueden formar teratomas al igual que las células reprogramadas genéticamente iPSc (Portmann-Lanz et al., 2010).

Por tanto, una alternativa es el uso de CME que tienen capacidad de diferenciación a condrocitos, osteocitos y osteoblastos (Dominici et al., 2006) y capacidad de transdiferenciación a neuronas colinérgicas y astrocitos (Avola et al., 2017; Mendivil-Perez et al., 2019), favoreciendo su uso como plataforma robusta para estudiar la EA *in vitro* y desde el enfoque de la neuroinmunología, enfoque relativamente nuevo que permite integrar los diferentes procesos neuropatológicos de la enfermedad alrededor del proceso inflamatorio como un componente clave para la fisiopatología del padecimiento (Robinson-Agramonte et al., 2019).

Desde este punto de vista, la CME permiten establecer un modelo natural de la EA, desde el ámbito neuroinmunológico de la EA, mejorando las aproximaciones metodológicas y permitiendo dar respuesta

a nuestra pregunta de investigación: **¿Podrían los astrocitos derivados de CME de sangre menstrual (SM) reactivarse mediante estímulos proinflamatorios?**

CAPITULO V: DESARROLLO DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

5.1. Hipótesis

Los astrocitos silvestres derivados de CME de Sangre Menstrual (SM) responden a estímulos proinflamatorios mediante la producción de citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL 1- β e IL-6 y activación de NF- κ B.

5.2. Objetivos del proyecto

5.2.1. Objetivo general

Caracterizar las células astrocíticas a partir de CME - SM como modelo de neuroinflamación de la Enfermedad de Alzheimer.

5.2.2. Objetivos específicos

1. Obtener y caracterizar astrocitos derivados de Células Mesenquimales Estromales de sangre menstrual.
2. Evaluar el efecto del lipopolisacárido (LPS) en función del marcador NF- κ B, citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 y marcadores GFAP y S100 β en astrocitos.
3. Evaluar el efecto del péptido A β 42 en función del marcador NF- κ B, citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL- 6 y marcadores GFAP y S100 β en astrocitos.
4. Evaluar el efecto del sobrenadante de las células colinérgicas PSEN 1 E280A en función del marcador NF- κ B, citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL- 6 y marcadores GFAP y S100 β en astrocitos.

CAPITULO VI: DESARROLLO DE LOS OBJETIVOS Y METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

6.1. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1.1 Aislamiento de CME-SM

Las muestras de sangre menstrual provenían de donantes sanas (previo consentimiento informado), recolectadas a través de copa menstrual o retención de descarga durante los primeros tres días de menstruación. La sangre menstrual se mezcló con volúmenes iguales de PBS, antibiótico (penicilina/estreptomicina/ anfotericina) y EDTA. Una vez que se eliminaron los contaminantes microbianos, las CME se aislaron dentro de las 4h siguientes, utilizando el método estándar de Ficoll descrito previamente (Liu et al., 2018). Después se suspendieron en medio de crecimiento DMEM con bajo contenido de glucosa (GIBCO®, Life Technologies, cat # 11885-084), suero fetal bovino (SFB) (GIBCO®, Life Technologies, cat # 10082-147) y antibiótico a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂. Al tercer día de incubación, las células no adherentes se lavaron y se adicionó medio de crecimiento con reemplazó cada 3 días. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 100 % se tripsinizaron.

6.1.2 Caracterización de CME-SM

Las CME-SM fueron caracterizadas de acuerdo a su capacidad de formación de colonias (la colonia muestra crecimiento adherente típico y morfología en forma fibroblastoide); positividad para marcadores de superficie mesenquimatosos CD90, CD9 y CD73 (99% de positividad) y capacidad de diferenciación a linaje osteocítico, condrocítico y adiposo realizados de acuerdo al protocolo descrito por Mendivil-Pérez y colaboradores (Mendivil-Perez et al., 2019).

6.1.3 Ensayo de transdiferenciación de CME-SM a astrocitos

Para la diferenciación de astrocitos se sembraron 1×10^5 células en medio de cultivo regular (DMEM bajo glucosa Sigma cat # D6046 suplementado con SFB) hasta alcanzar una confluencia baja. Luego, el medio fue reemplazado y las células fueron incubadas en Astrocyte medium® durante 0, 4 y 7 días.

6.1.4 Análisis de citometría de flujo de marcadores astrocíticos

La citometría de flujo se utilizó para determinar el porcentaje de células doble positivas GFAP/S100 β (Tcw, J et al., 2017). Las células tratadas con Astrocyte medium® en los días 0, 4 y 7 se suspendieron y fijaron con paraformaldehído (durante la noche). Después del lavado, las células se incubaron simultáneamente con anticuerpos primarios GFAP, S100 β a 4°C durante la noche. Luego las suspensiones celulares se lavaron e incubaron con anticuerpos secundarios (DyLight 594 donkey anti-goat and DyLight 488 donkey anti-rabbit antibodies). Finalmente, las células fueron lavadas y re-suspendidas en PBS para su análisis en un citómetro LSRFortessa (BD Biosciences, San Jose, CA). Se adquirieron diez mil eventos y el análisis de adquisición se realizó utilizando FlowJo 7.6.2 Data Analysis Software. La tinción positiva se definió como la emisión de fluorescencia que excedió los niveles de la población marcada en el control negativo.

6.1.5 Evaluación de marcadores astrocíticos mediante Western blot

Las células tratadas con Astrocyte medium® para 0, 4 y 7 días se trataron con tripsina y se recolectaron los pellets. Todos los lisados se cuantificaron utilizando el ensayo de ácido bicinonínico (Thermo Scientific cat # 23225), y fueron cargados en geles de poliacrilamida al 12%, después las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham Biosciences). Las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpos primarios monoclonales/policlonales contra la región de determinación, proteína ácida fibrilar glial (GFAP, cat# sc6170, Santa Cruz), S100β (cat # 676604, Biolegend), β-tubulina III (cat # G712A, Promega), Neurofilamento-L (NF-L, cat# 125044, Thermo). Se utilizó anticuerpo anti-actina (cat # MAB1501, Millipore) como control de expresión. Anticuerpos infrarrojos secundarios (goat anti-rabbit IRDye® 680RD, cat #926-68071; donkey anti-goat IRDye® 680RD, cat # 926-68074; and goat anti mouse IRDye® 800CW, cat #926-32270; LICORBiosciences) se usaron para el análisis del Western blot y los datos se adquirieron mediante el uso del software Odyssey.

6.1.6 Evaluación de marcadores astrocíticos y el factor nuclear NF-κB mediante inmunofluorescencia

Para el análisis de inmunofluorescencia de marcadores astrocíticos y neuronales, las células tratadas con Astrocyte Medium® para 0, 4 y 7 días se fijaron con paraformaldehído. Después del lavado se incubaron durante la noche con anticuerpos primarios contra proteínas GFAP, S100β, β-tubulina III, NFL y NF-κB (cat # PA5-16545). Luego se lavaron y se incubaron con anticuerpos fluorescentes secundarios (DyLight 488 y 595 donkey anti-rabbit and goat and mouse, Cat DI 2488 and DI 1094, respectivamente). Los núcleos fueron coloreados con Hoechst 33342 (Life Technologies) y las imágenes fueron adquiridas en un microscopio Floyd Cells Imaging Station.

6.1.7 Imágenes intracelulares de calcio

La concentración citoplasma de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) fue medida mediante microscopio de fluorescencia (AxioCam ZEISS). Las células cultivadas en Astrocyte medium para 0, 4, y 7 días fueron transferidas a una solución que contienen un indicador sensible Ca^{2+} (Fluo3-AM, una forma de acetoximéter del colorante fluorescente Fluo-3; Thermo Fisher Scientific Cat# F1242) durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se procedió al lavado. Los transitorios intracelulares Ca^{2+} fueron estimulados por glutamato. Las amplitudes de los transitorios de fluorescencia relacionados con Ca^{2+} se expresaron en relación con la fluorescencia en reposo ($\Delta F / F$) y se calcularon por la fórmula $\Delta F / F = (F_{max} - F_{rest}) / (F_{rest} - F_{bg})$ de acuerdo con Pap et al., 2009. El programa Image J (<https://imagej.net/>) se utilizó para el cálculo de las intensidades de fluorescencia publicadas anteriormente de acuerdo Mendivil-Pérez y colaboradores (Mendivil-Perez et al., 2019).

6.1.8 ELISA

Las CME-SM se sometieron al ensayo de diferenciación explicado previamente en el numeral 6.1.3 durante 7 días. Posteriormente, se sometieron las CSA a estímulos con LPS (1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), péptido sintético A β 42 (5 y 10 μM) y sobrenadantes tomados de cultivos de CME transdiferenciadas a neuronas que poseen la mutación PSEN2 E280A, se analizó un panel de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) y antiinflamatorias (IL-10) a través del ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Brevemente, se tomaron los sobrenadantes de los cultivos de CSA tras 4 días de ser estimulados con los diferentes compuestos mencionados anteriormente, para la cuantificación de la producción de citoquinas a través del kit ELISA (Biolegend, CA, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El plato de 96 pozos utilizado fue sensibilizado con el anticuerpo de captura durante toda la noche a 4°C; posteriormente, se lavó con buffer de lavado (PBS 1X y 0,05% Tween-20) y luego se adicionó buffer de bloqueo (SBF 10% y PBS 1X) durante 2 horas. A continuación, las muestras y el estándar de citoquinas recombinantes se añadieron durante 2h. Tras realizar lavados, se añadió el anticuerpo de detección por 1h a 25°C y luego la enzima avidina peroxidasa por 30 min. Finalmente, se añadió TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) durante 15 minutos y se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2N. La reacción colorimétrica se leyó en un espectrofotómetro Dynex Technologies, Inc. (Chantilly, VA, USA) a una longitud de onda de 450 nm.

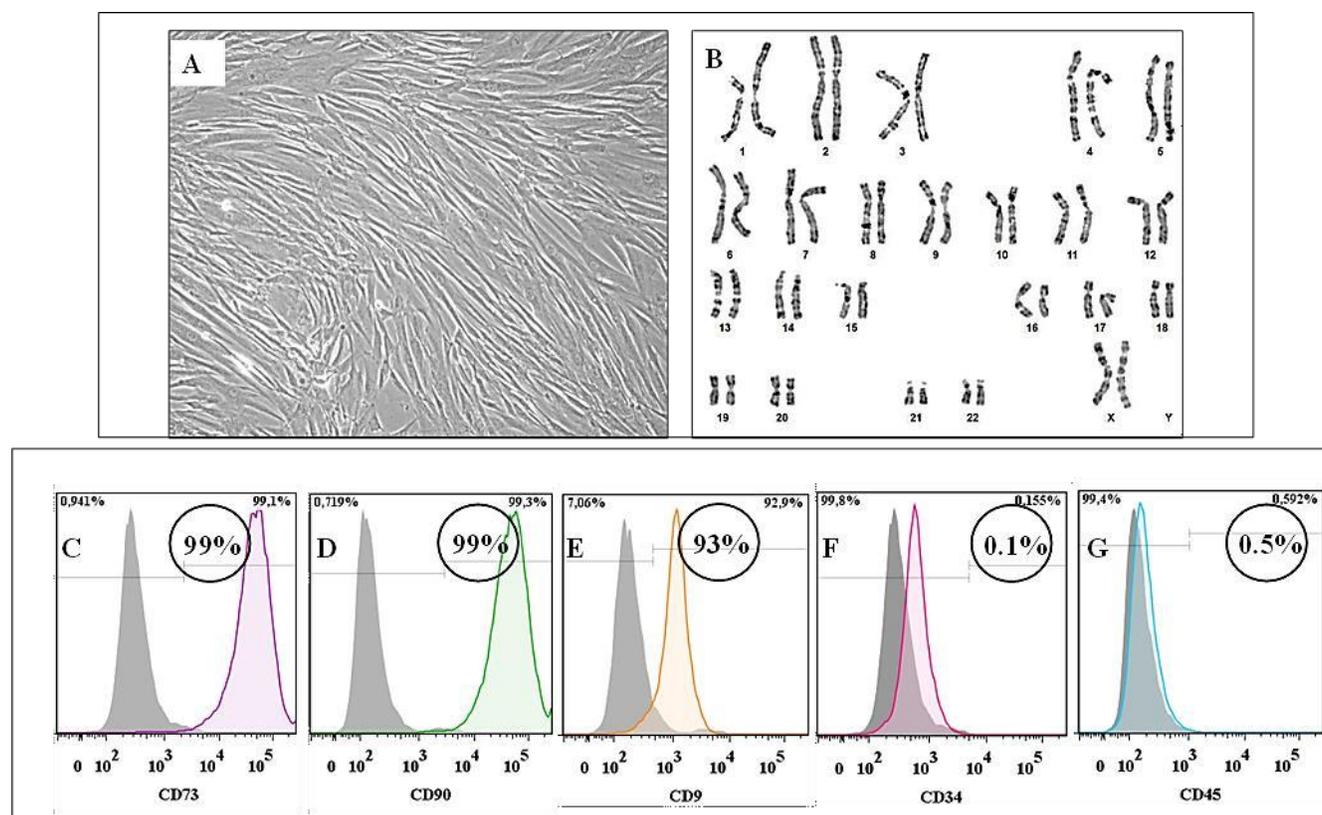
6.1.9 Análisis de datos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el análisis Student-t o ANOVA unidireccional seguido de la comparación post-hoc de Bonferroni calculada con el software científico GraphPadPrism 6 (GraphPad, Software, Inc. La Jolla, CA, EE. UU.). La significación estadística fue aceptada en * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ y *** $p < 0.001$

CAPITULO VII: RESULTADOS

7.2.1 Caracterización de CME-SM

Las CME aisladas de sangre menstrual fueron caracterizadas previamente en el grupo de investigación. Las evidencias sugieren que estas células cumplen con los criterios estándar para definir una Célula Mesenquimal Estromal de acuerdo con la Sociedad de Terapia Celular (Dominici et al.,2006). Como se muestra en la **figura 1**, las CME-SM presentan morfología fibroblastoide y adherencia al frasco de cultivo (Fig. 1A). El análisis de cariotipo no mostró alteraciones cromosómicas (Fig. 1B). Los porcentajes de positividad para los marcadores de superficie celular CD73 (Fig. 1C), CD90 (Fig. 1D) y CD9 (Fig. 1E) fueron superiores al 92%, mientras que el porcentaje de células negativas para marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45 fueron menores al 5% (Fig. 1F, 1G). Además, las células mostraron capacidad para diferenciarse en osteocitos (Fig. 1K), adipocitos (Fig. 1L), y condrocitos (Fig. 1M) en medios especiales, mientras que las CME- SM en medio de mantenimiento regular fueron negativas (Fig. 1H, 1I, 1J).



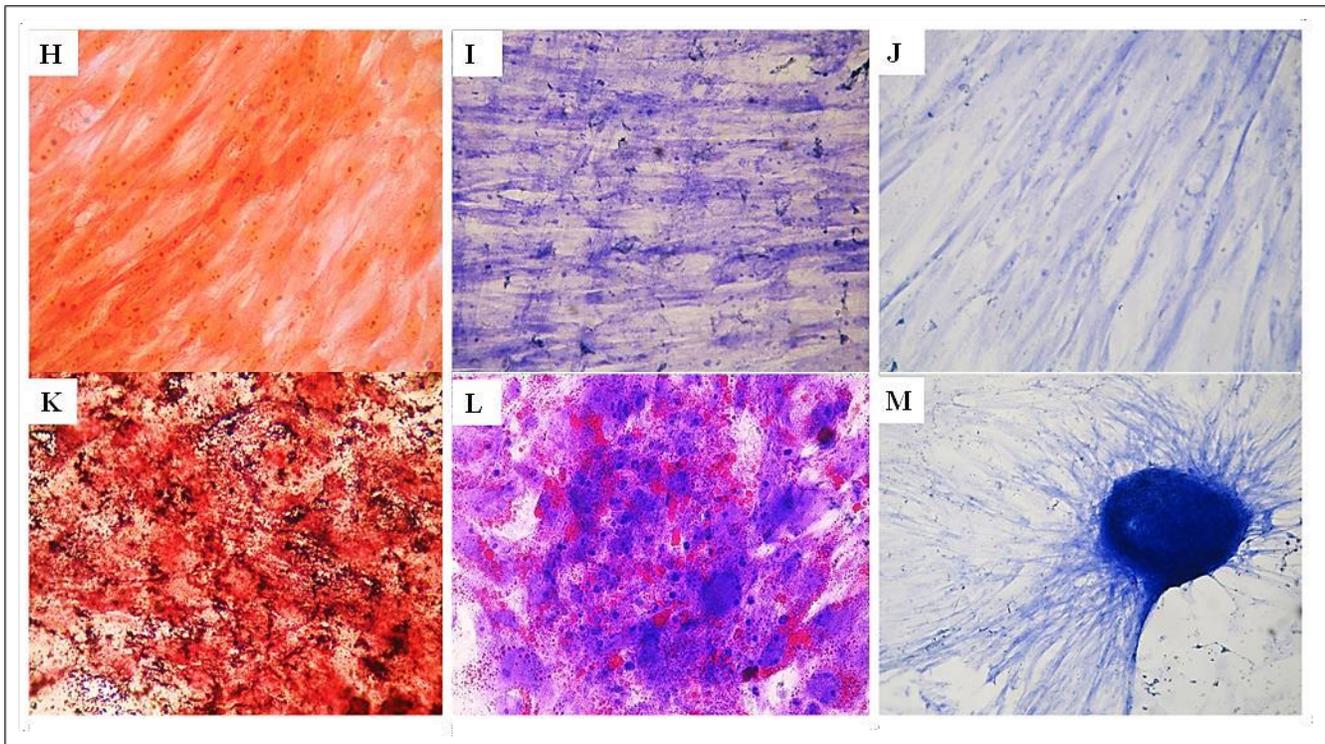


Figura 1. Caracterización de CME-SM (A) Imagen representativa de morfología fibroblastoide y crecimiento adherente. (B) cariotipo normal (46 XX). Análisis de citometría de flujo que demuestra positividad para CD73 (C), CD 90 (D), CD 9 (E). Negatividad para marcadores hematopoyéticos CD34 (F) y CD45 (G). Tinción Von Kossa negativa para CME-SM indiferenciadas en medio regular (H). Tinción Oil red- O para CME-SM indiferenciadas en medio regular (I). Tinción azul de toluidina para CME-SM indiferenciadas en medio regular (J). Tinción Von Kossa positiva para CME-SM diferenciadas a osteocitos evidenciada por precipitación intracelular plata (K). Tinción Oil- red-O positiva para CME-SM diferenciadas a adipocitos evidenciada por vacuolas lipídicas rojas (L). Tinción azul de toluidina para CME-SM diferenciadas a condrocitos (M). (Quintero-Espinoza 2021, Mol. Neurobiol. en evaluación).

7.2.2 Las CME- SM disminuyen marcadores mesenquimales (CD9 y CD73) con la exposición al medio de cultivo comercial.

Se evaluaron los marcadores de células mesenquimales evaluados anteriormente (Figura 1) y en marcador hematopoyético CD45 para evidenciar la regulación de estas moléculas después de someter las CME-SM al proceso de transdiferenciación. La transdiferenciación de las CME en células similares a astrocitos (CSA por sus siglas en español, astrocyte-like cells (ALCs) por sus siglas en inglés) se evaluó 7 días posterior a la incubación en Astrocyte medium®. En la Figura 2 se evidencia que los marcadores CD73 y CD9 se ven regulados negativamente, llevando su expresión a 0, mientras que el marcador CD90 permanecer presente en un 81%. Por otro lado, el marcador hematopoyético CD45 permanece invariable, sin aumentar si expresión durante el proceso de transdiferenciación.

