



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA HUMANA Y PSICOBIOLOGÍA

***“ESTUDIO DEL POTENCIAL NEURAL DE
LAS CÉLULAS PROGENITORAS DEL
LIGAMENTO PERIODONTAL”***

M^aCARMEN RAMÍREZ MONREAL

2012

AGRADECIMIENTOS

Después de muchos años de trabajo y esfuerzo, esta etapa llega a su fin. Ha sido un camino duro pero muy gratificante, y quiero agradecer de corazón a todas las personas que han estado a mi lado durante este tiempo, su apoyo y dedicación.

Quiero agradecer a mi director de Tesis **Salvador Martínez**, responsable principal de mi incursión en el mundo de la investigación, que me animó a explorar un mundo diferente y abrió puertas a nuevas sensaciones enriqueciendo la historia de mi vida.

A mi directora **Cecilia Garrido** que sin su apoyo incondicional este logro habría sido mucho más difícil, ofreciéndome su ayuda y consejo en todo momento, y facilitando tanto mi labor que me ha hecho sentir una privilegiada.

Y a mi director **Carlos Bueno**, un trabajador incansable, un guía en los días oscuros, un pilar fundamental en este trabajo de investigación y en mi día a día en el laboratorio, siempre dispuesto a ofrecerme su tiempo, sus ideas y sus palabras de aliento.

A mi técnico de laboratorio y amiga **Mónica Ródenas**. Contigo he compartido mi vida estos años como con nadie. Tantas horas de coche, risas,

llantos, madrugones, trabajo y emociones han dado como fruto un cariño excepcional.

A todos mis compañeros del laboratorio del Instituto de Neurociencias, por los momentos compartidos. He encontrado en ellos apoyo, ayuda, cariño, sonrisas, lealtad, compañerismo y amistad, y me considero una persona afortunada por haber tenido la oportunidad de trabajar con un grupo de personas tan humano.

Y por último quiero agradecer a mi familia su apoyo absoluto y la paciencia que han tenido conmigo durante estos años. A mi padre por alentarme a superarme cada día y no perder la ilusión por saber más, a mi madre por ser tan comprensiva y hacerme el camino más fácil, a mis hermanos por darme su cariño inconmensurable, tener la habilidad para sacarme una sonrisa en todo momento y sentirlos a mi lado pase lo que los pase.

A todos ellos, por sacar lo mejor de mí, gracias.

A mis padres y a mis hermanos

ABREVIATURAS

ABC	Avidina-biotina-peroxidasa.
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro.
BMP	Proteína morfogenética ósea.
BMSSCs	Células estromales de la médula ósea humana.
BrdU	Bromodeuxiridina.
BSA	Albúmina bovina sérica.
CD	Cluster de diferenciación.
CHAT	Acetilcolintransferasa.
CMA	Células madre de adulto.
CME	Células madre embrionarias.
CMN	Células madre neurales.
CNPasa	2',3'-nucleótido cíclico 3'- fosfodiesterasa.
CNTF	Factor neurotrófico ciliar.
DAB	Diaminobencidina.
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol.

DCX	Doblecortina.
DFSCs	Células madre del folículo dental.
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco.
DMSO	Dimetil Sulfóxido.
DNA	Ácido desoxiribonucleico.
DPSCs	Células madre de la pulpa dental.
EDTA	2',3'-nucleótido cíclico 3'- fosfodiesterasa.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
eGFP	Proteína verde fluorescente mejorada.
ERM	Restos epiteliales de Malassez.
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
GABA	Ácido γ -aminobutírico.
GAD	Ácido glutámico descarboxilasa.
GAG	Glucosaminoglicano.
GAT	Transportador de membrana plasmática GABA de alta afinidad.
GDNF	Factor neurotrófico derivado de una línea celular glial.
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial.
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico.
IPs	Células madre pluripotenciales inducidas.
LIF	Factor inhibidor de leucemia.
LPL	Lipoproteínas lipasa.
MAP1b	Proteína 1b asociada a microtúbulo.
MAP2	Proteína 2 asociada a microtúbulo.
MB	Medio Basal.
MD	Medio definido.
MEM	Medio mínimo esencial de Eagle.
MEPE	Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular.

MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad.
MSC	Célula madre mesénquimal.
MyoD	Proteína reguladora de la diferenciación miogénica.
NeuN	Proteína nuclear neural específica.
NF-M	Neurofilamento M.
NG2	Proteoglicano condroitín sulfato.
NGF	Factor de crecimiento nervioso.
Notch-1	Proteína presente en células madre embrionarias.
OCT 3/4	Factor de transcripción expresado en CME.
p75-NGFR	Receptor de baja afinidad del factor de crecimiento nervioso NGF.
PBS	Tampón fosfato.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
PDL	Ligamento periodontal.
<i>hPDL</i>	Ligamento periodontal humano.
PDLSCs	Células madre del ligamento periodontal.
PFA	Paraformaldehido.
PG	Proteoglicanos.
PPAR	Receptor activador de la proliferación de peroxisomas.
P/S	Penicilina/estreptomicina.
RNA	Ácido ribonucleico.
rpm	Revoluciones por minuto.
RT	Temperatura ambiente.
RT-PCR	Transcriptasa inversa de la reacción en cadena de la polimerasa.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
S.E.M.	Desviación estándar de la media.
SHED	Células madre de la pulpa de dientes deciduos.

Shh	Proteínas Hegdehog.
SN	Sistema Nervioso.
TGFb	Factor transformador del crecimiento.
TRIS	Tris-hidroximetil aminometano.
TUJ-1	β -III tubulina.
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular.
WB	Western Blot.
Wnt	Proteína implicada en la embriogénesis.

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1.- Células madre.....	3
1.1- Unidades de desarrollo en continua evolución.....	3
1.2- Células madre neurales.....	11
2.- Pluripotencialidad citogenética.....	14
3.- Ligamento periodontal.....	19
4.- Odontogénesis.....	26
5.- Células madre en el diente.....	40
6.- Células madre en el ligamento periodontal.....	48
OBJETIVOS.....	55
MATERIAL Y MÉTODOS.....	59
1.- Aislamiento y cultivo celular.....	61
2.- Recuento y estimación de la viabilidad.....	63
3.- Cultivo de células de ligamento periodontal.....	66
4.- Congelación de los subcultivos celulares.....	68

5.- Descongelación de los subcultivos celulares.....	69
6.- Método de transfección: Electroporación.....	69
7.- Trasplantes intracerebrales.....	70
8.- Perfusión intracardiaca y posfijación del tejido.....	73
9.- Técnica PCR-RNA.....	74
10.- Detección de proteínas.....	76
10.1.- In Vitro.....	76
10.1.1.- Inmunocitoquímica.....	76
10.1.2.- Electroforesis y Western Blotting.....	85
10.2.- In Vivo: Inmunohistoquímica.....	86
RESULTADOS.....	91
1.- Aislamiento y caracterización de las células del ligamento periodontal.....	93
2.- Sobreexpresión de eGFP transgénico.....	115
3.- Generación de esferas derivadas del cultivo de células del Hpdl.....	125
4.- Potencial de diferenciación neural de las células derivadas del hPDL.....	131
5.- Experimentos In Vivo.....	147
DISCUSIÓN.....	165
1.- Potencialidad neural in vitro de las PDLSCs.....	169
2.- Potencialidad neural in vivo de las PDLSCs.....	173
3.- Sobreexpresión de eGFP transgénico.....	176
CONCLUSIONES.....	179
BIBLIOGRAFÍA.....	183

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.- CÉLULAS MADRE.

1.1.- UNIDADES DE DESARROLLO EN CONTINUA EVOLUCIÓN.

Las células madre son células indiferenciadas capaces de proliferar, autorrenovarse, producir un gran número de progenie celular diferenciada a lo largo de distintos caminos moleculares específicos, así como regenerar los tejidos donde se encuentran.

Generalmente se pensaba que únicamente las células madre embrionarias (CME) eran totipotentes, capaces de generar todos los tejidos del organismo debido a su gran plasticidad durante el desarrollo embrionario temprano. Un amplio número de trabajos apoya este hecho, documentándolo en experimentos tanto in vitro como in vivo (Evans y col., 1981; Thomson y col., 1998; Keller y col., 1999; Krebsbach y Gehron, 2002; Moraleda y col., 2004; Barquinero y col., 2005). Respecto a las células madre en adulto, se pensaba que tenían un

potencial de diferenciación y regeneración restringido al tejido en el cual residían, incluso solo a algunos tipos celulares particulares de éste. Actualmente estos conceptos están siendo cuestionados y evolucionan hacia expectativas más amplias gracias a los resultados que se están obteniendo en los laboratorios de investigación.

Durante la embriogénesis, una única célula, el cigoto, da lugar a un organismo multicelular, cuyas células y tejidos adoptan múltiples características diferenciales para llevar a cabo funciones específicas dentro de cada órgano del cuerpo. El cigoto y las células resultado de sus primeras divisiones embrionarias, son las únicas células capaces de diferenciarse en cualquier tipo celular, incluyendo células del feto en desarrollo y del organismo adulto, además de los tejidos extraembrionarios como la placenta (Herzog y col., 2003). Por lo que se considera que en cordados desde el cigoto hasta las células de la masa celular interna del blastocisto, las células embrionarias son totipotentes (Fig. 1).

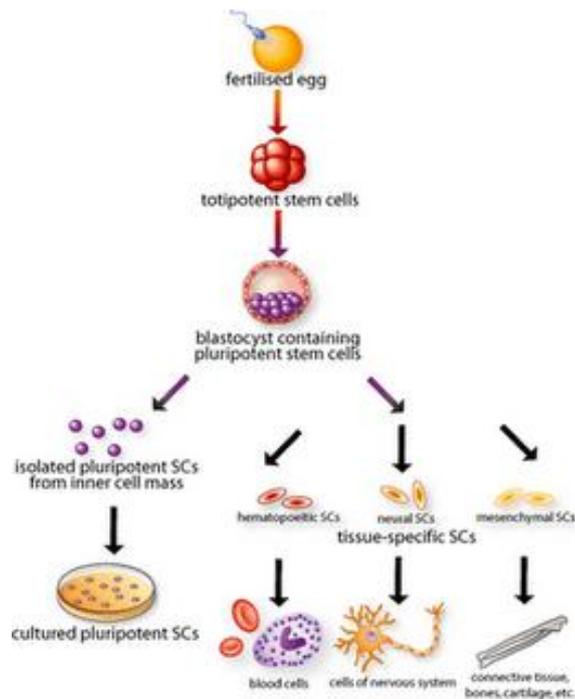


Figura 1.- El origen, aislamiento y especialización de las células madre.

Después del crecimiento completo del animal, muchos tejidos y órganos mantienen un proceso de equilibrio en su “pool” celular con pérdida y reposición constantes, donde las células muertas, bien por procesos naturales o estímulos ambientales, son reemplazadas por otras que se están produciendo. Este hecho se ha mantenido en la mayor parte de los tejidos a lo largo de la evolución, siendo común en invertebrados y hasta en algunos vertebrados. Por ejemplo, algunos anfibios son capaces de regenerar un miembro o la cola cuando son seccionados, incluso algunas neuronas del cerebro en aves pueden regenerarse (Álvarez-Buylla y Nottebohm, 1988). En el caso de los seres humanos, el hígado puede parcialmente regenerarse si el daño ocasionado no ha sido demasiado severo, la mucosa del tubo digestivo, la epidermis y el pelo de nuestra piel pueden fácilmente repararse cuando son lesionados. Las células madre hematopoyéticas, responsables de la renovación fisiológica de las células sanguíneas, son capaces de reconstituir la médula ósea y la sangre tras una aplasia medular secundaria a una irradiación subletal; como ocurre en el caso de las leucemias en cuya terapia se incluye el trasplante de progenitores hematopoyéticos.

Las células madre están por lo tanto presentes en varios tejidos y órganos del adulto, incluidos la médula ósea, el tejido subcutáneo, el epitelio intestinal, el músculo esquelético y el hígado; más recientes son las evidencias de la existencia de células madre en el sistema nervioso periférico y central, así como en la retina (Stemple y Anderson, 1992; Tropepe y col., 2000; Weissman, 2000; Okano, 2002). Como se ha dicho antes, en estos tejidos, las células madre son necesarias para reemplazar las células perdidas, ya sea por la renovación fisiológica o por condiciones patológicas, incluidas lesiones o enfermedades degenerativas. En este aspecto, hoy en día se conoce que el cerebro de vertebrados parece tener una lenta renovación y una cierta capacidad para regenerar células neurales (Okano, 2002).

Como se ha señalado anteriormente, las CME son totipotentes, pudiendo originar los linajes específicos de los diferentes tejidos y órganos de un animal. En el caso de las células madre que residen en tejidos u órganos adultos, se pensaba que tenían restringida su posibilidad de diferenciación a determinadas líneas celulares relacionadas con su lugar de ubicación. Numerosos grupos de investigación han explorado diferentes aspectos de la potencialidad histogenética de las células madre órgano-específicas del adulto, tratando de describir sus potenciales regenerativos y de encontrar nuevas aplicaciones de las mismas en la solución de algunos problemas clínicos.

Las células madre presentan dos tipos de divisiones celulares: durante la vida embrionaria son divisiones simétricas, cuyo resultado es expandir su población inicial. Cuando los esbozos de los órganos están inicialmente desarrollados, sus mitosis se convierten en asimétricas, en las cuales una célula hija se compromete en un linaje concreto del tejido donde se encuentra, mientras que la otra mantiene las características pluripotentes de la célula madre. En la vida adulta existen distintos tipos de célula madre de acuerdo a su localización y a su capacidad de diferenciación (Fuchs y Segre, 2000; Weissman 2000), pudiendo sufrir transformaciones en tipos celulares heterogénicos (diferentes a los predecibles) influenciadas por las señales de un microambiente nuevo, distinto al suyo habitual (Alison y col., 2000; Clarke y col., 2000). Las características diferenciales entre los distintos tipos de células madre, en principio definidas por la actividad de gradientes temporales y espaciales de información posicional derivados del entorno en el que se localizan (Wolper, 1994), pueden revertir cuando éstas son ubicadas en un nuevo nicho, readquiriendo la habilidad para generar tipologías celulares nuevas, y mostrar estados de potencialidad histogenética que normalmente solo se encuentran en el embrión (Anderson y col., 2001).

Uno de los ejemplos más conocidos que avalan lo anteriormente expuesto es la clonación en mamíferos, cuyo caso más significativo por ser pionero es el de la oveja "Dolly" (Wilmut y col., 1999). Se aisló el núcleo de una célula somática de un animal adulto y lo donaron como tal a una célula germinal fecundada a la que previamente se le había eliminado su propio núcleo. Esta nueva célula germinal manipulada fue implantada en una hembra huésped, donde se desarrolló de forma natural originando un individuo normal aunque clónico del animal que donó el núcleo celular. Este estudio y otros muchos experimentos de clonación que se han desarrollado en los últimos años, ponen de manifiesto que las células diferenciadas adultas tienen la posibilidad de reactivar los genes de su material genético activos durante el desarrollo. Con este hecho se confirma la importancia del entorno en el control de la expresión génica de una célula, y con ello la capacidad de reactivar programas de desarrollo diferentes que darán lugar a comportamientos heterogéneos en células diferenciadas.

Con todo, la biología de las células madre parece ser más compleja de lo que originalmente se pensaba. La posibilidad de que las células madre adultas que residen en un tejido puedan contribuir a la regeneración de otros, sugiere un grado de plasticidad histogénica previamente desconocida. Además, los cambios de destino celular pueden ser una propiedad natural de las células madre, que quizás puedan tomar parte en la reparación fisiológica continuada de los tejidos dañados a lo largo de la vida (Blau y col., 2001). Los numerosos hallazgos recientes en el campo sugieren que el concepto de célula madre órgano-específica está en continua revisión y, por tanto, que la visión de una población de células madre específica, homogénea e inamovible del tejido adulto puede necesitar ser actualizada.

Una meta importante para la medicina regenerativa actual es intentar canalizar la pluripotencialidad y la capacidad proliferativa de las células madre humanas hacia programas específicos de diferenciación dentro de contextos orgánicos definidos. Si esto llegara a ser posible en un futuro próximo reportaría enormes beneficios terapéuticos. Entre ellos destaca la generación de diferentes tipos de neuronas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, traumatismos de la médula espinal o para la enfermedad de Parkinson (Damier y Brachet, 2000; Lee y col., 2000), la producción de células del músculo cardíaco para desórdenes congénitos del corazón o para víctimas de infartos de miocardio (Doetschman y col., 1993), la generación de islas celulares del páncreas, secretoras de insulina, para el tratamiento de ciertos tipos de diabetes (Soria y col., 2000), así como la repoblación de las placas desmielinizadas de enfermos de esclerosis múltiple (Temple, 2001).

Otro aspecto posible, aunque más lejano, sería la fabricación in vitro de tejidos y órganos a partir de células madre programadas. Es obvio que esto representa un reto de mayor envergadura que el mero hecho de generar tipos celulares específicos. Ciertos grupos científicos han cultivado in vitro epidermis, usada con éxito en el tratamiento de pacientes con quemaduras graves (Green, 1991). Mientras, la creación de otros órganos o tejidos in vitro es considerablemente más complicada, la habilidad para producir cultivos eficientes de distintos tipos de células madre somáticas y para dirigir la pluripotencialidad de estas células madre a lo largo de determinados linajes celulares, representan los primeros pasos importantes para hacer realidad en el futuro la terapia celular regenerativa; esto que hoy nos parece ciencia ficción.

