



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Aplicaciones de las células madre en el estudio y
tratamiento de enfermedades priónicas: una revisión
bibliográfica.

Applications of stem cells in the study and therapy of prion diseases: a
review

Autor/es

Susmita Ortells Ramón

Director/es

Inmaculada Martín Burriel

Adelaida Hernaiz Martorell

Facultad de Ciencias

2021

Dña **Inmaculada Martín Burriel**, Catedrática de Genética del Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza y **Adelaida Hernaiz Martorell**, Investigadora predoctoral del mismo Departamento.

CERTIFICAN QUE:

El Trabajo Fin de Grado titulado "*Aplicaciones de las células madre en el estudio y tratamiento de enfermedades priónicas: una revisión bibliográfica*" que se recoge en la presente Memoria, de la que es autora **Susmita Ortells Ramón**, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Laboratorio de Genética Bioquímica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza y damos nuestro visto bueno a su presentación.

En Zaragoza a 9 de septiembre de 2021.



Fdo. Inmaculada Martín Burriel



Fdo: Adelaida Hernaiz Martorell

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| Resumen/abstract | 1 |
| Introducción | 1 |
| Enfermedades priónicas..... | 1 |
| Agente infeccioso | 3 |
| Proteína prion celular..... | 3 |
| Funciones | 4 |
| Conversión | 5 |
| Enfermedades prion-like | 6 |
| Tratamiento de las enfermedades priónicas | 6 |
| Uso de células madre en las enfermedades neurodegenerativas | 7 |
| Justificación y objetivos | 8 |
| Metodología | 8 |
| Estrategia de búsqueda..... | 9 |
| Criterio de exclusión..... | 9 |
| Resultados y discusión | 10 |
| Revisión bibliográfica | 10 |
| Células madre..... | 11 |
| Uso de células madre como modelo <i>in vitro</i> de enfermedades priónicas | 12 |
| Uso de células madre en la terapia de las enfermedades priónicas | 16 |
| Conclusión/ Conclusion | 20 |
| Bibliografía | 21 |

RESUMEN

Las enfermedades priónicas son un grupo de trastornos neurodegenerativos raros causados por la acumulación de una isoforma mal plegada (PrP^{Sc}) de la proteína prion celular (PrP^C). Tanto el mecanismo de patogenicidad como las funciones de la propia proteína prion celular siguen siendo desconocidos, y debido a que estas enfermedades son de progreso rápido y mortales, existe una necesidad urgente y no satisfecha de desarrollar terapias que permitan frenar la propagación del prion. Se han propuesto muchos fármacos para combatir esta enfermedad, no obstante, no han resultado efectivos para paliar el daño cerebral. Por ello, una técnica que se presenta como buena candidata terapéutica es el empleo de las células madre, células no especializadas con capacidad de autorrenovarse y dar lugar a distintos tipos de células. Se sabe que estas células migran hacia sitios de daño cerebral y pueden diferenciarse en tipos de células neuronales específicos. Además del uso en la medicina regenerativa, las células madre se emplean también como modelo *in vitro* de las enfermedades priónicas y para el estudio de nuevas terapias farmacológicas.

ABSTRACT

Prion diseases are a group of rare neurodegenerative disorders caused by the accumulation of a misfolded isoform (PrP^{Sc}) of the cellular prion protein (PrP^C). Both the mechanism of pathogenicity and the functions of the cellular prion protein remain unknown, and because these diseases are fast-progressing and deadly, there is an urgent and unmet need to develop therapies to slow the spread of the prion. Many drugs have been proposed to combat this disease, however, they have not been effective in alleviating brain damage. For this reason, the technique that is presented as a good therapeutic candidate is the use of stem cells, unspecialized cells with the ability to self-renew and give rise to different types of cells. These cells are known to migrate to sites of brain damage and can differentiate into specific neuronal cell types. Besides their use in regenerative medicine, stem cells are also used as an *in vitro* model of prion diseases and for the study of new pharmaceutical therapies.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Enfermedades priónicas

Las enfermedades priónicas son un grupo de trastornos neurodegenerativos raros causados por la acumulación de una isoforma mal plegada de la proteína prion celular (PrP^C), un componente fisiológico de la membrana neuronal. Esta isoforma mal plegada (PrP^{Sc}) es el agente infeccioso asociado a estas enfermedades y se caracteriza por su capacidad de autopropagación, además de su transmisibilidad. Se tratan de enfermedades que afectan tanto al ser humano como a otros animales (1–3).

La conversión de PrP^C a PrP^{Sc} se puede producir por contacto con este agente infeccioso presente en el medio ambiente o bien, generarse de forma endógena (4). Estas enfermedades presentan tres etiologías distintas, que se pueden emplear para su clasificación: enfermedades priónicas esporádicas (85-90%), adquiridas (<1%) y

genéticas (10-15%). La principal vía de infección de las enfermedades adquiridas en el ser humano es la vía oral, también descrita en otras muchas especies (5). Las adquiridas en la especie humana se corresponden con aquellas relacionadas con el canibalismo, las iatrogénicas y las de origen zoonótico (2,3), aunque, la transmisión de priones entre especies suele ser muy ineficiente debido a la "barrera de especies", exceptuando casos muy concretos como la encefalopatía espongiforme bovina, que dio lugar a la variante de Creutzfeldt-Jakob y, muy probablemente, la encefalopatía transmisible de la visión (2,6). En cuanto a las enfermedades genéticas, están relacionadas con mutaciones en el gen *PRNP*. Hasta la fecha, se han identificado más de 50 mutaciones en este gen, la mayoría silentes, aunque algunas son inserciones o dan lugar a codones STOP (7,8). La gran mayoría de estas mutaciones presentan una penetrancia del 100%, aunque en algunos casos es inferior al 1%, pudiendo considerarse únicamente factores de riesgo (7). Diferentes mutaciones en el gen *PRNP* pueden producir diferentes fenotipos clínico-patológicos en diferentes individuos dentro o entre familias con la misma mutación. De esta forma, un polimorfismo en el codón 129 pueden afectar significativamente las características clínico-patológicas del paciente (9,10).

Además, también se pueden dividir estas enfermedades según si afectan al ser humano o a otros animales. Así pues, entre las enfermedades humanas encontramos el kuru, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), Insomnio Familiar Fatal (FFI), el síndrome de Gerstmann-Sträussler (GSS) y la variante de Creutzfeldt-Jakob (vCJD). Estos cinco subtipos se diferencian en parte, por su fenotipo clínico, pero principalmente por su histopatología cerebral asociada. Por otro lado, entre las enfermedades que afectan a los animales destacan el Scrapie de las ovejas y cabras, la caquexia crónica de los ciervos y alces (CWD) y la Encefalopatía espongiforme bovina (BSE) (1). La incidencia mundial de estas enfermedades es aproximadamente 1 de cada 10^6 habitantes por año en el caso de enfermedad esporádica y 1 de cada 10^7 habitantes por año, para la enfermedad familiar. Las formas esporádicas tienen un curso rápido y progresivo (4-6 meses), mientras que la forma hereditaria generalmente se manifiesta a una edad más temprana y tienen un curso más prolongado (1,10).

Las enfermedades priónicas presentan una serie de características histopatológicas y síntomas neurológicos que incluyen la degeneración espongiforme del sistema nervioso central, formación de placas amiloides, gliosis reactiva y pérdida neuronal. Otras características atípicas que definen a estas enfermedades son los largos períodos de incubación, que puede extenderse desde varios meses a varios años, la ausencia de inflamación y la falta de respuesta inmune específica de la enfermedad (5,11).

Hasta la fecha, las enfermedades priónicas son los únicos trastornos neurodegenerativos en los que está involucrada una proteína infecciosa que se puede transmitir horizontalmente, siendo capaz de producir una enfermedad clínica (1,12).

Las enfermedades priónicas humanas suponen un enorme desafío diagnóstico debido, principalmente, a su rareza y heterogeneidad, que se atribuye no solo a la presencia de las distintas etiologías, sino también a los diversos fenotipos que componen la forma esporádica (13). La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (sCJD) representa la mayoría de casos de enfermedades priónicas humanas con varios subtipos distintos que se clasifican según el genotipo del gen de la proteína prion (*PRNP*) en el codón 129 y las propiedades moleculares de PrP^{Sc} en Western blot. Además, estas enfermedades son difíciles de reconocer debido a que comparten muchos síntomas con otras

patologías neurológicas y el espectro completo de los síntomas no suele aparecer hasta una etapa avanzada de la evolución de la enfermedad. Además, muchos marcadores de laboratorio de uso común no son específicos de la enfermedad priónica. El diagnóstico se hace según criterios de probabilidad (8,10).

2.2 Agente infeccioso

2.2.1 Proteína prion celular

La proteína prion celular (PrP^C) es una proteína de la superficie celular expresada en diversos órganos y tejidos, que consta de 231 aminoácidos y es codificada por el gen *PRNP*, localizado en el brazo corto del cromosoma 20 en humanos y en el cromosoma 2 en ratones. Se trata de una proteína anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) y que está altamente conservada en los mamíferos, lo que sugiere que está involucrada en alguna función clave en el organismo. Abarca 16 kb y contiene dos exones separados por un intrón. El primer exón contiene secuencias no traducidas, mientras que el segundo incluye el marco de lectura abierto (ORF) que codifica PrP^C. PrP^C se expresa constitutivamente en el sistema nervioso central (SNC), predominantemente en neuronas, pero también en células gliales, y en varios tejidos no neuronales, particularmente en leucocitos y otras líneas celulares del sistema inmunológico (3,14–18).

La secuencia de PrP^C se puede dividir en 2 regiones estructuralmente bien definidas: una cola larga y flexible N-terminal (aproximadamente 100 residuos) presentes en la mayoría de las especies que contiene una repetición en tándem de cuatro o cinco copias de una secuencia de ocho aminoácidos (PHGGGWGQ), denominada región de repeticiones de octapéptidos (OR) e involucrada en la unión de iones de cobre; y un dominio C-terminal globular anclado a GPI que contiene tres hélices- α y flanqueando a la primera hélice, dos hebras- β . La cola N-terminal consta también de dos grupos cargados (CC1 y CC2) y un dominio hidrofóbico (HD). Además, dos sitios de N-glicosilación están ubicados en los aminoácidos 180 y 196, y hay un enlace disulfuro entre los aminoácidos 178 y 213, como se puede observar en la Figura I (14,15,18).