Day 7

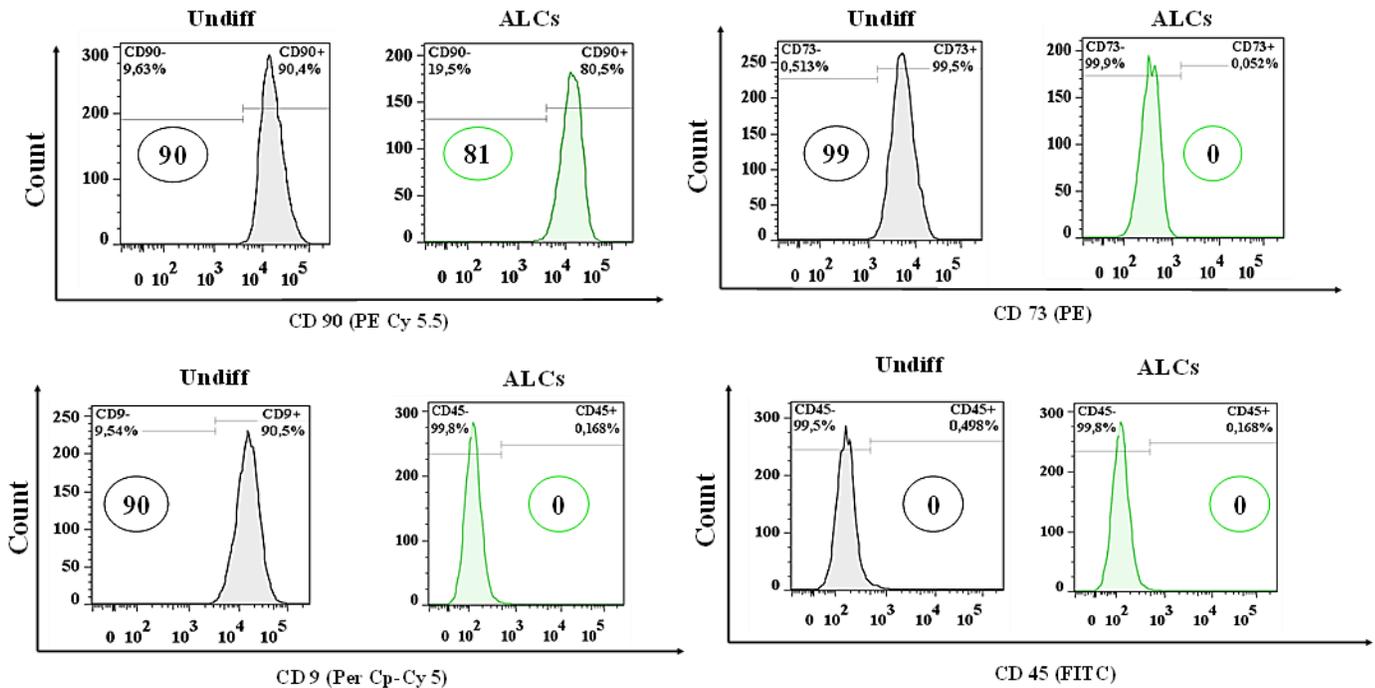
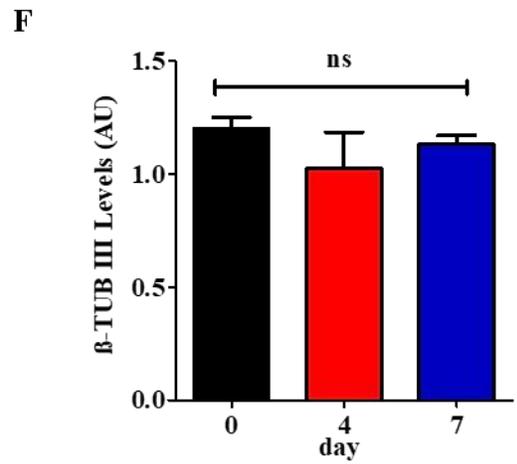
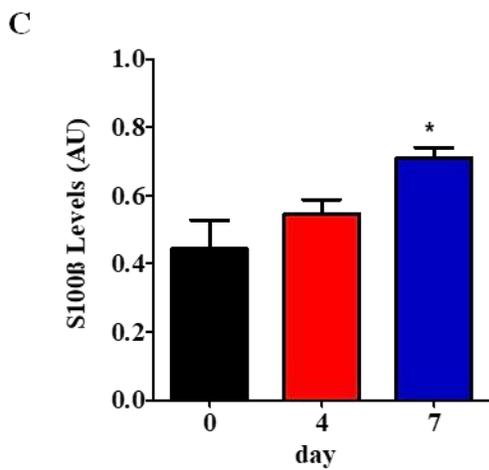
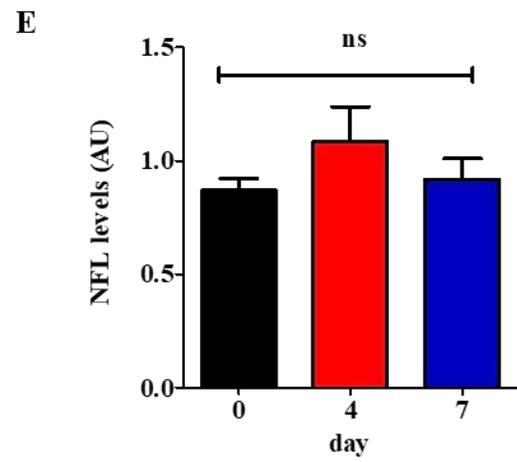
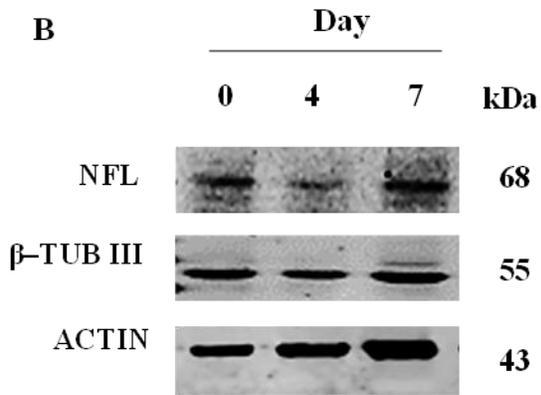
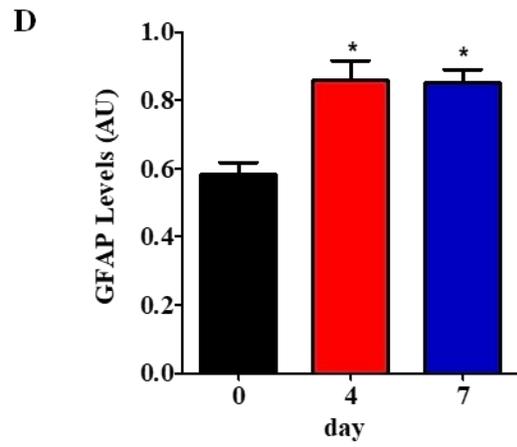
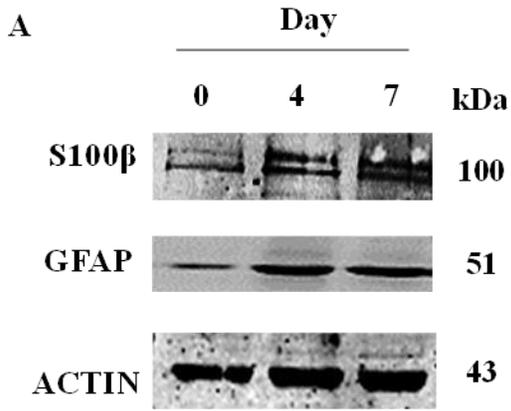


Figura 2. Análisis de citometría de marcadores de CME-SM tras la transdiferenciación a células similares a astrocitos. Las CME-SM fueron cultivadas en medio regular o Astrocyte médium® como se describe en materiales y métodos por 7 días. Porcentaje de células positivas para CD90, CD73, CD9 y CD45. Datos expresados como la media \pm SD de dos ensayos independientes. *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$).

7.2.3 Las CME- SM aumentan marcadores astrocíticos con la exposición al medio de cultivo comercial

La transdiferenciación de las CME en células similares a astrocitos (CSA) se evaluó después de 0, 4 y 7 días de incubación en Astrocyte médium®. El análisis de western blot muestra que las CME presentan niveles basales de S100 β y GFAP en el día 0 (Fig. 3A, 3C, 3D). La expresión de nivel de S100 β aumentó en el día 4 (~1.2-f.i., Fig. 3A and 3C), así como la expresión GFAP a los 4 y 7 días (~0.8- and ~0.6-f.i., Fig. 3A and 3D). En cuanto a los marcadores neuronales, la proteína de neurofilamento presentó una expresión baja en el día 7 comparada con el día 4 (0,8 y 0,6-f.i., Fig. 3B y 3E), contrario a la expresión de β -tubulina III, que aumentó en el día 7 (Fig. 3B y 3F). La misma tendencia con respecto al control se observó por inmunofluorescencia (Fig. 3G-P).

Dado que GFAP y S100 β son los marcadores estándar para identificar astrocitos (Verkhatsky et al., 2018), queríamos confirmar si las CME transdiferenciadas en CSA expresaron simultáneamente estos marcadores. El análisis de citometría de flujo muestra un porcentaje de la doble positividad de GFAP/S100 β fue del 25 y 59% a los 4 y 7 días de cultivo respectivamente (Figura 4A, B).



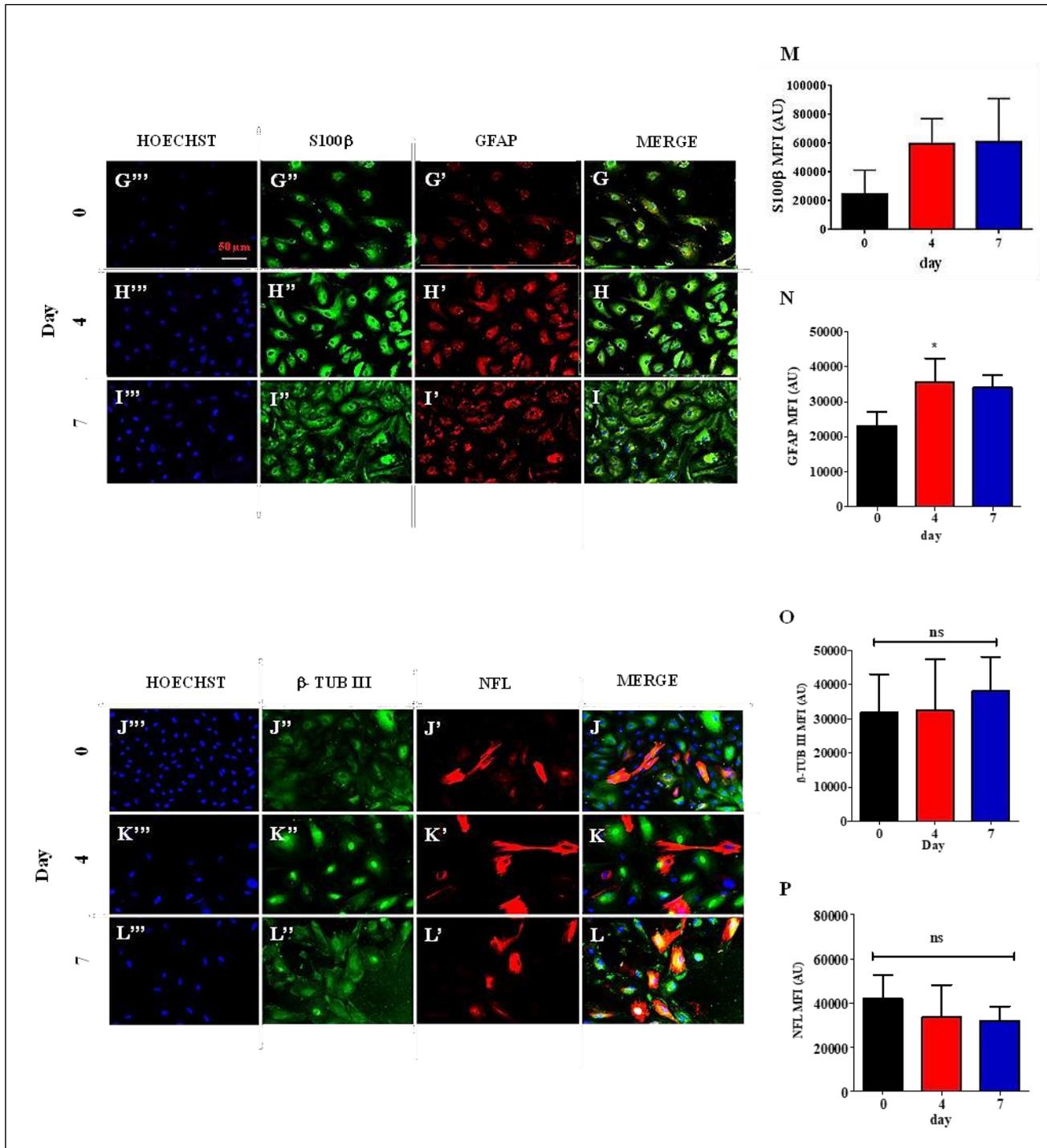


Figura 3. Las CME-SM aumentan marcadores astrocíticos. Las CME-SM fueron cultivadas en Astrocyte medium como se describe en materiales y métodos para 0, 4 y 7 días. Después los extractos de las proteínas fueron marcados con anticuerpos primarios contra las proteínas GFAP, S100β, NFL, β-tubulina III y actina. La intensidad de las bandas del western blot se demuestra en (A, B) fueron medidas (C, D, E, F) por imágenes de infrarrojo (Odyssey, LI-COR) y la intensidad fue normalizada con actina. Las imágenes representan 1 a experimentos independientes. Los datos son presentados como media ± SD. *(p<0.05), **(p<0.01), ***(p<0.001) Las CME-SM fueron cultivadas en Astrocyte medium como se describe en materiales y métodos por 0,4 y 7 días. Después las células se tiñeron doblemente como indica la figura con anticuerpos primarios contra las proteínas GFAP (roja) y S100β (verde) (G- I). NFL (rojo) y β-tubulina III (verde) (J-L). Los núcleos fueron teñidos con

Hoechst 33, 342 (azul). (M-P). Intensidad media de fluorescencia (MFI) cuantificación de imágenes obtenidas por inmunofluorescencia Imagen ampliada a 200X. Datos expresados como la media \pm SD. *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$).

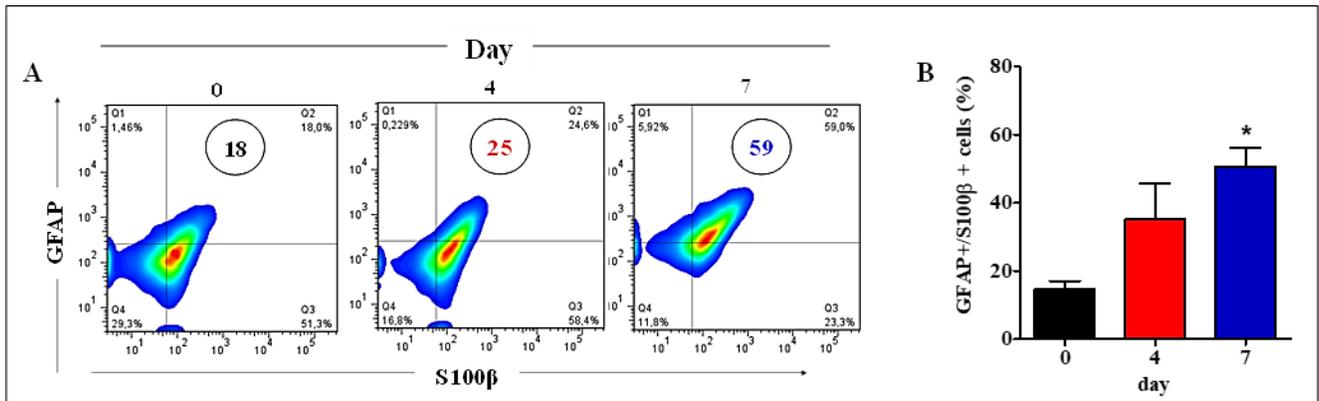


Figura 4. Análisis de citometría de diferenciación de CME-SM a Células Similares a astrocitos. Las CME-SM fueron cultivadas en Astrocyte medium como se describe en materiales y métodos por 0,4 y 7 días. (A) y (B) Porcentaje de células doblemente positivas para GFAP y S100 β . Datos expresados como la media \pm SD de dos ensayos independientes. *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$).

7.2.4 El glutamato favorece la acumulación intracelular de Ca²⁺ en CSA

La señalización de calcio intracelular en astrocitos se desencadena por múltiples factores, incluyendo el glutamato en la hendidura sináptica, que estimulan los receptores acoplados a la proteína G en la membrana, lo que lleva a la producción de IP3. IP3 activa los receptores IP3R2 en retículo endoplasmático (ER), resultando en la liberación intracelular de calcio y posterior exocitosis (Jones et al., 2018). Por lo tanto, la acumulación de Ca²⁺ en CSA se evaluó mediante imágenes Ca²⁺ mediadas por Fluo-3, con la estimulación de glutamato. Mientras que los CSA sin tratamiento en el día 0, no fueron afectadas, el glutamato indujo una elevación transitoria de Ca²⁺ intracelular en el día 4 y el día 7 (Fig. 5A-B) bajo las mismas condiciones experimentales. Además, el cambio máximo de fluorescencia ($\Delta F/F$) en el día 4 fue de $0,10 \pm 0,05$ veces después de 120 s. de exposición al glutamato en comparación con las células en el día 0 ($p < 0.05$), mientras que el máximo de $\Delta F/F$ en el día 7 fue de $0,50 \pm 0,2$ veces después de 240 s. tras la adición de glutamato ($p < 0.05$) y disminuye lentamente.

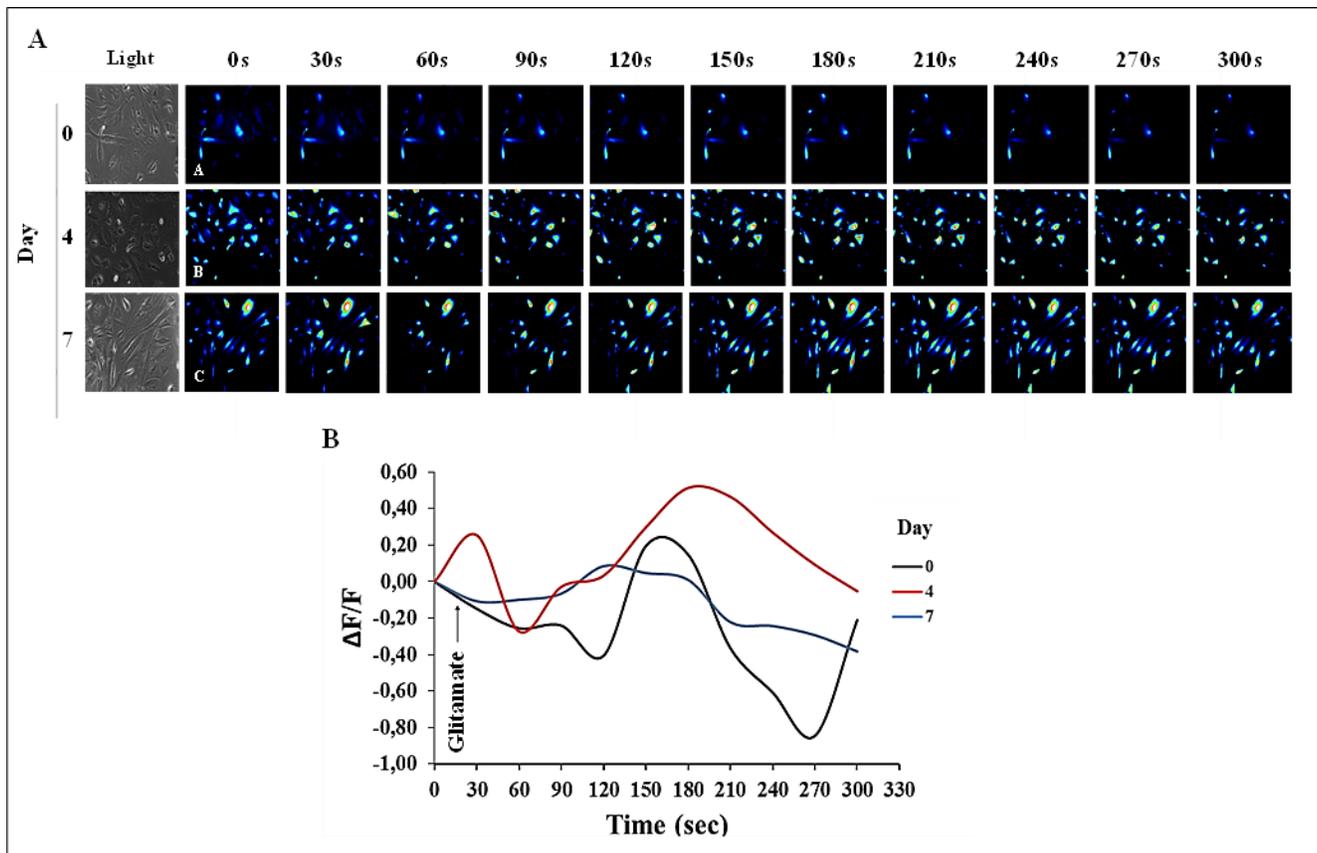


Figura 5. Las CSA responden al glutamato con transitorios de calcio intracelular. Las CME-SM fueron cultivadas en Astrocyte medium como se describe en materiales y métodos por 0,4 y 7 días. (A) imágenes de inmunofluorescencia de Ca^{2+} intracelular representativas en lapsos de tiempos de 0-300 segundos para los días 0,4 y 7 ($n=30$ células, $N=3$ pozos) en respuesta al tratamiento con glutamato. (B) La intensidad de fluorescencia es indicada con los contrastes de color: azul oscuro<azul brillante<amarillo<verde. Normalización de la señal media de fluorescencia ($\Delta F/F$) indicando la elevación citoplasmática temporal de calcio. Datos expresados como la media \pm SD. *($p<0.05$), **($p<0.01$), ***($p<0.001$).