Pero hay una pregunta de especial importancia, ¿cuál sería la fuente de células madre humanas para estas terapias potencialmente tan útiles? El exitoso cultivo y propagación de células madre embrionarias y células germinales primordiales

fue publicado por primera vez en 1998, cuando Shambloott y colaboradores aislaron y cultivaron crestas gonadales (células germinales) de fetos humanos abortados desde cinco a nueve semanas de edad. Mientras, Thomson y colaboradores cultivaban células de la masa celular interna de blastocistos humanos (1998). Desde el momento en el que estos artículos fueron publicados, la generación y uso de estas células madre humanas acarreó la aparición de serios exámenes éticos, los cuales no parecen tener, hasta el momento, una clara solución. Lo esencial en la cuestión es cómo fueron obtenidas las células madre humanas, y en el caso de estos artículos, si eran necesarios tejidos fetales o embrionarios humanos. Para seguir la técnica empleada en la clonación de "Dolly" hubieran necesitado una célula humana fertilizada a la que le hubieran sustituido el núcleo, pero la utilización de un embrión humano hubiera desencadenado verdaderos problemas morales para la sociedad. Hoy en día estamos asistiendo a importantes polémicas políticas y sociales al respecto del uso de embriones humanos para investigación.

Además, el uso clínico de las CME se enfrenta a dos importantes limitaciones, la capacidad para generar teratomas cuando se implantan en individuos adultos y que ningún adulto tiene sus propias células embrionarias disponibles para su uso terapéutico, por lo que habría que recurrir a células de embriones alogénicos y, por tanto, no histocompatibles, con todas las limitaciones de los trasplantes de órganos (necesidad de inmunosupresión, etc.) (Moraleda y col., 2004).

Un posible camino para evitar estas cuestiones sería el uso de células madre humanas aisladas de tejidos adultos que manipuladas adecuadamente, puedan ser conducidas hacia los linajes específicos. Mientras algunas ideas rozan aún lo ficticio, algunos resultados experimentales actuales ratifican la utilidad de

ciertos tipos de células madre somáticas, para una importante variedad de posibles terapias con células madre.

En el año 2006 fueron generadas las células madre pluripotenciales inducidas (IPs). Las IPs son células que en sus orígenes no eran embrionarias, pero tras la inducción se comportan como tal. Éstas células han supuesto un nuevo enfoque en la terapia celular (Takahashi y col., 2006), ya que se podría disponer de células con características totipotenciales sin tener que manipular o destruir embriones.

Además, a diferencia de las CME, con las IPs cabría la posibilidad de realizar trasplantes autólogos en los pacientes evitando los problemas de rechazo. Éstas células son morfológicamente similares a las CME, expresan genes y antígenos de superficie celular idénticos, tienen capacidad de diferenciarse in vitro a otros linajes celulares y tienen capacidad de formar teratomas cuando se trasplantan en ratones inmunodeprimidos. La única diferencia es que no proceden de embrión (Yu y col., 2009).

Takahashi y colaboradores fueron los primeros en conseguir IPs con la inserción de 4 genes al núcleo de fibroblastos de ratón. Los genes utilizados fueron *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc*, y *Klf4*. Este hallazgo ha sido posteriormente confirmado por diferentes investigadores en el mismo modelo animal (Nakagawa y col., 2008; Aoi y col., 2008; Kim y col., 2008; Park y col., 2008a; Park y col., 2008b; Park y col., 2009). La reprogramación celular también se ha realizado con éxito en células humanas, tras la inserción de los genes *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* y *Lin28* (Lowry y col., 2008; Aasen y col., 2008; Ebert y col., 2009; Choi y col., 2009; Loh y col., 2009). Más recientemente la técnica se ha refinado, hasta el punto que se han obtenido IPs con los genes *Oct4* y *Sox2* (Huangfu y col., 2008).

No obstante, deben seguir realizándose más experimentos que puedan confirmar la seguridad de estas células para su aplicación clínica, de tal modo que estemos seguros de que no existan cambios en el cariotipo a lo largo de su cultivo (Aasen y col., 2008), errores en la reprogramación de factores de transcripción o déficit de telomerasa (Davy y col., 2009; Marion y col., 2009). De hecho, hay que resaltar que en un trabajo reciente de Ohi y colaboradores (2011) se han encontrado importantes restricciones en su potencialidad, ya que guardan características inalterables relacionadas con su tejido de origen (Ohi y col., 2011).

En resumen, el uso del potencial regenerativo de las células madre parece ser muy amplio y prometedor. La habilidad para aislar y cultivar células madre adultas permitirá que además de una terapia regenerativa simple, surjan métodos para corregir genéticamente células madre para que sean útiles para el tratamiento de desórdenes genéticos humanos.

Cuando esta tecnología sea asimilada, acabaremos de dar un paso adelante en la ciencia que abrirá nuevas esperanzas terapéuticas. Sin embargo, la mayor parte de la sociedad está todavía expectante y temerosa ante los peligros éticos y morales que se muestran ante todos estos novedosos descubrimientos científicos y sus expectativas metodológicas.

1.2.- CÉLULAS MADRE NEURALES.

Las propiedades celulares usadas para definir a una población de células madre neurales (CMN) son la capacidad de generar neuroesferas en cultivos adecuados, la posibilidad de autorrenovarse y la potencialidad de los descendientes de una única célula para diferenciarse en los tres linajes de las

células neurales: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Una neuroesfera es un grupo celular de forma esférica que crece en suspensión, constituido por una célula madre neural que comenzó a proliferar inicialmente con divisiones simétricas originando células adherentes que se unieron unas a otras para formar estos grupos. En una neuroesfera, de toda la progenie de una CMN, solamente del 10 al 50% de las células originadas mantienen las características de célula madre, mientras que el resto son células que sufrirán una diferenciación espontánea (Galli y col., 2003). Estas características descritas para las CMN, pueden correlacionarse con la expresión de marcadores moleculares como son Nestina, Sox 1 y 2, y Musashi-1 entre otros marcadores (Pevny y Rao, 2003).

Durante el desarrollo, los precursores neurales están ubicados inicialmente en una capa celular, el neuroepitelio de la zona ventricular (VZ). Cuando el desarrollo continúa, aparecerá debajo de ella la zona subventricular (SVZ). La celularidad de la zona ventricular disminuye gradualmente durante el desarrollo embrionario, permaneciendo en el adulto como una monocapa de células continuas (epéndimo) que reviste las cavidades ventriculares. Por el contrario la zona subventricular persiste en mamíferos neonatales y adultos como una capa con actividad mitótica, adyacente al epéndimo que recubre los ventrículos (Gritti y col., 2002).

Las células individuales del neuroepitelio pueden diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos tanto *in vitro* como *in vivo* después de ser trasplantadas en el cerebro de un animal huésped. Estas células han sido denominadas células madre neuroepiteliales, cuyas propiedades han sido parcialmente descritas y parece que su supervivencia y proliferación son reguladas por el factor de crecimiento de fibroblasto básico (FGF2) (Qian y col., 1997).

Hacia la mitad de la embriogénesis la VZ se reduce considerablemente en tamaño, y pueden ser identificadas nuevas zonas con precursores activos mitóticamente. Células con actividad mitótica derivadas de la VZ que se acumulan próximas a esta zona constituyen las células de la SVZ, una zona que continúa expandiéndose durante el desarrollo y que contiene células definidas como células madre-dependientes del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Reynolds y col., 1992, 1996).

Después del descubrimiento de CMN en el embrión, el hallazgo de células madre en el cerebro adulto supuso un nuevo capítulo en la neurociencia. La neurogénesis en cerebro de vertebrados se pensaba que era un fenómeno exclusivo del desarrollo embrionario y estadios perinatales. En el caso de los mamíferos adultos, la neurogénesis ha sido mostrada en diferentes regiones neurogénicas y no neurogénicas, aunque las zonas más activas de CMN en el adulto es la SVZ, que permanece a lo largo de toda la vida como una capa mitóticamente activa en la pared de los ventrículos laterales del telencéfalo y a lo largo de su extensión rostral hacia los bulbos olfatorios (Galli y col., 2003), así como en el giro dentado del hipocampo, donde en ratas adultas jóvenes la neurogénesis constituye alrededor de un 3'3% del total de la población de células granulares del hipocampo por mes (Cameron y McKay, 2001).

De entre los numerosos marcadores potenciales para la población de CMN el más afianzado parece ser la Nestina, una proteína de los filamentos intermedios del citoesqueleto celular (Frederiksen y McKay, 1988). Aunque han sido abundantes las nuevas incorporaciones como son Musashi-1, una proteína de unión al RNA (Sakakibara y col., 1996; Kaneko y col., 2000); Notch, que se cree que mantiene a las células en un estado proliferativo e inhibe la diferenciación neuronal (Lewis, 1998); la subfamilia SOXB1 de factores de transcripción (Sox1, Sox2, Sox3), que se coexpresan en progenitores neurales proliferativos a lo largo

de la embriogénesis de roedores y en la edad adulta (Collignon y col., 1996). En cualquier caso, cabe destacar, que muchos de los marcadores no son totalmente específicos de CMN, ya que pueden expresarse en distintos niveles en precursores neurales intermedios, por lo que lo ideal sería utilizar una combinación de distintos marcadores.

La baja capacidad regenerativa del sistema nervioso central (SNC) de mamíferos adulto podría ser explicada primero, porque la diferenciación neuronal de las CMN endógenas podría estar inhibida por factores del microambiente presentes en la mayoría de las áreas del cerebro adulto y, segundo, porque el número de CMN endógenas puede ser demasiado pequeño para una autorreparación efectiva (Okano, 2002).

Muchos esfuerzos han sido orientados a revelar las señales moleculares presentes en las áreas neurogénicas, además de para determinar los mecanismos por los cuales estas señales actúan regulando la proliferación y diferenciación de los progenitores. Tanto reguladores positivos como negativos controlan las características de las CMN.

2.- PLURIPOTENCIALIDAD CITOGENÉTICA

Dos grandes pilares conceptuales sobre la biología del desarrollo han sido demostrados como inexactos en los últimos años. Unos de ellos, el gran dogma profundamente afianzado que decía que la neurogénesis era un proceso exclusivo del estadio embrionario y perinatal. El segundo concepto hace referencia al hecho de que las células madre específicas de los órganos han perdido irreversiblemente su capacidad para generar otros tipos celulares

distintos de aquellos pertenecientes al tejido u órgano que las albergaba, característica que diferenciaba fundamentalmente las células madre de adulto de las embrionarias. Sin embargo, una serie de estudios han desafiado la noción de restricción de linaje en las células madre adultas. Así, estos experimentos han presentado evidencias en las que las células madre adultas de un tejido u órgano son capaces de cruzar las barreras de linaje originando células de otros órganos, tanto in vitro como in vivo después de ser trasplantadas.

Son muchos los ejemplos de células madre capaces de originar células que normalmente se encuentran en tejidos distintos de donde las primeras fueron aisladas. Este fenómeno fue previamente documentado mostrando que las células germinales primordiales eran capaces de ser totipotentes si eran cultivadas con FGF2 y LIF (factor inhibidor de leucemia) (Donovan, 1994). Durante el desarrollo normal, las células germinales primordiales originan células únicamente germinales, cuando éstas son trasplantadas en blastocistos, ellas no contribuyen a ningún tejido somático. Sin embargo, si antes del trasplante en el blastocisto, las células germinales primordiales son tratadas en cultivo con FGF2 y LIF, éstas son capaces de contribuir además de a la línea germinal, a todos los tejidos somáticos (Donovan, 1994). Igualmente, progenitores de oligodendrocitos O2A aislados del nervio óptico, en principio comprometidos para dar únicamente oligodendrocitos, han podido ser reprogramados in vitro tras ser tratados con FGF2 para dar lugar a neuronas (Kondo y Raff, 2000). Todo ello soporta la idea de que progenitores específicos, o células madre de distintos tejidos, puedan ser orientados a mostrar una inesperada plasticidad de desarrollo en cultivo o in vivo después de un tratamiento in vitro previo. Sin embargo, este hecho debe ser interpretados con cautela, ya que esta plasticidad puede no ser exhibida durante el desarrollo normal o en circunstancias in vivo (Price y William, 2001).

Numerosos son los ejemplos actuales, algunos de los cuales han sido desarrollados in vivo, describiéndose una conversión entre distintas capas embrionarias, en las cuales las células madre originales y las células diferenciadas a partir de las mismas, pertenecen a linajes celulares que normalmente derivan de distintas capas germinales embrionarias. Así a partir de precursores de médula ósea (mesodermo) se han obtenido in vivo células del pulmón y del tracto gastrointestinal (endodermo) (Krause y col., 2001); células del hígado (endodermo) (Lagasse y col., 2000; Wang y col., 2002); células del páncreas (endodermo) (Ianus y col., 2003); células del sistema nervioso (neuronas y macroglía; origen ectodérmico) (Eglitis y Mezey, 1997; Brazelton y col., 2000; Mezey y col., 2000; Bonilla y col., 2002; Mezey y col., 2003) y células de Purkinje (Priller y col., 2001).

Otra serie de experimentos han demostrado que las células madre del SNC de ratón y humano tienen potencialidad para originar derivados no neurales. Así, a partir de CMN (ectodermo) de adulto se han originado células hematopoyéticas (mesodermo) (Bjornson y col., 1999); células musculares (mesodermo) (Galli y col., 2000); células del riñón (mesodermo), de hígado, de pulmón, de estómago y de intestino (endodermo) (Clarke y col., 2000). Todos estos artículos concluyen que las células madre del SNC retienen una mayor potencialidad de desarrollo de lo que previamente se había pensado.

La transdiferenciación de la células madre somáticas, entendida como la extensión de sus restricciones génicas intrínsecas como consecuencia de su exposición a un nuevo microambiente (Anderson y col., 2001), y descrita por los experimentos mencionados anteriormente, constituye en la actualidad un punto de activo debate.

La conclusión a la que se ha podido llegar es que se trata de un fenómeno poco frecuente y tiene lugar solamente bajo circunstancias peculiares. Tal vez, la capacidad para sufrir transdiferenciación sea característica de tipos celulares específicos, llamados células madre somáticas, y que normalmente constituye una fracción minoritaria de toda la población celular *in vivo*, cuyo comportamiento habitual incluiría dicho fenómeno con una baja frecuencia (Anderson y col., 2001), o bien un conjunto poblacional cuyo tamaño fluctúa *in vitro* dependiendo de las condiciones de cultivo (Galli y col., 2003). De igual modo, estudios en el desarrollo embrionario sugieren que mientras hay una progresiva restricción en el potencial de desarrollo, ésta no es absoluta y puede ser modificada mediante la alteración en la expresión de genes o modificando el entorno en un estado concreto del desarrollo (Liu y Rao, 2003). Por ejemplo, la expresión de genes neurales en el ectodermo puede generar neuronas (Lee y col., 1995). Estos resultados únicamente pueden explicarse a través de transdiferenciación y apoyan la posibilidad de que cambios en genes únicos puedan ser suficientes para alterar un fenotipo (Liu y Rao, 2003).

La transdiferenciación es un fenómeno que ocurre normalmente *in vivo* en plantas (Demura y col., 2002) y animales, tales como los anfibios durante la regeneración de los miembros (Stocum, 2002). *In vitro*, células somáticas definitivamente diferenciadas han sido orientadas hacia un fenotipo distinto, por ejemplo, fibroblastos que son reprogramados hacia células que expresan genes específicos de linfocitos T (Hakelien y col., 2002).

Una serie de criterios han sido propuestos para admitir que la transdiferenciación ha ocurrido (Greco y Recht, 2003), como que las células deben incorporarse en el tejido apropiado o nicho de células madre adecuado, que deben sobrevivir y diferenciarse apropiadamente, adoptando la morfología

celular característica, y deben adquirir la función fisiológica característica del tejido huésped.

Otro mecanismo alternativo a la transdiferenciación que explica, al menos en parte, la aparente plasticidad de las células madre somáticas es el fenómeno de fusión celular, aunque debido a que las células somáticas son menos susceptibles de sufrir fusión celular que las embrionarias, y la observación de que eventualmente productos poliploides de la fusión son altamente inestables, sería poco acertado pensar en ella como fenómeno exclusivo en la conversión de células madre somáticas en diferentes tipos celulares (Galli y col., 2003).

En cualquier caso, cuando la fusión celular es la responsable de la reprogramación del patrón de expresión de genes de una célula adulta, esto todavía representa plasticidad, solo que las células implicadas no precisan ser necesariamente células madre (Herzog y col., 2003). De todas formas, si la fusión es responsable de muchos de los datos de plasticidad somática o si son realmente el resultado de una transdiferenciación, así como cuales son las razones que determinan que fenómeno ocurrirá, son aún problemas muy desconocidos.

Otra explicación alternativa sería la presencia de poblaciones de células contaminantes, con un fenotipo diferente a las poblaciones empleadas en diversos experimentos. En muchos casos, estas pequeñas poblaciones contaminantes representan un número minúsculo de células que, aunque podrían con seguridad ser ignoradas, podrían llegar a ser un mayor problema cuando se selecciona una población de precursores celulares o células madre que ya en sí constituyen una subpoblación pequeña, sobre todo si ambas pueden proliferar bajo las mismas condiciones de cultivo y generar crecimientos incontrolados (Liu y Rao, 2003).

Otra opción que podría explicar la capacidad de las células madre específicas de tejido para originar distintos tipos celulares, es la posibilidad de que una población pluripotencial de primitivas (embrionarias) células madre persista, aunque en pequeño número, en cada tejido u órgano, representando el remanente de células totipotentes presentes en estadios tempranos del desarrollo. Estas células responderían a señales del nuevo entorno para dirigir su diferenciación a lo largo de un nuevo camino (Liu y Rao, 2003).