PrP^C es traducida en el retículo endoplasmático rugoso como un péptido de 253 aminoácidos que posteriormente sufre modificaciones postraduccionales en su transición a través del propio retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. Estas modificaciones incluyen la eliminación de un péptido señal de 22 aminoácidos en el extremo N-terminal, la formación de un enlace disulfuro y la adición de un ancla de GPI en el extremo C-terminal. Además, también puede sufrir eventos de escisión proteolítica denominados α , β y γ (Fig.I), que liberan los denominados fragmentos N1+C1, N2+C2 y C3, respectivamente. Estos eventos pueden ser importantes tanto a nivel fisiológico como patológico. La escisión alfa evita que el fragmento C1 se convierta en PrP^{Sc}. Se ha visto que la tasa de escisión β aumenta en el estado patológico y que los mutantes de delección de PrP^C que carecen del sitio de escisión α muestran una neurodegeneración espontánea que presenta características patológicas distintas a las de las enfermedades priónicas. La enzima responsable de la escisión de PrP^C puede no

ser única, se han observado varios miembros de la familia ADAM (a-disintegrina y metaloproteínasa) implicados en este proceso (3,14,15,18).

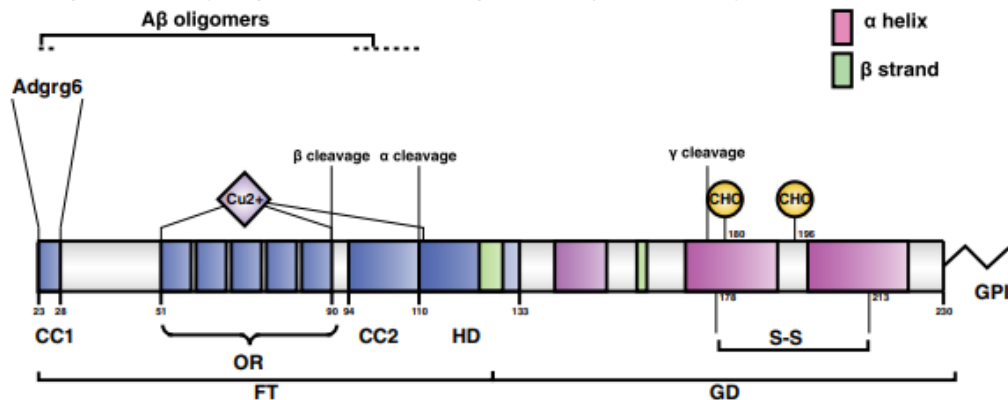


Figura 1: Estructura biomolecular del gen PRNP. Wulf M-A, Senatore A, Aguzzi A. The biological function of the cellular prion protein: an update. BMC Biol. diciembre de 2017.

Finalmente, se produce, en algunos casos, la adición de glicanos a los residuos Asn 181 y Asn 197. Después de atravesar el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, PrP^C se localiza en la superficie celular donde está anclada por el GPI. Tanto en la célula como en la superficie celular, la PrP^C está asociada con microdominios lipídicos de membrana específicos, enriquecidos en colesterol y esfingolípidos, llamados membranas resistentes a detergentes o balsas lipídicas. La forma que atraviesa la membrana se encuentra en un equilibrio dinámico con una forma internalizada, que se recicla de la superficie celular por endocitosis mediada por vías dependientes de clatrina o caveolina. La asociación con balsas lipídicas parece desempeñar un papel principal en la conducción de la localización de PrP^C en la célula, proporcionando una especie de "lanzadera" que la lleva desde el retículo endoplasmático a la superficie celular y viceversa. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que la asociación con microdominios lipídicos no es esencial para el transporte de PrP^C a la membrana plasmática, pero es bastante importante para su correcto plegado. En particular, el colesterol actuaría como un acompañante molecular en el proceso de plegamiento de PrP^C mediado por balsas de lípidos (14,15,18).

2.2.2 Funciones

La función fisiológica de la proteína PrP^C no está todavía muy clara. La expresión de PrP^C comienza en la embriogénesis y alcanza su nivel más alto en la edad adulta. Si bien se ha notificado la estructura tridimensional y una serie de roles putativos de PrP^C, la función bioquímica exacta de PrP^C aún no se ha dilucidado (5,19).

La evidencia actual sugiere varios papeles de la PrP^C en la célula que incluyen el transporte de cobre al interior de las células e interacción con otras proteínas de unión a cobre asociadas a la membrana cerebral (ej: mejora la incorporación de cobre en la superóxido dismutasa). También se ha descrito su participación en procesos fisiológicos que incluyen la diferenciación neuronal, varios mecanismos reguladores como la supervivencia o apoptosis de neuronas, el crecimiento de neuritas, la formación y función de sinapsis y el mantenimiento de las fibras mielínicas. Estos efectos posiblemente estén mediados por la participación de PrP^C en la transducción de señales (9,13,18,20,21). Por otro lado, diversos estudios muestran la posibilidad de que un aumento de PrP^C mediado por hipoxia desempeñe un papel importante en la angiogénesis, la neuritogénesis, el crecimiento axonal o en la tumorigénesis, en este

último caso mediante la regulación del crecimiento, diferenciación y resistencia tumoral a las terapias convencionales. Además, se ha observado que esta proteína está muy presente en las células madre y participa en su autorrenovación y proliferación, además de en la diferenciación neuronal de las células madre neuronales (20).

Sin embargo, aún no se ha encontrado una definición unificadora de la función de PrP^C, por tanto, esta proteína se describe a menudo como una proteína pleiotrópica implicada en diferentes funciones fisiológicas de las células neuronales y gliales (22).

2.2.3 Conversión

El agente infeccioso (PrP^{Sc}) es una proteína autorreplicante, codificada por el huésped que muestra una conformación completamente distinta de la proteína normal (PrP^C). Mientras que en la PrP^C predominan los motivos α -hélice frente a láminas- β (42% y 3% respectivamente), en la PrP^{Sc} sucede al revés (30% α -hélice frente a 43% láminas- β). Esta disimilitud en la estructura terciaria es la responsable de sus diferentes propiedades fisicoquímicas: mientras que la PrP^C es monomérica, soluble en detergentes no iónicos y proteasa-K (PK) sensible, la PrP^{Sc} es insoluble, parcialmente resistente a PK y propensa a la agregación. La digestión parcial de PrP^{Sc} con PK produce un fragmento infeccioso de aproximadamente 142 aminoácidos que se extiende aproximadamente desde el residuo 90 al 231, denominado núcleo de PrP^{Sc} resistente a PK. Sin embargo, la estructura primaria es idéntica en ambos casos, lo que podría explicar esa ausencia de respuesta inmune, fiebre y otros síntomas característicos de las infecciones (3,5,22). Al cambiar a la conformación PrP^{Sc} hay una pérdida de función, no obstante, recientemente se han notificado ganancia de función en levaduras. El plegamiento de las proteínas es muy sensible al estrés ambiental y al desequilibrio de la homeostasis por eso las tasas de aparición y desaparición de priones aumentan drásticamente en estas situaciones (23).

La PrP^{Sc} recién formada actúa como plantilla para facilitar la conversión de PrP^C en PrP^{Sc}, provocando la acumulación de PrP^{Sc}. Este descubrimiento es sumamente importante y pone en duda lo que sabemos sobre el dogma central de la biología molecular, pues revela la capacidad de las proteínas de servir como elementos de herencia (5,23). Se ha observado que PrP^C necesita encontrarse en un estado intermedio parcialmente desplegado (PrP^{*}) para interactuar con PrP^{Sc}, experimentando, de este modo, la conversión. La conversión de la proteína celular en la proteína infecciosa parece ser que puede requerir la ayuda de uno o más cofactores que todavía no han sido determinados. Existen estudios que indican que polianiones, como el RNA, o lípidos pueden participar en la aceleración de formación del prion. Estas evidencias no se han observado todavía en animales, sólo en estudios *in vitro* realizados con bacterias recombinantes. Por otro lado, también se han observado en levadura la presencia de chaperonas que participan en esta conversión (24,25).

Cuando los priones se pliegan mal, adquieren varias funciones: la propensión a iniciar un pliegue incorrecto dirigido por plantillas, infectividad, estabilidad y toxicidad. Es la estabilidad del prion lo que permite en gran medida su infectividad, ya que hace que sea difícil de desinfectar de los instrumentos quirúrgicos y es estable en los trasplantes de tejidos, lo que conduce a una infección iatrogénica (26).

2.3 Enfermedades prion-like

En los últimos años se han acumulado pruebas de que otras proteínas, como α -sinucleína, β -amiloide y tau (τ), presentan una conformación anormal que las convierte en fibrillas amiloides. Estas proteínas están en la base de enfermedades como el Parkinson (PD), el Alzheimer (AD), la enfermedad de Huntington (HD), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y amiloidosis sistémicas como diabetes tipo 2 y amiloidosis A, y son capaces de inducir por un mecanismo similar al prion un cambio conformacional que resulta patogénico. Los confórmeros amiloides pueden diseminarse de una célula a otra dentro del cerebro de los individuos afectados, dispersando así los fenotipos neurodegenerativos específicos de la proteína que se convierte en amiloide. Este hallazgo ilumina nuevas posibilidades para el diagnóstico y la terapéutica (10,13,26,27).

Además, datos más recientes, aunque todavía controvertidos, también sugieren que la PrP^C, quizás a través de su conversión a PrP^{Sc}, podría actuar como receptor de la proteína β amiloide, mediando la disfunción sináptica en la enfermedad de Alzheimer y posiblemente otros trastornos (13).

El comportamiento de tipo priónico ha estado en el centro de atención desde que se asoció por primera vez con estas enfermedades en mamíferos. Sin embargo, hay evidencias que sugieren que este mecanismo podría estar detrás de la regulación de procesos como la transcripción y traducción en múltiples especies. Aproximadamente 70 proteínas de unión a RNA humano (RBP) contienen un dominio de tipo priónico (PrLD), dominios de baja complejidad y de composición de aminoácidos similar a los dominios priónicos en levadura, que permiten que varias proteínas formen confórmeros infecciosos (28,29).

