

EL SECRETOMA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMÁTICAS ESTIMULA LA REGENERACIÓN NEURÍTICA EN NEURONAS DEL DRG DE RATONES DIABÉTICOS IN VITRO

Constanza Masse^{a*}

Manuel Aravena^a

José Ignacio Farías^a

Valentín Hernández^a

Constanza Troc^a

Cristian De Gregorio^b

^aEstudiante de Medicina, Facultad de Medicina Clínica Alemana de Santiago - Universidad del Desarrollo.

^bCentro de Medicina Regenerativa, Facultad de Medicina Clínica Alemana de Santiago - Universidad del Desarrollo.

Artículo recibido el 15 de abril, 2020. Aceptado en versión corregida el 17 de julio, 2020.

RESUMEN

Introducción: La diabetes es una enfermedad metabólica crónica que afecta cerca de 425 millones de personas a nivel mundial. Su complicación más común es la neuropatía diabética, una patología neurodegenerativa que afecta principalmente a nervios sensitivos y autonómicos. En distintos estudios preliminares, se ha observado que el secretoma de las células madre mesenquimáticas produce efectos anti-apoptóticos, tróficos y regenerativos en distintas células y tejidos. **Objetivo:** Evaluar si el secretoma de células mesenquimáticas humanas derivadas de tejido adiposo (hAD-MSC) promueve la regeneración neurítica de neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (DRG) de ratones diabéticos adultos in vitro. **Metodología:** Se extrajeron neuronas de DRG de 3 ratones db/db con diabetes mellitus tipo II (T2DM), con las cuales se realizaron 3 cultivos independientes. Las neuronas de cada cultivo recibieron NGF (comparador), vehículo (control negativo) o secretoma (tratamiento). Luego, se realizó inmunocitofluorescencia y posteriormente un análisis de Sholl. **Resultado:** El número de intersecciones de ramificaciones por neurona y radio máximo alcanzado por las neuritas fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en los grupos NGF y secretoma, respecto al vehículo. **Discusión:** Se considera que el secretoma tiene potencial terapéutico para un tratamiento de neuropatía diabética aunque, al ser un estudio in vitro, todavía no es extrapolable a estudios clínicos. **Conclusión:** La administración de secretoma de hAD-MSCs a neuronas de DRG de ratones db/db durante 48 horas promueve la regeneración de estas.

Palabras clave: Diabetes, Neuropatía, Células madre, mesénquima, regeneración nerviosa.

INTRODUCCIÓN

Esta investigación cuantitativa pretende mostrar los resultados de la administración de un posible tratamiento para la neuropatía diabética. El interés en este proyecto nace de la gran prevalencia de esta enfermedad a nivel mundial, la cual actualmente no tiene tratamiento y daña significativamente la calidad de vida de los pacientes que la padecen.

La diabetes es una enfermedad metabólica caracterizada por una hiperglicemia, resultante de un defecto en la secreción y/o efecto de la insulina¹. Se estima que 425 millones de personas en el mundo tienen diabetes², siendo esta la mayor epidemia del siglo XXI³. Las principales complicaciones asociadas a la diabetes son la nefropatía, la retinopatía y la neuropatía, siendo esta última la más frecuente⁴. La neuropatía es una patología neurodegenerativa que afecta principalmente a nervios autonómicos y sensitivos periféricos, y no posee tratamientos eficientes. Existen varios mecanismos involucrados en el desarrollo de la neuropatía diabética, como la vía de los polioles que provoca el aumento de especies reactivas de oxígeno, y la vía de las hexosaminas y la generación de productos de glicación avanzada, que inducen inflamación y una disminución de la irrigación por daño en la

microvasculatura⁵. Estos fenómenos producen daños en las neuronas al alterar la señalización intracelular, la expresión y dinámica de canales iónicos y enlenteciendo el transporte axónico. Todas estas vías llevan a una disfunción axonal y explican los síntomas de la neuropatía diabética⁶.

Las células madre mesenquimáticas (MSC) son células multipotentes auto-renovables, capaces de diferenciarse a otros tipos celulares⁷. Se ha observado que tienen la capacidad de migrar a sitios de inflamación⁸, además de ejercer efectos tróficos, inmunomoduladores, anti apoptóticos y regenerativos en distintos tejidos y órganos⁹. Esto a través de la secreción de múltiples citoquinas y factores de crecimiento (VEGF, IGF, NGF) que estimulan vías proliferativas y anti apoptóticas en la célula. Por esto se plantea que podría ser una estrategia para promover la regeneración neuronal y, por lo tanto, una posible opción terapéutica para la neuropatía diabética.