7.2.5 Las CSA aumentan marcadores astrocíticos con la exposición a estímulos proinflamatorios

Pasados los 7 días de transdiferenciación, se sometieron las CSA (ALCs por sus siglas en inglés) a diferentes concentraciones de LPS, $\text{A}\beta$ y sobrenadante obtenido de células transdiferenciadas a neuronas colinérgicas con la mutación E280A. Se evidenció un cambio significativo en los niveles de GFAP y S100 β en presencia del estímulo de LPS en todas las concentraciones (1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). No se presentaron cambios en estos marcadores astrocíticos cuando se trató con el péptido sintético $\text{A}\beta$, no obstante, y de forma interesante, los marcadores se vieron regulados al alza en presencia del sobrenadante de las células mutadas (E280A) (Figura 6).

Por otro lado, los marcadores neuronales β -III tubulina y neurofilamento no presentaron cambios a través de los tratamientos respecto al control, excepto para β -III tubulina en presencia de la concentración más alta de $\text{A}\beta$ (10 μM) que resultó con un aumento significativo de este marcador (Figura 7).

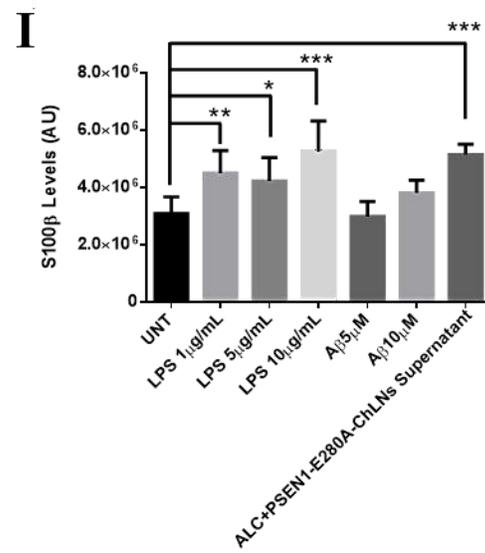
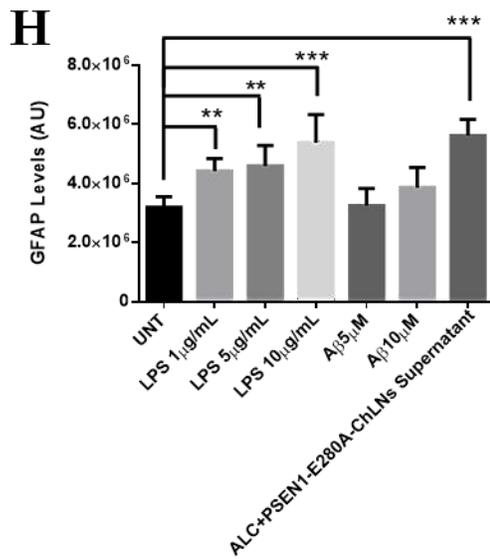
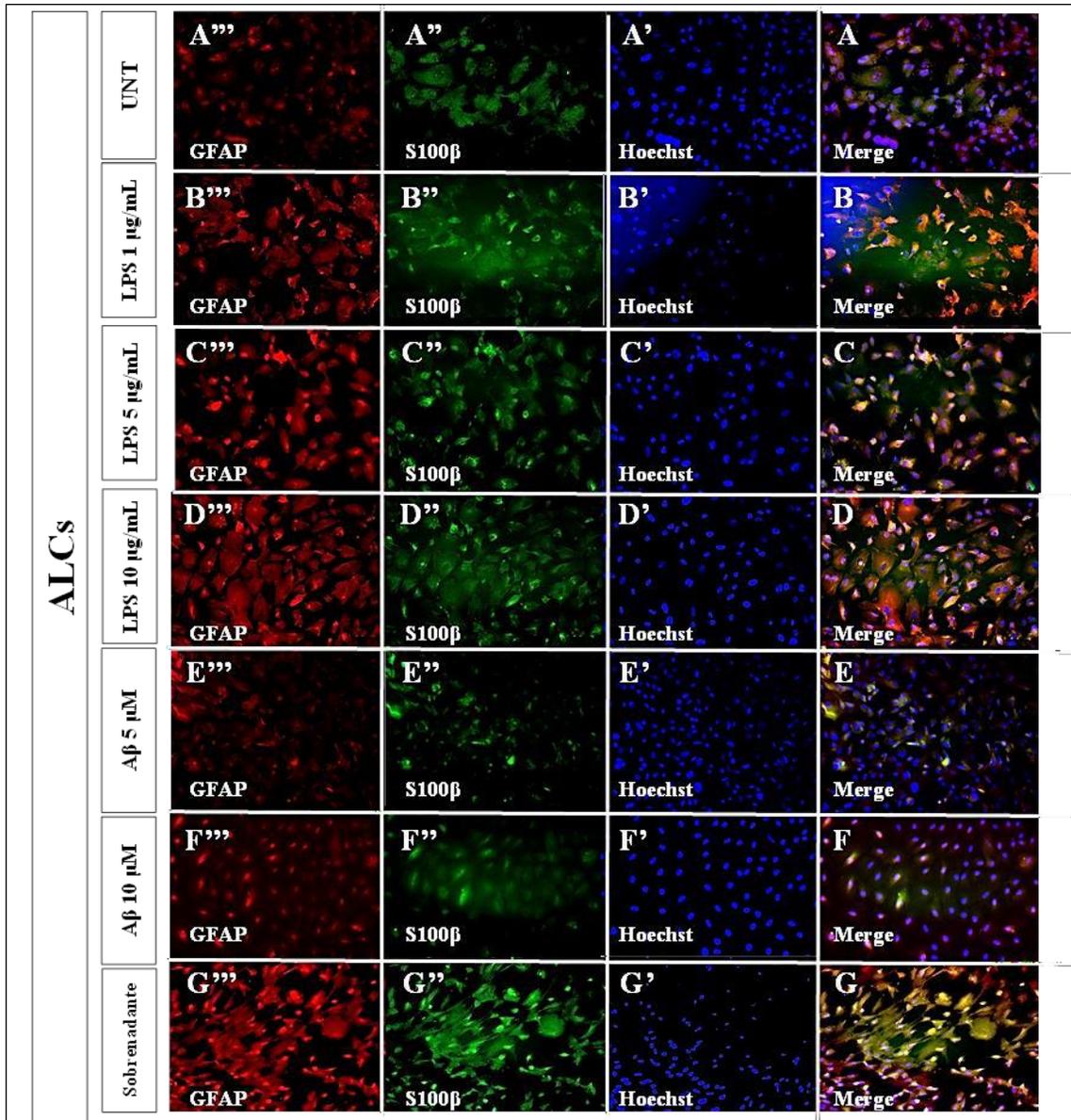


Figura 6. Las células similares a astrocitos (CSA) aumentan marcadores astrocíticos con la exposición a estímulos proinflamatorios. Las ALCs se sometieron a concentraciones crecientes de LPS (1, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$), A β (1 y 10 μM) y sobrenadante de células colinérgicas mutadas PSEN1 E280A (ALC+PSEN1-E280A-ChLNs Supernatant) durante 4 días. Después se tiñeron doblemente como indica la figura con anticuerpos primarios contra las proteínas GFAP (roja) (A'''-G''') y S100 β (verde) (A''-G'') Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33, 342 (azul). (A'-G'). Intensidad media de fluorescencia (MFI) cuantificación de imágenes obtenidas por inmunofluorescencia Imagen ampliada a 200X. Datos expresados como la media \pm SD. *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$).

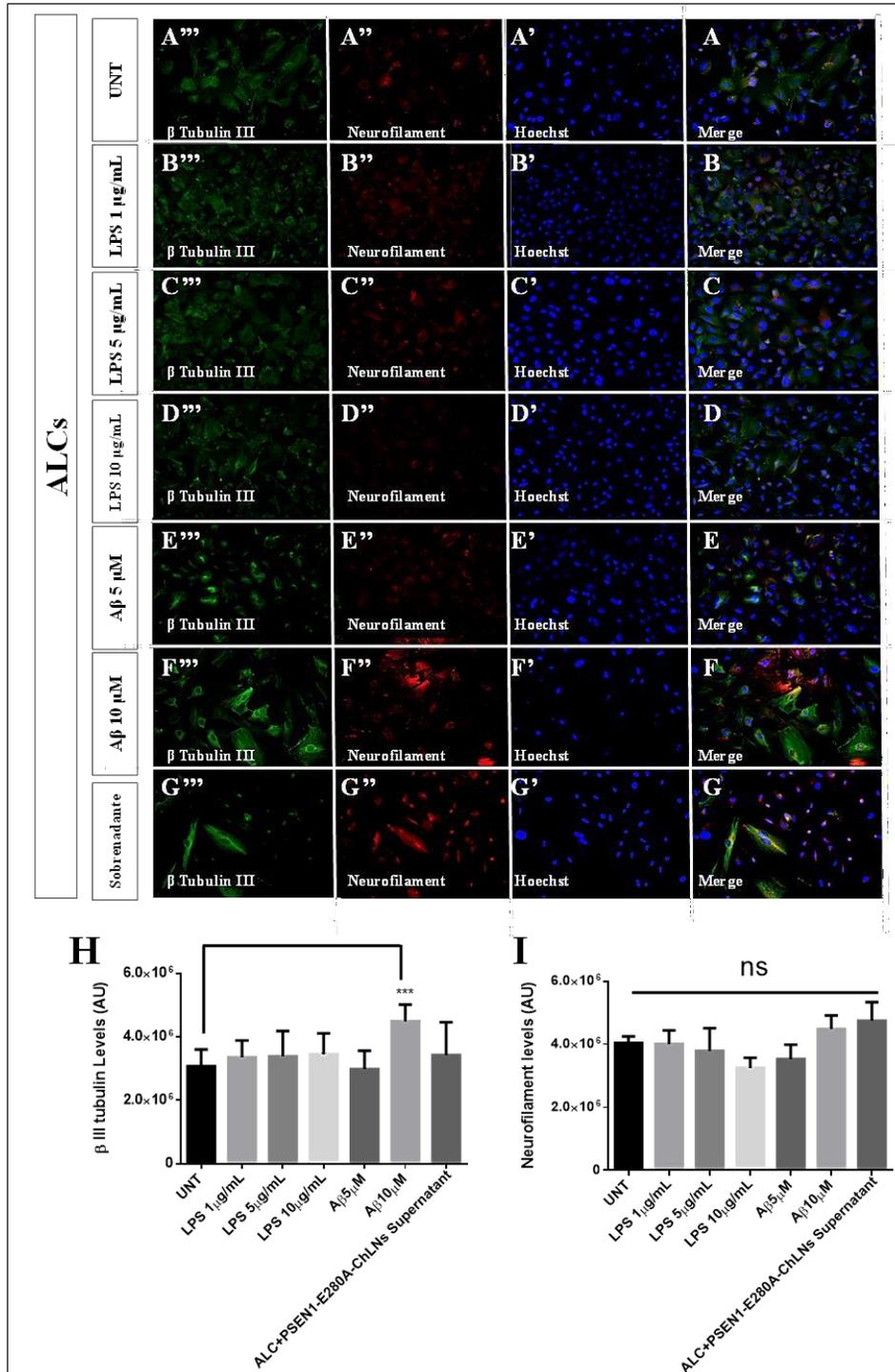


Figura 7. Las células similares a astrocitos (CSA) no presentaron cambios significativos con la exposición de estímulos proinflamatorios. Las ALCs se sometieron a concentraciones crecientes de LPS (1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), $\text{A}\beta$ (1 y 10 μM) y sobrenadante de células colinérgicas mutadas PSEN1 E280A (ALC+PSEN1-E280A-ChLNs Supernatant) durante 4 días. Después se tiñeron doblemente como indica la figura con anticuerpos primarios contra las proteínas Neurofilamento (roja) (A'''-G''') y β -III tubulina (verde) (A''-G''). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33, 342 (azul). (A'-G'). Intensidad media de fluorescencia (MFI) cuantificación de imágenes obtenidas por inmunofluorescencia Imagen ampliada a 200X. Datos expresados como la media \pm SD. *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$).

7.2.6. Las CSA activan NF- κ B en presencia de estímulos proinflamatorios.

Para evaluar el efecto de los estímulos en proteínas que se han visto activadas en la respuesta neuroinflamatoria, se evaluó la activación de NF- κ B en las células similares a astrocitos (ALCs por sus siglas en inglés). Se determinó que en presencia de LPS, independiente de su concentración, hay una activación de NF κ B determinada por su traslocación al núcleo (Figura 8 B-D). Así mismo, se observó una activación significativa de esta molécula en presencia de $\text{A}\beta$ (10 μM) y en presencia del sobrenadante con respecto al control.

7.2.7. Las CSA producen citoquinas proinflamatorias.

Una de las funciones comunes de los astrocitos como células inmunes es la respuesta a estímulos proinflamatorios a través de la producción de citoquinas y otros factores solubles. Cuando se evaluó la producción de IL-6, se evidencia la respuesta de las CSA en respuesta al LPS a todas las concentraciones con valores similares (mostrando como dato representativo el de menor concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que es estadísticamente significativa respecto al control de CSA en estado basal, sin estimular. Se observa que no hay respuesta ante el péptido sintético bajo ninguna de las concentraciones (Figura 9A). Sin embargo, interesantemente se muestra que los sobrenadantes provenientes de las neuronas colinérgicas E280A posee altas cantidades de IL-6, que se ve regulado a la baja de forma significativa cuando se pone en el cultivo de CSA. Se resalta que existe mayor cantidad de IL-6 en los sobrenadantes comparado con la activación que genera LPS en las CSA. A pesar de esto, como se presentó previamente, respecto al control, la producción de IL-6 es significativamente mayor. Por otro lado, en la figura 10A, se observa que no se produce IL-1 β en respuesta a estímulos como $\text{A}\beta_{42}$ y LPS. No obstante, se presenta un comportamiento similar al explicado en la figura 10B respecto a la regulación de la concentración de IL-1 β presente basalmente en los sobrenadantes de neuronas colinérgicas E280A. Finalmente, no se observa expresión de las proteínas TNF α e IL-10 por la técnica de ELISA.

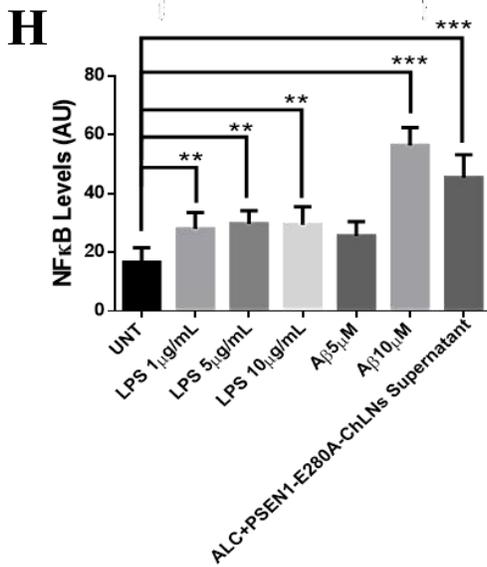
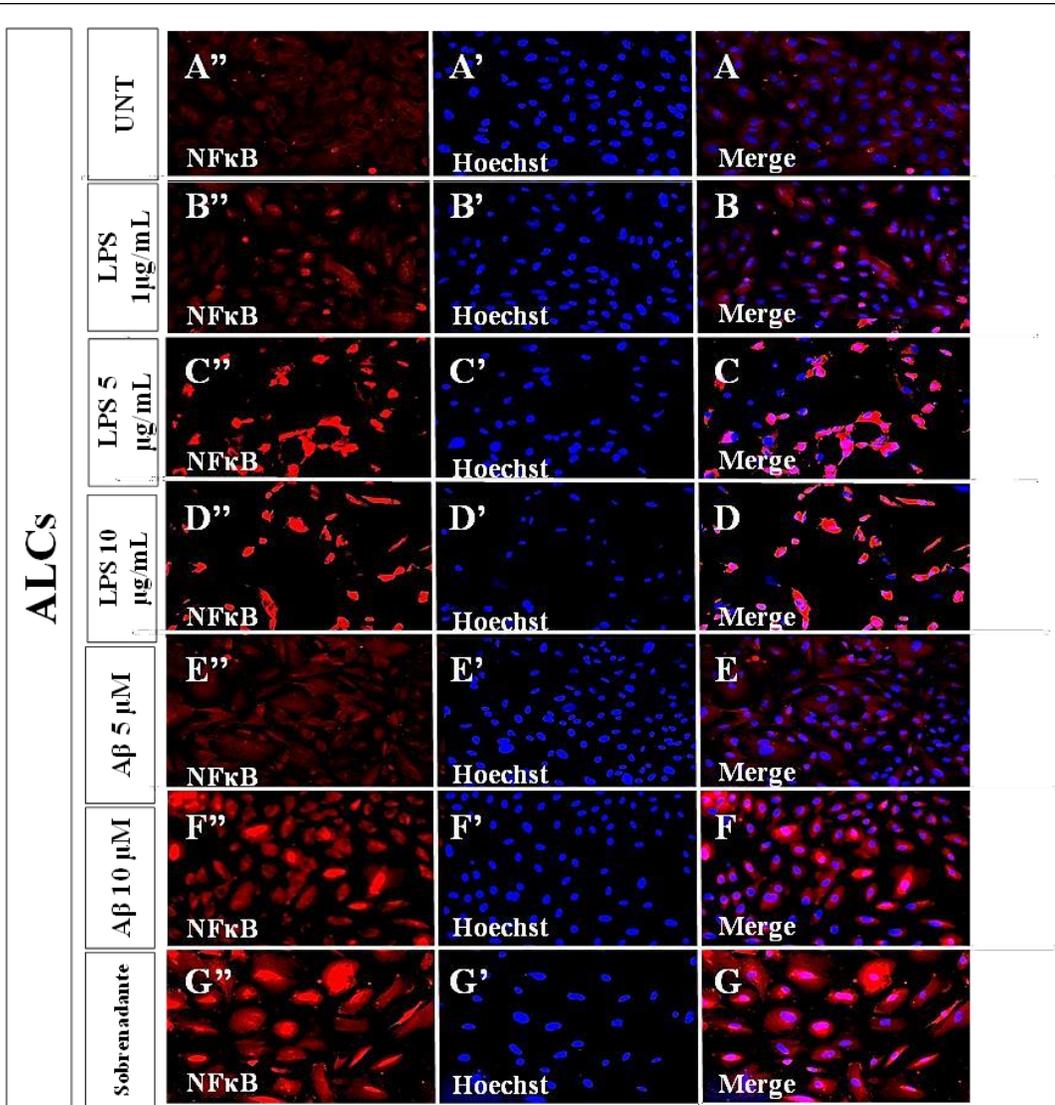


Figura 8. Activación del factor de transcripción NF- κ B con la exposición de factores proinflamatorios. Las ALCs se sometieron a concentraciones crecientes de LPS (1, 5 y 10 μ g/mL), A β (1 y 10 μ M) y sobrenadante de células colinérgicas mutadas PSEN1 E280A (ALC+PSEN1-E280A-ChLNs Supernatant) durante 4 días. Después se tiñeron doblemente como indica la figura con anticuerpos primarios contra las proteínas NF- κ B (roja)(A''-G'') Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33, 342 (azul). (A'-G'). Intensidad media de fluorescencia (MFI) cuantificación de imágenes obtenidas por inmunofluorescencia Imagen ampliada a 200X. Datos expresados como la media \pm SD. *(p<0.05), **(p<0.01), *** (p<0.001).