Por otro lado, después de lo descrito, cabría pensar que si las células somáticas mantienen de forma rutinaria una mayor potencialidad de desarrollo de la que exhiben durante el desarrollo normal, se plantearía la diferenciación como un proceso principalmente regulado por el entorno (Morrison, 2001).

A pesar de todo el debate surgido entorno al campo de las células madre, estas células representan uno de los más asombrosos desarrollos del conocimiento biomédico y biológico de la última década.

3.- LIGAMENTO PERIODONTAL

Los dientes representan uno de los principales componentes de la cavidad oral. El diente de un adulto consta de cuatro componentes estructurales diferenciados, el esmalte y el cemento en la parte más externa, la dentina por debajo, y la pulpa en la cavidad central. Los procesos alveolares de los maxilares contienen los alvéolos donde se ubican las raíces dentarias. El ligamento periodontal (PDL) es el tejido conectivo especializado que une cada una de las raíces de los dientes con el hueso que la rodea. La encía se adhiere con firmeza a los dientes y al tejido óseo subyacente. Se llama periodonto al

aparato de sostén del diente, su función es la de unir el diente al tejido óseo de los maxilares y conservar la integridad de la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad bucal. Está formado por el cemento, el ligamento periodontal, la encía y por el hueso alveolar (Fig. 2).

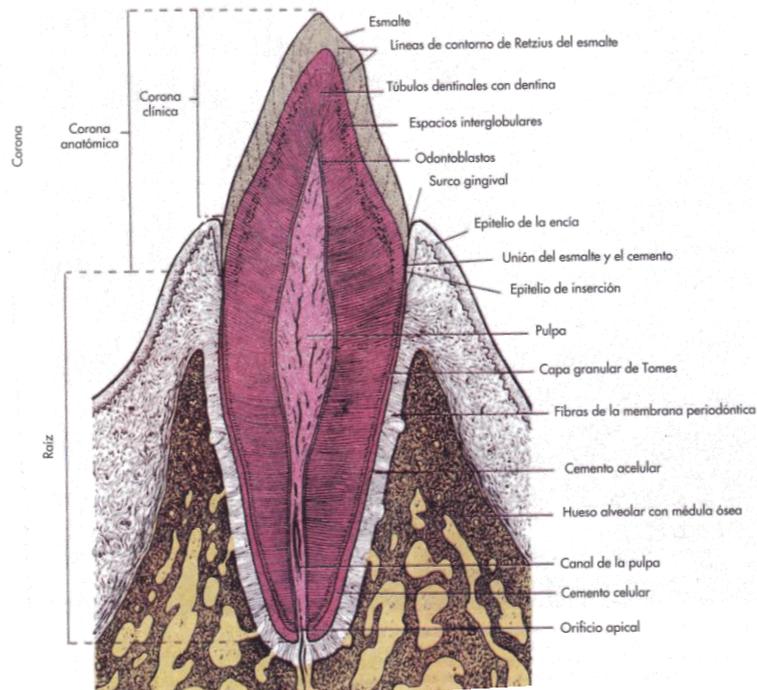


Figura 2.- Dibujo esquemático de un diente y las estructuras óseas y mucosas que lo rodean (Ross y col., 1998).

El esmalte es el tejido más duro del organismo y cubre la parte externa de la corona. El cemento cubre la raíz. La dentina está por debajo del esmalte y el cemento, y forma la mayor parte del diente. La pulpa dentaria se encuentra en el centro de la corona y la raíz. Contiene nervios, vasos sanguíneos y linfáticos. El PDL está ubicado entre el cemento y el hueso.

El PDL es un tejido conectivo muy vascularizado y celular que rodea la raíz de los dientes y une el cemento radicular con la lámina dura del hueso alveolar. En

sentido coronal, el PDL se continúa con la lamina propia de la encía y está separado de ésta por los haces de fibras colágenas que conectan la cresta del hueso alveolar con la raíz (fibras de la cresta alveolar).

El PDL tiene un papel muy importante en el soporte del diente pero también contribuye a la nutrición dental, la homeostasis y la reparación del tejido dañado entre otras funciones. El PDL tiene un espesor que varía entre 0,15 y 0,35 mm y está formado por una población heterogénea de células, además de fibras y sustancia intercelular básica.

Las **células** son, fundamentalmente, *fibroblastos*, células de origen mesenquimatoso cuya principal función es sintetizar y mantener la matriz extracelular propia del tejido. Presentan un desarrollado citoesqueleto de microtúbulos y de microfilamentos de actina implicados en procesos de motilidad celular.

Además de los fibroblastos, podemos encontrar *osteoblastos*, *osteoclastos*, *cementoblastos* y *cementoclastos*, encargados de la remodelación ósea y del cemento respectivamente. Los *cementoblastos* y los *osteoblastos* son células que también poseen la capacidad de producir colágeno y tienen un origen mesenquimatoso. Los *osteoclastos* y los *cementoclastos* son los encargados de la reabsorción del hueso y del cemento. Son células gigantes multinucleadas derivadas de los monocitos de la sangre, no derivadas de células locales, y tienen también origen mesenquimal.

En el espesor del ligamento se encuentran *células epiteliales* que constituyen los restos epiteliales de Malassez. Son pequeños cúmulos de células que proceden de los restos embrionarios de la vaina radicular de Hertwig. Estos restos disminuyen con la edad pero persisten durante toda la vida y se localizan cerca del cemento radicular y los vasos sanguíneos, fundamentalmente en la región

cervical y en la furca, donde se encuentra el cemento acelular. Se especula que pueden tener una función fisiológica como el mantenimiento del espacio periodontal y la prevención de anquilosis pero no hay evidencias firmes que apoyen esta idea. Fueron descritos por primera vez en 1817 por Serres como restos del órgano del esmalte los cuales desaparecían con la edad. Sin embargo, fue Malassez en 1885 quien presentó la primera descripción de las células y su distribución como una red fenestrada casi continua alrededor de la raíz del diente que persisten en el adulto (Fig. 3). En cortes longitudinales los restos aparecen como grupos aislados de células. Estos restos han sido relacionados con numerosas patologías dentales como quistes y tumores pero también se piensa que están relacionados con la regeneración periodontal (Rincon y col., 2006).

El desarrollo embriológico de los restos epiteliales de Malassez es un punto clave para la comprensión de los eventos asociados a su origen y el posible papel funcional dentro del PDL. Estas células de origen ectodérmico tienen la capacidad única de sintetizar y secretar proteínas normalmente asociadas con células de origen mesenquimal como osteopontina, sialoproteína ósea y osteoprotegerina (Rincon y col., 2006).

Estas células se caracterizan por tener un gran núcleo irregular con densa heterocromatina, en relación a un apenas distinguible citoplasma. Dicho citoplasma contiene tonofilamentos y abundantes mitocondrias pero un retículo endoplasmático poco desarrollado. Varios estudios han confirmado la naturaleza epitelial de estas células debido a la existencia de tonofilamentos, desmosomas y una lámina basal con hemidesmosomas separando estos restos celulares del tejido conectivo, características ultraestructurales que los distingue de los fibroblastos y cementoblastos del periodonto (Rincon y col., 2006)

Estudios ultraestructurales aseguran que existen al menos dos tipos de células de características diferentes en los restos epiteliales de Malassez: células maduras e inmaduras. Las células inmaduras son descritas con una apariencia irregular y un escaso retículo endoplasmático, pero relativamente ricas en mitocondrias. Suelen estar en contacto con células mesenquimales por procesos similares a las microvellosidades. Las células maduras tienen forma ovalada y se encuentran muy próximas unas a otras (Hamamoto y col., 1989).

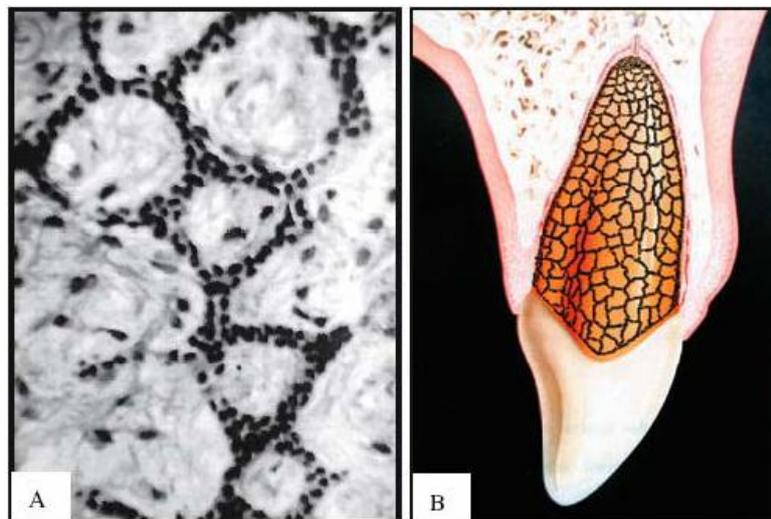


Figura 3.- (A) Apariencia histológica de la red formada por los restos epiteliales de Malassez. (B) Representación esquemática de la distribución de los restos epiteliales de Malassez alrededor de la raíz dental. (Rincon y col., 2006)

También pueden encontrarse entre otras células, macrófagos y células mesenquimatosas indiferenciadas que son capaces de originar fibroblastos, cementoblastos y osteoblastos. Además, podemos encontrar elementos vasculares y neurales.

Las fibras presentes en PDL son colágenas, elásticas y de oxitalán.

Las fibras colágenas están principalmente en forma de grupos o haces de colágeno tipo I y están distribuidas en patrones predeterminados para resistir las fuerzas mecánicas de la masticación. Las fibras del PDL están clasificadas según su ubicación, trayecto y en relación a las estructuras que conectan (Fig. 4):

- Fibras gingivales libres
- Fibras de la cresta alveolar
- Fibras horizontales
- Fibras oblicuas
- Fibras apicales
- Fibras interradiculares

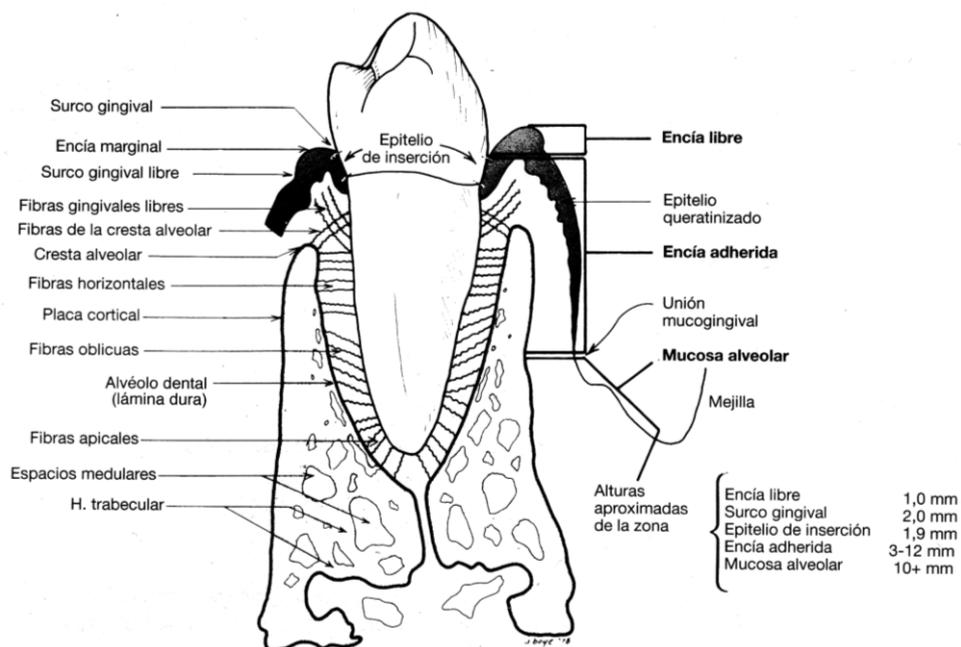


Figura 4.- Fibras principales del ligamento periodontal. (Woelfel y Scheid, 1998)

Los extremos de las fibras principales que están insertas por un lado en la estructura dentaria (cemento radicular) y por el otro en el hueso alveolar,

reciben el nombre de fibras de Sharpey y permiten al PDL mantener suspendida a la pieza dentaria dentro de su alveolo (Fig. 5).

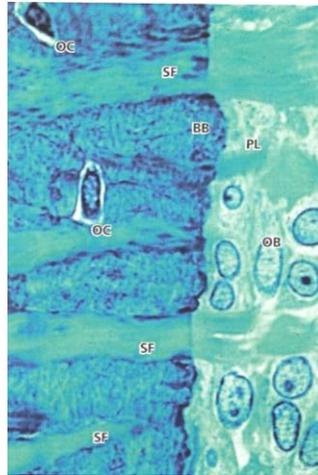


Figura 5.- Ligamento periodontal (PL); Hueso alveolar (BB); Fibras de Sharpey (SF); Osteoblastos (OB); Osteocitos (OC). (Lindhe, 2000)

Las fibras elásticas están formadas principalmente por una proteína llamada elastina, y por una glicoproteína dispuesta en microfibrillas que la rodean, llamada fibrilina. Estas fibras son escasas, van asociadas a vasos sanguíneos y proporcionan elasticidad al ligamento.

Las fibras oxitalánicas tienen una orientación principalmente apico-oclusal; están ubicadas dentro del PDL más próximas al diente que al hueso alveolar. Con frecuencia se insertan en el cemento. El papel de las fibras de oxitalán es sobre todo en el desarrollo del PDL y parece estar centrada en el mantenimiento de la integridad del sistema vascular (Tashiro y col., 2002).

La sustancia intercelular básica está formada principalmente por H₂O, y por proteoglicanos (PG), glucosaminoglicanos (GAG) y glucoproteínas de adhesión.

Las moléculas de GAG y PG forman una “sustancia fundamental” gelatinosa, hidratada en la que están incluidas las fibras de colágena. La capacidad de las células para adherirse a los componentes de la matriz extracelular se encuentra mediada, en gran parte, por las glucoproteínas de adhesión que se encuentran en la membrana celular.

La irrigación del ligamento periodontal procede de las arterias dentarias superior e inferior. Estas arterias se ramifican por todo el ligamento y establecen numerosas anastomosis arteriovenosas formando una red poliédrica que rodea la raíz.

El responsable de la inervación del PDL es el nervio trigémino y sus ramas. Las terminaciones nerviosas del periodonto tienen abundantes receptores del dolor, el tacto y la presión (*mecanorreceptores*) como los demás tejidos del organismo. El ligamento periodontal posee, además, *propioceptores* que aportan información concerniente a movimientos y posiciones del diente (es decir, sensibilidad profunda).

Los dientes del maxilar inferior, incluido su PDL, están inervados por el *nervio dentario inferior*, mientras que los del maxilar superior están inervados por el *plexo dentario superior*.

4.- ODONTOGÉNESIS.

Para emprender un estudio exhaustivo de las características histogenéticas de las células del ligamento periodontal y sus potencialidades regenerativas es preciso repasar los principales procesos que ocurren en el desarrollo del diente.

La odontogénesis es un proceso altamente coordinado y complejo que se extiende desde la cuarta semana del desarrollo embrionario hasta aproximadamente los 21 años, cuando se completa la formación apical del tercer molar. El ser humano posee 20 dientes deciduos y 32 dientes permanentes. Su proceso de formación es similar para ambos tipos de diente pero ocurre a diferentes edades (Koussoulakou y col., 2009).

Depende de una serie de señales entre dos tejidos adyacentes: un epitelio y un mesénquima. Mientras el proceso histológico está bien documentado, el mecanismo molecular subyacente está empezando ahora a ser aclarado (Maas and Bei, 1997). El avance realizado en los últimos años en el conocimiento de los aspectos moleculares de la odontogénesis permite afirmar que el desarrollo de la dentición está bajo un estricto control genético, que determina las posiciones, número y forma de las diferentes piezas dentarias. Existen células indiferenciadas que intervienen en este proceso desde sus inicios hasta su finalización, e igualmente existen numerosos genes involucrados, cuya función no se conoce por completo (Koussoulakou y col., 2009).

Los dientes derivan de dos de las primitivas capas germinales que se relacionan en la cavidad oral: el ectodermo y el mesodermo, contribuyendo también de forma importante células derivadas de la cresta neural, derivado especializado ectodérmico. La cresta neural es una población de células madre migratoria que pueden dar lugar a neuronas y células gliales del sistema nervioso periférico, células endocrinas, células del tejido conectivo, musculares y de pigmento durante el desarrollo embrionario (Miletich y col., 2004).

En la región cefálica, las células de la cresta neural del rombencéfalo y mesencéfalo, migran ventralmente hacia los arcos branquiales, aproximadamente a las 4 semanas de desarrollo intrauterino, donde

interaccionan con los tejidos mesodérmicos circundantes constituyendo el ectomesénquima. El desarrollo del ectomesénquima origina la interacción epiteliomesenquimal induciendo la proliferación y el engrosamiento del ectodermo que recubre la encía, formándose de esta manera la banda epitelial primaria, primera manifestación del desarrollo dental (Fig. 6-7).

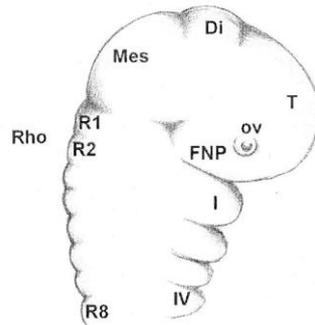


Figura 6.- Vista sagital simplificada de la parte cefálica de un embrión vertebrado. T=Telencéfalo, Di=Diencéfalo, Mes=Mesencéfalo, OV=vesícula ocular, FNP=Prominencia frontonasal, Rho=Romboencéfalo, R1-R8=Rombómeros. I-V=los primeros 4 arcos branquiales (Koussoulakou y col., 2009).