Las proteínas prion-like humanas constituyen un subconjunto de polipéptidos modulares ampliamente expresados en diferentes tipos de células y tejidos, asociados significativamente con enfermedades, integrados en redes de interacción altamente conectadas e involucrados en el flujo de información genética en la célula. En la mayoría de las enfermedades, el plegamiento incorrecto durante la enfermedad se asocia con la pérdida de funcionalidad de las proteínas como un paso clave en la etiología. Se ha observado que estas proteínas podrían desempeñar un papel relevante no solo en los trastornos neurológicos, sino también en diferentes tipos de cáncer e infecciones virales (26,28).

2.4 Tratamiento de las enfermedades priónicas

Conforme a los conocimientos actuales, para la creación de terapias se puede intervenir en diferentes fases que van desde la expresión de PrP^C hasta el desarrollo de la enfermedad (Figura II) (2). Se podría **reducir la expresión de PrP^C**, evitando la formación adicional de PrP^{Sc}(2); **inhibir la conversión priónica** (punto de mayor interés en los estudios de desarrollo de fármacos), bloqueando la formación de nueva PrP^{Sc}, pero es probable que no sea igual de efectivo en todas las cepas y podría conducir a la aparición de priones resistentes a los medicamentos (2,11,30); **estimular el aclaramiento** de PrP^{Sc} o **bloquear la neurotoxicidad** de PrP^{Sc} también puede ser beneficioso, pero probablemente deba combinarse con modalidades terapéuticas adicionales (2).

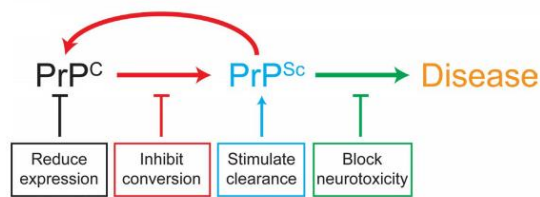


Figura II: posibles mecanismos de acción para la creación de potenciales terapéuticos para las enfermedades priónicas. Krance SH, Luke R, Shenouda M, Israwi AR, Colpitts SJ, Darwish L, et al. *Cellular models for discovering prion disease therapeutics: Progress and challenges. J Neurochem.* 2020.

Varios fármacos han sido desarrollados con datos preclínicos prometedores, pero han fracasado en ensayos clínicos en humanos debido a la ausencia de modelos de cultivos de células humanas, pues los cultivos celulares tradicionales y los animales modelos no pueden replicar con precisión la fisiopatología humana (31,32). Además de fármacos, también se han propuesto otros tipos de terapias como es la inmunoterapia y la técnica de RNA de interferencia (iRNA) (11,33). Otra estrategia anti-priónica que nos podemos encontrar en las bibliografías es el uso de potenciadores químicos de la autofagia (34).

Sin embargo, a día de hoy no hay ningún tratamiento efectivo contra las enfermedades priónicas, debido principalmente a tres barreras en entornos clínicos: diagnóstico tardío, cuando ya han aparecido los síntomas neurológicos; existencia de diferentes variantes conformacionales de PrP^{Sc} denominadas "cuasiespecies", pudiendo surgir cuasiespecies de PrP^{Sc} resistentes a fármacos al suministrar compuestos que se dirigen a la replicación de PrP^{Sc}; tropismo diferente *in vitro* de las distintas cepas, haciendo que los fármacos sean eficaces únicamente para cepas determinadas (35–37).

2.5 Uso de células madre en enfermedades neurodegenerativas

Los enfoques terapéuticos mencionados en el apartado anterior no se dirigen al daño cerebral, que ya ha ocurrido antes de la aparición de los síntomas clínicos. Por ello, la técnica que se presenta como una buena candidata terapéutica en el campo de las enfermedades neurodegenerativas, incluidas las enfermedades priónicas y prion-like, es el empleo de las células madre. Se sabe que las células madre embrionarias y los precursores neurales migran hacia sitios de daño cerebral y pueden diferenciarse en tipos de células neuronales específicos. La gran ventaja de las células madre es que se pueden derivar a una cantidad casi ilimitada de células a partir de una o pocas células (38). Aunque estas terapias aún se encuentran en la fase experimental de desarrollo, existe la esperanza de que puedan atenuar los síntomas neurodegenerativos de estas enfermedades (36,39). Además, a diferencia de los tratamientos basados en fármacos, las terapias que emplean células vivas tienen la ventaja de responder dinámicamente a un entorno que cambia en el tiempo, en lugar de centrarse en una única forma de acción (40).

La medicina regenerativa ha surgido como una opción prometedora para el tratamiento de enfermedades neurológicas mediante el uso de diferentes tipos de células: células madre neurales (NSC) derivadas de células madre pluripotentes, células madre embrionarias (ESC) o células madre pluripotentes inducidas (iPSC); células madre neurales fetales (fNSC); células precursoras neuronales (NPC); células madre mesenquimales (MSC).

Además del uso en la medicina regenerativa, las células madre se emplean también como modelo *in vitro* de las enfermedades priónicas y prion-like para el desarrollo de nuevas terapias, evaluación de compuestos farmacéuticos, estudios de mecanismos patogénicos e infectividad, etc.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las enfermedades priónicas aún a día de hoy siguen siendo un misterio, pues es la primera vez que se observa una proteína infecciosa. Además, tanto el mecanismo de patogenicidad como las funciones de la propia proteína prion celular siguen siendo desconocidas, y debido a que estas enfermedades son de progreso rápido, una vez aparecidos los síntomas, y mortales, existe una necesidad urgente y no satisfecha de desarrollar terapias que permitan frenar la propagación del prion.

El objetivo de este trabajo es la realización de una revisión bibliográfica sobre el uso de diversos tipos de células madre en el estudio de los mecanismos moleculares y tratamiento de las enfermedades priónicas, incluyendo potenciales aplicaciones basadas en su uso en otras enfermedades neurodegenerativas prion-like.

4. METODOLOGÍA

Para llevar a cabo esta revisión bibliográfica se ha procedido a la búsqueda de información en diversos artículos encontrados en las siguientes bases de datos:

- **Pubmed** (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>): motor de búsqueda de libre acceso que permite consultar principal y mayoritariamente los contenidos de la base de datos de Medline, aunque también una variedad de revistas científicas de similar calidad pero que no son parte de Medline. A través de este buscador es posible acceder a referencias bibliográficas y resúmenes de estos artículos de investigación biomédica.
- **Google académico** (<https://scholar.google.com/>): es un buscador de Google enfocado y especializado en la búsqueda de contenido y bibliografía científico-académica. El sitio indexa editoriales, bibliotecas, repositorios, bases de datos bibliográficas, entre otros. Entre sus resultados se pueden encontrar citas, enlaces a libros, artículos de revistas científicas, comunicaciones y congresos, informes científico-técnicos, tesis, tesinas y archivos depositados en repositorios.
- **Web of Science** facilitada por la biblioteca de la Universidad de Zaragoza ([Acceso a Web of Science | Biblioteca de la Universidad de Zaragoza \(unizar.es\)](https://www.unizar.es/biblioteca/)): recoge las referencias de las principales publicaciones científicas de cualquier disciplina del conocimiento, tanto científico como tecnológico, humanístico y sociológicos desde 1945.
- **ClinicalTrials.gov**: es un registro de ensayos clínicos, dirigido por la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos (NLM) en los Institutos Nacionales de Salud, y es la base de datos de ensayos clínicos más grande.

Además de las bases de datos, también se ha consultado el capítulo 32: “*Enfermedades del sistema nervioso por priones*” del libro titulado **Neurología** publicado por la editorial Elsevier.

4.1 Estrategia de búsqueda

La estrategia de búsqueda se ha basado en la selección de los artículos más representativos de los temas tratados en este trabajo, para lo cual ha sido fundamental las palabras claves de la búsqueda.

No obstante, incluso empleando unas palabras claves de búsqueda muy específicas, el número de artículos encontrados ha sido bastante alto y la búsqueda, a veces, poco refinada, pues a menudo se ha encontrado en estas bases de datos artículos cuyo matiz difería un poco de lo que se estaba buscando. Para resolver estos problemas, se ha ideado un criterio de exclusión, que se explica en el siguiente apartado.

Otra estrategia de búsqueda que se ha empleado ha sido la propia bibliografía referenciada en los artículos leídos, pues a veces la cita quedaba corta para el perfecto entendimiento del artículo o se consideraba que el tema tratado en dicha bibliografía era de interés para la elaboración de esta revisión.

Por último, dado que el idioma universal de la ciencia es el inglés, todas las búsquedas se han efectuado en dicho idioma. De este modo, se ha tenido acceso a artículos de grupos de investigación de muchos países y no se ha limitado sólo a España. Lo único que se ha consultado en español ha sido el libro de neurología mencionado anteriormente.

4.2 Criterio de exclusión

Con el propósito de restringir los resultados obtenidos en las bases de datos y de que este trabajo sea una revisión que contenga una información lo más actualizada posible del tema tratado se ha acotado la fecha de publicación de estos artículos a los últimos diez años. No obstante, algunos artículos, son del 2010, de hace once años, pues cuando se empezó a realizar la búsqueda bibliográfica acababa de comenzar el año, y apenas se habían publicado artículos. Se ha empleado este intervalo de tiempo porque se ha estimado adecuado para considerarse una información actual. Sin embargo, si se encontraban muchos artículos con esa acotación, se ha limitado a los últimos cinco años. Esto se ha podido hacer sobre todo con la búsqueda de información referente a las enfermedades priónicas, pero no con lo referente al empleo de las células madre en el estudio y terapia de dichas enfermedades, puesto que hay poca bibliografía al respecto, cuyo período se ha extendido hasta 15 años en algún caso.