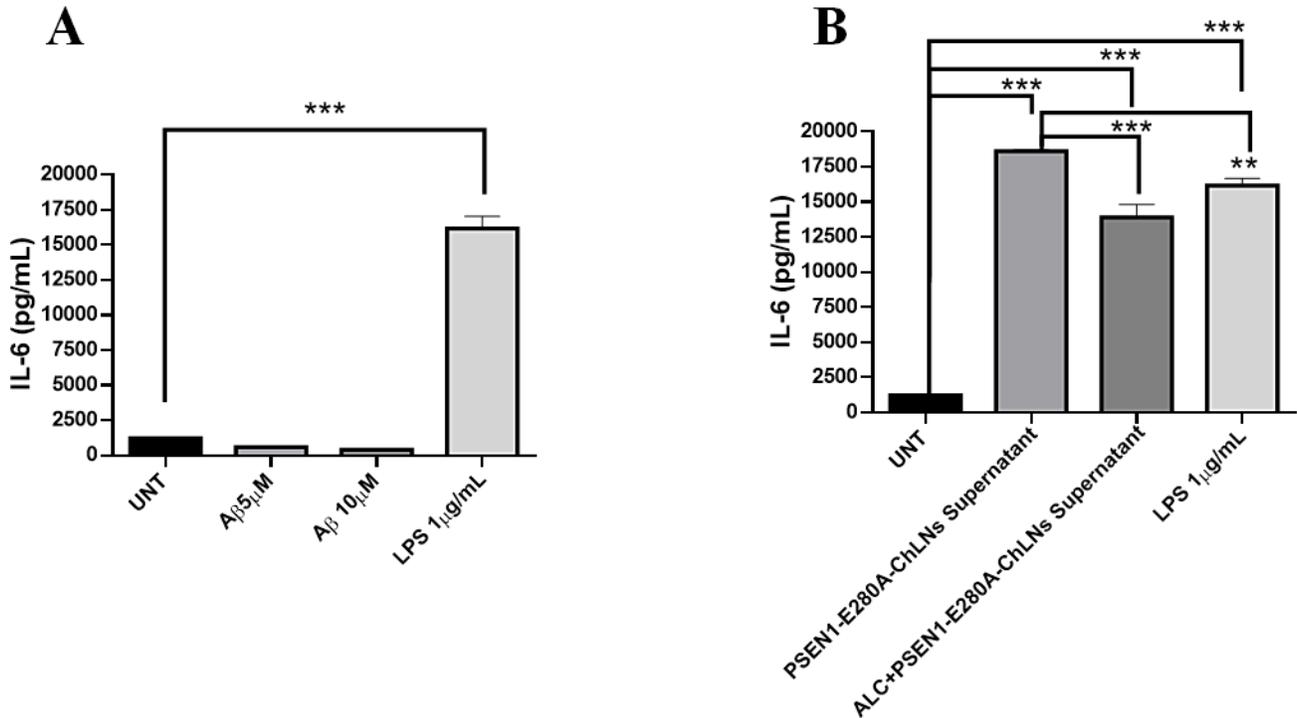


Figura 9. Las CSA responden a estímulos inflamatorios (LPS) produciendo IL-6 y sobrenadantes de cultivos de neuronas colinérgicas E280A, regulando la concentración de IL-6. Se sometieron las CSA a estímulos con LPS (1, 5 y 10 μ g/mL), péptido sintético A β 42 (5 y 10 μ M) y sobrenadantes tomados de cultivos de neuronas colinérgicas PSEN2 E280A (ALC+PSEN1-E280A-ChLNs Supernatant) y se analizó la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL1- β e IL-6) y antiinflamatorias (IL-10) a través del ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). A. Producción de IL-6 de CSA en respuesta a estímulos de LPS y A β 42. B. Regulación de IL-6 de CSA en respuesta a sobrenadantes de neuronas colinérgicas E280A. Datos expresados como la media \pm SD. *(p<0.05), **(p<0.01), *** (p<0.001).

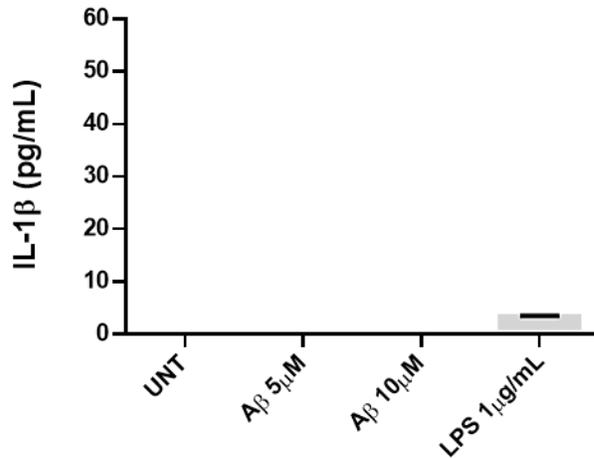
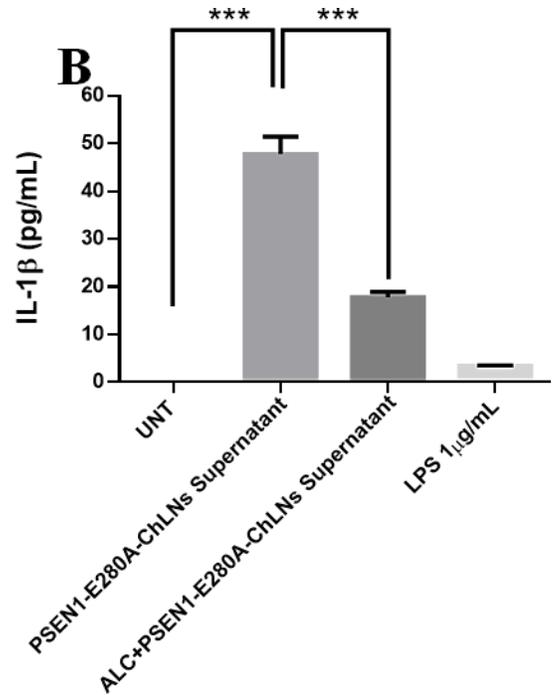
A**B**

Figura 10. Las CSA responden a sobrenadantes de cultivos de neuronas colinérgicas E280A, regulando la concentración de IL-1β. Se sometieron las CSA a estímulos con LPS (1, 5 y 10 μg/mL), péptido sintético Aβ₄₂ (5 y 10 μM) y sobrenadantes tomados de cultivos de neuronas colinérgicas PSEN2 E280A (ALC+PSEN1-E280A-ChLNs Supernatant) y se analizó la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF-α, IL1-β e IL-6) y antiinflamatorias (IL-10) a través del ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). **A.** Producción de IL-1β de CSA en respuesta a estímulos de LPS y Aβ₄₂. **B.** Regulación de IL-1β de CSA en respuesta a sobrenadantes de neuronas colinérgicas E280A. Datos expresados como la media ± SD. *(p<0.05), **(p<0.01), ***(p<0.001).

CAPITULO VIII. DISCUSIÓN

En este estudio reportamos por primera vez que el medio comercial para el mantenimiento de astrocitos (GIBCO® cat #A1261301) promueve la transdiferenciación de CME-SM a astrocitos en 7 días, evidenciado por la doble positividad para marcadores astrocíticos GFAP y S100 β (59%). Además de la disminución en el marcador específico de linaje neuronal, neurofilamento, a través de citometría, la tendencia del aumento en proteínas gliales también se observó con las técnicas de Western blot e inmunofluorescencia con respecto control. Adicionalmente, determinamos que hay una regulación de los marcadores mesenquimales CD9 y CD73 y una disminución (81% vs 90% del control) del marcador de CD90.

CD90 o Thy-1 es una glicoproteína de la superficie celular expresada en múltiples tipos celulares, entre ellos neuronas, células endoteliales, timocitos, células estromales y en algunas células hematopoyéticas. CD90 está vinculado principalmente a interacciones célula-célula o célula-matriz extracelular, modulando procesos de adhesión, además se ha reportado que tiene roles importantes en procesos de inmunidad e inflamación, y se ha reportado la presencia de uno de sus ligandos, la integrina $\alpha\gamma\beta3$, en astrocitos (Leyton & Hago, 2014). Sin embargo, la función de Thy-1 en astrocitos no se ha descrito.

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) componente del citoesqueleto es el marcador gold-standard para identificar astrocitos inmunohistoquímicamente (Garwood et al., 2017; Li et al., 2019; Tcw et al., 2017; Thomsen et al., 2013), sin embargo, muchos astrocitos sanos no expresan niveles detectables de GFAP; además, la expresión de GFAP puede depender de la ubicación anatómica de los astrocitos, así como de las especies en las que se examina su expresión (Anderson et al., 2014; Z. Zhang et al., 2019; Pavoni et al., 2018). Por lo anterior, es importante el uso de la proteína S100 β , también llamada proteína de unión a calcio β , un miembro de la familia S100, que se distribuye en el citoplasma, núcleo e incluso puede ser secretado (Cristóvão et al., 2018). La expresión de S100 β discrimina a un tipo de células que pierden su potencial de Células Madre Neuronales (positivas para GFAP) e indica una etapa más madura (Zhang, J., & Jiao, J. 2015), aunque la especificidad celular del S100 β es sustancialmente menor que la del GFAP, puesto que su expresión no solo es en astrogliá sino también en oligodendrocitos, células endoteliales, epitelio del plexo coroideo, células endoteliales vasculares y linfocitos (Steiner et al., 2007). En la literatura se ha reportado igualmente el uso de S100 β para marcaje astrocítico debido al alto nivel de expresión, por lo cual es utilizado universalmente como marcador tanto en fisiología como patología (Verkhatsky, A., & Nedergaard, 2018). El doble marcaje (GFAP/S100 β) podría ser mucho más apropiado para la identificación de células comprometidas con el linaje astrocítico que cualquiera de estos dos por sí solos, lo que lo convierte en una poderosa herramienta de identificación.

La variación en la expresión de las proteínas de identificación glial depende de las condiciones de diferenciación; por ejemplo, de Hemptinne y colaboradores no lograron demostrar la expresión del marcador típico de astrocitos maduros GFAP en ninguna de las condiciones de diferenciación probadas para CME de médula ósea, y aunque detectaron ARNm para S100 β , no obtuvieron señal de la proteína por inmunohistoquímica, pero sí de otras proteínas específicas para astrocitos como GLST-1. Este estudio proporciona una evidencia importante sobre la composición del medio de cultivo y sus efectos en la expresión de proteínas para la identificación de astrocitos (de Hemptinne et al., 2004).

En el caso de las CME-SM, Azedi y colaboradores (2017) demostraron la transdiferenciación a células gliales a través del paso intermedio de neuroesferas, utilizando como único marcaje de astrocitos la expresión de GFAP. En el estudio la regulación del gen GFAP no fue significativa comparado con el estado indiferenciado de las células, y además la expresión se evidencia en la etapas finales de diferenciación, es decir alrededor de los 28 días, sumado a que las células tienden a un linaje oligodendrial evidenciado con la alta expresión de olig-2 marcador específico para este linaje (Azedi et al., 2017). Otros estudios en CME-SM también usan sólo el marcaje de GFAP por inmunofluorescencia, sin embargo, no se realiza una cuantificación de dicha expresión (Y. Liu et al., 2018; Meng et al., 2007), o cuando se realiza solo se toma como marcador el GFAP desconociendo otros marcadores gliales (Cv et al., 2010). Por tanto, dificultan las comparaciones celulares y la solidez teórica de las investigaciones.

En nuestro estudio la expresión de proteínas gliales (GFAP y S100 β) y neuronales (neurofilamento y β -tubulina III) se evidencia desde el estado indiferenciado bajo las diferentes técnicas. Estos datos están de acuerdo con lo reportado en la literatura, en que las células estromales mesenquimales umbilicales no tratadas expresan una serie de marcadores neuronales incluyendo nestina, β -tubulina III y GFAP (Fu et al., 2004; Salehinejad et al., 2015; Vawda, 2008).

Las células similares a astrocitos obtenidos también presentaron un marcaje positivo para la proteína β -tubulina III, evidenciado mediante las técnicas de western blot, citometría e inmunofluorescencia. Esta proteína es considerada como un marcador neuronal en neurobiología del desarrollo y en la investigación de células madre, sin embargo también, puede presentarse en cultivo de astrocitos fetales humanos (E et al., 2008) y astrocitos humanos normales (Vb & Ee, 2017). Además, las Células Mesenquimales Estromales indiferenciadas también puede presentar la expresión de β -tubulina III, por tanto, la expresión de β III- tubulina podría ser una característica común y esperada en las células madre, no exclusiva de las células neuronales (Foudah, D et al., 2014).

Otra característica importante de destacar en nuestro estudio es que no se evidenciaron cambios morfológicos después de la transdiferenciación, ante esta situación cabe señalar que en poblaciones puras de astrocitos que se cultivan en condiciones estándar, se encuentra que las células son planas y de una forma más o menos poligonal, pero si los astrocitos son co-cultivados con neuronas, pueden asumir una forma estelar (Chandrasekaran et al., 2016), y cuando las células están expuestas a medios sin suero pueden tomar un cambio morfológico artificial o pseudoneuronal (Azedi et al., 2017), por ende, al añadir suero a los cultivos los astrocitos, estos pueden exhibir una morfología poligonal similar a los fibroblastos a diferencia de la morfología típica de los astrocitos que llevan procesos *in vivo* (Li et al., 2019).

Los astrocitos juegan un papel importante en la regulación de la concentración de glutamato en la matriz extracelular, indispensable para mantener las funciones fisiológicas normales del SNC. El exceso de glutamato en la matriz extracelular es eliminado por los astrocitos a través de la enzima EAAT (Transportador de glutamato de alta afinidad o transportador de aminoácidos excitatorios) y luego metabolizado en glutamina bajo la acción de la glutamina sintetasa. Las neuronas toman la glutamina liberada en la matriz extracelular como material para producir glutamato (Cheng et al., 2018).

En nuestro estudio las células similares a astrocitos respondieron al glutamato de manera lenta, lo cual está en concordancia con otros estudios de modelos celulares humanos donde las células son estimuladas con concentraciones menores a micromolar y con un solo pulso de glutamato se produce una respuesta lenta de calcio (Tcw et al., 2017), existiendo una correlación directa entre la concentración de glutamato y la frecuencia de las oscilaciones: a bajas concentraciones (por debajo de 1 μM), las oscilaciones transitorios de Ca^{2+} intracelulares eran asincrónicos y localizados, mientras que a concentraciones más altas (10-100 μM) las ondas CA^{2+} intercelulares se propagaban a largas distancias (Scemes & Giaume, 2006).

La neuroinflamación se produce de forma aguda o crónica cuando las células se someten a estímulos que propician la instauración de un ambiente proinflamatorio transitorio o constante en el tiempo; los daños mecánicos, estímulos externos como infecciones virales o bacterianas y la toxicidad producida por algunos componentes celulares como el glutamato son algunas de las fuentes que pueden producir neuroinflamación (Martínez-Tapia et al., 2018). En la enfermedad de Alzheimer, esta inflamación es crónica y se genera principalmente por la acumulación de péptido $\text{A}\beta$ tanto intra como extracelularmente y la hiperfosforilación de la proteína tau, principales marcadores neuropatológicos de la enfermedad (Dansokho & Heneka, 2018; Guzman-Martinez et al., 2019). En este sentido, durante el desarrollo del trabajo, se planteó someter a los astrocitos a estímulos modelando la enfermedad de Alzheimer. Para tal efecto, escogimos el péptido sintético $\text{A}\beta$, teniendo como control diferentes concentraciones de LPS, un componente altamente inmunogénico, utilizado ampliamente en la literatura (Zhang et al., 2017; Zheng et al., 2018). Además, las CSA también fueron estimuladas con el sobrenadante de neuronas colinérgicas PSEN1- E280A como estímulo que simulaba más directamente la enfermedad de Alzheimer por estudios anteriores realizados en el grupo de investigación (Soto-Mercado et al., 2020). Los estímulos con LPS mostraron el aumento de los marcadores astrocíticos GFAP y S100 β , mostrando que estas células similares a astrocitos presentan un fenotipo parecido al reportado para astrocitos reactivos y astrogliosis, regulando positivamente estos marcadores (Brenner & Messing, 2021; de Souza et al., 2013; Guerra et al., 2011; Ryu et al., 2019). Por otro lado, los marcadores neuronales no se vieron afectados con la presencia del estímulo de LPS, observando para Neurofilamento una tendencia a la baja dependiente de la concentración de LPS a la que se somete el cultivo.

Una de las principales funciones de los astrocitos como células inmunes es la producción de citoquinas como mecanismo de defensa ante el daño en tejidos o presencia de patógenos; estas citoquinas regulan la inflamación producida a través de actividades sobrelapantes y sinérgicas que pueden ocurrir tanto en receptores como a través de la transducción de señales intracelulares. Algunas de las citoquinas de mayor interés son la IL-6, TNF- α , INF- γ , IL-1 β y TGF- β (Kauri et al., 2020).

IL-6 es una citoquina proinflamatoria pleiotrópica, que presenta roles tanto pro-inflamatorios como antiinflamatorios, además lidera el desarrollo celular específico y la respuesta inmune humoral, además es un importante modulador de la transición de las fases de inflamación aguda a la crónica (Kaplanski et al., 2003; Scheller et al., 2011). Se ha reportado como una proteína de gran importancia en enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, en esclerosis múltiple, se conocen estudios donde se sugiere que las manifestaciones neuropatológicas como la degeneración de la materia gris y blanca se

inducen por la acción de IL-6 secretada por astrocitos y otras células gliales (Campbell et al., 2014; Petković et al., 2016; Quintana et al., 2009). Específicamente en la enfermedad de Alzheimer, IL-6 muestra un rol central patogénico en el estrés crónico y el envejecimiento que aumenta la posibilidad de la formación de ovillos neurofibrilares y A β (Ait-Ghezala et al., 2007). Se ha propuesto la vía canónica de activación de JAK/STAT3 por la alta expresión de IL-6, que conlleva a la hiperfosforilación de MAPK y de la proteína tau, que es responsable de la formación de los ovillos neurofibrilares (Quintanilla et al., 2004). Por otro lado, la vía JAK puede contribuir a la activación de NF- κ B a través de la vía PI3K/Akt, contribuyendo a la síntesis de A β promoviendo la formación de las placas seniles (Ait-Ghezala et al., 2007). Estas observaciones son concordantes con los resultados de la activación y translocación al núcleo de NF- κ B que se evidenció en la figura 8.