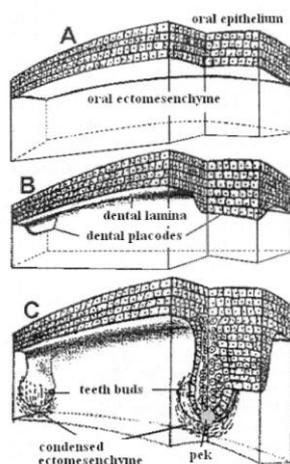


Figura 7.- Inicio de la odontogénesis. (A) Ectodermo oral en contacto con el ectomesénquima. (B) Las células epiteliales secretan señales específicas en diferentes áreas, proliferan y forman una banda de tejido epitelial, la lámina dental y las placodas dentales. (C) En las placodas dentales las células epiteliales proliferan y se introducen dentro del mesénquima formando las yemas dentales.

pek = nódulo esmalte primario. (Koussoulakou y col., 2009)

Los diferentes tejidos dentarios derivarán, entonces, del mesodermo y la cresta neural formando la papila y el folículo o saco dental que originan los odontoblastos, los cementoblastos y los fibroblastos; así como del ectodermo oral que forma el órgano del esmalte y los ameloblastos (Barbería, 1995; Miletich y col., 2004) (Fig. 8).

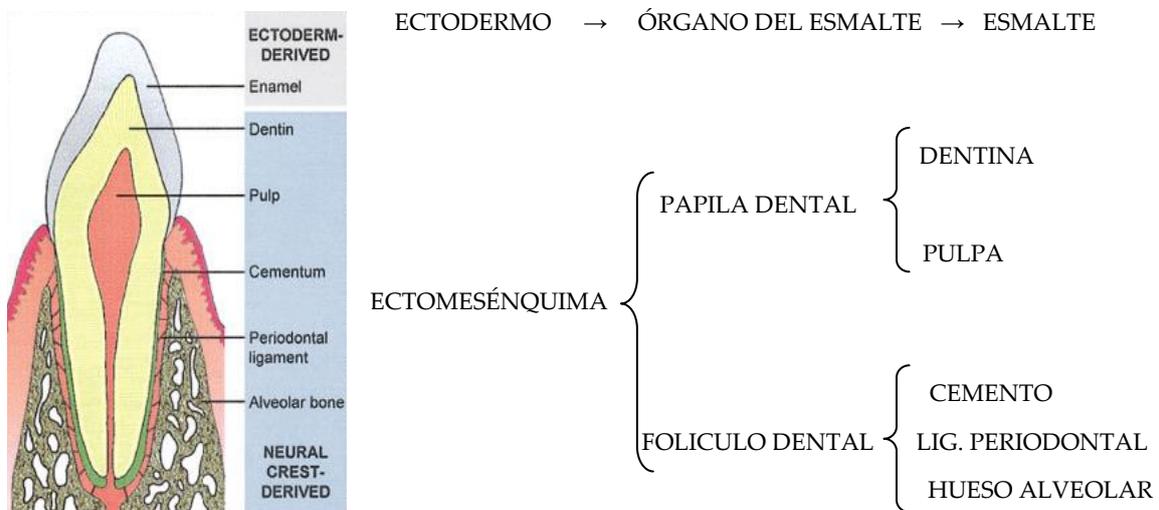


Figura 8.- Origen embriológico del diente (Miletich y col., 2004).

Fases de la Odontogénesis

Existen dos tipos de dentición en el ser humano, la temporal y la definitiva. La dentición temporal comienza a formarse a partir del segundo trimestre de embarazo y se extiende hasta después del parto. La dentición permanente comienza a formarse en el nacimiento y concluye a los 21 años de vida.

La odontogénesis tiene 4 etapas fundamentales: lámina dentaria, yema dentaria, casquete y campana (Barbería, 1995).

➤ Lámina dental

El tejido potencialmente odontogénico puede apreciarse entre las 4 y las 6 semanas de desarrollo embrionario como áreas de engrosamiento del ectodermo del estomodeo o boca primitiva. Constituye la banda epitelial primaria y se dirige hacia atrás formando dos arcos en forma de herradura, uno en el maxilar y el otro en la mandíbula, y reciben el nombre de lámina dental.

Posteriormente, se produce otra proliferación del epitelio oral formando la lámina vestibular o banda del surco labial. Esta lámina se desarrolla bucalmente respecto a la lámina dental, es decir, más cercana a la superficie de la cara, circunscribiendo la lámina dental y dividiendo los márgenes externos del estomodeo en segmentos bucales (que forman las mejillas y los segmentos labiales) y en segmentos linguales (en los cuales se desarrollan los dientes y el hueso alveolar). El vestíbulo de la boca se desarrolla entre el segmento lingual y el bucal por la desintegración de las células centrales.

El resto del epitelio forma el revestimiento de labios, mejillas y encías. La mayoría de las células epiteliales de las diferentes láminas se desintegran y desaparecen durante el desarrollo.

A partir de la lámina dental, se suceden 4 etapas en las que se producen la morfodiferenciación y la histodiferenciación del órgano dental. Destacar que el proceso es continuo, que no hay una clara diferenciación entre los estadios (Fig. 9).

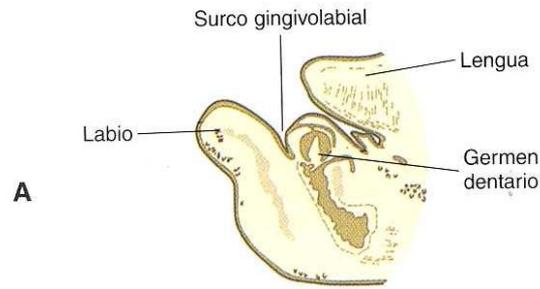


Figura 9.- Corte parasagital de la mandíbula de un embrión humano de 14 semanas de edad, donde puede apreciarse la localización relativa de los gérmenes dentarios. (Patten B, 1968)

➤ **Estadio de brote o yema dentaria**

Los brotes o gérmenes dentales que se corresponden con el número de dientes temporales (10 en maxilar y 10 en mandíbula) se desarrollan a la 8ª semana de desarrollo intrauterino como proliferaciones locales de la lámina dental que se introducen en el mesénquima subyacente. Alrededor de estas proliferaciones ectodérmicas, las células adyacentes sufren un proceso de condensación y constituirán la futura papila dental. Los brotes de los 32 dientes permanentes también se originarán de esta lámina alrededor del quinto mes de gestación y estarán situados en los procesos por lingual o palatino en relación a los elementos primarios. El extremo posterior de la lámina dental continúa su crecimiento hacia atrás, denominándose lámina sucesiva o definitiva y proveerá los brotes de los dientes permanentes que no tienen predecesores deciduos (Fig. 10).

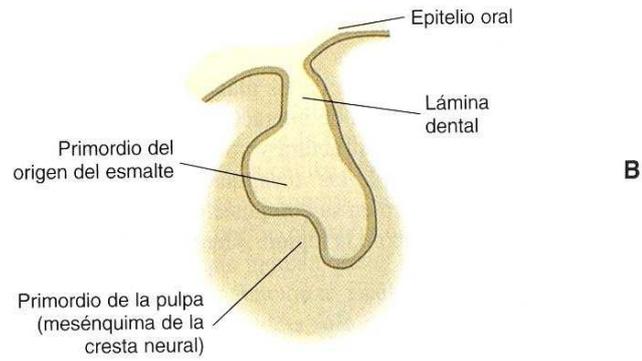


Figura 10.- Germen dentario en la fase de yema, a las 9 semanas. (Patten B, 1968)

➤ **Estadio de casquete o caperuza**

Aproximadamente a la 10^a semana de vida intrauterina, la superficie profunda de los brotes se invagina, quedando en el interior una condensación de células ectomesenquimales que constituye la papila dental y formándose el órgano del esmalte que adopta la forma de caperuza o casquete. Cada esbozo dentario estaría constituido por el órgano del esmalte y una papila dental, rodeados por el folículo dental (Fig. 11).

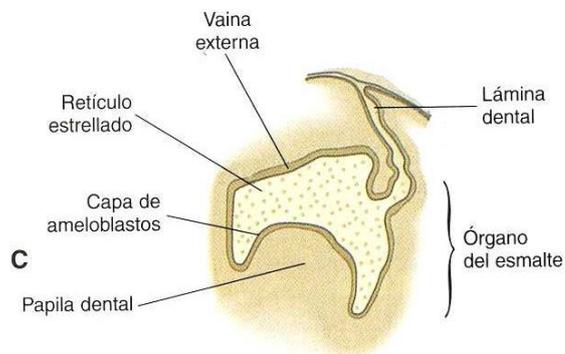


Figura 11.- Primordio dentario en la etapa de casquete, a las 11 semanas. (Patten B, 1968)

➤ Estadio de campana

A finales del 3º mes de desarrollo embrionario, la superficie inferior de la caperuza crece y profundiza en el mesénquima subyacente, de modo que la escotadura se hace más acusada y entra en el período de campana.

En este estadio ocurre la histodiferenciación del órgano del esmalte y también la determinación del patrón de la corona o morfodiferenciación. Empieza a observarse que a la altura del futuro cuello del diente los epitelios dentales externo e interno del órgano del esmalte se unen y forman el asa cervical de la cual derivará la raíz dentaria. En el centro de ambos epitelios queda el retículo estrellado y el estrato intermedio, necesarios también para la formación de la corona dental.

El epitelio dental interno induce a las células adyacentes de la papila dental a diferenciarse a odontoblastos. Los odontoblastos son los responsables de la formación y mineralización de la matriz de la dentina o predentina, que comienza en el 4º mes. La primera capa de dentina actúa como señal para que las células del epitelio interno del esmalte se diferencien a ameloblastos y comiencen a formar el esmalte. Esta interdependencia entre los tejidos se denomina inducción recíproca. La capa de contacto entre esmalte y dentina se llama unión amelodentinaria. El punto de maduración inicial de los ameloblastos (centro de crecimiento) originará la futura cúspide.

La capa constituida por los ameloblastos y los odontoblastos recibe el nombre de membrana amelodentinal o bilaminar (Fig. 12).

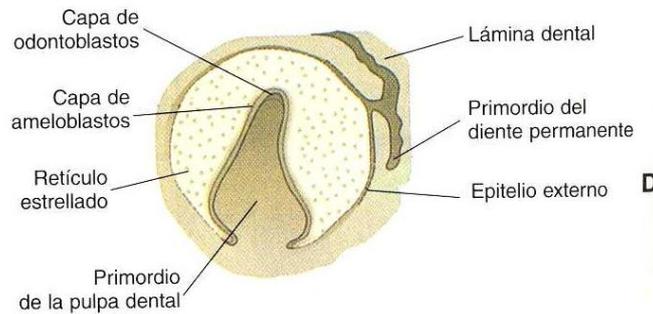


Figura 12.- Primordio de un incisivo central en la etapa de campana, a las 14 semanas. (Patten B, 1968)

➤ **Estadio de corona**

En este momento ocurre la formación de dentina y esmalte, la lámina dental se desintegra y el diente continúa su desarrollo separado del epitelio oral. Conforme aumenta el grosor de la dentina, los odontoblastos retroceden hacia la papila dental y dejan en la dentina prolongaciones citoplasmáticas llamadas prolongación o proceso odontoblástico. La capa de odontoblastos persiste durante toda la vida del diente y constantemente produce predentina y dentina. Es muy característico del ameloblasto el desarrollar unas prolongaciones cónicas llamadas Procesos de Tomes, que se unen a los cuerpos celulares mediante unos complejos de unión denominados aparato de barra terminal, que mantienen el contacto entre las células adyacentes. Este proceso de Tomes tiene un papel fundamental en la secreción de esmalte prismático. Cuando los ameloblastos han finalizado su participación en la mineralización del esmalte, secretan una cutícula orgánica sobre la superficie del esmalte, que se conoce como cutícula primaria o del desarrollo. Los ameloblastos se adhieren a esta cubierta orgánica del esmalte a través de hemidesmosomas y este estadio de formación y unión de la placa se conoce como estadio protector de la función del ameloblasto. Los ameloblastos se acortan y contactan con el estrato intermedio y el epitelio externo del esmalte, fusionándose para formar el

epitelio reducido del esmalte. Esta cobertura celular orgánica permanece en la superficie del esmalte hasta que el diente erupciona en la cavidad bucal. La forma de la corona de cada diente viene determinada por el cese de las mitosis en determinados puntos de la membrana bilaminar (Avery y Chiego, 2007) (Fig. 13).

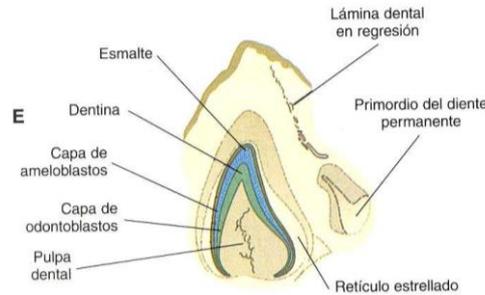


Figura 13.- Incisivo antes de hacer erupción en un feto a término. (Patten B, 1968)

➤ **Formación de la raíz**

La raíz comienza a formarse cuando acaba de hacerlo el esmalte de la corona, lo que sucede aproximadamente a los 6 meses después del nacimiento. El asa cervical profundizan en el mesénquima englobando cada vez más papila dental y pasa a constituir la vaina radicular epitelial de Hertwig, la cual determina la morfología de la futura raíz e induce la diferenciación de los odontoblastos que formarán la dentina radicular. Al depositarse cada vez más dentina en el interior de la capa ya formada, la cavidad pulpar se estrecha y finalmente forma un conducto por el que pasan los vasos sanguíneos y los nervios de la pieza dentaria. Iniciada la formación de la dentina radicular, las células del interior de la vaina de Hertwig sintetizan y segregan proteínas relacionadas con el esmalte (probablemente familia de las amelogenina). La degeneración de esta vaina pondrá en contacto a las células ectomesenquimáticas situadas en el folículo

dental con la superficie radicular. Las células en contacto con las proteínas relacionadas con el esmalte se diferencian en cementoblastos. Los cementoblastos fabrican una matriz que posteriormente se mineraliza y forma una delgada capa de cemento sobre la dentina radicular (se unen mediante interacciones fibrosas). Las fibras de colágeno que quedan incluidas en el cemento tras la calcificación forman parte de las fibras primitivas del ligamento periodontal. El resto de células de la papila dental formarán la pulpa dental. En el extremo en proliferación, la vaina radicular se dobla en un ángulo cercano a los 45°. Esta área se denomina diafragma epitelial. El diafragma epitelial rodea la abertura apical de la pulpa dentaria durante el desarrollo de la raíz.

Cuando los odontoblastos se diferencian a lo largo del borde de la pulpa, la dentinogénesis radicular avanza y la raíz se alarga. En la pulpa adyacente al diafragma epitelial se produce una proliferación celular. Esta se conoce como zona de proliferación pulpar. Se cree que esta área produce nuevas células necesarias para la elongación de la raíz. Posteriormente la raíz se ensancha hasta que la abertura apical se restringe a aproximadamente de 1 a 3 mm, suficiente para permitir una comunicación vascular y nerviosa entre la pulpa y el periodonto (Avery y Chiego, 2007).

Fuera del cemento se va a originar el ligamento periodontal, junto con la matriz secretada por los cementoblastos, y las criptas óseas donde se desarrollan los dientes y de donde erupcionarán más tarde (Fig. 14).

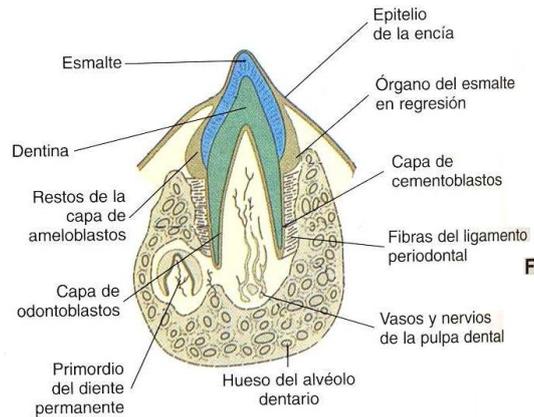


Figura 14.- Incisivo parcialmente protruido que muestra el primordio de un diente permanente cerca de una de sus raíces. (Patten B, 1968)

El PDL y el cemento radicular se desarrollan a partir del tejido conectivo laxo que rodea al germen dentario. El PDL se forma concomitantemente con el desarrollo de la raíz y la erupción del diente.

- a) El germen dentario se forma en una cripta del hueso. Las fibras colágenas producidas por los fibroblastos en el tejido conectivo laxo del germen dentario, durante el proceso de su maduración, quedan incluidas en el cemento recién formado apicalmente al límite cementoadamantino. Las fibras forman haces, orientadas hacia la porción coronal de la cripta osea.
- b) Las fibras verdaderas del PDL, las fibras periodontales, se desarrollan en conjunción con la erupción del diente, primero las que entran en la porción más marginal del hueso alveolar.
- c) Después, las dispuestas en haces ubicados más apicalmente.
- d) La posición de los haces de fibras colágenas se modifica continuamente durante la erupción dentaria.

Estas estructuras colágenas experimentan un remodelado continuo, es decir, reabsorción de fibras viejas y formación de nuevas (Lindhe, 2000) (Fig. 15).