Además de la fecha de publicación, otro factor clave para la exclusión ha sido el título, pues como se ha comentado con anterioridad las palabras claves no eran suficientes para refinar la búsqueda. Por ejemplo, cuando se ha efectuado la búsqueda “*stem cells and prion diseases*” sólo unos pocos artículos trataban ambos temas, a menudo, los artículos obtenidos trataban las enfermedades priónicas y otras sobre las células madre, y, sobre todo, el empleo de éstas en estudio o tratamiento de enfermedades distintas de

las priónicas, como isquemias, enfermedades intestinales, etc. Para resolver esto, Pubmed ofrece la posibilidad de refinar la búsqueda en la ventana “*search details*” que aparece en el lado derecho de la página. En dicha ventana se muestran los operadores booleanos, por lo tanto, si se quiere obtener información que contenga sólo lo referente al uso de células madre en las enfermedades priónicas, hay que introducir el operador booleano “AND”. En esta misma ventana, también se puede acotar más los artículos, buscando únicamente los artículos incluidos en los términos MeSH (Medical Subject Heading), que son palabras definidas por los documentalistas de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos (NLM) para catalogar y facilitar la búsqueda de información médica.

En el caso de Google Académico, además de acotar la fecha y del título, si se tenía que elegir un artículo frente a otro se hacía mediante el número de veces que se han citado dichos artículos, ya que esta base de datos ofrece esa información y se ha considerado que cuantas más veces se han citado mayor será la calidad de los mismos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Revisión bibliográfica

Para la búsqueda de información para la realización de la introducción se han empleado fundamentalmente cuatro palabras clave: “*prion diseases*”, “*prion protein*”, “*Conversion PrP^C to PrP^{Sc}*” y “*Prion-like diseases*”. Con estos términos aparecen miles de artículos, incluso acotando el período de publicación. Para elegir los artículos se han empleado los criterios de exclusión mencionados en el apartado anterior. Por ejemplo, para la búsqueda “*prion diseases*” en Pubmed con el filtro de 10 años se obtienen 20.629 artículos, un número considerablemente grande. Por ello, intentando reducir el número de artículos se acotó la fecha a los últimos 5 años, aun así, el número obtenido seguía siendo elevado (12.210). Por tanto, se decidió buscar sólo los artículos que aparecieran en el término MeSH (“*prion diseases*”[MeSH Terms]), obteniéndose con el filtro de 10 años 1.572 artículos y con el de 5 años 671 artículos. Este último número fue considerado como más apropiado.

Por otro lado, para la búsqueda de la información referente a las células madre y a su uso para el estudio y la terapia en las enfermedades priónicas se han empleado los siguientes términos: “*stem cells*”, “*stem cells and prion diseases*” y “*stem cells and prion diseases therapy*”. Aquí también surgía el mismo problema, un número muy grande de artículos, pero además aparecían muchos artículos sobre células madre que no tenían nada que ver con las enfermedades priónicas. Por ello, ha sido fundamental el uso del operador booleano AND. Con “*stem cells*”[MeSH Terms] AND “*prion diseases*”[MeSH Terms] se obtuvieron solo 20 resultados y con el filtro de 10 años, tan sólo 11 resultados. Con (“*stem cells*”[MeSH Terms] AND (“*prions*”[MeSH Terms]) AND (“*therapy*”[Subheading] OR “*therapy*”[All Fields] OR “*therapeutics*”[MeSH Terms] OR “*therapeutics*”[All Fields]) se obtuvieron 30 artículos en los últimos diez años. Por último, dado que con las búsquedas anteriores no se encontraron artículos referentes a ensayos preclínicos de fármacos, se hizo una búsqueda más específica, con (“*prion*

diseases"[MeSH Terms] AND "drug evaluation, preclinical"[MeSH Terms] AND "stem cells"[MeSH Terms]), obteniéndose tan solo un artículo.

De este modo, se escogieron unos 128 artículos, que se consideraron los más específicos del tema tratado en base al título y de estos fueron empleados finalmente. 62, de los cuales 30 han sido para la introducción, 5 para las características y clasificación de las células madre, y finalmente, 31 para el apartado "el uso de las células madre en el estudio y la terapia de las enfermedades priónicas", de los cuales, dos se habían empleado previamente para la introducción y otros dos para la clasificación de las células madre. Los otros 65 artículos se excluyeron por no resultar finalmente tan específicos, sobre todo en el tema de las células madre.

Hay mucha investigación en torno a las enfermedades priónicas, sobre todo en la proteína prion y su conversión en un agente patogénico y su mecanismo de transmisión. Por ello, se encuentran muchos artículos al respecto, haciendo difícil la acotación y selección de los artículos.

Por el contrario, con el tema de las células madre, más concretamente, el uso de las células madre en el estudio y la terapia de las enfermedades priónicas resulta más difícil encontrar bibliografía, pues como ya se ha mencionado sólo se encontraron 11 o 30 artículos que integraran los dos conceptos, aunque no todos explicaban el mecanismo de acción de la terapéutica o no era exactamente lo que se buscaba. Por ello, puesto que no hay muchos artículos relacionados con este tema en priones, algunos artículos que trataban de células madre en enfermedades *prion-like*, para las cuales hay mucha investigación vigente, también fueron tomados en cuenta dado que comparten características comunes con las enfermedades priónicas.

A continuación, se presenta la revisión realizada sobre el tema.

5.1.1 Células madre

Las células madre son una población de células no especializadas, presentes tanto en embriones como en células adultas, con la capacidad de autorrenovarse y dar lugar a múltiples tipos celulares. Existen varios niveles de especialización, reduciéndose en cada paso el potencial de diferenciación. El nicho de células madre está formado por una población celular heterogénea, matriz extracelular y diferentes factores solubles, que en conjunto proporcionan un microambiente adecuado (40–42).

Las células madre se pueden clasificar según su capacidad de diferenciación en: **Células madre totipotentes**, que pueden generar todos los tipos celulares del organismo, tanto los tejidos embrionarios como los extraembrionarios, por ejemplo un cigoto(40,41); **Células madre pluripotentes**, que pueden diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales dando lugar a las células del organismo adulto, pero no en estructuras extraembrionarias (placenta), por ejemplo las células madre embrionarias (ESC) y las células madre pluripotentes (iPSC) (40,41); **Células madre multipotentes**, que pueden dar lugar a todas las células derivadas de un linaje específico, por ejemplo las células madre hematopoyéticas y las mesenquimales (MSC) (2,40,41); **Células madre oligopotente**, cuya habilidad de diferenciación se restringe a un linaje específico, por ejemplo, una célula madre mielóide (41); **Células madre unipotentes**, caracterizadas por tener una capacidad de diferenciación más estrecha (solo en un tipo celular) y la propiedad especial de dividirse repetidamente. Esta última característica las

convierte en un candidato prometedor para el uso terapéutico en la medicina regenerativa, por ejemplo, las células madre de la piel (40,41).

Otra forma de clasificar las células madre es en base a la fuente de origen. De este modo distinguimos las siguientes: **Células madre embrionarias** (ESC), células pluripotentes que se obtiene de la masa interna embrionaria en la etapa de blastocito, y tienen la capacidad de diferenciarse en todos los tipos de tejidos. Su uso implica un alto riesgo de tumorigenicidad y genera una gran controversia ética para su uso en humanos(40,42,43); **Células madre fetales** (FSC), células que no son plenamente pluripotentes ni multipotentes, presentando una menor capacidad de división que las ESC y una mayor cinética de crecimiento, menor tamaño, telomerasa activa y mayor plasticidad que las células madre adultas (ASC), además de que no presentan tumorigenicidad (40,44); **Células madre perinatales** (PSC), células multipotentes que provienen de tejidos extraembrionarios perinatales, comparten propiedades con las ESC y las ASC (40), **Células madre adultas** (ASC), células multipotentes presentes en la mayoría de los tejidos adultos involucradas en la regeneración tisular(40); **Células madre pluripotentes inducidas** (iPSC), células pluripotentes que se generan a partir de células somáticas adultas mediante reprogramación (40).

El desarrollo de las iPSC supone un gran descubrimiento, ya que muestra, por primera vez, que las células diferenciadas todavía retienen la memoria genética importante para el desarrollo de un organismo y que los ovocitos contienen factores que pueden reprogramar los núcleos de las células maduras. Se ha planteado la hipótesis de que los factores que desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la identidad de las ESC también lo hacen en la inducción de la pluripotencia en las células somáticas. De esta forma, la expresión ectópica de factores de transcripción celular mediante la transducción de vectores retrovirales en fibroblastos de ratón es suficiente para revertir una célula somática en un estado similar al pluripotente (43). Recientemente, se han descrito organoides y astrocitos cerebrales humanos derivados de iPSC (45). Los organoides son particularmente útiles debido a su parecido con la organización celular endógena y la estructura de órganos, además, permiten la posibilidad de estudiar las interacciones célula-célula en un contexto celular que imita la fisiología y el desarrollo humanos, lo que permite moldear aspectos de la neurodegeneración característicos de las diversas enfermedades neurodegenerativas permiten su estudio y la posibilidad de un cribado farmacológico y de trasplante de células. Además, pueden sobrevivir en cultivo durante muchos meses, incluso años (39,46,47).

Una gran cantidad de estudios han revelado que el sistema CRISPR / Cas9 se puede utilizar para reprogramar células somáticas en iPSC y para modificar células pluripotentes genéticamente. Además, varios informes científicos confirman que la edición del genoma CRISPR / Cas9 y las iPSC humanas son dos herramientas impactantes para el modelado *in vitro* de enfermedades humanas (43).

5.1.2 Uso de las células madre como modelo *in vitro* de enfermedades priónicas

Los sistemas de cultivo celular en las enfermedades priónicas son herramientas útiles para el estudio de los mecanismos patogénicos, entre ellos la propagación de proteínas prion, y para la identificación de nuevas terapias. Sin embargo, solo unas pocas líneas celulares pueden infectarse y mostrar acumulación de PrP^{Sc}. Los modelos *in vitro* procedentes de hospedadores naturales serían herramientas muy útiles para la

investigación de muchos aspectos de estas enfermedades, por ejemplo, replicación de priones, toxicidad, susceptibilidad genética, diferencias en la susceptibilidad de cepas, mecanismos tempranos de infección y pruebas de nuevos tratamientos (36,43,45).