Por otra parte, en nuestro estudio no se observaron cambios en los niveles de TNF- α ; este comportamiento puede explicarse conociendo su cinética. La producción de esta citoquina generalmente se produce en tiempos tempranos posterior al estímulo proinflamatorio, sea un daño o una infección; se han reportado picos de expresión de esta entre los 30 minutos y las 24 h post estímulo en modelos del sistema nervioso central (Della Giustina et al., 2017; C. Gong et al., 1998; Sairanen et al., 2001), por otro lado, cuando TNF- α se administra para ver los efectos de su sobreexpresión, las mediciones también se realizan entre las 2 y 4 horas siguientes, hasta las 24h (Habbas et al., 2015, Henenssy et al., 2017). Esta citoquina es lábil y las células suelen captarla y desencadenar la señalización cascada abajo de forma rápida, por lo que pasados los 4 días a los que se sometieron las células similares a astrocitos para este ensayo, es poco probable que se encontrara esta molécula activa. No obstante, se conoce ampliamente el efecto de TNF- α y su implicación en neuroinflamación, neurodegeneración y otras enfermedades asociadas a la edad (Decourt et al., 2017; Michaud et al., 2013; Paouri & Georgopoulos, 2019). Este mismo comportamiento se presentó con la evaluación de los niveles de la interleuquina inflamatoria IL-10, según informes anteriores después del estímulo con LPS los astrocitos enriquecidos no presentaron una inducción significativa de la citoquina, la inducción de IL-10 mRNA comenzó a las 2 horas, pero estos niveles volvieron a la línea de base a las 12 horas (Norden et al., 2016); también se ha demostrado la expresión constitutiva del receptor de IL-10, sin embargo la secreción de IL-10 bajo el estímulo del LPS es dependiente del tiempo (Chistyakov et al., 2019; Ledebøer et al., 2002).

IL-1 β se ha visto involucrada en una amplia variedad de enfermedades neuroinflamatorias, con diversos roles que han llegado a ser controversiales (Mendiola & Cardona, 2018). En la enfermedad de Alzheimer se ha visto sobreexpresada por la inflamación crónica y activación tanto de astrocitos como de microglía, en nuestro trabajo la proteína no presenta variaciones a los 4 días, lo que sugiere que el pico podría encontrarse en momentos anteriores a la toma de la medida, tal como se explicó previamente para TNF- α . Una observación interesante respecto a IL-1 β durante nuestros experimentos fue la disminución de sus niveles mediada por las células similares a astrocitos cuando se compara el control de niveles en el sobrenadante solo; esto muestra que estas células serían capaces de regular los niveles de esta citoquina que en niveles altos y expresión crónica limita el aclaramiento de placas seniles y otros estímulos neurotóxicos durante la enfermedad de Alzheimer por parte de los astrocitos y células de la microglía (Mendiola & Cardona, 2018).

Finalmente aunque en el protocolo de diferenciación se utiliza un medio comercial para el mantenimiento de astrocitos primarios (Z.-Q. Liao et al., 2016; Mytych et al., 2015; Rao et al., 2015), no se ha demostrado previamente que respalde la diferenciación de CME-SM a astrocitos humanos, pero el método resulta rápido y robusto a diferencia de informes anteriores, no requiere un cultivo prolongado (14 o 28 días) (Avola et al., 2017; Y. Liu et al., 2018), o un medio de diferenciación complejo y con bajo rendimiento (Bahat-Stroomza et al., 2009; Salehinejad et al., 2015).

Agregado a las ventajas anteriores, la obtención de astrocitos humanos es de vital importancia para el estudio de enfermedades neurodegenerativas, puesto que existen diferencias específicas de especie con los astrocitos de ratón que son comúnmente utilizados para estos ensayos (Tarassishin et al., 2014; Y. Zhang et al., 2016; Z. Zhang et al., 2019), y que no recapitulan completamente las enfermedades humanas (Pavoni et al., 2018). El protocolo aquí descrito permite obtener astrocitos humanos que permiten su uso en cocultivo o en formación de esferoides como plataformas para descubrir mecanismos *in vitro* para un mayor entendimiento de las enfermedades neurodegenerativas.

CAPITULO IX. CONTRIBUCIONES O APORTES CIENTIFICOS

En este estudio se obtuvieron por primera vez células similares a astrocitos derivadas de sangre menstrual con el uso de un medio comercial para el mantenimiento de astrocitos. Evidenciado por el aumento en un 25% y 59% de las proteínas constitutivas GFAP y S100 β en los días 4 y 7 con la técnica de citometría de flujo; igualmente con las técnicas de inmunofluorescencia y western blot se evidencia un incremento de estas proteínas gliales (GFAP y S100 β) con respecto al control en el día 4 y una disminución en la proteína neurofilamento, específica para marcaje neuronal en el día 7 de la diferenciación. Además, las CSA en presencia del estímulo del glutamato, inducían una elevación transitoria de Ca²⁺ intracelular en el día 4 y el día 7, mientras que las CME-SM sin tratamiento en el día 0, no presentaron ningún efecto. Tomando en conjunto los resultados obtenidos, sugieren que los astrocitos humanos generados a partir de CME-SM se transdiferencian a astrocitos y tienen potencial funcional.

Las terapias hasta ahora se dirigen en gran medida a la hipótesis amiloide y la hipótesis colinérgica. Sin embargo, las evidencias acumuladas sobre la importancia de las células no neuronales, como los astrocitos, abren nuevas vías de investigación que tienen como objetivo una mejor comprensión de la patología de la EA, en este sentido éste trabajo es innovador como primer enfoque neuroinmunológico y descentralizado de las neuronas en la línea de investigación a la cual pertenezco.

Los resultados de investigación han contribuido a la realización del proyecto de investigación: “Efecto de la curcumina en un modelo de astrocitos de la Enfermedad de Alzheimer” en la línea de neurodegenerativas, neuroquímica y biología molecular del Grupo de Neurociencias de Antioquia y la participación en el artículo titulado: "Latent tri-lineage potential of human menstrual blood-derived mesenchymal stromal cells revealed by specific *in vitro* culture conditions" publicado en la revista: Molecular Neurobiology, 2021. De igual forma el estudio permitió el desarrollo y estandarización del protocolo alterno de obtención de CME- SM.

Este trabajo ocupó el segundo lugar en la modalidad póster en la primera versión digital del XII CONGRESO NACIONAL / XIII SEMINARIO INTERNACIONAL DE NEUROCIENCIAS llevado a cabo el 18-19/25-26 de junio del 2021.

CAPITULO X. CONCLUSIONES

Por primera vez se presenta una propuesta para la transdiferenciación de una novedosa fuente de células mesenquimales estromales, obtenidas a partir de sangre menstrual, a células similares a astrocitos en solo 7 días, suministrando un medio comercial que puede obtenerse fácilmente, mejorando así el tiempo y los costos de este proceso de diferenciación.

Las células similares a astrocitos fueron caracterizadas a través de diversas técnicas (inmunofluorescencia, western blot y citometría de flujo) mostrando la regulación positiva de marcadores astrocíticos (GFAP y S100 β), proponiendo así una plataforma más robusta de doble marcaje para estas células. Adicionalmente, se mostró a través de ensayos funcionales, como la liberación de calcio posterior a un estímulo de glutamato y la reactividad en presencia de estímulos proinflamatorios, conducen a proponer estas células como un modelo de neuroinflamación para el estudio de la Enfermedad de Alzheimer.

CAPITULO XI. PERSPECTIVAS

Los astrocitos son las células gliales más abundantes en el tejido cerebral y, funcionalmente, son igualmente, o más, heterogéneos que las neuronas. Modulan la comunicación sináptica, afectando el aclaramiento, el soporte energético y la plasticidad; también modulan la barrera hematoencefálica y la respuesta inmune cerebral. Por lo tanto, estas células integran diferentes señales: insumos metabólicos, inmunes y neuronales (Robinson-Agramonte et al., 2019). En los últimos dos décadas el estudio de estas células ha tenido gran auge debido a su papel modulador en diferentes enfermedades neurodegenerativas, es por ello que la generación de astrocitos derivados de CME-SM abre una nueva área para el estudio de las enfermedades neurológicas *in vitro* desde el enfoque integrador de la neurología. Este modelo podría ser utilizado para la investigación de interacciones celulares mediante de neuronas y astrocitos en cultivos 2D o en diseño de organoides (3D), igualmente podrían ser explotados para identificar y validar posibles fármacos mediante la detección de efectos adversos en las primeras etapas del desarrollo de medicamentos.

Debido a que existe una gama de poblaciones astrocitarias en el cerebro, será importante desarrollar protocolos estandarizados para la generación *in vitro* de subconjuntos de astrocitos con estado de madurez definido y propiedades fenotípicas, además de profundizar en la señalización inflamatoria a través de estudios de transcriptómica y la sobreexpresión de proteínas específicas de astrocitos involucradas en las respuestas inmunológicas en modelos *in vivo*.

Finalmente, las investigaciones futuras deben abordar las implicaciones de las señalizaciones patológicas en los astrocitos y sus consecuencias en las diferentes poblaciones celulares como neuronas, microglía, y es que, pese a los avances en el estudio de esta interesante población celular, aún persisten grandes vacíos de conocimientos en su rol fisiológico y patológico.

BIBLIOGRAFÍA

- A Armstrong, R. (2019). Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica*, 57(2), 87-105.
<https://doi.org/10.5114/fn.2019.85929>
- Acosta, C., Anderson, H. D., & Anderson, C. M. (2017). Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease. *Journal of Neuroscience Research*, 95(12), 2430-2447. <https://doi.org/10.1002/jnr.24075>
- Acosta-Baena, N., Sepulveda-Falla, D., Lopera-Gómez, C. M., Jaramillo-Elorza, M. C., Moreno, S., Aguirre-Acevedo, D. C., Saldarriaga, A., & Lopera, F. (2011). Pre-dementia clinical stages in presenilin 1 E280A familial early-onset Alzheimer's disease: A retrospective cohort study. *The Lancet. Neurology*, 10(3), 213-220. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70323-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70323-9)
- Ait-Ghezala, G., Volmar, C.-H., Frieling, J., Paris, D., Tweed, M., Bakshi, P., & Mullan, M. (2007). CD40 promotion of amyloid beta production occurs via the NF-kappaB pathway. *The European Journal of Neuroscience*, 25(6), 1685-1695. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05424.x>
- Alzheimer's Disease Collaborative Group. (1995). The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. *Nature Genetics*, 11(2), 219-222.
<https://doi.org/10.1038/ng1095-219>
- Arranz, A. M., & De Strooper, B. (2019). The role of astroglia in Alzheimer's disease: Pathophysiology and clinical implications. *The Lancet Neurology*, 18(4), 406-414. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30490-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30490-3)
- Avola, R., Graziano, A. C. E., Pannuzzo, G., & Cardile, V. (2017). Human Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue Differentiated into Neuronal or Glial Phenotype Express Different Aquaporins. *Molecular Neurobiology*, 54(10), 8308-8320. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0312-6>
- Azedi, F., Kazemnejad, S., Zarnani, A. H., Behzadi, G., Vasei, M., Khanmohammadi, M., Khanjani, S., Edalatkhah, H., & Lakpour, N. (2014). Differentiation potential of menstrual blood- versus bone marrow-stem cells into glial-like cells. *Cell Biology International*, 38(5), 615-624. <https://doi.org/10.1002/cbin.10245>

- Azedi, F., Kazemnejad, S., Zarnani, A. H., Soleimani, M., Shojaei, A., & Arasteh, S. (2017). Comparative capability of menstrual blood versus bone marrow derived stem cells in neural differentiation. *Molecular Biology Reports*, *44*(1), 169-182. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-4095-7>
- Bahat-Stroomza, M., Barhum, Y., Levy, Y. S., Karpov, O., Bulvik, S., Melamed, E., & Offen, D. (2009). Induction of adult human bone marrow mesenchymal stromal cells into functional astrocyte-like cells: Potential for restorative treatment in Parkinson's disease. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, *39*(1-2), 199-210. <https://doi.org/10.1007/s12031-008-9166-3>
- Barilani, M., Banfi, F., Sironi, S., Ragni, E., Guillaumin, S., Polveraccio, F., Rosso, L., Moro, M., Astori, G., Pozzobon, M., & Lazzari, L. (2018). Low-affinity Nerve Growth Factor Receptor (CD271) Heterogeneous Expression in Adult and Fetal Mesenchymal Stromal Cells. *Scientific Reports*, *8*(1), 9321. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27587-8>
- Becher, B., Spath, S., & Goverman, J. (2017). Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews Immunology*, *17*(1), 49-59. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.123>
- Belkacemi, T., Niermann, A., Hofmann, L., Wissenbach, U., Birnbaumer, L., Leidinger, P., Backes, C., Meese, E., Keller, A., Bai, X., Scheller, A., Kirchhoff, F., Philipp, S. E., Weissgerber, P., Flockerzi, V., & Beck, A. (2017). TRPC1- and TRPC3-dependent Ca²⁺ signaling in mouse cortical astrocytes affects injury-evoked astrogliosis in vivo. *Glia*, *65*(9), 1535-1549. <https://doi.org/10.1002/glia.23180>
- Beltrán, O., Osmarla Quintero, L., & Chaparro, O. (2005). PLASTICIDAD Y TRANSDIFERENCIACIÓN EN CÉLULAS «STEM» ADULTAS - REVISIÓN. *Revista Med*, *13*(1), 10-16. Redalyc.
- Benesova, J., Rusnakova, V., Honsa, P., Pivonkova, H., Dzamba, D., Kubista, M., & Anderova, M. (2012). Distinct expression/function of potassium and chloride channels contributes to the diverse volume regulation in cortical astrocytes of GFAP/EGFP mice. *PLoS One*, *7*(1), e29725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029725>
- Bharti, D., Shivakumar, S. B., Son, Y.-B., Choi, Y.-H., Ullah, I., Lee, H.-J., Kim, E.-J., Ock, S.-A., Park, J.-E., Park, J.-K., Kang, D., Lee, S.-L., Park, B.-W., & Rho, G.-J. (2019). Differentiation potential of different regions-

- derived same donor human Wharton's jelly mesenchymal stem cells into functional smooth muscle-like cells. *Cell and Tissue Research*, 377(2), 229-243. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03009-7>
- Bolós, M., Perea, J. R., & Avila, J. (2017). Alzheimer's disease as an inflammatory disease. *Biomolecular Concepts*, 8(1), 37-43. <https://doi.org/10.1515/bmc-2016-0029>
- Bonilla-Porras, A. R., Velez-Pardo, C., & Jimenez-Del-Rio, M. (2017). Fast transdifferentiation of human Wharton's jelly mesenchymal stem cells into neurospheres and nerve-like cells. *Journal of Neuroscience Methods*, 282, 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.03.005>
- Bozorgmehr, M., Gurung, S., Darzi, S., Nikoo, S., Kazemnejad, S., Zarnani, A.-H., & Gargett, C. E. (2020). Endometrial and Menstrual Blood Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Biological Properties and Clinical Application. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 497. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00497>
- Brenner, M., & Messing, A. (2021). Regulation of GFAP Expression. *ASN Neuro*, 13, 1759091420981206. <https://doi.org/10.1177/1759091420981206>
- Brickell, K. L., Steinbart, E. J., Rumbaugh, M., Payami, H., Schellenberg, G. D., Van Deerlin, V., Yuan, W., & Bird, T. D. (2006). Early-onset Alzheimer disease in families with late-onset Alzheimer disease: A potential important subtype of familial Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 63(9), 1307-1311. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.9.1307>
- Brown, C., McKee, C., Bakshi, S., Walker, K., Hakman, E., Halassy, S., Svinarich, D., Dodds, R., Govind, C. K., & Chaudhry, G. R. (2019). Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(9), 1738-1755. <https://doi.org/10.1002/term.2914>
- Cai, Z., Wan, C.-Q., & Liu, Z. (2017). Astrocyte and Alzheimer's disease. *Journal of Neurology*, 264(10), 2068-2074. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8593-x>
- Calsolaro, V., & Edison, P. (2016). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 12(6), 719-732. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.010>

- Camargo, N., Goudriaan, A., van Deijk, A.-L. F., Otte, W. M., Brouwers, J. F., Lodder, H., Gutmann, D. H., Nave, K.-A., Dijkhuizen, R. M., Mansvelter, H. D., Chrast, R., Smit, A. B., & Verheijen, M. H. G. (2017). Oligodendroglial myelination requires astrocyte-derived lipids. *PLoS Biology*, *15*(5), e1002605. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002605>
- Campbell, I. L., Erta, M., Lim, S. L., Frausto, R., May, U., Rose-John, S., Scheller, J., & Hidalgo, J. (2014). Trans-signaling is a dominant mechanism for the pathogenic actions of interleukin-6 in the brain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *34*(7), 2503-2513. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2830-13.2014>
- Carrero, I., Gonzalo, M. R., Martin, B., Sanz-Anquela, J. M., Arevalo-Serrano, J., & Gonzalo-Ruiz, A. (2012). Oligomers of beta-amyloid protein (Abeta1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha, and a nuclear factor kappa-B mechanism in the rat brain. *Experimental Neurology*, *236*(2), 215-227. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.05.004>
- Cekanaviciute, E., & Buckwalter, M. S. (2016). Astrocytes: Integrative Regulators of Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, *13*(4), 685-701. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0477-8>
- Chandrasekaran, A., Avci, H. X., Leist, M., Kobolák, J., & Dinnyés, A. (2016). Astrocyte Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells: New Tools for Neurological Disorder Research. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *10*, 215. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00215>
- Chase, T. N., Farlow, M. R., & Clarence-Smith, K. (2017). Donepezil Plus Solifenacin (CPC-201) Treatment for Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, *14*(2), 405-416. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0511-x>
- Chen, L., Qu, J., Cheng, T., Chen, X., & Xiang, C. (2019). Menstrual blood-derived stem cells: Toward therapeutic mechanisms, novel strategies, and future perspectives in the treatment of diseases. *Stem Cell Research & Therapy*, *10*(1), 406. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1503-7>

- Chen, M., Su, W., Lin, X., Guo, Z., Wang, J., Zhang, Q., Brand, D., Ryffel, B., Huang, J., Liu, Z., He, X., Le, A. D., & Zheng, S. G. (2013). Adoptive transfer of human gingiva-derived mesenchymal stem cells ameliorates collagen-induced arthritis via suppression of Th1 and Th17 cells and enhancement of regulatory T cell differentiation. *Arthritis and Rheumatism*, *65*(5), 1181-1193. <https://doi.org/10.1002/art.37894>
- Cheng, Z., Ou, Y., Zhang, L., Zhang, P., Yuan, X., Peng, W., Wang, S., Zhu, X., Zhang, L., & Meng, Y. (2018). The glutamate clearance function of adipose stromal cells-derived astrocytes. *Neuroscience Letters*, *677*, 94-102. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.04.048>
- Cherry, J. D., Olschowka, J. A., & O'Banion, M. K. (2015). Arginase 1+ microglia reduce Abeta plaque deposition during IL-1beta-dependent neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, *12*, 203. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0411-8>
- Chistyakov, D. V., Astakhova, A. A., Azbukina, N. V., Goriainov, S. V., Chistyakov, V. V., & Sergeeva, M. G. (2019). Cellular Model of Endotoxin Tolerance in Astrocytes: Role of Interleukin 10 and Oxylipins. *Cells*, *8*(12). <https://doi.org/10.3390/cells8121553>
- Chong, F. P., Ng, K. Y., Koh, R. Y., & Chye, S. M. (2018). Tau Proteins and Tauopathies in Alzheimer's Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *38*(5), 965-980. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0574-1>
- Chong, Y. (1997). Effect of a carboxy-terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein on expression of proinflammatory cytokines in rat glial cells. *Life Sciences*, *61*(23), 2323-2333. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(97\)00936-3](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(97)00936-3)
- Christina Patterson. (2018). *Informe mundial sobre el Alzheimer 2018* (p. 48). Alzheimer's Disease International (ADI).
- Collino, F., Pomatto, M., Bruno, S., Lindoso, R. S., Tapparo, M., Sicheng, W., Quesenberry, P., & Camussi, G. (2017). Exosome and Microvesicle-Enriched Fractions Isolated from Mesenchymal Stem Cells by Gradient Separation Showed Different Molecular Signatures and Functions on Renal Tubular Epithelial Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, *13*(2), 226-243. <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9713-1>