Sin embargo, existe un reducido número de estudios donde se ha observado la transformación espontánea de MSC trasplantadas a células tumorales^{10,11,12}, por lo que aún no existe certeza de la seguridad en este tipo de tratamientos. Se ha descrito que el mecanismo terapéutico más

*Correspondencia: cmasser@udd.cl



importante de las MSC está asociado a su función paracrina, al secretar una gran variedad de factores de crecimiento, citoquinas, interleucinas y ligandos en forma de moléculas solubles y vesículas extracelulares; el secretoma¹³.

El secretoma puede generar efectos tróficos y paracrinos equivalentes al de las MSC trasplantadas, siendo más seguro y fácil de utilizar en el ambiente clínico cotidiano como un biofármaco. Estudios anteriores han demostrado que neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG), incubadas in vitro en medios hiperglicémicos, presentan una disminución de la regeneración, aumento del estrés oxidativo y apoptosis celular^{14,15}. En un trabajo preliminar del laboratorio, se logró cultivar neuronas del DRG de ratones diabéticos adultos de 6 meses de vida, y se demostró que presentan una baja capacidad de elongar neuritas in vitro¹⁶. Este modelo de cultivo de neuronas de ratones diabéticos adultos presenta características fisiológicas más relevantes para la enfermedad, ya que no implica un estrés agudo inducido por la hiperglicemia, sino el efecto crónico de un microambiente dañino.

Ante la problemática que representa esta patología, se propone evaluar los efectos del secretoma de MSC humanas derivadas de tejido adiposo (hAD-MSC) en neuronas de DRG de ratones diabéticos adultos in vitro. Se hipotetiza que esta intervención tendrá como resultado una mejora en la regeneración neurítica de estas neuronas, aumentando la elongación y la ramificación de éstas.

METODOLOGÍA

Diseño experimental

La población de esta investigación son muestras de neuronas de los DRGs de ratones adultos hembras de 26 semanas db/db (Cg-m^{+/+}Lepr^d b/J) deficientes para el receptor de leptina, por lo que desarrollaron diabetes mellitus tipo II de forma espontánea entre las 4-8 semanas de vida¹⁷. Al extraer las neuronas desde los DRGs, se ha descrito que las neuronas sufren apoptosis debido al estrés a las que son sometidas en la extracción, el proceso de digestión enzimática, la disgregación mecánica o la ausencia de factores neurotróficos¹⁸, por lo que en este estudio no se contempló el uso de un agente estresor adicional.

Se obtuvieron 3 cultivos independientes, uno por cada ratón, y cada cultivo a su vez se dividió en 3 placas (Figura 1). Cada cultivo se utilizó para evaluar regeneración mediante inmunocitofluorescencia y posterior análisis de Sholl. Para la inmunocitofluorescencia, se realizaron tinciones con β III tubulina, DAPI y faloidina, las cuales permiten realizar un análisis de Sholl¹⁹. La β III tubulina se encuentra específicamente en los microtúbulos de las neuronas²⁰, el DAPI marca núcleos celulares²¹ y la faloidina marca filamentos de actina encontrados en todo tipo de células permitiendo reconocer la

morfología y diferenciarlas de las neuronas^{22,23}. Dentro del análisis de Sholl, se utilizó NGF como comparador y PBS como control negativo.

Después del plaqueo (0h), se esperó 5 horas para que se fijaran las neuronas y se les administraron los tratamientos. A las 29 horas se lavaron y volvieron a administrar los tratamientos. 43 horas después de la administración del tratamiento (48 horas post-plaqueo), las muestras fueron fijadas y teñidas para analizar y evaluar su regeneración. Dentro de los grupos de 3 placas, a la primera se la trató con secretoma de hAD-MSC (intervención), la segunda se trató con NGF (comparador), debido a que las neuronas son capaces de responder a este factor neurotrófico, disminuyendo la apoptosis^{24,25} y estimulando la extensión de neuritas²⁵, y a la tercera se la trató con PBS (control negativo).