- **Células madre embrionarias (ESC)**

La mayoría de los estudios que relacionan las ESC con los priones hacen referencia al papel de la proteína prion en la diferenciación de las ESC. Un ejemplo de ello es el estudio llevado a cabo por Lee y colaboradores en el que se muestra que la expresión ectópica de PrP^C en células madre humanas (hESC) desencadena la diferenciación hacia los linajes endodérmicos, mesodérmico y ectodérmico, mientras que el silenciamiento de esta proteína suprime únicamente la diferenciación hacia linajes ectodérmicos. Este mismo grupo de investigación ha diseñado recientemente un estudio para probar si PrP^C controla la diferenciación de hESC en células de linajes comprometidos con neuronas, oligodendrocitos y astrocitos. Para ello, PrP^C fue silenciada en hESC cultivadas bajo condiciones que inducen la diferenciación de las mismas en los linajes mencionados anteriormente. Los resultados muestran que este silenciamiento suprime la diferenciación hacia los tres linajes. Además, el cambio de expresión de PrP^C durante un curso de tiempo de diferenciación reveló que silenciar la expresión de PrP^C durante la etapa inicial que corresponde a los cuerpos embrionarios tiene un impacto más significativo que silenciar en etapas posteriores de diferenciación(48).

- **Células madre neuronales (NSC)**

Milhavet y colaboradores han demostrado que las NSC diferenciadas pueden propagar priones. Las NSC suponen una ventaja para usarlas como modelo *in vitro*, ya que pueden replicarse fácilmente hasta 10 pases, manteniendo su potencial de diferenciación e infección, lo que permite la acumulación de importantes reservas de células congeladas. Además, las condiciones de cultivo y la diferenciación se pueden modular mediante una combinación de varios factores de crecimiento y/o modificación del medio de cultivo. El modelo NSC permite el estudio *ex vivo* de la orientación neuronal de priones y el papel preciso de los astrocitos, discriminar diferentes cepas de priones en cultivo, especialmente importante en CJD, detectar enfoques terapéuticos y estudiar la función de PrP^C y la toxicidad de PrP^{Sc} (49).

Recientemente Ezpeleta y colaboradores observaron casos de pacientes con CJD y GSS que presentan placas de beta amiloide (A β), lo que sugiere que PrP^{Sc} estimula la producción y la deposición de péptidos A β . Vieron que los péptidos A β inducidos por priones no afectan la replicación ni la infectividad de los priones, pero muestran propiedades prion-like, ya que pueden depositarse en el cerebro del ratón cuando los trímeros A β se co-transmiten con PrP^{Sc}, acelerando, además, la muerte de los ratones infectados con priones. Para llegar a esta conclusión, se emplearon NSC reprimidas de forma estable para la proteína precursora amiloidea (APP) y se infectaron crónicamente con una cepa de prion. Así se observó que los monómeros, trímeros y tetrámeros de A β ya no eran detectables tanto en el medio de cultivo como en los lisados celulares en comparación con las células infectadas donde no se silenciaron la APP. También se midió a 160 dpi, cuando los ratones infectados con priones comienzan a desarrollar signos clínicos, los productos del procesamiento β de APP, observándose un aumento muy similar de A β en ratones infectados con priones libres de APP y con APP, en

comparación con los ratones no infectados. Dado que no se evidenció ningún cambio en la infectividad de priones entre los inóculos de PrP^{Sc} libres de A β o con A β se concluyó que la infección por priones es suficiente para promover la acumulación de A β , independientemente de la presencia de cualquier especie de A β en el inóculo (50).

- **Células madre mesenquimales (MSC)**

Son células con morfología similar al fibroblasto caracterizadas por su capacidad tanto de autorrenovación como de diferenciación en los tejidos mesodérmicos (osteoblastos, adipocitos, condrocitos y miocitos). Se ha observado que las MSC derivadas de la médula ósea y la sangre periférica son capaces de transdiferenciarse en células de tipo neuronal y expresar PrP^C al menos a nivel trascricional. Además, estas células parecen ser capaces de infectarse con priones. Este hecho junto con la expresión de PrP^C hace que estas células sean buenas candidatas para desarrollar sistemas *in vitro* para el estudio de la infectividad y multiplicación de priones. Por otro lado, durante su proceso de diferenciación neurogénica, la expresión de PrP^C aumenta a medida que PrP^C participa en la neuritogénesis. Este aumento también podría facilitar la infección de estas células para desarrollar modelos *in vitro* para la replicación de priones. Además, las diferencias entre cultivos que albergan el mismo genotipo *PRNP* podrían ayudar en la identificación de otros factores relacionados con la susceptibilidad a los priones (36,40,45).

Las células del estroma de la médula ósea no necesitan diferenciarse en células neurales para multiplicar priones. Un estudio llevado a cabo por Takakura y colaboradores demostró la presencia de PrP^{Sc} en MSC derivadas de la médula ósea obtenidas de pacientes con CJD, y se propuso como un método alternativo para el diagnóstico (36).

- **Células madre pluripotentes inducidas (iPSC)**

El potencial de estas células tanto en la investigación básica como en la clínica se incrementó cuando un estudio identificó los cuatro factores de transcripción (c-Myc, Klf4, Sox2 y Oct3/4) esenciales para inducir la pluripotencia en las células somáticas de ratones adultos. Posteriormente, se descubrió que este fenómeno también tenía lugar en las células humanas. Este descubrimiento ha permitido la diferenciación de varios tipos de células, incluidas células del SNC como astrocitos, neuronas, oligodendrocitos y microglía. El uso de estas células está emergiendo como una herramienta invaluable en la investigación de priones debido a su capacidad para mantener la pluripotencia en cultivo celular(51). Los genotipos de los cultivos resultantes no tienen por qué limitarse a los animales transgénicos disponibles, permitiendo que la relación entre la infección por priones y los antecedentes genéticos se pueda investigar a una escala mucho mayor. Además, las iPSC permiten el estudio de la infección y propagación por priones en cultivos humanos primarios, lo que por razones éticas antes era inviable (39).

También ha sido posible generar cultivos derivados de iPSC a partir de pacientes con mutaciones específicas del gen *PRNP*, que se sabe que provocan enfermedad priónica familiar. Tales cultivos también abren la posibilidad de un cribado de fármacos personalizado para pacientes individuales (39).

Un trabajo reciente realizado por Groveman y colaboradores ha investigado el uso de organoides derivados de iPSC para reproducir la infección y la patogénesis por priones

humanos. En este trabajo inocularon organoides con dos subtipos de priones esporádicos de CJD. Con este estudio se mostró por primera vez que los organoides cerebrales pueden modelar aspectos de la enfermedad priónica humana, y, por tanto, ofrecer una herramienta poderosa para investigar diferentes subtipos y probar distintas terapias. Sin embargo, presentan ciertas limitaciones tales como que son muy heterogéneos, no están vascularizados y pueden carecer de células cerebrales no derivadas de neuronas, como células epiteliales y la microglía (46).

- **Células madre como modelo *in vitro* de enfermedades prion-like**

Debido a que los trabajos en priones son limitados, se incluyen a continuación estudios que emplean las iPSC como modelo *in vitro* de las enfermedades prion-like, ya que, como se viene diciendo, comparten características comunes con las enfermedades priónicas.

La viabilidad y utilidad de los modelos iPSC para estudiar proteínas prion-like se ha demostrado en estudios que evalúan los perfiles de toxicidad específicos de diferentes grupos de A β derivados de cerebros de pacientes de control o con Alzheimer, así como la agregación espontánea de tau que alberga enfermedades asociadas a las mutaciones P301L y V337M. Además, las iPSC pueden imitar múltiples características patológicas, como la vulnerabilidad selectiva de subpoblaciones neuronales, disfunción mitocondrial o deterioro de las vías de degradación de proteínas. Modelar enfermedades neurodegenerativas con estas células es un enfoque poderoso que ofrece un sistema basado en humanos para dilucidar los mecanismos de aparición y progresión de la enfermedad (51).

Hasta la fecha, se han estudiado muchas enfermedades utilizando un solo tipo de célula, por ejemplo, las neuronas derivadas de iPSC se han utilizado para modelar la enfermedad de Alzheimer y la de Parkinson. Sin embargo, puede ser necesario más de un tipo de célula para modelar eficazmente el fenotipo de algunas enfermedades. El cocultivo de más de un tipo de células sería útil para estudiar la interacción de diferentes tipos de células, permitiendo, así, la investigación de aspectos no autónomos de la patología de la enfermedad (47).

Numerosos estudios relacionados con la propagación de proteínas se han centrado en caracterizar la liberación, la absorción posterior y la respuesta de las células a las proteínas patógenas. Los estudios que evalúan la liberación de proteínas de las iPSC se han centrado en gran medida en tau y solo un estudio abordó el A β . Estos estudios, para los cuales se emplearon líneas inmortalizadas derivadas de iPSC, tanto del cerebro de un paciente con AD como uno sano, indican que la liberación de las proteínas no es específica de los procesos patógenos, sino un mecanismo fisiológico, pues en ambos tipos de neuronas se liberan formas solubles y agregadas de la proteína. No obstante, la forma de la proteína liberada puede verse influida por mutaciones que causan la enfermedad, por ejemplo, una mutación en el gen de la presenilina 1 (*PSEN1*) se asoció con un cambio en las longitudes de los fragmentos de tau liberados en el medio. La biología de la absorción de tau también ha sido un foco de investigación. En particular, se ha informado de que las formas nativas y mal plegadas de tau se internalizan a niveles similares que en las neuronas corticales control, aunque existen algunas diferencias en la maquinaria celular implicada en la captación (51).

5.1.3 Uso de células madre en la terapia de las enfermedades priónicas

La terapia con células madre es el enfoque principal de la medicina regenerativa, cuyos objetivos principales son el reemplazo de células y tejidos disfuncionales o muertos con células que funcionan fisiológicamente, la prevención de más daños, la modificación del microambiente del tejido, el uso de su actividad antiinflamatoria e inmunosupresora, y la activación de la autorrenovación y mecanismos reparadores. Aunque los estudios preclínicos han demostrado resultados alentadores, la traducción de las terapias con células madre a la clínica y el éxito de los ensayos clínicos se ven todavía limitados (34,52,53).

Por otro lado, los avances científicos en la biología de las células madre y la neurogénesis en adultos han generado la esperanza de que los trastornos neurodegenerativos puedan beneficiarse de la terapia basada en células madre, debido a su enorme potencial en la regeneración y reparación de tejido (54).