- Congdon, E. E., & Sigurdsson, E. M. (2018). Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature Reviews. Neurology*, *14*(7), 399-415. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0013-z>
- Contino, S., Porporato, P. E., Bird, M., Marinangeli, C., Opsomer, R., Sonveaux, P., Bontemps, F., Dewachter, I., Octave, J.-N., Bertrand, L., Stanga, S., & Kienlen-Campard, P. (2017). Presenilin 2-Dependent Maintenance of Mitochondrial Oxidative Capacity and Morphology. *Frontiers in Physiology*, *8*, 796. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00796>
- Cristóvão, J. S., Morris, V. K., Cardoso, I., Leal, S. S., Martínez, J., Botelho, H. M., Göbl, C., David, R., Kierdorf, K., Alemi, M., Madl, T., Fritz, G., Reif, B., & Gomes, C. M. (2018). The neuronal S100B protein is a calcium-tuned suppressor of amyloid- β aggregation. *Science Advances*, *4*(6), eaaq1702. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaq1702>
- Cui, Y., Ma, S., Zhang, C., Cao, W., Liu, M., Li, D., Lv, P., Xing, Q., Qu, R., Yao, N., Yang, B., & Guan, F. (2017). Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improves cognitive function in Alzheimer's disease mice by decreasing oxidative stress and promoting hippocampal neurogenesis. *Behavioural Brain Research*, *320*, 291-301. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.12.021>
- Cummings, J. L., Atri, A., Ballard, C., Boneva, N., Frölich, L., Molinuevo, J. L., Raket, L. L., & Tariot, P. N. (2018). Insights into globalization: Comparison of patient characteristics and disease progression among geographic regions in a multinational Alzheimer's disease clinical program. *Alzheimer's Research & Therapy*, *10*(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s13195-018-0443-2>
- Cv, B., Y, K., M, M., Sj, Y., M, A., Jg, A., Cd, S., N, K.-N., & Pr, S. (2010). Menstrual blood cells display stem cell-like phenotypic markers and exert neuroprotection following transplantation in experimental stroke. *Stem Cells and Development*, *19*(4). <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0340>
- Dai, J., Johnson, E. C. B., Dammer, E. B., Duong, D. M., Gearing, M., Lah, J. J., Levey, A. I., Wingo, T. S., & Seyfried, N. T. (2018). Effects of APOE Genotype on Brain Proteomic Network and Cell Type Changes in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*, 454. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00454>

- Dansokho, C., & Heneka, M. T. (2018). Neuroinflammatory responses in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, *125*(5), 771-779. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1831-7>
- de Bruijn, R. F. A. G., Bos, M. J., Portegies, M. L. P., Hofman, A., Franco, O. H., Koudstaal, P. J., & Ikram, M. A. (2015). The potential for prevention of dementia across two decades: The prospective, population-based Rotterdam Study. *BMC Medicine*, *13*, 132. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0377-5>
- de Hemptinne, I., Vermeiren, C., Maloteaux, J.-M., & Hermans, E. (2004). Induction of glial glutamate transporters in adult mesenchymal stem cells. *Journal of Neurochemistry*, *91*(1), 155-166. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02709.x>
- de Leve, S., Wirsdörfer, F., & Jendrossek, V. (2019). Targeting the Immunomodulatory CD73/Adenosine System to Improve the Therapeutic Gain of Radiotherapy. *Frontiers in Immunology*, *10*, 698. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00698>
- de Souza, D. F., Wartchow, K., Hansen, F., Lunardi, P., Guerra, M. C., Nardin, P., & Gonçalves, C.-A. (2013). Interleukin-6-induced S100B secretion is inhibited by haloperidol and risperidone. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *43*, 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.12.001>
- Decourt, B., Lahiri, D. K., & Sabbagh, M. N. (2017). Targeting Tumor Necrosis Factor Alpha for Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, *14*(4), 412-425. <https://doi.org/10.2174/1567205013666160930110551>
- Dejanovic, B., Huntley, M. A., De Mazière, A., Meilandt, W. J., Wu, T., Srinivasan, K., Jiang, Z., Gandham, V., Friedman, B. A., Ngu, H., Foreman, O., Carano, R. A. D., Chih, B., Klumperman, J., Bakalarski, C., Hanson, J. E., & Sheng, M. (2018). Changes in the Synaptic Proteome in Tauopathy and Rescue of Tau-Induced Synapse Loss by C1q Antibodies. *Neuron*, *100*(6), 1322-1336.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.014>
- Della Giustina, A., Goldim, M. P., Danielski, L. G., Florentino, D., Mathias, K., Garbossa, L., Oliveira Junior, A. N., Fileti, M. E., Zarbato, G. F., da Rosa, N., Martins Laurentino, A. O., Fortunato, J. J., Mina, F., Bellettini-Santos, T., Budni, J., Barichello, T., Dal-Pizzol, F., & Petronilho, F. (2017). Alpha-lipoic acid attenuates

acute neuroinflammation and long-term cognitive impairment after polymicrobial sepsis.

Neurochemistry International, 108, 436-447. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.06.003>

Denizot, A., Arizono, M., Nägerl, U. V., Soula, H., & Berry, H. (2019). Simulation of calcium signaling in fine astrocytic processes: Effect of spatial properties on spontaneous activity. *PLoS Computational Biology*, 15(8), e1006795. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006795>

Dinarello, C. A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, 117(14), 3720-3732. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-273417>

Docheva, D., Popov, C., Mutschler, W., & Schieker, M. (2007). Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: Surface characteristics and the integrin system. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11(1), 21-38. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00001.x>

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>

Dos Santos, J. F., Borçari, N. R., da Silva Araújo, M., & Nunes, V. A. (2019). Mesenchymal stem cells differentiate into keratinocytes and express epidermal kallikreins: Towards an in vitro model of human epidermis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(8), 13141-13155. <https://doi.org/10.1002/jcb.28589>

Duncan, T., & Valenzuela, M. (2017). Alzheimer's disease, dementia, and stem cell therapy. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0567-5>

E, D., L, D. V., J, G., V, M., B, S., L, B., Jp, de C., Dp, A., A, L., K, K., P, D., & Cd, K. (2008). Class III beta-tubulin is constitutively coexpressed with glial fibrillary acidic protein and nestin in midgestational human fetal astrocytes: Implications for phenotypic identity. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 67(4). <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31816a686d>

Elahi, F. M., Casaletto, K. B., La Joie, R., Walters, S. M., Harvey, D., Wolf, A., Edwards, L., Rivera-Contreras, W., Karydas, A., Cobigo, Y., Rosen, H. J., DeCarli, C., Miller, B. L., Rabinovici, G. D., & Kramer, J. H. (2020).

Plasma biomarkers of astrocytic and neuronal dysfunction in early- and late-onset Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 16(4), 681-695.

<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.09.004>

Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., & Lee, Y. L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical Research*, 25(9-10), 1439-1451. <https://doi.org/10.1023/a:1007677003387>

Epperly, T., Dunay, M. A., & Boice, J. L. (2017). Alzheimer Disease: Pharmacologic and Nonpharmacologic Therapies for Cognitive and Functional Symptoms. *American Family Physician*, 95(12), 771-778.

Eratne, D., Loi, S., Farrand, S., Kelso, W., Velakoulis, D., & Looi, J. (2018). Alzheimer's disease paper 1: Clinical update on epidemiology, pathophysiology and diagnosis. *Australasian psychiatry : bulletin of Royal Australian and New Zealand College of Psychiatrists*, 26, 1039856218762308.

<https://doi.org/10.1177/1039856218762308>

Escamilla-Ayala, A., Wouters, R., Sannerud, R., & Annaert, W. (2020). Contribution of the Presenilins in the cell biology, structure and function of γ -secretase. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.

<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.02.005>

Eusemann, T. N., Willmroth, F., Fiebich, B., Biber, K., & van Calker, D. (2015). Adenosine Receptors Differentially Regulate the Expression of Regulators of G-Protein Signalling (RGS) 2, 3 and 4 in Astrocyte-Like Cells.

PLoS One, 10(8), e0134934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134934>

Ezratty, E. J., Pasolli, H. A., & Fuchs, E. (2016). A Presenilin-2-ARF4 trafficking axis modulates Notch signaling during epidermal differentiation. *The Journal of Cell Biology*, 214(1), 89-101.

<https://doi.org/10.1083/jcb.201508082>

Flanagan, B., McDaid, L., Wade, J., Wong-Lin, K., & Harkin, J. (2018). A computational study of astrocytic glutamate influence on post-synaptic neuronal excitability. *PLoS Computational Biology*, 14(4),

e1006040. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006040>

Flanders, K. C., Lippa, C. F., Smith, T. W., Pollen, D. A., & Sporn, M. B. (1995). Altered expression of transforming growth factor-beta in Alzheimer's disease. *Neurology*, *45*(8), 1561-1569.

<https://doi.org/10.1212/wnl.45.8.1561>

Fleisher, A. S., Chen, K., Quiroz, Y. T., Jakimovich, L. J., Gomez, M. G., Langois, C. M., Langbaum, J. B. S., Ayutyanont, N., Roontiva, A., Thiyyagura, P., Lee, W., Mo, H., Lopez, L., Moreno, S., Acosta-Baena, N., Giraldo, M., Garcia, G., Reiman, R. A., Huentelman, M. J., ... Reiman, E. M. (2012). Florbetapir PET analysis of amyloid- β deposition in the presenilin 1 E280A autosomal dominant Alzheimer's disease kindred: A cross-sectional study. *The Lancet. Neurology*, *11*(12), 1057-1065.

[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70227-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70227-2)

Fong, L. K., Yang, M. M., Dos Santos Chaves, R., Reyna, S. M., Langness, V. F., Woodruff, G., Roberts, E. A., Young, J. E., & Goldstein, L. S. B. (2018). Full-length amyloid precursor protein regulates lipoprotein metabolism and amyloid- β clearance in human astrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *293*(29), 11341-11357. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000441>

Forlenza, O. V., Diniz, B. S., Talib, L. L., Mendonça, V. A., Ojopi, E. B., Gattaz, W. F., & Teixeira, A. L. (2009).

Increased serum IL-1beta level in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, *28*(6), 507-512. <https://doi.org/10.1159/000255051>

Formaggio, F., Saracino, E., Mola, M. G., Rao, S. B., Amiry-Moghaddam, M., Muccini, M., Zamboni, R., Nicchia, G. P., Caprini, M., & Benfenati, V. (2019). LRRC8A is essential for swelling-activated chloride current and for regulatory volume decrease in astrocytes. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *33*(1), 101-113. <https://doi.org/10.1096/fj.201701397RR>

Frausin, S., Viventi, S., Verga Falzacappa, L., Quattromani, M. J., Leanza, G., Tommasini, A., & Valencic, E. (2015). Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells: Biological properties, induction of neuronal phenotype and current applications in neurodegeneration research. *Immunomarkers in human developing and pediatric neoplastic tissues*, *117*(4), 329-338.

<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2015.02.005>

- Frederiksen, H. R., Haukedal, H., & Freude, K. (2019). Cell Type Specific Expression of Toll-Like Receptors in Human Brains and Implications in Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, 2019, 1-18.
<https://doi.org/10.1155/2019/7420189>
- Friedenstein, A. J., Deriglasova, U. F., Kulagina, N. N., Panasuk, A. F., Rudakowa, S. F., Luriá, E. A., & Ruadkow, I. A. (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental Hematology*, 2(2), 83-92.
- Fu, Y.-S., Shih, Y.-T., Cheng, Y.-C., & Min, M.-Y. (2004). Transformation of human umbilical mesenchymal cells into neurons in vitro. *Journal of Biomedical Science*, 11(5), 652-660.
<https://doi.org/10.1007/BF02256131>
- Gao, Y., Ren, R.-J., Zhong, Z.-L., Dammer, E., Zhao, Q.-H., Shan, S., Zhou, Z., Li, X., Zhang, Y.-Q., Cui, H.-L., Hu, Y.-B., Chen, S.-D., Chen, J.-J., Guo, Q.-H., & Wang, G. (2019). Mutation profile of APP, PSEN1, and PSEN2 in Chinese familial Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 77, 154-157.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.01.018>
- Garwood, C. J., Ratcliffe, L. E., Simpson, J. E., Heath, P. R., Ince, P. G., & Wharton, S. B. (2017). Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 43(4), 281-298.
<https://doi.org/10.1111/nan.12338>
- Gonçalves, C.-A., Leite, M. C., & Nardin, P. (2008). Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clinical Biochemistry*, 41(10-11), 755-763.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.04.003>
- Gong, C., Qin, Z., Betz, A. L., Liu, X. H., & Yang, G. Y. (1998). Cellular localization of tumor necrosis factor alpha following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Research*, 801(1-2), 1-8. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00489-2](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00489-2)

- Gong, N.-J., Dibb, R., Bulk, M., van der Weerd, L., & Liu, C. (2019). Imaging beta amyloid aggregation and iron accumulation in Alzheimer's disease using quantitative susceptibility mapping MRI. *NeuroImage*, *191*, 176-185. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.02.019>
- González-Reyes, R. E., Nava-Mesa, M. O., Vargas-Sánchez, K., Ariza-Salamanca, D., & Mora-Muñoz, L. (2017). Involvement of Astrocytes in Alzheimer's Disease from a Neuroinflammatory and Oxidative Stress Perspective. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*, 427. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00427>
- Guerra, M. C., Tortorelli, L. S., Galland, F., Da Ré, C., Negri, E., Engelke, D. S., Rodrigues, L., Leite, M. C., & Gonçalves, C.-A. (2011). Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: A study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *Journal of Neuroinflammation*, *8*, 128. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-128>
- Guillamón-Vivancos, T., Gómez-Pinedo, U., & Matías-Guiu, J. (2015). Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, *30*(2), 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2012.12.007>
- Guzman-Martinez, L., Maccioni, R. B., Andrade, V., Navarrete, L. P., Pastor, M. G., & Ramos-Escobar, N. (2019). Neuroinflammation as a Common Feature of Neurodegenerative Disorders. *Frontiers in Pharmacology*, *10*, 1008. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01008>
- Gyoneva, S., Swanger, S. A., Zhang, J., Weinshenker, D., & Traynelis, S. F. (2016). Altered motility of plaque-associated microglia in a model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, *330*, 410-420. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.061>
- Habbas, S., Santello, M., Becker, D., Stubbe, H., Zappia, G., Liaudet, N., Klaus, F. R., Kollias, G., Fontana, A., Pryce, C. R., Suter, T., & Volterra, A. (2015). Neuroinflammatory TNF α Impairs Memory via Astrocyte Signaling. *Cell*, *163*(7), 1730-1741. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.023>
- Hampel, H., Haslinger, A., Scheloske, M., Padberg, F., Fischer, P., Unger, J., Teipel, S. J., Neumann, M., Rosenberg, C., Oshida, R., Hulette, C., Pongratz, D., Ewers, M., Kretschmar, H. A., & Möller, H.-J.

(2005). Pattern of interleukin-6 receptor complex immunoreactivity between cortical regions of rapid autopsy normal and Alzheimer's disease brain. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 255(4), 269-278. <https://doi.org/10.1007/s00406-004-0558-2>

Hennessy, E., Gormley, S., Lopez-Rodriguez, A. B., Murray, C., Murray, C., & Cunningham, C. (2017). Systemic TNF- α produces acute cognitive dysfunction and exaggerated sickness behavior when superimposed upon progressive neurodegeneration. *Brain, behavior, and immunity*, 59, 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.09.011>

Hong, S., Beja-Glasser, V. F., Nfonoyim, B. M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K. M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B. A., Lemere, C. A., Selkoe, D. J., & Stevens, B. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*, 352(6286), 712-716. <https://doi.org/10.1126/science.aad8373>

Hou, Y., Song, H., Croteau, D. L., Akbari, M., & Bohr, V. A. (2017). Genome instability in Alzheimer disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 161(Pt A), 83-94. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.04.005>

Hu, Y., Chen, W., Wu, L., Jiang, L., Liang, N., Tan, L., Liang, M., & Tang, N. (2019). TGF-beta1 Restores Hippocampal Synaptic Plasticity and Memory in Alzheimer Model via the PI3K/Akt/Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, 67(1), 142-149. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1219-7>

Huang, L., Nakamura, Y., Lo, E. H., & Hayakawa, K. (2019). Astrocyte Signaling in the Neurovascular Unit After Central Nervous System Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2). <https://doi.org/10.3390/ijms20020282>

Huang, S.-F., Othman, A., Koshkin, A., Fischer, S., Fischer, D., Zamboni, N., Ono, K., Sawa, T., & Ogunshola, O. O. (2020). Astrocyte glutathione maintains endothelial barrier stability. *Redox Biology*, 34, 101576. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101576>

- Iba, M., Guo, J. L., McBride, J. D., Zhang, B., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2013). Synthetic tau fibrils mediate transmission of neurofibrillary tangles in a transgenic mouse model of Alzheimer's-like tauopathy. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(3), 1024-1037. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2642-12.2013>
- Ishibashi, M., Egawa, K., & Fukuda, A. (2019). Diverse Actions of Astrocytes in GABAergic Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(12). <https://doi.org/10.3390/ijms20122964>
- Jaeger, P. A., Pickford, F., Sun, C.-H., Lucin, K. M., Masliah, E., & Wyss-Coray, T. (2010). Regulation of amyloid precursor protein processing by the Beclin 1 complex. *PLoS One*, *5*(6), e11102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011102>
- Jamali, S., Mostafavi, H., Barati, G., Eskandari, M., & Nadri, S. (2017). Differentiation of mesenchymal stem cells -derived trabecular meshwork into dopaminergic neuron-like cells on nanofibrous scaffolds. *Biologicals : Journal of the International Association of Biological Standardization*, *50*, 49-54. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2017.09.002>
- Janelidze, S., Zetterberg, H., Mattsson, N., Palmqvist, S., Vanderstichele, H., Lindberg, O., van Westen, D., Stomrud, E., Minthon, L., Blennow, K., Swedish BioFINDER study group, & Hansson, O. (2016). CSF A β 42/A β 40 and A β 42/A β 38 ratios: Better diagnostic markers of Alzheimer disease. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *3*(3), 154-165. <https://doi.org/10.1002/acn3.274>
- Jang, S., Cho, H.-H., Cho, Y.-B., Park, J.-S., & Jeong, H.-S. (2010). Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biology*, *11*, 25. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-25>
- Jensen, C. J., Massie, A., & De Keyser, J. (2013). Immune Players in the CNS: The Astrocyte. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, *8*(4), 824-839. <https://doi.org/10.1007/s11481-013-9480-6>
- Jiang, H., Newman, M., & Lardelli, M. (2018). The zebrafish orthologue of familial Alzheimer's disease gene PRESENILIN 2 is required for normal adult melanotic skin pigmentation. *PLoS One*, *13*(10), e0206155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206155>

- Jin, W., Xu, Y.-P., Yang, A.-H., & Xing, Y.-Q. (2015). In vitro induction and differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells into neuron-like cells by all-trans retinoic acid. *International Journal of Ophthalmology*, *8*(2), 250-256. <https://doi.org/10.3980/j.issn.2222-3959.2015.02.07>
- Jori, F. P., Napolitano, M. A., Melone, M. A. B., Cipollaro, M., Cascino, A., Altucci, L., Peluso, G., Giordano, A., & Galderisi, U. (2005). Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *94*(4), 645-655. <https://doi.org/10.1002/jcb.20315>
- Kaplanski, G., Marin, V., Montero-Julian, F., Mantovani, A., & Farnarier, C. (2003). IL-6: A regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends in Immunology*, *24*(1), 25-29. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(02\)00013-3](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(02)00013-3)
- Kaur, D., Sharma, V., & Deshmukh, R. (2019). Activation of microglia and astrocytes: a roadway to neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*, *27*(4), 663–677. <https://doi.org/10.1007/s10787-019-00580-x>
- Kawahara, K., Suenobu, M., Yoshida, A., Koga, K., Hyodo, A., Ohtsuka, H., Kuniyasu, A., Tamamaki, N., Sugimoto, Y., & Nakayama, H. (2012). Intracerebral microinjection of interleukin-4/interleukin-13 reduces β -amyloid accumulation in the ipsilateral side and improves cognitive deficits in young amyloid precursor protein 23 mice. *Neuroscience*, *207*, 243-260. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.01.049>
- Kim, H. W., Lee, H.-S., Kang, J. M., Bae, S.-H., Kim, C., Lee, S.-H., Schwarz, J., Kim, G. J., Kim, J.-S., Cha, D. H., Kim, J., Chang, S. W., Lee, T. H., & Moon, J. (2018). Dual Effects of Human Placenta-Derived Neural Cells on Neuroprotection and the Inhibition of Neuroinflammation in a Rodent Model of Parkinson's Disease. *Cell Transplantation*, *27*(5), 814-830. <https://doi.org/10.1177/0963689718766324>
- Kinney, J. W., Bemiller, S. M., Murtishaw, A. S., Leisgang, A. M., Salazar, A. M., & Lamb, B. T. (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, *4*(1), 575-590. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.06.014>
- Kobolak, J., Dinnyes, A., Memic, A., Khademhosseini, A., & Mobasheri, A. (2016). Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative

medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods (San Diego, Calif.)*, 99, 62-68.