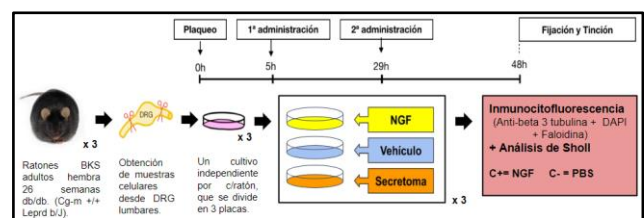


Figura 1. Diseño experimental

Obtención del secretoma

El secretoma de hAD-MSC utilizado en este trabajo fue provisto por el Centro de Medicina Regenerativa, CAS-UDD, de acuerdo a lo descrito por Oses et al.²⁶

Animales

Los ratones BKS adultos hembras db/db (Cg-m^{+/+}Lepr^db/J) de 26 semanas de edad con T2DM son proporcionados por el Bioterio de la UDD. Dichos ratones fueron mantenidos a temperatura y humedad constantes, con un ciclo de luz/noche de 12 horas y acceso a dieta standard (LabDiet 5P00 RMH 3000, USA) sin restricciones, y agua. Para la eutanasia, se les administró una sobredosis de tiopentato de sodio intraperitoneal. Una vez que los animales dejaron de presentar signos vitales, se les realizó una dislocación cervical, y se procedió a extraer la columna vertebral para la obtención de los ganglios lumbares. El acta de aprobación CICUAL es la N*5/2017_CICUAL, con fecha 7 de mayo de 2017.

Obtención de neuronas de DRGs de ratones diabéticos

Luego de obtener los ganglios lumbares L3-L5, los DRG se extrajeron con pinzas finas, y se transfirieron a un tubo Falcon con HBSS y se les agregó 600 μ L de tripsina al 0,625% (m/v). Después, se incubaron durante 30 min a 37°C con agitación cada 10 min. Luego, se centrifugó el tejido y se reemplazó el medio por DMEM/F12 + colagenasa tipo 1 al 05% (m/v) durante 30 min, con agitación cada 10 min.

Posteriormente, se agregó 1 ml de DMEM/12 + FBS 10% para frenar la reacción. En seguida, se disgregó el tejido en forma mecánica utilizando pipetas Pasteur de vidrio, y se sembraron a una densidad aproximada de 5.000 células por pocillo (1,9 cm²) en medio de plaqueo (DMEM/F12 + FBS 10%) en covers pre-tratados con ácido nítrico y polilisina como matriz de adherencia. Luego de 3 horas, se retiró el medio de plaqueo y se agregó el medio de cultivo definitivo (DMEM F12 + N2 + citosina arabinósida (ara-C) + antibióticos + intervención). Se dejaron en un incubador a 37° y 5% de CO₂ por 48 horas.

Administración del tratamiento

Para el tratamiento con secretoma de hAD-MSC de cada condición experimental (5.000 células), se utilizó una cantidad equivalente a la producción de secretoma de 600 hAD-MSCs (durante 48 hrs) concentrado en un volumen de 10 μ L²⁷. En resumen, lo que produce una hAD-MSC en 48 hrs, estará biodisponible para tres neuronas. Para el tratamiento con NGF, (Alomone, NGF 7S) se utilizó una concentración final de 10 ng/ml.

Para el tratamiento con vehículo, las neuronas se trataron con PBS 1X. El medio de cultivo se cambió completamente a las 24 horas.

Inmunofluorescencia

Se fijaron las células con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos. Luego se lavaron las células fijadas con PBS 3 veces, y se les agregó 300 μ L de tritón X-100 10% durante 10 minutos para permeabilizarlas. Luego se agregó 300 μ L de BSA 5% en PBS para bloquear, y después de una hora a temperatura ambiente se agregó el anticuerpo primario, el cual fue anti- β 3-tubulina (1:150; TU-20 Santa Cruz). Se dejó reposando en una cámara húmeda a 32°C durante 3 horas.

Finalizadas las 3 horas, se realizaron 3 lavados con PBS, para luego agregar anticuerpo secundario anti-mouse Alexa 488 (1:350), faloidina AlexaFluor-555 (Santa Cruz) 1:500 y DAPI 1:400, todo esto en PBS. El anticuerpo secundario y los marcadores fluorescentes se incubaron en un horno a 37°C durante una hora. Finalizada esa hora, se lavaron 3 veces con PBS y se depositaron en un portaobjetos, utilizando Floursave (Merck-Millipore) sobre la muestra como medio de montaje, y se dejó secando durante 30 min a temperatura ambiente. Terminado dicho tiempo, las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta ser observadas en el microscopio confocal Fluoview Fv10i.