Un estudio llevado a cabo por Relañó-Ginés y colaboradores sugiere que existe una ventana de tiempo en la que el tratamiento podría ser más eficaz, lo que pone de manifiesto que es muy importante hacer un diagnóstico temprano de las enfermedades priónicas (11).

Por otra parte, en la preparación del injerto celular hay que prestar atención a la tumorigénesis, especialmente con el uso de ESC e iPSC, realizando pruebas genéticas y cribado *in vivo*. También es importante la procedencia de la célula, teniendo mejor compatibilidad inmunológica si es del propio paciente, aunque habrá que corregir los defectos genéticos para evitar la neurodegeneración. Es necesario también la mejora del microambiente, pues se ha visto que el microambiente alrededor del sitio de injerto afecta negativamente al injerto (55).

- **Células madre embrionarias (ESC)**

Las células madre embrionarias de ratón pueden diferenciarse eficazmente en precursores neurales *in vitro* que pueden generar neuronas funcionales, astrocitos y oligodendrocitos. Se ha demostrado que las células madre neurales derivadas de ESC de ratón sobreviven, se integran y, en cierta medida, funcionan después del trasplante dentro del tejido huésped de roedores apropiado. La investigación sobre células madre embrionarias humanas también ha comenzado en varios países donde se ha demostrado que integran de manera estable el cerebro de los roedores después de la diferenciación. Se ha avanzado en tres procesos fundamentales del desarrollo: control del ciclo celular; control del destino celular; y primeros pasos en la diferenciación neuronal. No obstante, queda trabajo por hacer en el campo del crecimiento, particularmente en lo que respecta a la manipulación genética y la diferenciación para demostrar sus posibles beneficios terapéuticos a largo plazo tras el injerto en tejidos dañados en humanos (56).

- **Células madre neuronales (NSC)**

Es sabido claramente que una gran cantidad de nuevas neuronas se pueden generar a partir de NSC adultas e integrarse en circuitos neuronales preexistentes. Además, también se ha visto que la replicación de los priones tiene lugar en las NSC de la capa subgranular (SGL) de la circunvolución dentada del hipocampo, lugar clave para la

neurogénesis adulta. La existencia generalizada de progenitores neurales endógenos representa una nueva vía terapéutica para la medicina regenerativa para los trastornos neurodegenerativos, ya sea a través de NSC trasplantadas o manipulando las existentes. De hecho, se ha sugerido que la neurogénesis adulta es una “reserva neurogénica” (49,54,57). El papel de la neurogénesis en la neurodegeneración asociada a las enfermedades priónicas y prion-like no está aclarada, y los datos de diferentes sistemas de modelos a veces entran en conflicto. Aunque la neurogénesis adulta podría ser útil para el sistema nervioso a través de la regeneración, se ha observado que ésta también puede verse alterada por la acumulación de las proteínas priónicas mal plegadas. Por tanto, su inhibición permitiría que la neurogénesis endógena compensara el sistema neuronal lesionado, que se podría lograr mediante la ingeniería genética utilizando vectores virales que expresen moléculas antiprion bien caracterizadas, como anticuerpos de fragmentos variables de cadena única anti-PrP (scFv), mutantes de PrP negativos dominantes, iRNA, etc. Además, comprender la modulación endógena de las células madre neurales y el sistema de neurogénesis podría ayudar a desarrollar enfoques terapéuticos basados en células madre en cualquiera de las enfermedades neurodegenerativas (38,57).

El primer estudio sobre el uso de NSC en enfermedades priónicas evaluó el efecto del trasplante de NSC fetales (fNSC) derivadas de embriones de ratón knockout resistentes a priones (koPrP) en el hipocampo de ratones wild-type (wt) asintomáticos infectados de Sprapie a los 150 días después de la inoculación. Se observó un aumento en el número de neuronas funcionales en la capa de células piramidales de aproximadamente 1,5 veces el día 21 después del injerto (dpi) y en el punto final (250 dpi), sin embargo, no se consiguió modificar los tiempos de incubación y supervivencia. Más recientemente, utilizando también fNSC de ratón, se observó que el injerto de NSC podría prolongar significativamente la incubación (en un 20%) y tiempos de supervivencia (en un 13%) en ratones wt infectados con priones. Este efecto sólo se producía si las fNSC se injertaban antes de la aparición de los signos clínicos, lo que sugiere la existencia de una ventana de tiempo específica para el éxito del tratamiento. Además, el mayor tiempo de incubación se correlacionó con una reducción del número de astrocitos en las áreas cercanas al injerto, lo que significa que el trasplante de células por sí solo podría desempeñar un papel clave en el proceso inflamatorio, probablemente a través de la secreción de factores tróficos por parte de las fNSC (38).

Recientemente, Frid y colaboradores describieron una terapia basada en células precursoras neuronales fetales (fNPC) que imitan una mutación responsable de una CJD genética. Se observó que tanto las fNPC provenientes de ratones transgénicos (Tg) como las de ratones wt prolongaban el tiempo de incubación de la enfermedad en un 35% y que el número de NSC endógeno aumentaba en el cerebro de los animales injertados, sugiriendo un efecto proneurogénico. La acumulación de PrP^{Sc} no fue evaluada en las células injertadas, pero se mostró la ausencia de acumulación en NSC endógenas en ratones transgénicos y la falta de transmisión de priones cuando se injertaron TgCJD NSC en el cerebro de ratones wt (38).

Existe una delección en la cola N-terminal de la proteína prion denominada Δ CR, en la que falta un bloque altamente conservado de 21 aminoácidos (residuos 105-125) que resulta la más neurotóxica y produce un fenotipo letal neonatal en ratones transgénicos. Massignan y colaboradores hicieron la sorprendente observación de que la expresión

de Δ CR PrP hace que una variedad de líneas celulares transformadas, así como células madre neuronales diferenciadas derivadas de ratones transgénicos, sean sensibles a los efectos letales de dos clases de fármacos estructural y mecánicamente distintas: antibióticos aminoglucósidos (que incluyen G418 e higromicina) y agentes quimioterapéuticos que escinden el DNA (que incluyen fleomicina (zeocina) y bleomicina). Es importante destacar que wt PrP no posee esta actividad y, de hecho, es capaz de suprimir el efecto de sensibilización al fármaco de Δ CR PrP cuando las dos proteínas se expresan juntas. El efecto sensibilizador de fármacos de Δ CR PrP se observa en células madre neurales diferenciadas derivadas de ratones Tg(Δ CR), cuyos cultivos incluyen neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Este resultado demuestra que el efecto del fármaco es operativo en los mismos tipos de células que muestran cambios patológicos *in vivo* y no es específico de las líneas celulares transformadas (58).

- **Células madre mesenquimales (MSC)**

Entre todos los tipos de células madre, las MSC son numéricamente el tipo de célula más utilizado en entornos preclínicos y clínicos. Se consideran el tipo de célula ideal para el trasplante. Esto puede deberse a sus propiedades pleiotrópicas tales como actividades antiapoptóticas, antifibróticas, antiinflamatorias y angiogénicas, producción de factores de crecimiento y modulación del sistema inmunológico además de su capacidad de diferenciación a varios linajes celulares, su accesibilidad y la facilidad con la que se propagan *in vitro*. Sus capacidades inmunes privilegiadas también hacen que las MSC sean una fuente ideal para las aplicaciones alogénicas. Además, presentan ciertas ventajas, como la ausencia de formación de teratomas, por derivar de células adultas y la capacidad de migrar hacia los focos inflamatorios a través de la expresión de receptores de quimiocinas, aunque se espera que los mecanismos de migración difieran con los microambientes tisulares inducidos por la enfermedad (30,36,40,52).

Las MSC migran a lesiones neuropatológicas de enfermedades neurodegenerativas como respuesta a la secreción de factores tróficos, que activan reacciones restauradoras endógenas en el cerebro lesionado, recuperando la función de los tejidos dañados, la diferenciación neuronal o fusión celular y la estimulación de la proliferación y diferenciación de células madre neuronales endógenas (30,45). Song y colaboradores llevaron a cabo un ensayo de migración *in vitro* para investigar los factores quimioattractivos de las MSC en los cerebros de ratones infectados por priones. Para ello, las MSC humanas inmortalizadas (hMSC) fueron pretratadas con anticuerpos contra los receptores de quimiocinas CCR3, CCR5, CXCR3 y CXCR4 y los extractos de cerebros de ratones infectados por priones se pretrataron con anticuerpos contra los ligandos correspondientes. De acuerdo con los resultados de un ensayo de migración *in vitro*, se observó que las hMSC que migraban desde el área trasplantada hacia lesiones cerebrales de ratones infectados por priones, expresaban CCR3, CCR5, CXCR3 y CXCR4. Además, las hMSC que habían migrado al hipocampo derecho de los ratones infectados por priones expresaron CCR1, CX3CR1 y CXCR4, lo que implica la participación de estos receptores de quimiocinas en las funciones de las hMSC después de la migración quimiotáctica. Una mayor elucidación de los mecanismos que subyacen a la migración de las MSC puede proporcionar información útil sobre la aplicación de las MSC al tratamiento de las enfermedades priónicas (30).

En las enfermedades priónicas, el potencial terapéutico de las MSC se estudió por primera vez utilizando hMSC que expresa el gen *LacZ*. Con el propósito de evaluar la

migración de hMSC en el cerebro, se trasplantaron estas en el tálamo de ratones wt infectados con cepas de Scrapie. Se observó que pasadas las tres semanas del trasplante las hMSCs estaban todavía presentes, no solo en el lado de la inyección sino también en el lado contra lateral y se pudo correlacionar el grado de migración con la gravedad de la enfermedad, pues en los ratones no infectados se detectó un nivel bajo de hMSC. Esto sugiere que, en ratones infectados, las MSCs injertadas se mantienen y son atraídas por las áreas dañadas del cerebro. Además, se observó que el nivel de secreción/expresión de varios factores tróficos fue mayor en los ratones infectados. Se descubrió que algunas células positivas para *LacZ* expresaban *GFAP* (marcador de astrocitos) o *MAP2* (marcador neuronal), lo que evidencia que las células injertadas pueden integrarse y diferenciarse en linajes neurales. Finalmente, también se pudo observar que la tasa de supervivencia media de los ratones infectados injertados con hMSC aumentó de forma leve pero significativa (38).