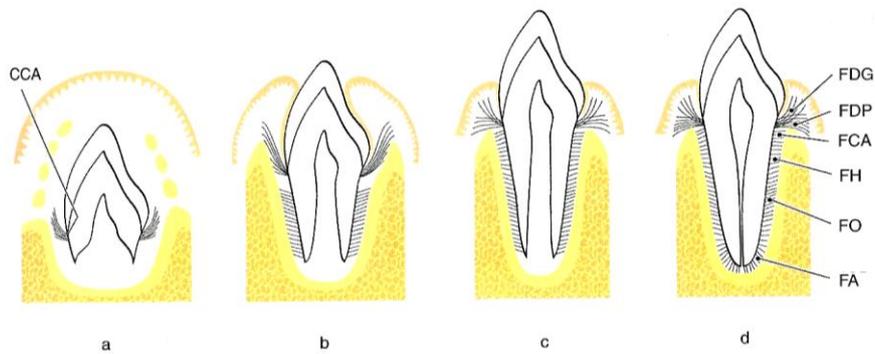


Figura 15.- Desarrollo del PDL; CCA: Limite cementoadamantino; FDG: Fibras dentogingivales; FDP: Fibras dentoperiosticas; FCA: Fibras de la cresta alveolar; FH: Fibras horizontales; FO: Fibras oblicuas; FA: Fibras periapicales. (Lindhe, 2000)

Histofisiología de la morfogénesis dentaria.

La formación del diente viene determinada fundamentalmente por células: las células epiteliales bucales que forman el órgano del esmalte y las células ectomesenquimales que forman la papila y el folículo dental. Destacar que un tipo de células que intervienen en la formación del diente son las células procedentes de la cresta neural. Estas células tienen su origen en el borde dorsal del tubo neural y migran posteriormente hacia maxilar y mandíbula entremezclándose con las células mesenquimatosas. Estas células también están presentes en la formación del mesénquima de las glándulas salivares y dermis, así como hueso, nervios y músculos de la cara (Avery y Chiago, 2007).

Una de las claves en el proceso de odontogénesis es la interacción del ectomesénquima y del epitelio. De tal modo que un epitelio de origen no dentario, expuesto ectópicamente al efecto inductor del ectomesénquima de la papila dentaria puede dar lugar a la formación de los derivados epiteliales de un primordio dental (órgano del esmalte y esmalte). Otra de las funciones de este ectomesénquima es regular la morfología de los elementos dentarios, dando lugar a incisivos, caninos, premolares o molares, según el momento (Gómez y Campos, 2002).

Aproximadamente son 300 genes y 100 factores de transcripción los que regulan el proceso de morfogénesis dentaria, que actualmente no se conocen completamente, si bien se han identificado distintos factores que codifican señales morfogenéticas y que participan en la interacción epitelio-mesénquima como son: las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), los factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs), las proteínas Hedgehog (Shh) y las proteínas Wnt (Gómez y Campos, 2002).

Las BMPs intervienen en la expresión de los genes *Msx-1*, *Msx-2*, *left1*, *Pax-9* y *Barx1*, los cuales contribuyen a determinar el patrón del órgano dentario. Se expresan en las células epiteliales y células ectomesenquimáticas. BMP-4 es la molécula más importante de esta familia.

Los FGFs regulan la morfogénesis epitelial y el desarrollo del mesénquima. FGF-8 es junto a BMP-4 de las moléculas más importantes.

Las proteínas Shh se encargan del crecimiento y determinan la forma del diente.

Las Proteínas Wnt intervienen en la regulación de la proliferación, la migración y la diferenciación celular.

Otros factores implicados son el TGF β (factor transformador del crecimiento) y la Activina que intervienen en el estadio de brote, el EGF (factor de crecimiento epidérmico) que actúa en el estadio de campana y el PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas) que actúa en el estadio de campana.

Las células epiteliales estimulan la llegada de las células multipotentes de la cresta neural secretando proteínas de la familia de los FGFs (FGF3, FGF4, FGF8, FGF10) y BMPs (BMP2, BMP4) los cuales provocan una división del epitelio ectodérmico oral en un dominio distal y otro proximal. BMP4 y FGF8 se encuentran en ectodermo y ectomesénquima, mientras que Shh y Wnt sólo se halla en ectomesénquima. Una vez poblado el primer arco branquial, las células procedentes de la cresta neural se entremezclan con las del mesénquima y comienza la interacción epitelio/ectomesénquima para dar lugar a las etapas de formación del germen del diente (Chung y col., 2009).

5.- CÉLULAS MADRE EN EL DIENTE

Durante el desarrollo del diente, una subpoblación de células mesenquimales se diferencian en odontoblastos, que son los responsables de la formación de la dentina primaria. Después de la erupción dental, debido a los mecanismos de erosión y/o la degradación dentinaria de origen bacteriano, los odontoblastos forman la llamada dentina reparativa. Se piensa que estos odontoblastos surgen de la proliferación y diferenciación de una población precursora, que se encuentra en algún lugar dentro del tejido pulpar. Están siendo identificados continuamente en todos los tejidos conjuntivos del cuerpo humano nichos de células madre/progenitoras que juegan un papel fundamental en los procesos reparativos de lesiones. Ésta subpoblación celular puede representar solamente

el 1% de la población total, sin embargo, dan lugar a una gran cantidad de progenie diferenciada en respuesta a señales específicas extracelulares (Sloan & Waddington, 2009).

La localización de esos nichos de células madre en el caso de la pulpa dental es todavía objeto de debate. Los primeros estudios de Fitzferald y col. (1990) proponían que esas células progenitoras derivaban de una población de células similares a los fibroblastos y señalaban cierta contribución de células hijas derivadas de una población perivascular. Estudios posteriores han sugerido que los nichos de células madre/progenitoras residen predominantemente en regiones perivasculares de la cavidad pulpar, desde donde migran al sitio de la lesión. Sin embargo, la determinación de nichos por elevación en la expresión de Notch (señal molecular que controla el destino de las células madre) tras una lesión pulpar in vivo ha sugerido nichos adicionales por toda la pulpa (Sloan & Waddington, 2009).

Vemos como los estudios realizados sugieren que existe más de una población de células madre dentro de la pulpa dental que difieren en su estado embrionario, apuntando a la existencia de dos estirpes celulares, una con características de la cresta neural y otra de origen mesenquimal. Lo que puede explicar las diferencias observadas en las respuestas odontogénicas, como la proliferación y los patrones de la señal de Notch tras un trauma, después de varios trasplantes de células madre clonogénicas derivadas de una sola célula. Esto también se ha observado en las diferencias genotípicas y en los patrones de expresión de proteínas en células madre de la pulpa de dientes deciduos y del PDL (Sloan & Waddington, 2009).

Un grupo de investigadores (Gronthos y col., 2000) lograron aislar una población de células clonogénicas, con un alto índice de proliferación,

procedente de la pulpa dental de un ser humano adulto: les llamaron células madre de la pulpa dental (DPSCs: Dental Pulp Stem Cells). En este estudio comparan las DPSCs con las células estromales de la médula ósea humana (BMSSCs). Estas células tienen un inmunofenotipo muy similar *in vitro*, con la expresión de marcadores de células madre similares (incluyendo CD44, CD106, CD146, 3G5 y Stro-1 (Gronthos y col., 2000; Sloan & Waddington, 2009).

En estudios funcionales, las DPSCs produjeron una menor cantidad de nódulos calcificados y, al contrario que las BMSSCs, no dieron lugar a adipocitos (Gronthos y col., 2000). Ambos tipos de células expresan proteínas asociadas a la formación de tejido mineral, tales como fosfatasa alcalina, osteocalcina y osteopontina. Un patrón de expresión similar fue encontrado en células madre aisladas del PDL. Sin embargo, las DPSCs han mostrado una mayor proliferación y una tasa de potencial de crecimiento más alta (Sloan & Waddington, 2009).

Las células madre de la pulpa dental son definidas como células clonogénicas capaces de autorrenovarse y diferenciarse en múltiples líneas celulares (Gronthos y col., 2000). En este trabajo Gronthos y colaboradores (2000) estudian la capacidad de autorrenovación y de diferenciación en múltiples líneas celulares de las células madre de la pulpa dental de humano adulto (DPSCs). Las células aisladas fueron expandidas *ex vivo* y transplantadas en la superficie dorsal subcutánea de ratones inmunodeprimidos, y fueron capaces de producir dentina asociada con tejido conectivo similar al de la pulpa con odontoblastos alineados en la superficie dentinaria, tejido fibroso y vasos sanguíneos, sin hematopoyesis activa ni adipocitos (estructura similar al complejo dentino-pulpar). Las BMSSCs formaron hueso asociado a elementos medulares hematopoyéticos (hematopoyesis activa) y adipogénesis, con presencia de osteoclastos y una remodelación ósea normal. Posteriormente, las

células estromales fueron re-aisladas tras 3 meses desde el trasplante, e identificadas como humanas en el 85% de casos, lo que demostró el proceso de diferenciación. Fueron expandidas ex vivo, de nuevo, y re-trasplantadas en ratones inmunodeprimidos. Las células trasplantadas fueron capaces de diferenciarse de nuevo en odontoblastos y dar lugar a una estructura similar al complejo dentino-pulpar que contenía fibras de colágeno organizadas.

A nivel endodóntico, se ha conseguido regenerar pulpa y favorecer su revascularización en perros a partir de DPSCs. Una fracción celular CD146 y CD31 de pulpa dental de perro, tras ser expandidas in vitro y formar estructuras tubulares, fue implantada en una pulpa dental dañada, reparándola, con la consiguiente formación de vasos sanguíneos y células neurales a los 14 días del trasplante (Iohara y col., 2009).

Además, tras 5 semanas en cultivo con una mezcla de inducción adipogénica, se formaron grupos de lípidos y también fueron capaces de expresar marcadores de adipocitos (PPAR y LPL). También expresaron marcadores de precursores neurales y células glía (Nestina y GFAP) in vitro. Los resultados indicaron que había subpoblaciones celulares con diferentes índices de proliferación y potencial de desarrollo (Gronthos y col., 2002).

Debido a su origen embrionario en la cresta neural, las DPSCs tienen la capacidad de diferenciarse a neuronas, glía y oligodendrocitos (Sasaki y col., 2008; Rosenbaum y col., 2008). Estas células, cuando son cultivadas con un medio de inducción neural adecuado para neuronas, provoca en ellas un cambio de morfología y aumenta la expresión de marcadores neurales como β -III tubulina, GAD y NeuN. De igual modo son capaces de sobrevivir en el hipocampo de un ratón durante más de 10 días y seguir expresando marcadores neurales (Miura y col., 2003).

Estas células inician la diferenciación neural formando neuroesferas, siendo la neuroesfera la forma más primaria en este tipo de diferenciación. De hecho, disminuye su capacidad de adhesión y su nivel de proliferación. Al realizar el análisis de marcadores neurales, se puede comprobar la expresión de Nestina tanto en el interior como en la parte más externa de la neuroesfera, TUJ-1 (β -III tubulina), en la capa externa y S-100 exclusivamente en la interna. Estas neuroesferas de origen dental se organizan como las neuroesferas derivadas de células de cerebro, en distintas capas o niveles (Sasaki y col., 2008) (Fig. 16).

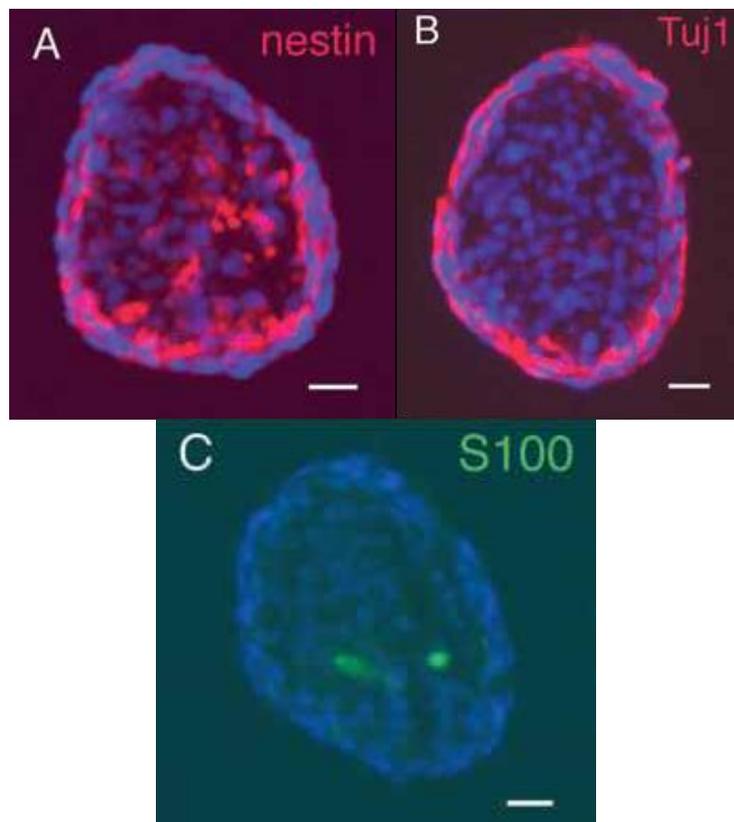


Figura 16.- Marcaje de Nestina, Tuj-1 y S-100 en neuroesferas derivadas de pulpa dental. Tomado de Sasaki y cols (2008).

Tras varias semanas de cultivo, si se aísla el RNA de estas células, expresan las proteínas NGF, GDNF y BDNF; lo que sugiere que las DPSCs pueden tener un efecto neuroprotector. Co-cultivadas con neuronas trigeminales, experimentan un cambio de morfología, con la aparición de prolongaciones citoplasmáticas de tipo dendritiforme que nos hacen recordar a células del sistema nervioso (Nosrat y col., 2001; Nosrat y col., 2004).

Las DPSCs favorecen la respuesta endógena neural. Esta habilidad se demostró en un estudio en el que células procedentes de pulpa dental de monos, fueron inyectadas en el hipocampo de ratones inmunodeprimidos y entre el 7-30 día post-implantación se observó un aumento de Nestina, β -III tubulina, GFAP e Iba1 en la zona de la inyección que en algún caso coexpresaban con BrdU. También se produjo un aumento de factores neurotróficos como CNTF, VEGF, FGF-2 y NGF (Huang y col., 2008).

En un estudio más reciente se inyectaron DPSCs, prediferenciadas neuronalmente en cultivo, en el fluido cerebroespinal de ratas de 3 días de edad. Adicionalmente se les indujo mediante frío una lesión en la corteza cerebral a las ratas. A las 4 semanas se analizaron los cerebros de las ratas y se hallaron DPSCs en las zonas normales de los progenitores neurales (zona subventricular, subcallosa y subgranular). Los análisis inmunohistoquímicos revelaron que las DPSCs expresaban marcadores neuronales tempranos (N-Tubulina, NF-M, NeuN, GFAP) y mostraron actividad electrofisiológica de neuronas funcionales. Además se observó un aumento en el marcaje inmunohistoquímico y la actividad electrofisiológica en la zona lesionada de la corteza cerebral (Király y col., 2011)

La presencia de un medio condrogénico afecta a este tipo de células, como a las de médula ósea, incrementándose la expresión de aggrecan y colágeno II y con

la formación de proteoglicanos derivados del cartílago, visibles mediante la tinción Alcian Blue (Cheng y col., 2008)

Además, las células madre de la pulpa dental tienen una capacidad de reparación cardiomiogénica similar a las células madre procedentes de la médula ósea y tejido adiposo (Ventura y col., 2007; Armiñán y col., 2008). El trasplante de DPSCs en ratas inmunodeprimidas a las que se les había provocado infarto de miocardio, mejora la función cardíaca, aumentando el número de vesículas cardíacas, y reduciendo la zona infartada (Gandía y col., 2008).

Las DPSCs cuando son cultivadas con un medio inductor de tipo miogénico, expresan de una forma intensa los marcadores miosina y myoD. También se ha comprobado la diferenciación miogénica de DPSCs in vivo, observándose resultados en la zona de los implantes con marcajes positivos de MyoD1 y MHC (Yang y col., 2007).

En otro estudio, Miura y colaboradores (2003) describen que en la pulpa remanente de los dientes deciduos humanos exfoliados contenía una población de células madre multipotenciales (SHED: Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth), que podían ser aisladas y expandidas ex vivo. La población aislada tuvo un mayor índice de proliferación que las DPSCs, expresaron STRO-1 y CD146 en superficie, dos marcadores de células madre mesenquimales también encontrados en DPSCs y en BMSSCs. En experimentos de cultivo fueron capaces de diferenciarse en odontoblastos funcionales, osteoblastos, adipocitos y células neurales. Inmunofenotípicamente expresaron marcadores neurales muy inmaduros, reflejando el importante papel que tienen las células de la cresta neural en la odontogénesis. Tras su inducción al linaje neural, con un medio inductor neurogénico durante 4 semanas, aumentaron la expresión de

GFAP, β -III tubulina y GAD. En los trasplantes realizados en ratones inmunodeprimidos, fueron capaces de inducir la formación de hueso, capaces de generar dentina, y de sobrevivir en el cerebro de ratón expresando múltiples marcadores neurales. Sin embargo, no fueron capaces de regenerar el complejo dentino-pulpar completo como las DPSCs en experimentos in vivo.

Esta investigación concluye que las SHED parecen ser un tipo de células más inmaduras que las DPSCs, con un gran índice de proliferación y potencial para diferenciarse en múltiples líneas celulares (Miura y col., 2003).

In vivo, células procedentes de pulpa dental de terceros molares (DPSCs) y de dientes temporales (SHED) coexpresan marcadores neurales (β -III tubulina y NF-M), cuando han sido trasplantadas en el mesencéfalo de embriones de ave. A las 24 horas del trasplante, las DPSCs y SHED se localizan en la zona normal de migración de células procedentes de la cresta neural, pero sin coexpresar marcadores neurales. A las 48 y 72 horas, las DPSCs y SHED provocan una marcada respuesta endógena neural. Estas células adquieren una morfología bipolar y coexpresan marcadores neurales como β -III tubulina y NF-M, a diferencia de los fibroblastos de la piel utilizados como grupo control, en los cuales no se halló ninguna co-expresión neural (Arthur y col., 2008).