Análisis de Sholl

Luego de obtener las imágenes desde el microscopio confocal, se utilizó el programa ImageJ (NIH, USA) para transformar las imágenes de fluorescencia a imágenes binarias (blanco y negro) y analizarlas, de acuerdo a los descrito por Ferreira et

al.¹⁹. El análisis de Sholl permitió obtener el número de intersecciones de las ramificaciones con círculos concéntricos de 15 μ m, a partir del centro de la neurona, y entregó el valor de la suma total de intersecciones por neurona y el radio máximo de intersección.

Las intersecciones de las ramificaciones indican el paso de una neurita por el círculo concéntrico trazado por el programa, mientras que el radio máximo al cual se detecta una ramificación corresponde a la distancia máxima que alcanzó la neurita de mayor tamaño. Al extraer las neuronas del DRG las neuritas de estas sufren una retracción, por lo que observar intersecciones de las ramificaciones implicaría una elongación de estas neuritas y, por tanto, su regeneración.

Presentación de datos y análisis estadístico

En todas las condiciones experimentales se utilizó un n=3. Los datos cuantitativos fueron presentados como promedio \pm error estándar. Todas las comparaciones fueron realizadas a través de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, considerando significancia en caso de obtener un p<0,05.

RESULTADO

Después del proceso de obtención de imágenes de inmunofluorescencia a través de microscopía cofocal con los marcadores DAPI, faloidina y anticuerpo anti- β 3 tubulina (Figura. 2A), se procedió al proceso de aislación de neuronas, obteniendo imágenes binarias de estas para su análisis de Sholl (Figura. 2B).

Una vez realizado el análisis, se cuantificó el número de intersecciones de las ramificaciones por cada círculo concéntrico de 15 μ m de radio (Figura. 2C) para la evaluación de regeneración y elongación neurítica. Se puede apreciar que en los radios de menor tamaño, el número de intersecciones en el grupo de neuronas que recibió NGF supera en número de intersecciones al grupo que recibió el tratamiento de secretoma, pero una vez alcanzado un radio de 180 μ m, el grupo que recibió el tratamiento supera a dicho grupo comparador en cantidad de intersecciones.

Al cuantificar el número de intersecciones por neurona, se puede ver que en los grupos NGF e intervención (hAD-MSC secretoma) son significativamente mayores (p<0,05) que el vehículo, donde se puede observar que presentan más del doble de intersecciones que el vehículo (Figura. 2D). Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los grupos NGF e intervención. El número de intersecciones con los círculos concéntricos indica elongación y ramificación de las neuritas y, por lo tanto, su regeneración.

Al mismo tiempo, al cuantificar el radio máximo alcanzado dentro de los círculos concéntricos del



análisis de Sholl (fig. 2E), se obtuvo una vez más que los grupos NGF e intervención son significativamente mayores ($p < 0,05$) que el grupo con vehículo, y que no se encontró diferencia significativa entre los grupos

NGF e intervención. El radio máximo cuantifica la elongación de las neuritas y, en consecuencia, su capacidad de regeneración.