Un estudio reciente evaluó el efecto terapéutico del trasplante autólogo de BM-MS (Bone Marrow-MS) en modelos de ratón priónico, observándose un ligero, pero significativo incremento de la tasa de supervivencia y la activación de las células microgliales, como indica el aumento de la expresión del gen *Aif1* que codifica la proteína microglial IBA-1 (38).

- **Células madre pluripotentes inducidas (iPSC)**

Tras el estudio pionero de Yamanaka, varios grupos de científicos han utilizado diferentes estrategias para producir las iPSC para cumplir con los criterios de seguridad y calidad para aplicaciones terapéuticas efectivas. En este enfoque, las células somáticas de un paciente con enfermedad se aíslan y cultivan. Las células se reprograman a iPSC, a través de la transferencia de genes mediada por virus o no virus, antes de la sustitución del gen que causa la enfermedad por un gen sano. Las iPSC modificadas genéticamente se enriquecen y luego se diferencian en el subtipo de células afectadas. Luego, las células se reinfunden en el paciente (43).

En el tratamiento de las enfermedades priónicas, el potencial uso de las iPSC es el trasplante celular, que se puede realizar mediante administración intracerebral si ya han aparecido los primeros signos clínicos asociados a priones, intravenosa antes del inicio de los síntomas, e infusiones vía intravenosa en sujetos sintomáticos tempranos (59).

- **Uso de células madre para terapia de enfermedades prion-like.**

En la bibliografía no aparecen ensayos clínicos de fármacos contra priones, sin embargo, si hay evidencias de algunos en enfermedades prion-like, sobre todo empleando las iPSC, como se muestra a continuación (60).

Bright y colaboradores (61) generaron iPSC a partir de pacientes con AD esporádica o mutante presenilina-1. Al comparar las neuronas corticales derivadas de estos pacientes con AD y los controles de la misma edad, descubrieron que las neuronas derivadas de la AD secretaban una forma específica de Tau y desarrollaron un anticuerpo específico para los fragmentos de Tau. En 2017, este anticuerpo (BMS-986168) con licencia de Biogen, ingresó a los ensayos clínicos de fase II. En otro estudio, llevado a cabo por Wainger y colaboradores (62) se encontró que las neuronas motoras derivadas de iPSC de pacientes con ELA eran hiperexcitables en comparación con los controles, y la Retigabina, un fármaco aprobado para la epilepsia, podría rescatar este fenotipo de

hiperexcitabilidad en las neuronas motoras derivadas de pacientes con diferentes mutaciones asociadas a la ELA. Actualmente, Retigabine se encuentra en un ensayo clínico de fase II.

6. CONCLUSIÓN

A día de hoy todavía queda mucho trabajo y se necesita mucha más investigación para entender los mecanismos del agente infeccioso (PrP^{Sc}) y encontrar, así, un tratamiento que cure definitivamente las enfermedades priónicas. Para conseguir esto, las células madre aparecen como unas buenas candidatas, tanto por su empleo como modelos *in vitro* de enfermedades priónicas y prion-like como su uso en la medicina regenerativa.

Las células madre son buenas candidatas como modelo *in vitro* debido a su capacidad de infectarse por cepas priónicas y replicar el prion. Además, los modelos *in vitro* procedentes de hospedadores naturales son herramientas muy útiles para la investigación de muchos aspectos de estas enfermedades como, por ejemplo, replicación de priones, toxicidad, susceptibilidad genética, diferencias en la susceptibilidad de cepas, mecanismos tempranos de infección y pruebas de nuevos tratamientos. Sin embargo, para modelar mejor estas enfermedades es necesario el cocultivo de células, que integren, además de neuronas, astrocitos y células gliales. Este problema quedaría resuelto con el empleo de los organoides.

Se espera que la medicina regenerativa tenga un gran impacto médico, científico y social, ya que ofrece la posibilidad de tratar enfermedades que actualmente son incurables. En las enfermedades priónicas, solo unos pocos ensayos preclínicos han evaluado las estrategias de la medicina regenerativa, y esta escasez de estudios probablemente refleja la complejidad de tales enfermedades. Además, al estudiar las estrategias de la medicina regenerativa para las enfermedades priónicas, es necesario abordar cuestiones clave, como la fuente celular óptima, las limitaciones éticas, el sistema de administración y cómo garantizar la larga duración, la seguridad a largo plazo y la respuesta de las células del donante. Además, las terapias celulares por sí solas pueden no ser suficientes para reparar las lesiones cerebrales, por lo tanto, debería ser importante desarrollar enfoques multimodales que combinen fármacos farmacológicos, inmunomodulación, estimulación de la neurogénesis endógena y terapias genéticas, celulares o de células múltiples. Por último, para promover la innovación terapéutica, la investigación futura debe abordar el efecto de las células injertadas en los tejidos circundantes y mejorar la calidad y seguridad de las células que se van a injertar.

En el cribado farmacéutico debemos tener en cuenta que existe una ventana terapéutica a partir de la cual ya no sería efectivo el fármaco, por ello es sumamente importante que se desarrollen, paralelamente, métodos diagnósticos que permitan un diagnóstico temprano de la enfermedad.

CONCLUSION

To this day there is still a lot of work and much more research is needed to understand the mechanisms of the infectious agent (PrP^{Sc}) and thus find a treatment that will cure prion diseases definitively. To achieve this, stem cells appear as good candidates, both

for their use as *in vitro* models in prion and prion-like diseases and for their role in regenerative medicine.

Stem cells are good candidates as *in vitro* models due to their ability to become infected by prion strains and to replicate the prion. In addition, *in vitro* models derived from natural hosts are very useful tools for investigating many aspects of these diseases, for example, prion replication, toxicity, genetic susceptibility, differences in strain susceptibility, early mechanisms of infection, and evidence of new treatments. However, to better model these diseases, it is necessary to co-culture cells, which integrate, in addition to neurons, astrocytes and glial cells. This problem would be solved with the use of organoids.

Regarding regenerative medicine, it is expected to have a great medical, scientific and social impact, since it offers the possibility of treating diseases that are currently incurable. In prion diseases, only a few preclinical trials have evaluated regenerative medicine strategies, and this paucity of studies probably reflects the complexity of such diseases. In addition, when studying regenerative medicine strategies for prion diseases, several key questions need to be addressed, such as the optimal cell source, ethical limitations, the best delivery system, and how to ensure long-lasting, long-term safety and the response of the donor cells. Furthermore, it is clear that cell therapies alone may not be sufficient to repair brain injuries, therefore, it should be important to develop multimodal approaches that combine pharmacological drugs, immunomodulation, stimulation of endogenous neurogenesis, and gene, cellular, or multi-cell therapies. Finally, to promote therapeutic innovation, future research must address the effect of grafted cells on surrounding tissues and improve the quality and safety of the cells to be grafted.

In pharmaceutical screening, we must bear in mind that there is a therapeutic window from which the drug would no longer be effective, which is why it is extremely important that diagnostic methods are developed in parallel that allow an early diagnosis of the disease.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brown K, Mastrianni JA. The Prion Diseases. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 1 de diciembre de 2010;23(4):277-98.
2. Krance SH, Luke R, Shenouda M, Israwi AR, Colpitts SJ, Darwish L, et al. Cellular models for discovering prion disease therapeutics: Progress and challenges. *J Neurochem.* 2020;153(2):150-72.
3. Kim M-O, Takada LT, Wong K, Forner SA, Geschwind MD. Genetic PrP Prion Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* mayo de 2018;10(5):a033134.
4. Le NTT, Wu B, Harris DA. Prion neurotoxicity. *Brain Pathol Zurich Switz.* marzo de 2019;29(2):263-77.
5. Atkinson CJ, Zhang K, Munn AL, Wiegman A, Wei MQ. Prion protein scrapie and the normal cellular prion protein. *Prion.* 8 de diciembre de 2015;10(1):63-82.

6. Moreno JA, Telling GC. Insights into mechanisms of transmission and pathogenesis from transgenic mouse models of prion diseases. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2017;1658:219-52.
7. Tee BL, Longoria Ibarrola EM, Geschwind MD. Prion Diseases. *Neurol Clin*. 1 de noviembre de 2018;36(4):865-97.
8. Figgie MP, Appleby BS. Clinical Use of Improved Diagnostic Testing for Detection of Prion Disease. *Viruses*. 28 de abril de 2021;13(5):789.
9. PRNP gene: MedlinePlus Genetics [Internet]. [citado 13 de abril de 2021]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/prnp/>
10. Zarranz JJ. *Neurología*. sexta edición. Elsevier; 2018.
11. Relaño-Ginés A, Lehmann S, Bencsik A, Herva ME, Torres JM, Crozet CA. Stem Cell Therapy Extends Incubation and Survival Time in Prion-Infected Mice in a Time Window-Dependant Manner. *J Infect Dis*. 1 de octubre de 2011;204(7):1038-45.
12. Scialò C, De Cecco E, Manganotti P, Legname G. Prion and Prion-Like Protein Strains: Deciphering the Molecular Basis of Heterogeneity in Neurodegeneration. *Viruses*. 14 de marzo de 2019;11(3).
13. Puoti G, Bizzi A, Forloni G, Safar JG, Tagliavini F, Gambetti P. Sporadic human prion diseases: molecular insights and diagnosis. *Lancet Neurol*. 1 de julio de 2012;11(7):618-28.
14. Wulf M-A, Senatore A, Aguzzi A. The biological function of the cellular prion protein: an update. *BMC Biol*. diciembre de 2017;15(1):34.
15. del Río JA, Ferrer I, Gavín R. Role of cellular prion protein in interneuronal amyloid transmission. *Prog Neurobiol*. 1 de junio de 2018;165-167:87-102.
16. Segarra C, Lehmann S, Coste J. Prion Protein Expression and Processing in Human Mononuclear Cells: The Impact of the Codon 129 Prion Gene Polymorphism. *PLOS ONE*. 4 de junio de 2009;4(6):e5796.
17. Legname G, Scialò C. On the role of the cellular prion protein in the uptake and signaling of pathological aggregates in neurodegenerative diseases. *Prion*. diciembre de 2020;14(1):257-70.
18. Parchi P, Saverioni D. Review paper
 Molecular pathology, classification, and diagnosis of sporadic human prion disease variants. *Folia Neuropathol*. 2012;50(1):20-45.
19. Ramljak S, Asif AR, Armstrong VW, Wrede A, Groschup MH, Buschmann A, et al. Physiological Role of the Cellular Prion Protein (PrPc): Protein Profiling Study in Two Cell Culture Systems. *J Proteome Res*. 1 de julio de 2008;7(7):2681-95.
20. Martellucci S, Santacroce C, Santilli F, Manganelli V, Sorice M, Mattei V. Prion Protein in Stem Cells: A Lipid Raft Component Involved in the Cellular Differentiation Process. *Int J Mol Sci* [Internet]. 11 de junio de 2020 [citado 17 de mayo de 2021];21(11). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7312503/>