<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.09.016>

Koronyo-Hamaoui, M., Sheyn, J., Hayden, E. Y., Li, S., Fuchs, D.-T., Regis, G. C., Lopes, D. H. J., Black, K. L., Bernstein, K. E., Teplow, D. B., Fuchs, S., Koronyo, Y., & Rentsendorj, A. (2020). Peripherally derived angiotensin converting enzyme-enhanced macrophages alleviate Alzheimer-related disease. *Brain*, 143(1), 336-358. <https://doi.org/10.1093/brain/awz364>

Kumar, A., Bhanja, A., Bhattacharyya, J., & Jaganathan, B. G. (2016). Multiple roles of CD90 in cancer. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(9), 11611-11622. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5112-0>

Kvartsberg, H., Lashley, T., Murray, C. E., Brinkmalm, G., Cullen, N. C., Höglund, K., Zetterberg, H., Blennow, K., & Portelius, E. (2019). The intact postsynaptic protein neurogranin is reduced in brain tissue from patients with familial and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 137(1), 89-102. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1910-3>

Lane-Donovan, C., & Herz, J. (2017). ApoE, ApoE Receptors, and the Synapse in Alzheimer's Disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 28(4), 273-284. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.12.001>

Laurent, C., Buée, L., & Blum, D. (2018). Tau and neuroinflammation: What impact for Alzheimer's Disease and Tauopathies? *Biomedical Journal*, 41(1), 21-33. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.01.003>

Le Meur, K., Mendizabal-Zubiaga, J., Grandes, P., & Audinat, E. (2012). GABA release by hippocampal astrocytes. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 6. <https://doi.org/10.3389/fncom.2012.00059>

Ledeboer, A., Brevé, J. J. P., Wierinckx, A., van der Jagt, S., Bristow, A. F., Leysen, J. E., Tilders, F. J. H., & Van Dam, A.-M. (2002). Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. *The European Journal of Neuroscience*, 16(7), 1175-1185. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02200.x>

Lee, E. B. (2011). Obesity, leptin, and Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1243(1), 15-29. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06274.x>

- Lee, M., Schwab, C., & McGeer, P. L. (2011). Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia*, *59*(1), 152-165. <https://doi.org/10.1002/glia.21087>
- Leite, C., Silva, N. T., Mendes, S., Ribeiro, A., de Faria, J. P., Lourenço, T., dos Santos, F., Andrade, P. Z., Cardoso, C. M. P., Vieira, M., Paiva, A., da Silva, C. L., Cabral, J. M. S., Relvas, J. B., & Grãos, M. (2014). Differentiation of human umbilical cord matrix mesenchymal stem cells into neural-like progenitor cells and maturation into an oligodendroglial-like lineage. *PLoS One*, *9*(10), e111059. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111059>
- Lemere, C. A., Lopera, F., Kosik, K. S., Lendon, C. L., Ossa, J., Saido, T. C., Yamaguchi, H., Ruiz, A., Martinez, A., Madrigal, L., Hincapie, L., Arango, J. C., Anthony, D. C., Koo, E. H., Goate, A. M., Selkoe, D. J., & Arango, J. C. (1996). The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nature Medicine*, *2*(10), 1146-1150. <https://doi.org/10.1038/nm1096-1146>
- Leyton, L., & Hagoood, J. S. (2014). Thy-1 modulates neurological cell-cell and cell-matrix interactions through multiple molecular interactions. *Advances in neurobiology*, *8*, 3–20. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8090-7_1
- Li, J., Khankan, R. R., Caneda, C., Godoy, M. I., Haney, M. S., Krawczyk, M. C., Bassik, M. C., Sloan, S. A., & Zhang, Y. (2019). Astrocyte-to-astrocyte contact and a positive feedback loop of growth factor signaling regulate astrocyte maturation. *Glia*, *67*(8), 1571-1597. <https://doi.org/10.1002/glia.23630>
- Liao, Y.-F., Wang, B.-J., Cheng, H.-T., Kuo, L.-H., & Wolfe, M. S. (2004). Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interferon-gamma stimulate gamma-secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein through a. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(47), 49523-49532. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402034200>
- Liao, Z.-Q., Ye, M., Yu, P.-G., Xiao, C., & Lin, F.-Y. (2016). Glioma-Associated Oncogene Homolog1 (Gli1)-Aquaporin1 pathway promotes glioma cell metastasis. *BMB Reports*, *49*(7), 394-399. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2016.49.7.011>

- Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W.-S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, *541*(7638), 481-487.
<https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Liu, K., Guo, L., Zhou, Z., Pan, M., & Yan, C. (2019). Mesenchymal stem cells transfer mitochondria into cerebral microvasculature and promote recovery from ischemic stroke. *Microvascular Research*, *123*, 74-80.
<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2019.01.001>
- Liu, K., Ji, K., Guo, L., Wu, W., Lu, H., Shan, P., & Yan, C. (2014). Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia-reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. *Microvascular Research*, *92*, 10-18.
<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2014.01.008>
- Liu, Y., Niu, R., Yang, F., Yan, Y., Liang, S., Sun, Y., Shen, P., & Lin, J. (2018). Biological characteristics of human menstrual blood-derived endometrial stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *22*(3), 1627-1639. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13437>
- Lo, M.-T., Kauppi, K., Fan, C.-C., Sanyal, N., Reas, E. T., Sundar, V. S., Lee, W.-C., Desikan, R. S., McEvoy, L. K., Chen, C.-H., & Alzheimer's Disease Genetics Consortium. (2019). Identification of genetic heterogeneity of Alzheimer's disease across age. *Neurobiology of Aging*, *84*, 243.e1-243.e9.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.02.022>
- Lobo-Silva, D., Carriche, G. M., Castro, A. G., Roque, S., & Saraiva, M. (2016). Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *Journal of Neuroinflammation*, *13*(1), 297.
<https://doi.org/10.1186/s12974-016-0763-8>
- Lopera, F., Ardilla, A., Martínez, A., Madrigal, L., Arango-Viana, J. C., Lemere, C. A., Arango-Lasprilla, J. C., Hincapié, L., Arcos-Burgos, M., Ossa, J. E., Behrens, I. M., Norton, J., Lendon, C., Goate, A. M., Ruiz-

- Linares, A., Rosselli, M., & Kosik, K. S. (1997). Clinical features of early-onset Alzheimer disease in a large kindred with an E280A presenilin-1 mutation. *JAMA*, *277*(10), 793-799.
- Lu, Y., Zhou, Y., Zhang, R., Wen, L., Wu, K., Li, Y., Yao, Y., Duan, R., & Jia, Y. (2019). Bone Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Recovery Following Spinal Cord Injury via Improvement of the Integrity of the Blood-Spinal Cord Barrier. *Frontiers in Neuroscience*, *13*, 209.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00209>
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, *224*, 164-175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>
- Magalhães, C. A., Carvalho, M. das G., Sousa, L. P. de, Caramelli, P., & Gomes, K. B. (2017). Alzheimer's disease and cytokine IL-10 gene polymorphisms: Is there an association? *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, *75*(9), 649-656. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20170110>
- Mamelak, M. (2017). Energy and the Alzheimer brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *75*, 297-313.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.02.001>
- Marei, H. E. S., El-Gamal, A., Althani, A., Afifi, N., Abd-Elmaksoud, A., Farag, A., Cenciarelli, C., Thomas, C., & Anwarul, H. (2018). Cholinergic and dopaminergic neuronal differentiation of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(2), 936-945.
<https://doi.org/10.1002/jcp.25937>
- Martínez-Tapia, R. J., Estrada-Rojo, F., Hernández-Chávez, A. A., Barajas-Martínez, A., Islas Escoto, S., Navarro, L., & Chavarría, A. (2018). Neuroinflamación: El ying-yang de la neuroinmunología. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, *61*, 44-53.
- Mendiola, A. S., & Cardona, A. E. (2018). The IL-1 β phenomena in neuroinflammatory diseases. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, *125*(5), 781-795. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1732-9>

- Mendivil-Perez, M., Velez-Pardo, C., & Jimenez-Del-Rio, M. (2019). Direct transdifferentiation of human Wharton's jelly mesenchymal stromal cells into cholinergic-like neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, 312, 126-138. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.11.019>
- Meng, X., Ichim, T. E., Zhong, J., Rogers, A., Yin, Z., Jackson, J., Wang, H., Ge, W., Bogin, V., Chan, K. W., Thébaud, B., & Riordan, N. H. (2007). Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population. *Journal of Translational Medicine*, 5, 57. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-5-57>
- Meraz-Ríos, M. A., Toral-Rios, D., Franco-Bocanegra, D., Villeda-Hernández, J., & Campos-Peña, V. (2013). Inflammatory process in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00059>
- Meurer, S. K., & Weiskirchen, R. (2020). Endoglin: An «Accessory» Receptor Regulating Blood Cell Development and Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23). <https://doi.org/10.3390/ijms21239247>
- Michaud, M., Balardy, L., Moulis, G., Gaudin, C., Peyrot, C., Vellas, B., Cesari, M., & Nourhashemi, F. (2013). Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *Journal of the American Medical Directors Association*, 14(12), 877-882. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2013.05.009>
- Minor, M., Alcedo, K. P., Battaglia, R. A., & Snider, N. T. (2019). Cell type- and tissue-specific functions of ecto-5'-nucleotidase (CD73). *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 317(6), C1079-C1092. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00285.2019>
- Mitchell, R., Mellows, B., Sheard, J., Antonioli, M., Kretz, O., Chambers, D., Zeuner, M.-T., Tomkins, J. E., Denecke, B., Musante, L., Joch, B., Debaq-Chainiaux, F., Holthofer, H., Ray, S., Huber, T. B., Dengjel, J., De Coppi, P., Widera, D., & Patel, K. (2019). Secretome of adipose-derived mesenchymal stem cells promotes skeletal muscle regeneration through synergistic action of extracellular vesicle cargo and soluble proteins. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1213-1>

- Morales G, I., Farías G, G., & Maccioni B, R. B. (2010). La neuroinflamación como factor detonante del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, *48*, 49-57.
- Mori, T., Koyama, N., Arendash, G. W., Horikoshi-Sakuraba, Y., Tan, J., & Town, T. (2009). Overexpression of human S100B exacerbates cerebral amyloidosis and gliosis in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Glia*, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/glia.20924>
- Müller, M. S., Fouyssac, M., & Taylor, C. W. (2018). Effective Glucose Uptake by Human Astrocytes Requires Its Sequestration in the Endoplasmic Reticulum by Glucose-6-Phosphatase- β . *Current Biology*, *28*(21), 3481-3486.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.08.060>
- Mytych, J., Lewinska, A., Zebrowski, J., & Wnuk, M. (2015). Gold Nanoparticles Promote Oxidant-Mediated Activation of NF- κ B and 53BP1 Recruitment-Based Adaptive Response in Human Astrocytes. *BioMed Research International*, *2015*, 304575. <https://doi.org/10.1155/2015/304575>
- Netsch, P., Elvers-Hornung, S., Uhlig, S., Klüter, H., Huck, V., Kirschhöfer, F., Brenner-Weiß, G., Janetzko, K., Solz, H., Wuchter, P., Bugert, P., & Bieback, K. (2018). Human mesenchymal stromal cells inhibit platelet activation and aggregation involving CD73-converted adenosine. *Stem Cell Research & Therapy*, *9*(1), 184. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0936-8>
- Ng, A., Tam, W. W., Zhang, M. W., Ho, C. S., Husain, S. F., McIntyre, R. S., & Ho, R. C. (2018). IL-1 β , IL-6, TNF- α and CRP in Elderly Patients with Depression or Alzheimer's disease: Systematic Review and Meta-Analysis. *Scientific Reports*, *8*(1), 12050. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30487-6>
- Nielsen, H. M., Mulder, S. D., Beliën, J. A. M., Musters, R. J. P., Eikelenboom, P., & Veerhuis, R. (2010). Astrocytic A β 1-42 uptake is determined by A β -aggregation state and the presence of amyloid-associated proteins: Uptake of A β 1-42 Oligomers and Fibrils. *Glia*, *58*(10), 1235-1246. <https://doi.org/10.1002/glia.21004>
- Norden, D. M., Trojanowski, P. J., Villanueva, E., Navarro, E., & Godbout, J. P. (2016). Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia*, *64*(2), 300-316. <https://doi.org/10.1002/glia.22930>

- Oikawa, N., & Walter, J. (2019). Presenilins and γ -Secretase in Membrane Proteostasis. *Cells*, 8(3).
<https://doi.org/10.3390/cells8030209>
- Oliet, S. H., Piet, R., & Poulain, D. A. (2001). Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5518), 923-926.
<https://doi.org/10.1126/science.1059162>
- Olsen, M., Aguilar, X., Sehlin, D., Fang, X. T., Antoni, G., Erlandsson, A., & Syvänen, S. (2018). Astroglial Responses to Amyloid-Beta Progression in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Molecular Imaging and Biology*, 20(4), 605-614. <https://doi.org/10.1007/s11307-017-1153-z>
- Organización Mundial de las Salud. (s. f.). *Demencia*. Recuperado 17 de mayo de 2020, de
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Ouyang, W., & O'Garra, A. (2019). IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: From Basic Science to Clinical Translation. *Immunity*, 50(4), 871-891. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.020>
- Pahrudin Arrozi, A., Shukri, S. N. S., Wan Ngah, W. Z., Mohd Yusof, Y. A., Ahmad Damanhuri, M. H., & Makpol, S. (2017). Evaluation of the Expression of Amyloid Precursor Protein and the Ratio of Secreted Amyloid Beta 42 to Amyloid Beta 40 in SH-SY5Y Cells Stably Transfected with Wild-Type, Single-Mutant and Double-Mutant Forms of the APP Gene for the Study of Alzheimer's Disease Pathology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183(3), 853-866. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2468-6>
- Paouri, E., & Georgopoulos, S. (2019). Systemic and CNS Inflammation Crosstalk: Implications for Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 16(6), 559-574.
<https://doi.org/10.2174/1567205016666190321154618>
- Park, H., Han, K.-S., Oh, S.-J., Jo, S., Woo, J., Yoon, B.-E., & Lee, C. J. (2013). High glutamate permeability and distal localization of Best1 channel in CA1 hippocampal astrocyte. *Molecular Brain*, 6, 54.
<https://doi.org/10.1186/1756-6606-6-54>

- Park, H. J., Shin, J. Y., Kim, H. N., Oh, S. H., Song, S. K., & Lee, P. H. (2015). Mesenchymal stem cells stabilize the blood–brain barrier through regulation of astrocytes. *Stem Cell Research & Therapy*, *6*(1), 187.
<https://doi.org/10.1186/s13287-015-0180-4>
- Park, J., An, S. S. A., Giau, V. V., Shim, K., Youn, Y. C., Bagyinszky, E., & Kim, S. (2017). Identification of a novel PSEN1 mutation (Leu232Pro) in a Korean patient with early-onset Alzheimer’s disease and a family history of dementia. *Neurobiology of Aging*, *56*, 212.e11-212.e17.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.04.012>
- Pavoni, S., Jarray, R., Nassor, F., Guyot, A.-C., Cottin, S., Rontard, J., Mikol, J., Mabondzo, A., Deslys, J.-P., & Yates, F. (2018). Small-molecule induction of A β -42 peptide production in human cerebral organoids to model Alzheimer’s disease associated phenotypes. *PloS One*, *13*(12), e0209150.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209150>
- Pereira Diniz, L., Tortelli, V., Matias, I., Morgado, J., Bérnago Araujo, A. P., Melo, H. M., Seixas da Silva, G. S., Alves-Leon, S. V., de Souza, J. M., Ferreira, S. T., De Felice, F. G., & Gomes, F. C. A. (2017). Astrocyte Transforming Growth Factor Beta 1 Protects Synapses against A β Oligomers in Alzheimer’s Disease Model. *The Journal of Neuroscience*, *37*(28), 6797-6809. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3351-16.2017>
- Perez-Nievas, B. G., & Serrano-Pozo, A. (2018). Deciphering the Astrocyte Reaction in Alzheimer’s Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *10*, 114. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00114>
- Petković, F., Campbell, I. L., Gonzalez, B., & Castellano, B. (2016). Astrocyte-targeted production of interleukin-6 reduces astroglial and microglial activation in the cuprizone demyelination model: Implications for myelin clearance and oligodendrocyte maturation. *Glia*, *64*(12), 2104-2119.
<https://doi.org/10.1002/glia.23043>
- Pimenova, A. A., & Goate, A. M. (2020). Novel presenilin 1 and 2 double knock-out cell line for in vitro validation of PSEN1 and PSEN2 mutations. *Neurobiology of Disease*, *138*, 104785.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104785>

- Plitman, E., de la Fuente-Sandoval, C., Reyes-Madrigal, F., Chavez, S., Gómez-Cruz, G., León-Ortiz, P., & Graff-Guerrero, A. (2016). Elevated Myo-Inositol, Choline, and Glutamate Levels in the Associative Striatum of Antipsychotic-Naive Patients With First-Episode Psychosis: A Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Study With Implications for Glial Dysfunction. *Schizophrenia Bulletin*, *42*(2), 415-424. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbv118>
- Pluta, R., Kocki, J., Ułamek-Kozioł, M., Bogucka-Kocka, A., Gil-Kulik, P., Januszewski, S., Jabłoński, M., Petniak, A., Brzozowska, J., Bogucki, J., Furmaga-Jabłońska, W., & Czuczwar, S. J. (2016). Alzheimer-associated presenilin 2 gene is dysregulated in rat medial temporal lobe cortex after complete brain ischemia due to cardiac arrest. *Pharmacological Reports: PR*, *68*(1), 155-161. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.08.002>
- Portmann-Lanz, C. B., Schoeberlein, A., Portmann, R., Mohr, S., Rollini, P., Sager, R., & Surbek, D. V. (2010). Turning placenta into brain: Placental mesenchymal stem cells differentiate into neurons and oligodendrocytes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *202*(3), 294.e1-294.e11. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2009.10.893>
- Proust, A., Barat, C., Leboeuf, M., Drouin, J., & Tremblay, M. J. (2017). Contrasting effect of the latency-reversing agents bryostatin-1 and JQ1 on astrocyte-mediated neuroinflammation and brain neutrophil invasion. *Journal of Neuroinflammation*, *14*(1), 242. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-1019-y>
- Quintana, A., Müller, M., Frausto, R. F., Ramos, R., Getts, D. R., Sanz, E., Hofer, M. J., Krauthausen, M., King, N. J. C., Hidalgo, J., & Campbell, I. L. (2009). Site-specific production of IL-6 in the central nervous system retargets and enhances the inflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *183*(3), 2079-2088. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900242>
- Quintanilla, R. A., Orellana, D. I., González-Billault, C., & Maccioni, R. B. (2004). Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Experimental Cell Research*, *295*(1), 245-257. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.01.002>

- Rae, C., Hare, N., Bubb, W. A., McEwan, S. R., Bröer, A., McQuillan, J. A., Balcar, V. J., Conigrave, A. D., & Bröer, S. (2003). Inhibition of glutamine transport depletes glutamate and GABA neurotransmitter pools: Further evidence for metabolic compartmentation. *Journal of Neurochemistry*, *85*(2), 503-514. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01713.x>
- Rao, S., Morales, A. A., & Pearse, D. D. (2015). The Comparative Utility of Viromer RED and Lipofectamine for Transient Gene Introduction into Glial Cells. *BioMed Research International*, *2015*, 458624. <https://doi.org/10.1155/2015/458624>
- Reiss, A. B., Arain, H. A., Stecker, M. M., Siegart, N. M., & Kasselmann, L. J. (2018). Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Reviews in the Neurosciences*, *29*(6), 613-627. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0063>
- Ren, C., Li, D., Zhou, Q., & Hu, X. (2020). Mitochondria-targeted TPP-MoS₂ with dual enzyme activity provides efficient neuroprotection through M1/M2 microglial polarization in an Alzheimer's disease model. *Biomaterials*, *232*, 119752. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119752>
- Ringheim, G. E., Szczepanik, A. M., Petko, W., Burgher, K. L., Zhu, S. Z., & Chao, C. C. (1998). Enhancement of beta-amyloid precursor protein transcription and expression by the soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 complex. *Brain Research. Molecular Brain Research*, *55*(1), 35-44. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(97\)00356-2](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(97)00356-2)
- Rizor, A., Pajarillo, E., Johnson, J., Aschner, M., & Lee, E. (2019). Astrocytic Oxidative/Nitrosative Stress Contributes to Parkinson's Disease Pathogenesis: The Dual Role of Reactive Astrocytes. *Antioxidants*, *8*(8), 265. <https://doi.org/10.3390/antiox8080265>
- Robinson, M., Fraser, I., McKee, E., Scheck, K., Chang, L., & Willerth, S. M. (2018). Transdifferentiating Astrocytes Into Neurons Using ASCL1 Functionalized With a Novel Intracellular Protein Delivery Technology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *6*, 173. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00173>
- Robinson-Agramonte, M. de L. A., Gonçalves, C.-A., Farina de Almeida, R., González Quevedo, A., Chow, S., Velázquez Pérez, L., Díaz de la Fé, A., Sesterheim, P., & Souza, D. O. G. (2019). Neuroinflammation and

Neuromodulation in Neurological Diseases. *Behavioral Sciences (Basel, Switzerland)*, 9(9).