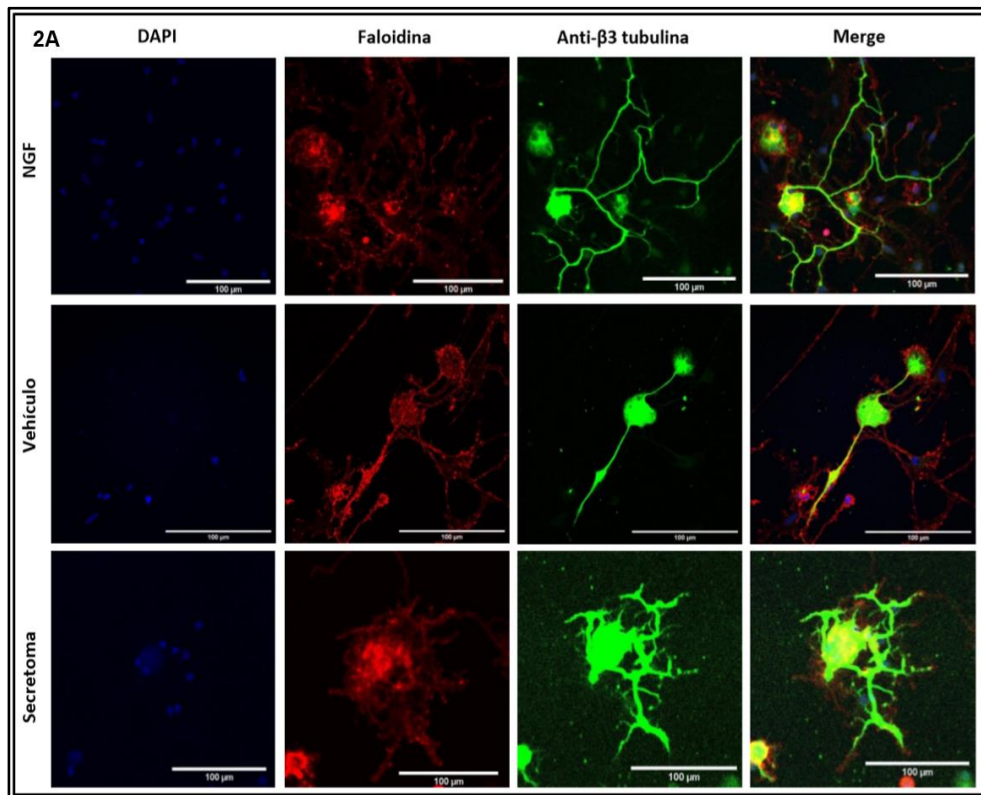


Figura 2. (A) Imágenes representativa de co-tinciones en los diferentes grupos. Tinciones con DAPI (azul), faloidina (rojo), anti-β3-tubulina (verde) y el merge correspondiente a los grupos tratados con secretoma, vehículo y NGF

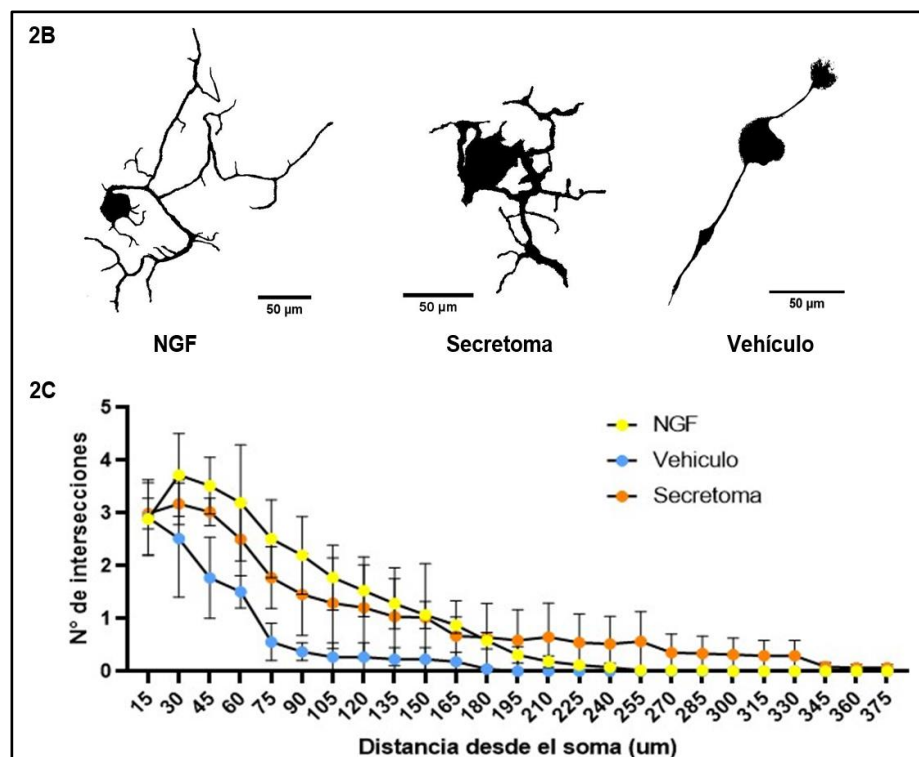


Figura 2. (B) Análisis de Sholl en neuronas de ratones db/db in vitro. Imágenes binarias representativas de los grupos de neuronas analizadas. (C) Análisis de Sholl.