Lo que es común en todos los casos es que la pulpa dental es una fuente tisular muy accesible, capaz de proveer de suficientes células madre multipotentes para que puedan ser utilizadas en un futuro como base en terapias celulares por su potencial en la aplicación clínica.

Otra fuente de células madre del diente es el folículo dental (DFSCs: Dental Follicle Stem Cells), saco de tejido conectivo que envuelve al diente no erupcionado. El folículo dental dará lugar al ligamento periodontal,

contribuyendo a la formación de los fibroblastos del ligamento que rodea el diente, y a células con capacidad de diferenciarse a odontoblastos, cementoblastos y osteoblastos (Morsczeck y col., 2005). Debido a su condición de vestigio embrionario estas células expresan Nestina y Notch-1. Tras su diferenciación con dexametasona aparecen depósitos cálcicos que se tiñen con Alizarín Red. In vivo son capaces de expresar la proteína osteocalcina y sialoproteína ósea tras un mes de trasplante en ratón inmunodeprimido, pero no de formar hueso o cemento (Morsczeck y col., 2005). Estudios más recientes avalan su diferenciación a osteoblastos/cementoblastos, adipocitos y neuronas in vitro (Yao y col., 2008; Morsczeck y col., 2008; Morsczeck y col., 2009).

6.- CÉLULAS MADRE EN EL LIGAMENTO PERIODONTAL

La presencia de múltiples tipos de células en el PDL dio lugar a la teoría de que este tejido podía contener una subpoblación de células progenitoras que mantuvieran la homeostasis tisular y la regeneración del tejido periodontal.

La regeneración periodontal es un mecanismo fisiológico continuo; en circunstancias normales, células y tejidos nuevos se forman de manera constantes para sustituir a los que maduran y mueren, esto se denomina reparación de desgaste, se manifiesta por actividad mitótica en el epitelio de la encía y el tejido conectivo del ligamento periodontal, formación de hueso y depósito continuo de cemento. La regeneración también sucede en el transcurso de la enfermedad periodontal destructiva; casi todos los tejidos gingivales y periodontales están en estados inflamatorios crónicos y en consecuencia son lesiones en cicatrización. La regeneración es parte de la cicatrización. No obstante, las bacterias y el exudado inflamatorio que producen, son lesivos para

las células y los tejidos en vías de regeneración y evitan que la cicatrización prosiga hasta su terminación (Carranza F.A. y cols., 2003).

La capacidad de las células del PDL para autorrenovarse y conseguir la regeneración periodontal implica que células progenitoras, y posiblemente células madre, existan dentro del mismo tejido del ligamento (Ivanovski y col. 2006).

En 2004, Seo y colaboradores publicaron un trabajo para demostrar que era posible que el PDL humano contuviera una población de células madre postnatales multipotenciales, que podían ser aisladas y expandidas in vitro, proveyendo un reservorio único de células madre de una fuente tisular accesible. Estas células fueron descritas como unas células con capacidad clonogénica, con alto índice de proliferación y con capacidad de regenerar tejido periodontal (Seo y col., 2004).

Experimentos previos han demostrado que la médula ósea humana y el tejido de la pulpa dental (en deciduos y permanentes) adultos contienen células madre capaces de diferenciarse en osteoblastos/odontoblastos, adipocitos, y células similares a las neurales. Estas células fueron caracterizadas como progenitores STRO-1 y CD146 positivas posiblemente derivadas de un nicho perivascular dentro del microambiente de la médula ósea y la pulpa dental. En el caso de las células madre adulta en el PDL (PDLSCs: Periodontal Ligament Stem Cells) son similares a otras células madre mesenquimales con respecto a la expresión de STRO-1, CD146, CD90, CD29, CD44, CD13, CD105 y CD166, por lo que las células madre del PDL pueden también derivar de una población de células perivasculares que conservan capacidad autorregenerativa y multipotencialidad (Seo y col., 2004; Trubiani y col., 2005; Nagatomo y col., 2006). Algunos estudios apuntan que la localización perivascular de las células

progenitoras sugiere que la sangre o la médula ósea podría ser fuente de esas células (Gould y col., 1977; McCulloch y col., 1987).

Debido a la heterogeneidad de las células madre mesenquimales STRO-1/CD146 positivas, es posible que en determinados experimentos se seleccione una población enriquecida de células madre que contendría células muy poco comprometidas. Sería necesario identificar marcadores específicos únicamente expresados por células madre de PDL, con enfoques moleculares y genéticos, para poder establecer una población celular más homogénea.

Después de aislar PDLSCs y someterlas a determinadas condiciones de cultivo, demostraron ser una población interesante por su capacidad para expresar un fenotipo mesodérmico, diferenciándose en células similares a cementoblastos, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, miofibroblastos y células formadoras de colágeno (Nagatomo y col., 2006; Techawattanawisal y col., 2007; Gay y col., 2007; Coura y col., 2008, Kadar y col., 2009).

La formación de nódulos calcificados fue en menor medida que en el caso de las DPSCs, SHED y BMSSCs. Las PDLSCs expresaron una serie de marcadores cementoblásticos/osteoblásticos, incluidos la fosfatasa alcalina, MEPE, sialoproteína ósea, osteocalcina y el receptor tipo I del TGF β , aunque no formaron dentina ni hueso, ni sus componentes hematopoyéticos asociados in vivo (Seo y col., 2004).

Para evaluar la capacidad de las PDLSCs para diferenciarse en cementoblastos funcionales, los trasplantes fueron realizados en la superficie dorsal subcutánea de 12 ratones inmunodeprimidos. Una estructura similar al cemento-PDL fue regenerada. Mostraron la capacidad para formar fibras de colágeno, como las

fibras de Sharpey, embebiéndose en el tejido similar al cemento, sugiriendo el potencial para regenerar el PDL-cemento in vivo (Seo y col., 2004).

Para evaluar si las PDLSCs eran capaces de contribuir a la reparación del tejido periodontal, las transplantaron en defectos periodontales creados quirúrgicamente en el área molar de mandíbula de ratas inmunocomprometidas (Seo y col., 2004). El resultado fue que en 2 de las 6 muestras recogidas estaban integradas y en algunas zonas se podían encontrar conectadas las superficies del hueso alveolar y del diente, indicando que este tipo de células están implicadas en el proceso de reparación del tejido periodontal y su potencial para regenerar la fijación del PDL.

Cuando fueron transplantadas en roedores inmunodeprimidos, mostraron la capacidad para generar una estructura similar al cemento-PDL y contribuir a la regeneración del tejido periodontal (Seo y col., 2004). Este hecho es muy importante, con relación a la terapéutica dirigida a la regeneración del tejido destruido por la enfermedad periodontal, una de las principales causas de la pérdida de piezas dentales (Ripamonti y col., 2009; McGuire y col., 2008; Yang y col., 2009).

Seo y colaboradores (2005) analizaron el efecto de la criopreservación sobre las células progenitoras adultas del ligamento periodontal observando, a través del marcador celular STRO-1, la presencia de estas células después de 3 a 6 meses de congelamiento de las muestras del ligamento periodontal en nitrógeno líquido. Adicionalmente, evaluaron el potencial de diferenciación después del trasplante in vivo, pudiendo visualizar la formación de estructuras similares al cemento, a dentina, a fibras colágenas y al ligamento periodontal. Se observó que las tasas de proliferación de colonias representaban solo el 40% de las

descritas por estudios previos en poblaciones de células progenitoras del ligamento periodontal.

En estudios posteriores se ha investigado el potencial de las PDLSCs para dar lugar a células propias del sistema nervioso. Para ello las PDLSCs humanas han sido cultivadas con diferentes medios descritos para células madre del sistema nervioso.

Cuando el medio estaba libre de suero y con EGF Y FGF2, éstas se han propagado como agregados celulares que recuerdan a las neuroesferas, modo por el cual proliferan las CMN. Este hecho refuerza la importancia de las células de la cresta neural en el desarrollo y capacidad regenerativas de las piezas dentarias. Al analizarlas descubrieron que expresaban marcadores de células madre neurales como Nestina y Sox-2, además de Emx2, un marcador temprano del desarrollo del neocortex, y A2B5, un antígeno neuronal de superficie (Widera y col., 2007).

Si eran tratadas con ácido retinoico, adquirirían una morfología neuronal y llegaban a expresar marcadores neuronales como la β -III-tubulina, Neurofilamento-M, Neurofilamento-H, MAP2, GAD67, Neurofilamento-L y Sinaptofisina (Widera y col., 2007).

Cuando eran cultivadas con suero y dependiendo de otros componentes del medio, la morfología era fibroblástica, tenían una gran proliferación y podían llegar a expresar diversos marcadores neurales (de la cresta neural, neuronales o gliales) en función del estudio (Widera y col., 2007; Coura y col., 2008; Kadar y col., 2009). Así, cuando las PDLSCs eran cultivadas con el 10% de suero bovino fetal durante 4 días, las células expresaban el marcador glial GFAP (Fig. 17). Y cuando eran cultivadas en un medio inductivo para células de la cresta neural,

se identificaba marcadores de cresta neural (HNK1, p75, nestina), neuronas (β -III-tubulina, Neurofilamento-M, proteína 2 asociada a microtúbulo y periferina) y células de la glía indiferenciadas (proteína cero), sugiriendo diferenciación ectodérmica. La expresión de periferina, una proteína específica de neuronas periféricas, confirma la existencia de células de origen en la cresta neural en el ligamento periodontal humano.

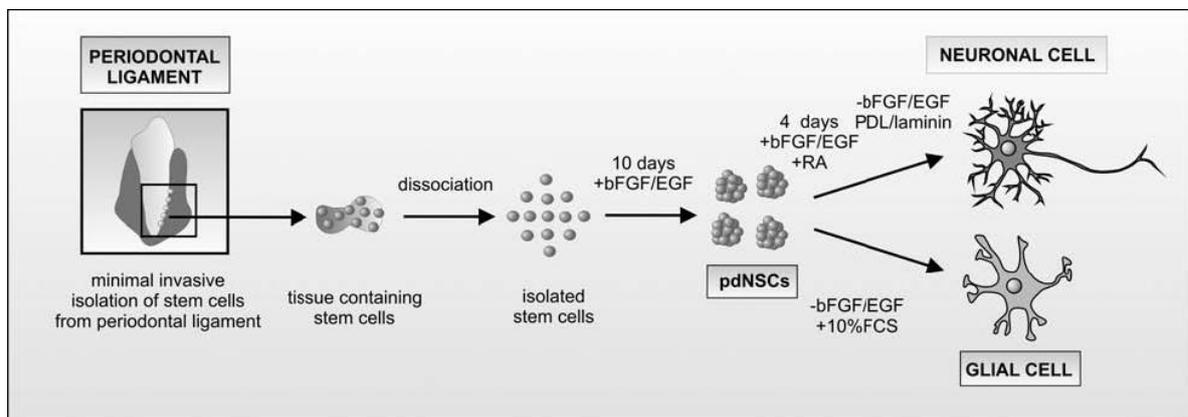


Figura 17.- Diagrama esquemático del protocolo de aislamiento y diferenciación en el estudio de Widera y colaboradores (2007).

Otros datos aportados han sido la migración de dichas células en respuesta a citoquinas inductoras de la migración de las CMN y la capacidad de dichas células para sobrevivir e integrarse en cultivos de corte hipocampal organotípico de rata y expresar marcadores neurales como Neurofilamento-L, β -III-tubulina, Sinaptofisina y GFAP. Además no se produjo osificación o formación de otras estructuras teratógenas en estos trasplantes organotípicos heterólogos (Widera y col., 2007).

En el caso de PDLSCs de rata, cuando eran cultivadas en un medio descrito para la formación de neuroesferas, con EGF, bFGF, LIF y libre de suero, y eran

analizadas, las esferas expresaron Nestina (marcador de precursor neural), GFAP (marcador de glía), Vimentina (marcador de glía radial y célula madre mesenquimal) y los factores de transcripción asociados a la cresta neural *Twist*, *Slug*, *Sox2* y *Sox9*. Cuando eran cultivadas con un medio con suero, y en función también de factores neurotróficos añadidos al mismo, expresaron diferentes marcadores neurales y mesenquimales (Neurofilamento-M, GFAP, CNPasa y MyoD). De esta manera, se demuestra que las células madre que componen las esferas en cultivo son capaces de diferenciarse en progenie neural y mesodérmica, incluidos nervios periféricos, glía y músculo esquelético, bajo ciertas condiciones de cultivo (Techawattanawisal y col., 2007).

También existen evidencias preliminares que sugieren la producción de insulina por parte de las células del PDL humanas, indicativo de generación de células de linaje endodermal de tipo endocrino (Huang y col., 2009).

El experimento de Seo y col., en 2004, fue el primero en demostrar que las PDLSCs adultas son clonogénicas, células altamente proliferativas y capaces de regenerar tejido similar al cemento-PDL, propiedades que las definen como células madre.

Como en el caso de las células madre de la pulpa dental, el PDL también se trata de una fuente muy accesible para la obtención de células madre. Además, el PDL de un único diente puede dar lugar a una gran cantidad de células madre debido a su capacidad para proliferar ex vivo.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Para la realización del siguiente trabajo se propusieron los siguientes objetivos concretos:

- 1- Aislamiento y amplificación de las células madre del ligamento periodontal a partir de dientes extraídos del adulto.
- 2- Definición de las características de estas células en un medio de cultivo basal descrito para células madre del ligamento periodontal, incluyendo morfología que presentan y el perfil inmunofenotípico.
- 3- Conocer parcialmente la potencialidad citogénica de estas células mediante el estudio de la respuesta de las células del ligamento periodontal oral a medios de cultivos definidos para células madre del sistema nervioso.
- 4- Conocer la potencialidad neural in vivo de las células madre del ligamento periodontal humano adulto para diferenciarse en neuronas y macroglía (astrocitos y oligodendrocitos) mediante trasplantes intracerebrales en ratones adultos.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- AISLAMIENTO DEL LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO.

Las extracciones dentales se realizaron en la Unidad de Salud Bucodental de los Centros de Salud de Murcia-Centro, Cieza y Abarán (Murcia). Se recogieron dientes definitivos (n=200) de pacientes mayores de 14 años con enfermedad periodontal avanzada o afectación por caries, por lo que la extracción estaba indicada. Para asegurar el anonimato de los donantes no se llevo a cabo la identificación de los dientes recogidos.

Inmediatamente tras la extracción, los dientes recogidos se depositaron en tubos (FALCON) con medio de cultivo celular, que constaba de: Minimum Essential Medium Eagle (MEM, SIGMA), mezcla de antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina; SIGMA) y antifúngicos (250 unidades/ml de anfotericina ; SIGMA).

Las muestras se conservaron entre 4°C y 8°C hasta poder ser procesadas.

- Extracción del Ligamento Periodontal Humano (hPDL):

Se trabajó en condiciones de esterilidad en una cabina de seguridad biológica vertical tipo II con filtro HEPA (Telstar).

1. Los dientes recogidos se colocaron en una placa de Petri que contenía PBS esteril (tampón fosfato salino 0.1 M, pH 7.4) y una mezcla de antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina; SIGMA) y antifúngicos (250 unidades/ml de anfotericina ; SIGMA).
2. A continuación, el ligamento periodontal se retiró cuidadosamente de la superficie de la raíz de los dientes, fundamentalmente del tercio medio, con la ayuda de unas pinzas y un bisturí (hoja nº15).
3. El ligamento periodontal (junto con el PBS) se trasladó a un tubo (Falcon) donde se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se procedió a realizar la disgregación enzimática y mecánica.

- Disgregación enzimática:

1. El precipitado celular fue sometido a una disgregación enzimática utilizando una solución de proteasas: Colagenasa tipo I (3mg/ml; Worthington Biochem) y dispasa (4mg/ml; GIBCO) durante 1 hora a 37°C.
2. Las proteasas se inactivaron añadiendo un volumen igual o mayor de medio de cultivo celular MEM muy frío.
3. Se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm.

4. Tras desechar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado celular en medio de cultivo celular MEM con anfotericina (250 unidades/ml).
5. Se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm.
6. Tras desechar el sobrenadante, se añadió medio de cultivo celular MEM con anfotericina (250 unidades/ml).

- Disgregación mecánica:

1. Con el fin de quitar los trozos más grandes de tejido remanente, se recogieron las células del tubo con una pipeta Pasteur y se depositaron sobre una malla estéril de 70 μ m (Falcon, BD), donde se tamizaron a través de la malla añadiéndose medio de cultivo MEM.
2. La solución resultante se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm.
3. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se añadió medio de cultivo celular MEM.

2.- RECUENTO Y ESTIMACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Antes de cultivar las células obtenidas, se hizo un recuento y estimación de la viabilidad celular mediante la utilización de la cámara de Neubauer o hemocitómetro y azul tripán. Este método se basa en el principio que las células vivas (viables) cuya membrana citoplasmática está intacta, no permite la entrada del colorante (azul tripán), permaneciendo refringentes. Mientras que

las células muertas (no viables), debido a que su membrana citoplasmática se encuentra rota, permite el paso de colorante tiñéndolas de azul (Fig. 18).

Los pasos a seguir eran los siguientes:

La suspensión celular se agitó y se depositaron 10µl de la misma en un tubo (Eppendorf), se añadió 10µl de la solución de azul tripán a la muestra anterior, agitándose la mezcla con la misma micropipeta y procurando no hacer burbujas. Se pegó el cubrecámara en el hemocitómetro humedeciendo los bordes del mismo, y se llenó con la mezcla anterior la cámara de aire que existe entre el cubreobjetos y el hemocitómetro (0.1mm³), por uno de los lados del mismo. Contamos en el microscopio de contraste de fase las células teñidas y no teñidas en una de las regiones de la cámara según la figura.