21. Wadsworth J, Asante E, Collinge J. Review: Contribution of transgenic models to understanding human prion disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1 de septiembre de 2010;36:576-97.
22. Probing the N-Terminal β -Sheet Conversion in the Crystal Structure of the Human Prion Protein Bound to a Nanobody | *Journal of the American Chemical Society* [Internet]. [citado 18 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja407527p>
23. Halfmann R, Lindquist S. Epigenetics in the Extreme: Prions and the Inheritance of Environmentally Acquired Traits. *Science.* 29 de octubre de 2010;330(6004):629-32.
24. Colby DW, Prusiner SB. Prions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 de enero de 2011;3(1):a006833-a006833.
25. Wang F, Wang X, Yuan C-G, Ma J. Generating a Prion with Bacterially Expressed Recombinant Prion Protein. *Science.* 26 de febrero de 2010;327(5969):1132-5.
26. Allison WT, DuVal MG, Nguyen-Phuoc K, Leighton PLA. Reduced Abundance and Subverted Functions of Proteins in Prion-Like Diseases: Gained Functions Fascinate but Lost Functions Affect Aetiology. *Int J Mol Sci* [Internet]. 24 de octubre de 2017 [citado 6 de abril de 2021];18(10). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5666902/>
27. Cushman M, Johnson BS, King OD, Gitler AD, Shorter J. Prion-like disorders: blurring the divide between transmissibility and infectivity. *J Cell Sci.* 15 de abril de 2010;123(8):1191-201.
28. Iglesias V, Paladin L, Juan-Blanco T, Pallarès I, Aloy P, Tosatto SCE, et al. In silico Characterization of Human Prion-Like Proteins: Beyond Neurological Diseases. *Front Physiol* [Internet]. 27 de marzo de 2019 [citado 30 de marzo de 2021];10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6445884/>
29. Harrison AF, Shorter J. RNA-binding proteins with prion-like domains in health and disease. *Biochem J.* 7 de abril de 2017;474(8):1417-38.
30. Song C-H, Honmou O, Furuoka H, Horiuchi M. Identification of Chemoattractive Factors Involved in the Migration of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells to Brain Lesions Caused by Prions ∇ . *J Virol.* noviembre de 2011;85(21):11069-78.
31. Slanzi A, Iannoto G, Rossi B, Zenaro E, Constantin G. In vitro Models of Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 13 de mayo de 2020 [citado 17 de mayo de 2021];8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7247860/>
32. Krejciova Z, Alibhai J, Zhao C, Krencik R, Rzechorzek NM, Ullian EM, et al. Human stem cell-derived astrocytes replicate human prions in a PRNP genotype-dependent manner. *J Exp Med.* 4 de diciembre de 2017;214(12):3481-95.
33. Marandi Y, Farahi N, Sadeghi A, Sadeghi-Hashjin G. Review paper
 Prion diseases – current theories and potential therapies: a brief review. *Folia Neuropathol.* 2012;50(1):46-9.

34. Abdelaziz DH, Abdulrahman BA, Gilch S, Schatzl HM. Autophagy pathways in the treatment of prion diseases. *Curr Opin Pharmacol.* febrero de 2019;44:46-52.
35. Burke CM, Mark KMK, Kun J, Beauchemin KS, Supattapone S. Emergence of prions selectively resistant to combination drug therapy. *PLoS Pathog.* 18 de mayo de 2020;16(5):e1008581.
36. Mediano DR, Sanz-Rubio D, Ranera B, Bolea R, Martín-Burriel I. The Potential of Mesenchymal Stem Cell in Prion Research. *Zoonoses Public Health.* 2015;62(3):165-78.
37. Shikiya RA, Langenfeld KA, Eckland TE, Trinh J, Holec SAM, Mathiason CK, et al. PrPSc formation and clearance as determinants of prion tropism. *PLoS Pathog.* 29 de marzo de 2017;13(3):e1006298.
38. Relaño-Ginés A, Lehmann S, Crozet C. Cell-based therapy against prion diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 1 de febrero de 2019;44:8-14.
39. Pineau H, Sim VL. From Cell Culture to Organoids-Model Systems for Investigating Prion Strain Characteristics. *Biomolecules.* 14 de enero de 2021;11(1):106.
40. Hernández R, Jiménez-Luna C, Perales-Adán J, Perazzoli G, Melguizo C, Prados J. Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells towards Neuronal Lineage: Clinical Trials in Nervous System Disorders. *Biomol Ther.* enero de 2020;28(1):34-44.
41. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther [Internet].* 26 de febrero de 2019 [citado 9 de junio de 2021];10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6390367/>
42. Lin C-S, Xin Z-C, Deng C-H, Ning H, Lin G, Lue TF. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. :9.
43. Al Abbar A, Ngai SC, Nograles N, Alhaji SY, Abdullah S. Induced Pluripotent Stem Cells: Reprogramming Platforms and Applications in Cell Replacement Therapy. *BioResearch Open Access.* 1 de abril de 2020;9(1):121-36.
44. Spinelli V, Guillot PV, De Coppi P. Induced pluripotent stem (iPS) cells from human fetal stem cells (hFSCs). *Organogenesis.* 1 de abril de 2013;9(2):101-10.
45. García-Mendivil L, Mediano DR, Hernaiz A, Sanz-Rubio D, Vázquez FJ, Marín B, et al. Effect of Scrapie Prion Infection in Ovine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Ovine Mesenchymal Stem Cell-Derived Neurons. *Anim Open Access J MDPI.* 15 de abril de 2021;11(4):1137.
46. Groveman BR, Foliaki ST, Orru CD, Zanusso G, Carroll JA, Race B, et al. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease prion infection of human cerebral organoids. *Acta Neuropathol Commun.* 14 de junio de 2019;7:12.
47. Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov.* febrero de 2017;16(2):115-30.
48. Lee YJ, Baskakov IV. The cellular form of the prion protein guides the differentiation of human embryonic stem cells into neuron-, oligodendrocyte-, and astrocyte-committed lineages. *Prion.* 1 de noviembre de 2014;8(3):266-75.

49. Milhavel O, Casanova D, Chevallier N, McKay RDG, Lehmann S. Neural Stem Cell Model for Prion Propagation. *STEM CELLS*. 2006;24(10):2284-91.
50. Ezpeleta J, Baudouin V, Arellano-Anaya ZE, Boudet-Devaud F, Pietri M, Baudry A, et al. Production of seedable Amyloid- β peptides in model of prion diseases upon PrPSc-induced PDK1 overactivation. *Nat Commun*. 1 de agosto de 2019;10:3442.
51. de Rus Jacquet A, Denis HL, Cicchetti F, Alpaugh M. Current and future applications of induced pluripotent stem cell-based models to study pathological proteins in neurodegenerative disorders. *Mol Psychiatry* [Internet]. 25 de enero de 2021 [citado 9 de agosto de 2021]; Disponible en: <http://www.nature.com/articles/s41380-020-00999-7>
52. Öztürk S, Elçin AE, Koca A, Elçin YM. Therapeutic Applications of Stem Cells and Extracellular Vesicles in Emergency Care: Futuristic Perspectives. *Stem Cell Rev Rep*. 24 de agosto de 2020;1-21.
53. Shaker A, Rubin DC. One step closer to gut repair. *Nature*. 9 de mayo de 2012;485(7397):181-2.
54. Relaño-Ginés A, Lehmann S, Crozet C. Prion diseases and adult neurogenesis: How do prions counteract the brain's endogenous repair machinery? *Prion*. 1 de noviembre de 2014;8(3):240-6.
55. Xiao B, Ng HH, Takahashi R, Tan E-K. Induced pluripotent stem cells in Parkinson's disease: scientific and clinical challenges. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. julio de 2016;87(7):697-702.
56. A. R-G, A. G, S. L, O. M, C. C. Gene and Cell Therapy for Prion Diseases. *Infect Disord - Drug Targets*. 31 de enero de 2009;9(1):58-68.
57. Jalland CMO, Scheffler K, Benestad SL, Moldal T, Ersdal C, Gunnes G, et al. Neil3 induced neurogenesis protects against prion disease during the clinical phase. *Sci Rep*. 25 de noviembre de 2016;6:37844.
58. Massignan T, Stewart RS, Biasini E, Solomon IH, Bonetto V, Chiesa R, et al. A Novel, Drug-based, Cellular Assay for the Activity of Neurotoxic Mutants of the Prion Protein. *J Biol Chem*. 5 de marzo de 2010;285(10):7752-65.
59. PRION 2019 emerging concepts. *Prion*. 18 de mayo de 2019;13(Suppl 1):1-141.
60. Han C, Chaineau M, Chen CX-Q, Beitel LK, Durcan TM. Open Science Meets Stem Cells: A New Drug Discovery Approach for Neurodegenerative Disorders. *Front Neurosci*. 2018;12:47.
61. Human secreted tau increases amyloid-beta production | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [citado 20 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0197458014006022?token=2D209BB241CA7E59F32D727152B9B65460726A44D673FD270136DC1BC26DB9352E0E08CE93BC0BB9552F184F07889289&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210820102503>
62. Wainger BJ, Kiskinis E, Mellin C, Wiskow O, Han SSW, Sandoe J, et al. Intrinsic Membrane Hyperexcitability of Amyotrophic Lateral Sclerosis Patient-Derived Motor Neurons. *Cell Rep*. abril de 2014;7(1):1-11.