<https://doi.org/10.3390/bs9090099>

Rodríguez-Arellano, J. J., Parpura, V., Zorec, R., & Verkhratsky, A. (2016). Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Dynamic and metabolic astrocyte-neuron interactions in healthy and diseased brain*, 323, 170-182. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.01.007>

Roelofs, R. F., Fischer, D. F., Houtman, S. H., Sluijs, J. A., Van Haren, W., Van Leeuwen, F. W., & Hol, E. M. (2005). Adult human subventricular, subgranular, and subpial zones contain astrocytes with a specialized intermediate filament cytoskeleton. *Glia*, 52(4), 289-300.

<https://doi.org/10.1002/glia.20243>

Rosado, M. M., Bernardo, M. E., Scarsella, M., Conforti, A., Giorda, E., Biagini, S., Cascioli, S., Rossi, F., Guzzo, I., Vivarelli, M., Dello Strologo, L., Emma, F., Locatelli, F., & Carsetti, R. (2015). Inhibition of B-cell proliferation and antibody production by mesenchymal stromal cells is mediated by T cells. *Stem Cells and Development*, 24(1), 93-103. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0155>

Rossi, E., Smadja, D., Goyard, C., Cras, A., Dizier, B., Bacha, N., Lokajczyk, A., Guerin, C. L., Gendron, N., Planquette, B., Mignon, V., Bernabéu, C., Sanchez, O., & Smadja, D. M. (2017). Co-injection of mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells accelerates muscle recovery in hind limb ischemia through an endoglin-dependent mechanism. *Thrombosis and Haemostasis*, 117(10), 1908-1918. <https://doi.org/10.1160/TH17-01-0007>

Ruiz de Sánchez, C., Nariño, D., & Muñoz Ceron, J. F. (2010). Epidemiología y carga de la enfermedad de Alzheimer. *Acta neurol. colomb*, 87-94.

Ryu, K.-Y., Lee, H.-J., Woo, H., Kang, R.-J., Han, K.-M., Park, H., Lee, S. M., Lee, J.-Y., Jeong, Y. J., Nam, H.-W., Nam, Y., & Hoe, H.-S. (2019). Dasatinib regulates LPS-induced microglial and astrocytic neuroinflammatory responses by inhibiting AKT/STAT3 signaling. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 190. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1561-x>

- Sairanen, T. R., Lindsberg, P. J., Brenner, M., Carpén, O., & Sirén, A. (2001). Differential cellular expression of tumor necrosis factor-alpha and Type I tumor necrosis factor receptor after transient global forebrain ischemia. *Journal of the Neurological Sciences*, *186*(1-2), 87-99. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(01\)00508-1](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(01)00508-1)
- Salehinejad, P., Alitheen, N. B., Ali, A. M., Omar, A. R., Moshrefi, M., Motamedi, B., & Nematollahi-Mahani, S. N. (2015). Neural differentiation of human umbilical cord matrix-derived mesenchymal cells under special culture conditions. *Cytotechnology*, *67*(3), 449-460. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9703-6>
- Scemes, E., & Giaume, C. (2006). Astrocyte calcium waves: What they are and what they do. *Glia*, *54*(7), 716-725. <https://doi.org/10.1002/glia.20374>
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1813*(5), 878-888. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.034>
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, *8*(6), 595-608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>
- Sepulveda-Falla, D., Barrera-Ocampo, A., Hagel, C., Korwitz, A., Vinueza-Veloz, M. F., Zhou, K., Schonewille, M., Zhou, H., Velazquez-Perez, L., Rodriguez-Labrada, R., Villegas, A., Ferrer, I., Lopera, F., Langer, T., De Zeeuw, C. I., & Glatzel, M. (2014). Familial Alzheimer's disease-associated presenilin-1 alters cerebellar activity and calcium homeostasis. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(4), 1552-1567. <https://doi.org/10.1172/JCI66407>
- Serrano-Pozo, A., Betensky, R. A., Frosch, M. P., & Hyman, B. T. (2016). Plaque-Associated Local Toxicity Increases over the Clinical Course of Alzheimer Disease. *The American Journal of Pathology*, *186*(2), 375-384. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.10.010>
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *1*(1), a006189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>

- Shahbazi, A., Safa, M., Alikarami, F., Kargozar, S., Asadi, M. H., Joghataei, M. T., & Soleimani, M. (2016). Rapid Induction of Neural Differentiation in Human Umbilical Cord Matrix Mesenchymal Stem Cells by cAMP-elevating Agents. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 5(3), 167-177.
- Shivakumar, S. B., Lee, H.-J., Son, Y.-B., Bharti, D., Ock, S. A., Lee, S.-L., Kang, Y.-H., Park, B.-W., & Rho, G.-J. (2019). In vitro differentiation of single donor derived human dental mesenchymal stem cells into pancreatic β cell-like cells. *Bioscience Reports*, 39(5). <https://doi.org/10.1042/BSR20182051>
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180-183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Silva, M. V. F., Loures, C. de M. G., Alves, L. C. V., de Souza, L. C., Borges, K. B. G., & Carvalho, M. das G. (2019). Alzheimer's disease: Risk factors and potentially protective measures. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0524-y>
- Singh, K., Han, K., Tilve, S., Wu, K., Geller, H. M., & Sack, M. N. (2018). Parkin targets NOD2 to regulate astrocyte endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Glia*, 66(11), 2427-2437. <https://doi.org/10.1002/glia.23482>
- Singh, M., Kakkar, A., Sharma, R., Kharbanda, O. P., Monga, N., Kumar, M., Chowdhary, S., Airan, B., & Mohanty, S. (2017). Synergistic Effect of BDNF and FGF2 in Efficient Generation of Functional Dopaminergic Neurons from human Mesenchymal Stem Cells. *Scientific Reports*, 7(1), 10378. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11028-z>
- Sollvander, S., Nikitidou, E., Brolin, R., Soderberg, L., Sehlin, D., Lannfelt, L., & Erlandsson, A. (2016). Accumulation of amyloid-beta by astrocytes result in enlarged endosomes and microvesicle-induced apoptosis of neurons. *Molecular Neurodegeneration*, 11(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0098-z>
- Song, Y., & Gunnarson, E. (2012). Potassium dependent regulation of astrocyte water permeability is mediated by cAMP signaling. *PLoS One*, 7(4), e34936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034936>

- Spees, J. L., Lee, R. H., & Gregory, C. A. (2016). Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), 125. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0363-7>
- Sun, J., Carlson-Stevermer, J., Das, U., Shen, M., Delenclos, M., Snead, A. M., Koo, S. Y., Wang, L., Qiao, D., Loi, J., Petersen, A. J., Stockton, M., Bhattacharyya, A., Jones, M. V., Zhao, X., McLean, P. J., Sproul, A. A., Saha, K., & Roy, S. (2019). CRISPR/Cas9 editing of APP C-terminus attenuates β -cleavage and promotes α -cleavage. *Nature Communications*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07971-8>
- Swaminathan, G., Zhu, W., & Plowey, E. D. (2016). BECN1/Beclin 1 sorts cell-surface APP/amyloid β precursor protein for lysosomal degradation. *Autophagy*, 12(12), 2404. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1234561>
- Takano, T., Tian, G.-F., Peng, W., Lou, N., Libionka, W., Han, X., & Nedergaard, M. (2006). Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nature Neuroscience*, 9(2), 260-267. <https://doi.org/10.1038/nn1623>
- Tapella, L., Cerruti, M., Biocotino, I., Stevano, A., Rocchio, F., Canonico, P. L., Grilli, M., Genazzani, A. A., & Lim, D. (2018). TGF- β 2 and TGF- β 3 from cultured β -amyloid-treated or 3xTg-AD-derived astrocytes may mediate astrocyte-neuron communication. *The European Journal of Neuroscience*, 47(3), 211-221. <https://doi.org/10.1111/ejn.13819>
- Tarafdar, A., & Pula, G. (2018). The Role of NADPH Oxidases and Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). <https://doi.org/10.3390/ijms19123824>
- Tarassishin, L., Suh, H.-S., & Lee, S. C. (2014). LPS and IL-1 differentially activate mouse and human astrocytes: Role of CD14. *Glia*, 62(6), 999-1013. <https://doi.org/10.1002/glia.22657>
- Tcw, J., Wang, M., Pimenova, A. A., Bowles, K. R., Hartley, B. J., Lacin, E., Machlovi, S. I., Abdelaal, R., Karch, C. M., Phatnani, H., Slesinger, P. A., Zhang, B., Goate, A. M., & Brennand, K. J. (2017). An Efficient Platform for Astrocyte Differentiation from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 9(2), 600-614. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.06.018>
- Tian, T., Bai, D., Li, W., Huang, G.-W., & Liu, H. (2016). Effects of Folic Acid on Secretases Involved in A β Deposition in APP/PS1 Mice. *Nutrients*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/nu8090556>

- Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., & Nair, M. (2019). Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Nanomedicine*, *14*, 5541-5554.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S200490>
- Tong, J., Ang, L.-C., Williams, B., Furukawa, Y., Fitzmaurice, P., Guttman, M., Boileau, I., Hornykiewicz, O., & Kish, S. J. (2015). Low levels of astroglial markers in Parkinson's disease: Relationship to α -synuclein accumulation. *Neurobiology of Disease*, *82*, 243-253. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.06.010>
- Turillazzi, E., Neri, M., Cerretani, D., Cantatore, S., Frati, P., Moltoni, L., Busardò, F. P., Pomara, C., Riezzo, I., & Fineschi, V. (2016). Lipid peroxidation and apoptotic response in rat brain areas induced by long-term administration of nandrolone: The mutual crosstalk between ROS and NF- κ B. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *20*(4), 601-612. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12748>
- Tyan, S.-H., Shih, A. Y.-J., Walsh, J. J., Murayama, H., Sarsoza, F., Ku, L., Eggert, S., Hof, P. R., Koo, E. H., & Dickstein, D. L. (2012). Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *51*(1-2), 43. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.07.009>
- Vardjan, N., Gabrijel, M., Potokar, M., Svajger, U., Kreft, M., Jeras, M., de Pablo, Y., Faiz, M., Pekny, M., & Zorec, R. (2012). IFN-gamma-induced increase in the mobility of MHC class II compartments in astrocytes depends on intermediate filaments. *Journal of Neuroinflammation*, *9*, 144.
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-144>
- Vasile, F., Dossi, E., & Rouach, N. (2017). Human astrocytes: Structure and functions in the healthy brain. *Brain Structure & Function*, *222*(5), 2017-2029. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1383-5>
- Vawda, R. (2008). *Characterisation and Neurogenic Potential of Stem Cells from the Human Umbilical Cord Matrix*. <https://doi.org/10.25560/4413>
- Vb, K., & Ee, S. (2017). Hydrogel scaffolds promote neural gene expression and structural reorganization in human astrocyte cultures. *PeerJ*, *5*. <https://doi.org/10.7717/peerj.2829>

- Vega, I. E., Cabrera, L. Y., Wygant, C. M., Velez-Ortiz, D., & Counts, S. E. (2017). Alzheimer's Disease in the Latino Community: Intersection of Genetics and Social Determinants of Health. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *58*(4), 979-992. <https://doi.org/10.3233/JAD-161261>
- Vergara, C., Houben, S., Suain, V., Yilmaz, Z., De Decker, R., Vanden Dries, V., Boom, A., Mansour, S., Leroy, K., Ando, K., & Brion, J.-P. (2019). Amyloid- β pathology enhances pathological fibrillary tau seeding induced by Alzheimer PHF in vivo. *Acta Neuropathologica*, *137*(3), 397-412. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1953-5>
- Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiological Reviews*, *98*(1), 239-389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
- Vidal, R., & Ghetti, B. (2012). Generation of a novel murine model of A β deposition based on the expression of human wild-type amyloid precursor protein gene. *Prion*, *6*(4), 346-349. <https://doi.org/10.4161/pri.21023>
- Wang, S.-H., Lin, S.-J., Chen, Y.-H., Lin, F.-Y., Shih, J.-C., Wu, C.-C., Wu, H.-L., & Chen, Y.-L. (2009). Late outgrowth endothelial cells derived from Wharton jelly in human umbilical cord reduce neointimal formation after vascular injury: Involvement of pigment epithelium-derived factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *29*(6), 816-822. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.184739>
- Wang, W., Hou, T.-T., Jia, L.-F., Wu, Q.-Q., Quan, M.-N., & Jia, J.-P. (2019). Toxic amyloid- β oligomers induced self-replication in astrocytes triggering neuronal injury. *EBioMedicine*, *42*, 174-187. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.049>
- Wang, X., Ma, S., Yang, B., Huang, T., Meng, N., Xu, L., Xing, Q., Zhang, Y., Zhang, K., Li, Q., Zhang, T., Wu, J., Yang, G. L., Guan, F., & Wang, J. (2018). Resveratrol promotes hUC-MSCs engraftment and neural repair in a mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, *339*, 297-304. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.10.032>
- Wiśniewski, H. M., Narang, H. K., & Terry, R. D. (1976). Neurofibrillary tangles of paired helical filaments. *Journal of the Neurological Sciences*, *27*(2), 173-181. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(76\)90059-9](https://doi.org/10.1016/0022-510X(76)90059-9)

- Wyszenbach, A., Quintela, T., Llaveró, F., Zugaza, J. L., Matute, C., & Alberdi, E. (2016). Amyloid β -induced astrogliosis is mediated by β 1-integrin via NADPH oxidase 2 in Alzheimer's disease. *Aging Cell*, *15*(6), 1140-1152. <https://doi.org/10.1111/ace1.12521>
- Xie, L., Zhang, N., Zhang, Q., Li, C., Sandhu, A. F., Iii, G. W., Lin, S., Lv, P., Liu, Y., Wu, Q., & Yu, S. (2020). Inflammatory factors and amyloid β -induced microglial polarization promote inflammatory crosstalk with astrocytes. *Aging*, *12*(22), 22538-22549. <https://doi.org/10.18632/aging.103663>
- Xu, H., Zhang, H., Zhang, J., Huang, Q., Shen, Z., & Wu, R. (2016). Evaluation of neuron-glia integrity by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy: Implications for psychiatric disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *71*, 563-577. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.09.027>
- Yamamoto, M., Kiyota, T., Horiba, M., Buescher, J. L., Walsh, S. M., Gendelman, H. E., & Ikezu, T. (2007). Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Regulate Amyloid- β Plaque Deposition and β -Secretase Expression in Swedish Mutant APP Transgenic Mice. *The American Journal of Pathology*, *170*(2), 680-692. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060378>
- Yang, K., Park, H.-J., Han, S., Lee, J., Ko, E., Kim, J., Lee, J. S., Yu, J. H., Song, K. Y., Cheong, E., Cho, S.-R., Chung, S., & Cho, S.-W. (2015). Recapitulation of in vivo-like paracrine signals of human mesenchymal stem cells for functional neuronal differentiation of human neural stem cells in a 3D microfluidic system. *Biomaterials*, *63*, 177-188. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.06.011>
- Yang, Z., & Wang, K. K. W. (2015). Glial fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in Neurosciences*, *38*(6), 364-374. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.003>
- Yardan, T., Erenler, A. K., Baydin, A., Aydin, K., & Cokluk, C. (2011). Usefulness of S100B protein in neurological disorders. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, *61*(3), 276-281.
- Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G., & Barres, B. A. (2012). Genomic Analysis of Reactive Astrogliosis. *Journal of Neuroscience*, *32*(18), 6391-6410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012>

- Zenaro, E., Pietronigro, E., Bianca, V. D., Piacentino, G., Marongiu, L., Budui, S., Turano, E., Rossi, B., Angiari, S., Dusi, S., Montresor, A., Carlucci, T., Nani, S., Tosadori, G., Calciano, L., Catalucci, D., Berton, G., Bonetti, B., & Constantin, G. (2015). Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nature Medicine*, *21*(8), 880-886. <https://doi.org/10.1038/nm.3913>
- Zhang, J., & Jiao, J. (2015). Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *BioMed Research International*, *2015*, 727542. <https://doi.org/10.1155/2015/727542>
- Zhang, X., Huang, W.-J., & Chen, W.-W. (2016). TGF- β 1 factor in the cerebrovascular diseases of Alzheimer's disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *20*(24), 5178-5185.
- Zhang, Y., Sloan, S. A., Clarke, L. E., Caneda, C., Plaza, C. A., Blumenthal, P. D., Vogel, H., Steinberg, G. K., Edwards, M. S. B., Li, G., Duncan, J. A. 3rd, Cheshier, S. H., Shuer, L. M., Chang, E. F., Grant, G. A., Gephart, M. G. H., & Barres, B. A. (2016). Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron*, *89*(1), 37-53. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.013>
- Zhang, Z., Ma, Z., Zou, W., Guo, H., Liu, M., Ma, Y., & Zhang, L. (2019). The Appropriate Marker for Astrocytes: Comparing the Distribution and Expression of Three Astrocytic Markers in Different Mouse Cerebral Regions. *BioMed Research International*, *2019*, 9605265. <https://doi.org/10.1155/2019/9605265>
- Zhao, L., Feng, Y., Chen, X., Yuan, J., Liu, X., Chen, Y., Zhao, Y., Liu, P., & Li, Y. (2016). Effects of IGF-1 on neural differentiation of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells. *Life Sciences*, *151*, 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.001>
- Zhen, H.; Zhao, L.; Ling, Z.; Kuo, L.; Xue, X.; Feng, J. (2018). Wip1 regulates blood-brain barrier function and neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide via the sonic hedgehog signaling signaling pathway. *Mol. Immunol.* 2018, 93, 31–37. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589017305199?via%3Dihub>

Zhong, L., Xu, Y., Zhuo, R., Wang, T., Wang, K., Huang, R., Wang, D., Gao, Y., Zhu, Y., Sheng, X., Chen, K., Wang, N., Zhu, L., Can, D., Marten, Y., Shinohara, M., Liu, C.-C., Du, D., Sun, H., ... Chen, X.-F. (2019). Soluble TREM2 ameliorates pathological phenotypes by modulating microglial functions in an Alzheimer's disease model. *Nature Communications*, *10*(1), 1365. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09118-9>