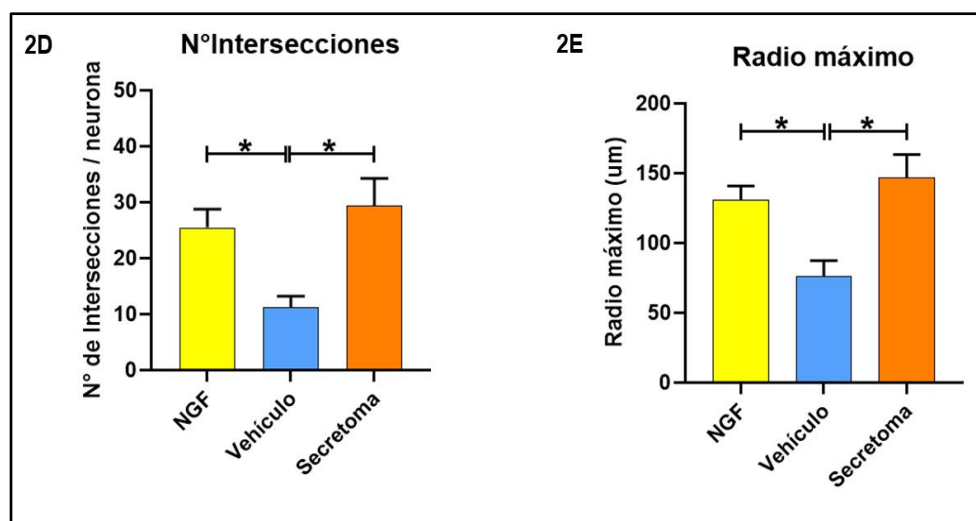


Figura 2.
(D) Cuantificación del n° de intersecciones por neurona, representados.
(E) Cuantificación del promedio de radio máximo alcanzado por cada neurona, dentro de los círculos concéntricos. El “***” significa $p < 0,05$ para todas las gráficas de la figura. (Test estadístico, $n=3$)

DISCUSIÓN

Las hMSC han demostrado tener un gran potencial terapéutico para tratar una extensa cantidad de patologías²⁸. En este trabajo, se investigó este potencial para un tratamiento de neuropatía diabética, en un modelo in vitro que utiliza neuronas de los DRG de ratones que desarrollan diabetes tipo II (T2DM) de forma espontánea. El modelo de ratones BKS con T2DM (Cg-m+/+Leprdb/J) de 26 semanas de edad ha sido descrito previamente in vivo¹⁷, pero el uso de sus neuronas para realizar un cultivo celular corresponde a un nuevo modelo para el estudio de neuropatía diabética in vitro. Actualmente, la gran mayoría de los modelos de neuropatía diabética in vitro utilizan ratones jóvenes o neonatos y, además, no existen modelos in vitro para diabetes mellitus tipo II. La edad y el tipo de diabetes son factores importantes en el estudio de esta patología, debido a que ratones con T2DM en estadio avanzado presentan más similitudes con la fisiopatología de la enfermedad en humanos¹⁷.

Se considera que el cultivo celular fue exitoso, ya que las tinciones con DAPI definían claramente los núcleos celulares y la tinción con anti- $\beta 3$ tubulina mostraban una morfología bien definida y coherente con la de neuronas (Figura 2).

En el análisis de Sholl, se realizó el conteo de intersecciones entre las ramificaciones y los círculos concéntricos trazados por el programa tal como se graficó en la Figura 2B. La suma de intersecciones por neurona, lo cual es un indicador del largo de las neuritas²⁹, fue significativamente mayor en el grupo que recibió el secretoma, en comparación con las neuronas que solo recibieron vehículo. El radio máximo de intersección también es significativamente mayor en las neuronas a las que se les administró el secretoma, en comparación a aquellas que recibieron el vehículo, evidenciando que estas últimas efectivamente regeneraron menos,

resultado que concuerda con los resultados de De Gregorio et al¹⁶.

En la literatura se ha descrito que al realizar una axotomía, una digestión mecánica y química, (como al hacer un cultivo), ocurre una retracción neurítica completa¹⁸. Además, en un trabajo preliminar de laboratorio se demostró que las neuritas de las neuronas de ratones de DRG tienen una baja capacidad de regeneración in vitro¹⁶. Es por esto que los resultados indican regeneración y no detención de la degeneración. Considerando lo anterior, estos resultados permiten afirmar que la administración del secretoma a neuronas de ratones afectados por la T2DM, estimula la regeneración neurítica.

CONCLUSIÓN

Tanto el cultivo como la inmunotinción de las neuronas de ratones db/db de 26 semanas, fueron realizadas exitosamente. Esto permite afirmar que la evaluación de la administración del secretoma fue realizada correctamente. Con los resultados obtenidos se puede concluir que la administración de secretoma de hAD-MSCs a neuronas de los DRG de ratones db/db durante 48 horas promovió su regeneración.