Para un recuento más exacto pueden contarse las cuatro regiones de la cámara y obtener la media aritmética de los recuentos. Se calculó el número de células totales y viables de la muestra según las siguientes fórmulas:

N° células viables/ml = n° células vivas contadas x 10000 x factor de dilución

N° células totales/ml = (n° células vivas contadas + muertas contadas) x 10000 x factor de dilución.

$\%Viabilidad = \frac{n^{\circ} \text{ de células viables}}{n^{\circ} \text{ de células totales}} \times 100$

Se multiplica el número de células por 10000, ya que el volumen correspondiente a la región contada en la cámara Neubauer es de 0.1mm^3 .

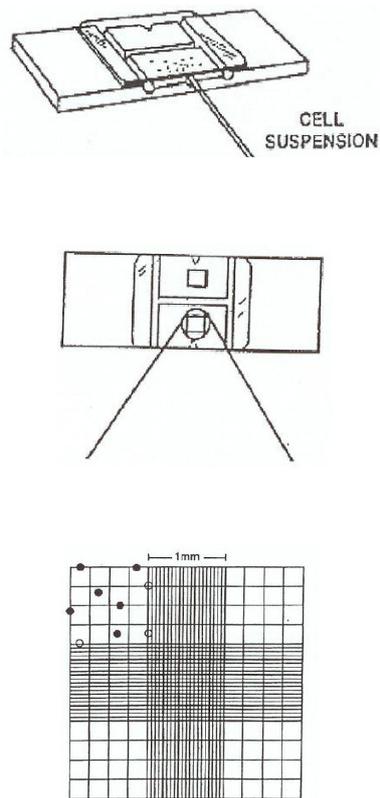


Figura 18.- Cámara Neubauer. Estimación de la viabilidad

Tras hacer el recuento y la estimación de la viabilidad, se ajustó la solución celular a 1×10^5 células/ml y se sembró 3ml de la misma por frasco de cultivo de 25 cm^2 (Sarstedt). Las células se cultivaron a 37°C , 5% de CO_2 y 95% de humedad.

3.- CULTIVO DE CELULAS DE LIGAMENTO PERIODONTAL.

Las células aisladas del ligamento periodontal crecen adheridas al plástico de la placa de cultivo. Para el cultivo primario de PDLSCs, su expansión y mantenimiento, se utilizó un medio de cultivo celular que fue denominado medio basal (MB). El medio basal estaba compuesto por α -MEM (Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification, SIGMA) al que se le añadieron los siguientes componentes:

<i>COMPONENTES</i>	<i>CONCENTRACIÓN</i>
Calf Serum fetal(GIBCO)	15%
Penicilina/ Estreptomicina(SIGMA)	100 μ g/ml
Glutamina(SIGMA)	2mmol/l
Ácido ascórbico 2 fosfato(SIGMA)	100 μ mol/l
Anfotericina(SIGMA)	2.5 μ l/ml

Tabla 1. Componentes del Medio Basal.

Con el objetivo de conseguir un número de células suficientes para llevar a cabo la investigación, semanalmente, cuando las células estaban cerca de llegar al estadio de confluencia, ocupando aproximadamente el 85% de la base del frasco de cultivo, se realizaba el siguiente proceso:

Se retiraba el medio de cultivo del frasco que contenían las células, se añadía Tripsina 0.25% + EDTA 1mM (disgregación enzimática) en cantidad suficiente para cubrir la superficie del mismo y se incubaba en una estufa para cultivos celulares a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad durante 5 minutos.

Posteriormente, se procedía a la neutralización de la actividad enzimática con igual o mayor cantidad de medio de cultivo frío. La mezcla era centrifugada

durante 10 minutos a 1000 rpm, se desechaba el sobrenadante y se resuspendían las células en 1 ml de medio de cultivo basal. Tras estimar la viabilidad, se ajustaba el número de células de la suspensión anterior, normalmente a 1×10^5 células/ml, y eran sembradas en un frasco de cultivos de mayor superficie que el anterior. Las células se incubaron en una estufa para cultivos celulares a 37°C , 5% de CO_2 y 95% de humedad. El medio de cultivo celular basal era cambiado con una frecuencia de 3 veces por semana aproximadamente.

En este trabajo de investigación se han utilizado dos tipos diferentes de medio de cultivo, el medio para cultivar células del hPDL (medio de cultivo celular basal), anteriormente descrito, y un segundo medio para la proliferación y mantenimiento de células madre neurales tanto del adulto como del embrión (medio de cultivo celular definido), cuyos componentes fueron:

- *Solución Hormonal 10X*: DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagles Medium/F12; Gibco) suplementado con:

<i>Solución de hormonas 10X</i>	<i>CONCENTRACIÓN</i>
GLUCOSA	0.48%
NaHCO_3	0.09%
HEPES	4mM
Apo-Transferrina (Sigma)	0.8mg/ml
Insulina (Roche Molecular Biochemicals)	0.2mg/ml
Putrescina (Sigma)	77 $\mu\text{g/ml}$
Progesterona (Sigma)	0.16 μM
Na_2SeO_3 (Sigma)	0.24 μM
Mezclar bien y filtrar. Alicuotar y guardar a -20°C	

Tabla 2. Componentes de la Solución de Hormonas 10X.

- *Medio completo*: DMEM/F12 suplementado con:

<i>Medio Completo (100ml)</i>	<i>CONCENTRACIÓN</i>
GLUCOSA	0.6%
NaHCO ₃	0.11%
HEPES	5mM
L-Glutamina (Gibco)	2mM
Solución de hormonas 10X	10%
P/S (penicilina/streptomina)	50 unidades/ml
EGF(Epidermal Growth Factor, Peppo-Tech)	20ng/ml
FGF2(Fibroblast Growth Factor,Peppo-Tech)	10ng/ml
BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma)	4mg/ml
HEPARINA (Sigma)	0.7 unidades/ml

Tabla 3. Componentes del medio completo.

4.- CONGELACIÓN DE LOS SUBCULTIVOS CELULARES

Para tener una reserva de células almacenadas que permitiera llevar a cabo la investigación, se procedió a la congelación de células en estado proliferativo. Los cultivos celulares se congelaron en medio de cultivo celular α -MEM (SIGMA) con 10% de DMSO (dimetil sulfóxido; SIGMA), que evita la cristalización del agua dentro del citoplasma. Se colocó 1 ml de suspensión celular (aproximadamente 1×10^6 células/ml) por cada vial, se le añadió DMSO y se agitó. Posteriormente, los viales fueron colocados en un recipiente (Cryo1; NALGENE) que contenía isopropanol y se guardó en una cámara frigorífica de -70°C durante 2 horas. La utilización de este recipiente permite la bajada de

temperatura de manera gradual, aumentando así la viabilidad celular. Tras 2 horas a -70°C , los viales fueron crioconservados en nitrógeno líquido.

5.- DESCONGELACIÓN DE LOS SUBCULTIVOS CELULARES

En los casos en los que los cultivos celulares fueron congelados, viales de 1×10^6 células fueron descongelados sumergiéndolos en un baño a 37°C . Posteriormente se añadía medio de cultivo celular a la suspensión y era centrifugada durante 10 minutos a 1000 rpm.

El precipitado celular resultante se resuspendía en 1ml de medio de cultivo celular basal. Tras estimar la viabilidad, las células eran sembradas en un frasco de cultivo y se incubaban en una estufa para cultivos celulares a 37°C , 5% de CO_2 y 95% de humedad.

6.- METODO DE TRANSFECCIÓN: ELECTROPORACIÓN

Técnica basada en la permeabilización transitoria de las membranas celulares a una gran variedad de moléculas solubles en agua, como los ácidos nucleicos. Esto se consigue sometiendo a las células vivas a pulsos eléctricos breves que inducen diferencias en el potencial transmembrana y abren poros transitorios en las membranas celulares.

Para este proceso se prepararon 2 millones de células procedentes del ligamento periodontal que fueron tripsinizadas, centrifugadas y resuspendidas en 150 μ l de medio de cultivo basal α -MEM. A esta suspensión celular se añadió 10 μ g de DNA plasmídico y la mezcla se dispuso en una cubeta de plástico, enfriada previamente a 4°C, con electrodos de aluminio separados 0.4 cm (Bio-rad®). Se aplicó un campo eléctrico de 40 μ s de duración, con unas condiciones de voltaje de 300v y una capacitancia de 500 μ F, utilizando para ello un Electroporador Gene Pulser-II (Bio-rad).

Una vez electroporada la suspensión celular, se centrifugó y volvió a sembrar en frascos de cultivo con medio de cultivo basal. Para llevar a cabo la selección de las células transfectadas, se utilizó el antibiótico higromicina B (Calbiochem) a una concentración de 100 μ g/ml.

7.- TRASPLANTES INTRACEREBRALES

Los animales usados para el desarrollo de la presente tesis han sido mantenidos en condiciones óptimas de supervivencia en el animalario del Instituto de Neurociencias de San Juan (Alicante). Todos los experimentos realizados para el desarrollo del presente trabajo se han hecho de acuerdo a la normativa de la comunidad europea (European Council Directive 86/609/EEC) para el cuidado de los animales de laboratorio.

Los ratones utilizados fueron 15 ejemplares hembras adultas de entre uno y dos meses de edad, tipo nude o desnudos (HSD: ATHYMIC NUDE-Foxn1 nu/un, autosómico recesivo, mutación en el cromosoma 11), que además de presentar su fenotipo desnudo o sin pelo, carecen de un timo funcional que permanece

rudimentario y produce un número reducido de células T maduras, por lo cual no rechazan tejidos alo y xenotrasplantados (Fig. 19).



Figura 19.- Ratón nude

Con el fin de mantener el animal anestesiado durante toda la manipulación, se le colocó una máscara anestésica con isofluorano.

El animal se colocó en un aparato estereotáxico KOPF modelo 900LS y se sujetaron con adaptadores de ratón para la boca y las barras interaurales, de modo que la cabeza quedara inmovilizada (Fig. 20).

Con el brazo estereotáxico se localizó el punto de la inyección en el hemisferio derecho: 2'1mm en posición caudal a la sutura *Bregma* y a 1'9mm a la derecha de la línea media sagital (Fig. 21). Se hizo una marca y con una fresa (minicraft) portando una broca de 1mm de diámetro se perforó el hueso craneal haciendo un agujero.

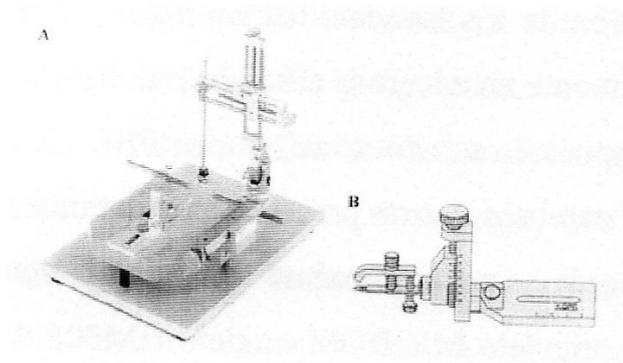


Figura 20.- Aparato estereotáxico KOPF modelo 900LS

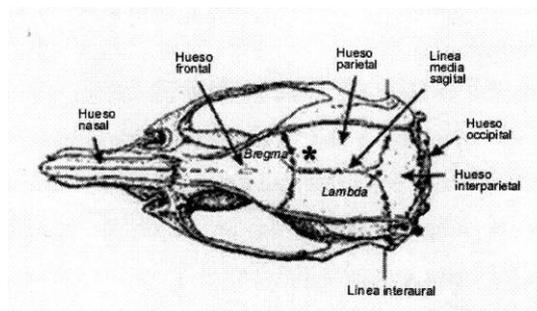


Figura 21.- Imagen del plano superior de un cráneo de ratón.

Se indican los puntos de intersección de las suturas craneales *Bregma* y *Lambda*, los ejes de la línea interaural y de la línea medio sagital, así como el nombre de los distintos huesos que lo forman. * indica el lugar de la inyección celular en el hemisferio derecho.

A través de este agujero, bajo la lupa (LEICA modelo MS 5) y con ayuda de una jeringuilla de punta biselada de 5 μ l (Hamilton), se inyectó 1 μ l (1×10^5 células) de suspensión celular, todo ello bajo condiciones asépticas. La ubicación de la inyección fue en el área parietal, a 2'1 mm de profundidad en el parénquima cerebral desde la dura madre (Franklin y Paxinos, 1997). Tanto la liberación de la suspensión celular como la extracción de la aguja se hicieron lentamente para evitar una difusión masiva sobre la superficie cerebral.

Los animales, después de la inyección, se recuperaron de la anestesia en una manta térmica a 37°C y posteriormente fueron devueltos a sus jaulas habituales donde se mantuvieron en condiciones óptimas hasta su sacrificio.

Tras 1 mes después de ser trasplantados, los animales fueron sacrificados mediante perfusión intracardiaca con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS. A continuación los cerebros fueron extraídos y posfijados para más tarde ser analizados inmunohistoquímicamente.

8.- PERFUSIÓN INTRACARDIACA Y POSFIJACIÓN DEL TEJIDO

Los animales experimentales fueron anestesiados con isofluorano y sacrificados mediante perfusión intracardiaca con PFA (Prolabo) al 4% en PBS. Para ello el protocolo seguido fue el siguiente:

1. Se abrió la cavidad torácica con ayuda de unas tijeras de disección finas dejando al descubierto el corazón, que aun mantenía ritmo cardíaco, aunque lento. Seguidamente se realizó un corte en la aurícula derecha abriendo así la circulación sanguínea en la porción venosa del circuito mayor. Esto permitió el adecuado flujo de las soluciones de perfusión.
2. A continuación se hizo una incisión en el ventrículo izquierdo con una aguja 30g (0'3mm x 13mm) conectada a una bomba peristáltica (Minipuls, Gilson) a través de la cual se inyectó a una velocidad de 6µl/s, primeramente 5 ml de PBS estéril para lavar la

sangre y evitar la formación de coágulos sanguíneos, y posteriormente 50ml de PFA al 4% en PBS.

3. Una vez fijados, los animales fueron decapitados con unas tijeras grandes y con ayuda de un bisturí se les cortó la piel, con unas tijeras finas rectas se les hizo en el cráneo un corte perpendicular y otro paralelo a la línea media sagital para, por último, con unas pinzas finas rectas abrir el resto del cráneo y dejar expuesto el cerebro que fue extraído, tras cortar el quiasma óptico, con unas pinzas curvas.
4. Tras ello, el cerebro fue posfijado toda la noche a 4°C inmerso en igual fijador y a continuación lavado con PBS (3x30 minutos). Posteriormente, los cerebros fueron crioprottegidos incubándolos primeramente en sacarosa (Prolabo) al 15% en PBS a R/T durante 8 horas y después en sacarosa al 20% en PBS a 4°C toda la noche.

9.- TÉCNICA PCR-RNA

- Aislamiento de RNA de células en cultivo.

Las células en proliferación se tripsinizaron y centrifugaron congelando a -70°C el sedimento celular para evitar la degradación de RNA. El aislamiento de RNA total se hizo según el protocolo del fabricante del kit comercial RNeasy Mini Kit (Quiagen).

- *Reacción de transcripción reversa.*

1-2µg de RNA total purificado se utilizó como molde para la obtención del cDNA utilizando 20 unidades de retrotranscriptasa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT; Promega), 50pmoles de hexameros al azar (Promega), 10 unidades de inhibidor de RNasa (RNAsin, Promega) y 1mM de desoxirribonucleótidos, en un volumen final de 20 µl. La reacción en reverso se hizo durante 90 minutos a 42°C, inactivando posteriormente la enzima AMV-RT durante 5 minutos a 90°C.

- *Amplificación de DNA.*

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en un termociclador (Biorad). Se utilizó como molde 1 µl de cDNA, desoxirribonucleótidos (dNTPs, Promega), oligonucleótidos (Bonsaitech) y el enzima Amplitaq (Perkin- Elmer). La amplificación de los fragmentos de DNA se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa.

- *Oligonucleotidos utilizados.*

MUSASHI-1: 5' GGCTTCGTCACCTTTCATGGACC 3'

5' GGGAAGTGGTAGGTGTAACCAG 3'

NESTINA: 5' GAAGTAGGGGATGAGGAGGC 3'

5' TAGAGACCTCCGTCGCTGTT 3'

OCT 3/4: 5' GAGGAGTCCCAGGACATCAA 3'

5' TCTCCAGGTTGCCTCTCACT 3'

SLUG: 5' CAGTCCAAGCTTTCAGACCC 3'
5' CAGTGAGGGCAAGAAAAAGG 3'

SOX9: 5' AGAAGGACCACCCGGATTAC 3'
5' AAGTCGATAGGGGGCTGTCT 3'

TWIST: 5' ATTCAAAGAAACAGGGCGTG 3'
5' CTATGGTTTTGCAGGCCAGT 3'

SOX2 5' CATCACCCACAGCAAATGAC 3'
5' TTTTTCGTCGCTTGGAGACT 3'

10.- DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

10.1.- IN VITRO

10.1.1.- *Inmunocitoquímica (ICC)*

- Preparación del sustrato de adhesión para llevar a cabo la inmunocitoquímica.

Con el fin de facilitar su manipulación, las células eran sembradas sobre cubreobjetos de cristal tratados con un sustrato, sobre los que posteriormente la inmunocitoquímica era realizada.