Sin embargo, este trabajo se enfocó específicamente en neuronas sensoriales, descartando otros tipos celulares relevantes para la enfermedad, como las células de Schwann. Otros estudios deben ser llevados a cabo para evaluar el efecto del secretoma en otros tipos celulares, relevantes para la fisiopatología de la neuropatía diabética. Además, al ser un estudio in vitro, el modelo no es extrapolable a estudios clínicos en humanos. El NGF, por ejemplo, es efectivo en la etapa in vitro, pero no in vivo³⁰. Por lo que se propone determinar si el tratamiento con secretoma es efectivo y seguro in vivo, evaluando en este caso si mejoran los síntomas de la neuropatía diabética en el ratón.



Finalmente, se considera que estudios posteriores mostrarán que el secretoma es un tratamiento prometedor para la neuropatía diabética.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* [Internet]. 2010 [citado el 15 de agosto de 2019]; 33(Supplement 1):S62-S69. Disponible en: https://care.diabetesjournals.org/content/37/supplement_1/s81.short
- International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas 8a ed* [Internet]. [citado el 15 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://diabetesatlas.org/en/>
- Tabish SA. Is diabetes becoming the biggest epidemic of the twenty-first century?. *Int. J. Health Sci* [Internet]. 2007 [citado el 18 de agosto de 2019];1(2)1,V-VIII. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3068646/>
- Lotfy M, Adegate J, Kalasz H. Chronic Complications of Diabetes Mellitus: A Mini Review. *Curr. Diabetes Rev* [Internet]. 2017 [citado el 28 de septiembre de 2019]; 13(1):3-10. Disponible en: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cdr/2017/00000013/00000001/art00003>
- Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, et al. Diabetic neuropathy. *Nat. Rev. Dis. Primers* [Internet]. 2019 [citado el 30 de agosto de 2019];5(1):1-18. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41572-019-0092-1>
- Cashman C, Höke A. Mechanisms of distal axonal degeneration in peripheral neuropathies. *Neurosci. Lett.* [Internet]. 2015 [citado el 2 de julio de 2020];596:33-50. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.01.048>
- Kim EJ, Kim N, Cho SG. The potential use of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Mol Med* [Internet]. 2013 [citado el 15 de agosto de 2019];45(1):e2-e2. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/emm20132>
- Kim N, Cho SG. Clinical applications of mesenchymal stem cells, *Korean J Intern Med.* [Internet]. 2013 [citado el 16 de agosto de 2019];28(4):387-402. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3712145/>
- Wakao S, Kuroda Y, Ogura F, et al. Regenerative Effects of Mesenchymal Stem Cells: Contribution of Muse Cells, a Novel Pluripotent Stem Cell Type that Resides in Mesenchymal Cells. *Cells* [Internet]. 2012 [citado el 28 de septiembre de 2019];1(4):1045-60. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4409/1/4/1045>
- Lee HY, Hong IS. Double-edged sword of mesenchymal stem cells: Cancer-promoting versus therapeutic potential. *Cancer Sci* [Internet]. 2017 [citado el 15 de agosto de 2019];108(10):1939-46. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cas.13334>
- Volarevic V, Simovic B, Gazdic M, et al. Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy. *Int J Med Sci* [Internet]. 2018 [citado el 26 de agosto de 2019]; 15(1):36-45. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5765738/>
- He L, Zhao F, Zheng Y, et al. Loss of interactions between p53 and surviving gene in mesenchymal stem cells after spontaneous transformation in vitro. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2016 [citado el 18 de agosto de 2019];75:74-84. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.03.018>
- Hofer HR, Tuan RS. Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. *Stem Cell Research Therapy* [Internet]. 2016 [citado el 28 de septiembre de 2019];7(1):131. Disponible en: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-016-0394-0>
- Krieglstein K, Strelau J, et al. TGF- β and the regulation of neuron survival and death. *J. Physiol. Paris* [Internet]. 2002 [citado el 3 de septiembre de 2019];96(1-2):25-30. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(01\)00077-8](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(01)00077-8)
- Sherr CJ, De Pinho RA. Cellular Senescence: Minireview Mitotic Clock or Culture Shock?. *Cell* [Internet]. 2000 [citado el 3 de septiembre de 2019];102(4):407-10. Disponible en: [https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674\(00\)00046-5](https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674(00)00046-5)
- De Gregorio C, Ezquer F, Contador D. Human adipose-derived mesenchymal stem cell conditioned medium ameliorates polyneuropathy and foot ulceration in diabetic BKS db/db mice. *Stem cell res ther.* Por publicar, 2020.
- De Gregorio C, Contador D, Campero M. Characterization of diabetic neuropathy progression in a mouse model of type 2 diabetes mellitus. *BIOL OPEN* [Internet]. 2018 [citado el 15 de agosto de 2019];7(9):bio036830. Disponible en: <https://bio.biologists.org/content/7/9/bio036830.abstract>
- Sango K, Saito H, Takano M. Cultured Adult Animal Neurons and Schwann Cells Give Us New Insights into Diabetic Neuropathy. *Curr. Diabetes Rev* [Internet]. 2006 [citado el 26 de agosto de 2019];2(2):169-83. Disponible en: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cdr/2006/00000002/00000002/art00004>
- Ferreira T, Blackman A, Oyer J. Neuronal morphometry directly from bitmap images. *Nat. Methods* [Internet]. 2014 [citado el 18 de agosto de 2019];11(10):982-4. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nmeth.3125/>
- Katsetos CD, Legido A, Perentes E, Mörk SJ. Class III β -Tubulin Isotype: A Key Cytoskeletal Protein at the Crossroads of Developmental Neurobiology and Tumor Neuropathology. *J. Child Neurol* [Internet]. 2003 [citado el 28 de septiembre de 2019];18(12):851-66. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/088307380301801205>
- Nguyena S, Lievena C & Levinab L. Simultaneous labeling of projecting neurons and apoptotic state. *J of Neuroscience Methods* [Internet]. 2007 [citado el 26 de agosto de 2019];161(2):281-4. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.10.026>
- Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Sci* [Internet]. 1998 [citado el 3 de octubre de 2019]; 279(5350):509-14. DOI: 10.1126/science.279.5350.509
- Bradke F, Fawcett JW, Spira ME. Assembly of a new growth cone after axotomy: the precursor to axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosci* [Internet]. 2012 [citado el 18 de agosto de 2019];13(3):183-93. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrn3176>
- Vogelbaum M, Tong J, Rich K. Developmental Regulation of Apoptosis in Dorsal Root Ganglion Neurons. *J. Neurosci* [Internet]. 1998 [citado el 3 de octubre de 2019];18(21):8928-35. Disponible en: <https://www.jneurosci.org/content/18/21/8928.short>
- LeClair RJ, Durmus T, et al. Cthrc1 Is a Novel Inhibitor of Transforming Growth Factor- β Signaling and Neointimal Lesion Formation. *Circ. Res* [Internet]. 2007 [citado el 10 de octubre de 2019];100(6):826-33. Disponible en: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/01.RES.0000260806.99307.72>



26. Oses C, Olivares B, Ezquer M, et al. Preconditioning of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with deferoxamine increases the production of pro-angiogenic, neuroprotective and anti-inflammatory factors: Potential application in the treatment of diabetic neuropathy. PLoS One [Internet]. 2017 [citado el 15 de agosto de 2019];12(5):e0178011. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5438173/>
27. Andrius Kaselis A, Treinys R, Vosyliute R. DRG Axon Elongation and Growth Cone Collapse Rate Induced by Sema3A are Differently Dependent on NGF Concentration. Cell Mol Neurobiol [Internet]. 2014 [citado el 10 de octubre de 2019];34(2):289-96. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10571-013-0013-x>
28. Zhou J, Zhang Z, Qian G. Mesenchymal stem cells to treat diabetic neuropathy: a long and strenuous way from bench to the clinic. Cell Death Discov [Internet]. 2016 [citado el 7 de noviembre de 2019];2(1):1-7. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/cddiscovery201655>
29. Gensel J, Schonberg D, Alexander J, et al. Semi-automated Sholl analysis for quantifying changes in growth and differentiation of neurons and glia. J Neuroscience Methods [Internet]. 2010 [citado el 15 de agosto de 2019];190(1):71-79. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.04.026>
30. Apfel SC. Nerve growth factor for the treatment of diabetic neuropathy: What went wrong, what went right, and what does the future hold? Int. Rev. Neurobiol [Internet]. 2002 [citado el 28 de septiembre de 2019];50:393-413. Disponible en: https://books.google.cl/books?hl=es&lr=&id=b3txI3EVdP8C&oi=fnd&pg=PA393&dq=Apfel+S.+C..+Nerve+growth+factor+for+the+treatment+of+diabetic+neuropathy:+What+went+wrong,+what+went+right,+and+what+does+the+future+hold%3F+Int.+Rev.+Neurobiol+&ots=CQAsy_5zRu&sig=oLwL6zpmkdbK326kkl91CErD0o#v=onepage&q&f=false