La preparación del sustrato de adhesión se realizaba mediante el siguiente protocolo:

Se sumergía en etanol al 70% cubreobjetos de cristal esféricos de 12mm de diámetro. Posteriormente, los cubreobjetos eran secados con papel de filtro y colocados en una placa petri de cristal estéril donde se autoclavaron a 120°C durante 20 minutos para su esterilización.

A continuación, en condiciones estériles, se colocaba un cubreobjeto estéril en cada pocillo de una placa estéril para cultivo celulares de 24 pocillos. 2 µl de H₂O miliQ estéril eran depositados en el fondo de cada pocillo, se colocaba un cubre estéril centrado en cada uno de los mismos y tras 5 minutos el cubreobjeto quedaba adherido al fondo.

Utilizamos como sustrato de adhesión para las células:

- Poli-L-Lisina 0,01% (SIGMA)

Se depositaban 100µl de suspensión en cada pocillo, se incubaba la placa en una estufa a 37°C durante 10 minutos, se procedía a lavar 3 veces con H₂O miliQ estéril y a quitar el exceso de sustrato. Posteriormente se sembraban 100µl de suspensión celular en cada cubre (aprox. 1×10^4 células) y se incubaba en una estufa para cultivos celulares a 37°C y con el 5% de CO₂.

- La técnica llevada a cabo fue la siguiente:

1. Las células se fijaron con paraformaldehido (PFA, Merck) al 4% (p/v) en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.4 durante 10 minutos a temperatura ambiente.
2. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS (pH 7.4).

3. Después de la fijación, las células se bloquearon durante 2 horas como mínimo con una solución de PBS , conteniendo 10% de suero de caballo (HS, *Horse Serum*, Gibco) en presencia de un detergente no iónico (Tritón X-100, Merck) al 0.25%, para bloquear la posible unión inespecífica de los anticuerpos.
4. Las células se incubaron durante toda la noche con el primer anticuerpo disuelto en una solución de PBS conteniendo 0.25% de Tritón y suero de caballo al 1%.
5. Tras la incubación del primer anticuerpo, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con la misma solución en la que se disolvió el anticuerpo primario.
6. Posteriormente, se llevaba a cabo el proceso de revelado, según la técnica más adecuada en cada caso, y los cubreobjetos eran montados sobre portaobjetos con Moviol, Eukitt o Glicerol según el caso.

Técnicas de revelado:

A.- Tinción a través de reacción enzimática:

Se incubaba el anticuerpo secundario biotinilado indicado (de nuevo en la misma solución) durante 2 horas a R/T, todos ellos preparados a una concentración de 1:300. Después de 3 lavados del anticuerpo secundario con PBS conteniendo 0.25% Tritón, las células se incubaron durante una hora con un complejo de avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vector) preparado a una concentración de 1:400 en PBS. La avidina (glicoproteína de la clara de huevo) muestra una alta afinidad por la biotina con la que se han conjugado los anticuerpos secundarios.

Se realizaron 3 lavados con PBS y, posteriormente, otros 3 con tampón Tris 0.05M. A continuación, revelamos con diaminobencidina (DAB) a una

concentración de 0.033% en tampón Tris 0.05M y H₂O₂ al 0.0018%. El H₂O₂ es utilizado como sustrato de la enzima peroxidasa del complejo ABC y así, indirectamente a la avidina, amplificando la señal, provocando la aparición de un precipitado negro allí donde está unido el primer anticuerpo. El tiempo de revelado depende del anticuerpo primario utilizado y se para la reacción mediante lavados con TRIS 0.05M (2x10minutos).

B.- Tinción inmunofluorescente:

La inmunofluorescencia permite realizar múltiples tinciones con varios anticuerpos primarios a la vez, siempre y cuando estén generados en distintas especies e incluso, combinar éstas, con un marcaje nuclear de las células con Hoechst 33258 (0.2 µg/ml en PBS, Molecular Probes) o DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol, 10µg/ml en PBS, Molecular Probes), sondas que se intercalan en el DNA y que tras su excitación nos permite visualizar los núcleos de todas las células.

La diferencia con la técnica anterior radica en que después de lavar el primer anticuerpo, se añaden los anticuerpos secundarios fluorescentes que están conjugados a distintos fluorocromos. En este estudio se han utilizado Alexa Fluor® 488 (anti-ratón o anti-conejo, 1:500; Molecular Probes), Alexa Fluor® 594 (anti-ratón o anti-conejo, 1:500; Molecular Probes). En el caso de que no estén conjugados, se incubarán en primer lugar los anticuerpos secundarios biotinilados como ya ha sido descrito y, posteriormente, la muestra se incubará en la oscuridad durante 1 hora con estreptavidina (proteína microbiana que no contiene carbohidratos) conjugada con fluoresceína (verde; Vector), texas red (rojo; Vector) o Cy3 (rojo; GE Healthcare) preparada a una concentración 1:300 en PBS. La estreptavidina muestra una afinidad específica por la biotina (vitamina que forma el coenzima o grupo proteico de varios enzimas que

transfieren grupos carboxilo) usada para conjugar los anticuerpos secundarios correspondientes.

A continuación, se hacen lavados con PBS.

- Anticuerpos utilizados:

La caracterización de los distintos fenotipos celulares presentes en los cultivos analizados se realizó por medio de técnicas inmunocitoquímicas basadas en la afinidad específica entre el antígeno y el anticuerpo. Para ello se dispuso de una serie de anticuerpos primarios:

- Monoclonal de ratón **anti-nestina** (isotipo IgG; Chemicon) (1:100), que reconoce un filamento intermedio específico de células neuroepiteliales indiferenciadas (Frederiksen y McKay, 1988; Gritti y col., 1996; Fuchs y Weber, 1994).
- Monoclonal de rata **anti-GFAP** (isotipo IgG; Calbiochem) (1:500), que reconoce la proteína ácida glial fibrilar presente en filamentos intermedios que se expresa en los astrocitos (Raff y col., 1979). Generalmente considerado específica de la glía pero los progenitores que lo expresan se ha demostrado que son la principal fuente de la neurogénesis (García y col., 2004).
- Monoclonal de ratón **anti- β -tubulina(BIII) (Tuj-1)** (isotipo IgG; Covance) (1:1000), reconoce la proteína β -tubulina isotipo III, dímero que se asocia a la α -tubulina para formar los microtúbulos, siendo marcador específico de neuronas desde los primeros estadios

de su diferenciación, así como de sus prolongaciones axónicas (Burgoyne y col., 1988)

- Monoclonal de ratón **anti-MAP2** (isotipo IgG; Chemicon) (1:500) que reconoce los microtúbulos de los árboles dendríticos de las neuronas cerebrales (marcador de neuronas) (Zhang y col., 2004).
- Policlonal de conejo **anti-NG2** (isotipo IgG; Chemicon) (1:100), que reconoce un proteoglicano condroitín sulfato presente en los progenitores oligodendrogiales (Levine y Nishiyama, 1996).
- Monoclonal de rata **anti-CD90** (isotipo IgG; BD Pharmingen) (1:500), marcador de superficie celular asociado a células madre mesenquimales. Además es expresado en gran variedad de células incluyendo fibroblastos humanos, neuronas, células madre hematopoyéticas, células endoteliales, células T murinas y en células de hígado de ratas (Mayani y col., 1994; Isacke y col., 2000).
- Monoclonal de rata **anti-CD44** (isotipo IgG; BD Pharmingen) (1:500), marcador de superficie de células madre mesenquimales. También se expresa en la mayoría de los linfocitos, y en monocitos, granulocitos, timocitos y fibroblastos (Isacke y col., 2000).
- Monoclonal de ratón **anti-O4** (isotipo IgM; Chemicon) (1:500), que reconoce glicolípidos componentes de la membrana de los oligodendrocitos (Reynolds y Hardy, 1997).

- Monoclonal de ratón **anti-MAP1b** (isotipo IgG; Abcam) (1:350), su expresión es generalmente escasa en las fibras axonales en desarrollo, moderada en los axones maduros y alta en dendritas en desarrollo y maduras (Bloom y col., 1984; Riederer y Matus, 1985).
- Policlonal de conejo **anti-Sinaptofisina** (isotipo IgG; ZymedLaboratories) (1:200), que reconoce una glicoproteína de transmembrana expresada por la mayoría de células neuronales, neuroendocrinas y sus neoplasias (Wiedenmann y col., 1985).
- Policlonal de conejo **anti-GABA** (isotipo IgG; Sigma) (1:300), que marca interneuronas gabaérgicas inhibitoras del Sistema Nervioso (Trottier y col., 1989).
- Policlonal de conejo **anti-GAD65/67** (isotipo IgG; Sigma) (1:300), reconoce dos formas moleculares de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD65 y GAD67) en neuronas gabaérgicas (Podrygajlo y col., 2009).
- Monoclonal de rata **anti-CD34** (isotipo IgG; eBiosciencie) (1:100), reconoce selectivamente las células progenitoras hematopoyéticas y el endotelio de pequeños vasos de varios tejidos (Poblet y col., 1994).
- Monoclonal de rata **anti-CD117** (isotipo IgG; BDBiosciencie) (1:100), marcador de células madre hematopoyéticas (Ikuta y col., 1992).

- Policlonal de conejo **Anti-p75** (IgG; Chemicon) (1:300), reconoce el receptor de baja afinidad para neurotrofinas, una subfamilia de factores de crecimiento que actúan fundamentalmente sobre algunos tipos específicos de neuronas (Casaccia-Bonnet y col., 1999).
- Monoclonal de ratón **Anti-NeuN** (isotipo IgG; Chemicon) (1:300), marcador específico de núcleos neuronales (Mullen y col., 1992).
- Policlonal de conejo **Anti-GAT-1**, (isotipo IgG; Chemicon) (1:300), reconoce el transportador predominante neuronal GABA GAT1 que se localiza en los axones y terminaciones nerviosas GABAérgicas (Guastella y col., 1990).
- Policlonal de cabra **Anti-Chat**, (isotipo IgG; Chemicon) (1:1000), marcador específico de neuronas colinérgicas (Houser y col., 1983).

Anticuerpo	Mc/Pc	Especie	Isotipo	Dilución	Casa Comercial
Nestina	Mc	Ratón	IgG	1:100	Chemicon
GFAP	Mc	Rata	IgG	1:500	Calbiochem
Tuj-1	Mc	Ratón	IgG	1:1000	Covance
MAP2	Mc	Ratón	IgG	1:500	Chemicon
NG2	Pc	Conejo	IgG	1:100	Chemicon
CD90	Mc	Rata	IgG	1:500	BD Pharmingen
CD44	Mc	Rata	IgG	1:500	BD Pharmingen

O4	Mc	Ratón	IgM	1:500	Chemicon
MAP1b	Mc	Ratón	IgG	1:350	Abcam
Sinaptofisina	Pc	Conejo	IgG	1:200	ZymedLaboratories
GABA	Pc	Conejo	IgG	1:300	Sigma
GAD65/67	Pc	Conejo	IgG	1:300	Sigma
CD34	Mc	Rata	IgG	1:100	eBiosciencie
CD117	Mc	Rata	IgG	1:100	BDBiosciencie
p75 ^{NTR}	Pc	Conejo	IgG	1:300	Chemicon
NeuN	Mc	Ratón	IgG	1:300	Chemicon
GAT-1	Pc	Conejo	IgG	1:300	Chemicon
Chat	Pc	Cabra	IgG	1:1000	Chemicon

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados en inmunocitoquímica.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios biotinilados (Vector):

Anticuerpo	Reconoce	Dilución
Goat Anti-Mouse (GAM)	Ratón	1:300
Goat Anti-rat	Rata	1:300
Rabbit Anti-Goat	Cabra	1:300
Goat Anti-Rabbit (GAR)	Conejo	1:300

Tabla 5. Anticuerpos secundarios.

- Imágenes y análisis de datos:

El análisis y la fotografía de las muestras fueron llevados a cabo con un microscopio invertido LEICA CTR 6000 equipado con una cámara digital LEICA DC500 o con un microscopio LEICA DM IRB equipado con una cámara digital LEICA DFC350FX (Nussloch, Alemania). El análisis estadístico se realizó

utilizando el software Prophet (NIH). Los datos son la media \pm error estandar de la media (E.S.M) de 3 medidas independientes (se contabilizaron en cada una de ellas cinco campos por pocillo).

10.1.2.- Electroforesis y Western Blotting.

La extracción de proteínas se realizó mediante la lisis de células que habían sido tripsinizadas previamente. El tampón de lisis está compuesto de 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5mM EDTA, 1mM EGTA. A esta solución se añadió inhibidores de proteasas (mini EDTA free protease inhibitor cocktail tablets, Roche). Tras 30 minutos en hielo, las muestras se centrifugaron y se midió la concentración de proteínas en el sobrenadante por el método del Ácido Bicinchonínico (BCA protein assay, Bio-Rad). A continuación se llevó a cabo la electroforesis para separar las distintas proteínas celulares en función de su peso molecular (gel de acrilamida/bisacrilamida). Las muestras se resuspendieron en tampón de carga: 10% glicerol, 2% SDS (de "sodium dodecyl sulfate", SIGMA), 62 mM tris-HCl pH 6.8, 7.5 mM EDTA, 5% β -mercaptoetanol y 0.005 azul de bromofenol. Se cargó cada pocillo con 30 μ gr de proteína total y se realizó una electroforesis en presencia de SDS según el método de Laemmli (Laemmli 1970) en geles de poliacrilamida/SDS del 8%. Tras la electroforesis, los geles de poliacrilamida se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m de tamaño de poro (Schleicher & Schuell). La inmunodetección de las proteínas Nestina (200kDalton) y b-actina (42kDalton) se realizó según el método de Towbin (Towbin y cols, 1979). Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-Nestina (1:1000, Chemicon), anticuerpo policlonal generado en conejo y anti-b-actina (1:7000, Sigma), anticuerpo monoclonal generado en ratón. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-rabbit (PI-1000, Vector) y anti-mouse (PI-2000, Vector). Los anticuerpos secundarios estaban

acoplados a peroxidasa para su posterior detección por quimioluminiscencia, utilizando el sistema de revelado ECL (Amersham). Se utilizó el sistema de detección de Western blot (Amersham Biosciences Europe) usando el sistema de detección de geles Fujifilm Bioimage-analyzer LAS-1000 Plus.

10.2.- IN VIVO: INMUNOHISTOQUÍMICA

Para analizar los trasplantes celulares, los cerebros se diseccionaron frontalmente (40 micras de grosor) en un microtomo de congelación, y las secciones (cortes flotantes) se mantuvieron a - 20°C sumergidas en solución crioprotectora (1.256gr de NaH₂PO₄, 4.36gr de Na₂HPO₄ hasta 320 ml de H₂O y a esta solución se añade 240 ml de etilenglicol y 240 ml de glicerol).

La caracterización de los distintos fenotipos celulares presentes en los tejidos analizados se realizó por medio de técnicas inmunohistoquímicas basadas en la afinidad específica entre el antígeno y el anticuerpo. Para ello se dispuso del anticuerpo primario marcador de las células trasplantadas: Anticuerpo anti-GFP (proteína verde fluorescente) (isotipo IgG; Molecular Probes) para amplificar la señal y poder localizarlas mejor. Así como una batería de anticuerpos primarios para los distintos linajes de las células del sistema nervioso central. En el caso del anti-GFP, el anticuerpo era policlonal de conejo (1:500) o monoclonal de ratón (1:300) en función del segundo anticuerpo primario utilizado en la inmunohistoquímica doble.

a. Detección por revelado con DAB.

Las secciones de cerebro, que se encontraban en solución crioprotectora, fueron lavadas con PBS. Para evitar señales inespecíficas, antes de bloquear se eliminó la actividad peroxidasa endógena del tejido, incubando en PBS con 3 %H₂O₂

(agua oxigenada, Foret) y 10 % metanol (Panreac) durante 20 minutos y se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS.

Después de los 3 lavados con PBS, se procedió con los mismos pasos descritos en inmunocitoquímica revelando mediante reacción enzimática. Al final, los cortes flotantes eran montados en portaobjetos de cristal Superfrost.

Esta técnica se utilizó llevando a cabo una inmunohistoquímica simple, utilizando el anticuerpo policlonal de conejo anti-GFP y revelando mediante reacción enzimática, para observar la situación de las células trasplantadas en el cerebro de cada uno de los ratones operados.

Las secciones que fueron reveladas con DAB, fueron teñidas con cresil violeta (1% w/v cresil violeta acetato en 100% de etanol, SIGMA) para una mejor visualización de la organización cerebral en sus componentes neuronales. Los portaobjetos con las secciones eran sumergidos en 70% de etanol, posteriormente en agua destilada y seguidamente en cresil violeta al 1% durante 3 minutos. Después de lavar con agua destilada, las secciones eran deshidratadas gradualmente en 70, 96 y 100% de etanol y después aclaradas en Xilol durante 15 minutos. Finalmente los portaobjetos eran cubiertos por cubreobjetos (Menzel-Glaser) con medio de montaje Eukitt y analizadas mediante un microscopio LEICA DM IRB equipado con una cámara digital LEICA DFC350FX.

b. Detección por Inmunofluorescencia.

En todos los demás casos se realizó una inmunohistoquímica doble con marcadores de las células trasplantadas y marcadores de células pertenecientes

a los distintos linajes neurales, y revelando mediante técnicas de inmunofluorescencia.

El protocolo utilizado en la inmunohistoquímica doble fue el siguiente:

1. Las secciones de cerebro, que se encontraban en solución crioprotectora, fueron lavadas con PBS (3x10minutos).
2. Posteriormente se procedió al bloqueo, durante 2 horas como mínimo con una solución de PBS, conteniendo 10% de suero de caballo (HS, *Horse Serum*, Gibco) en presencia de un detergente no iónico (Tritón X-100, Merck) al 0.25%, para bloquear la posible unión inespecífica de los anticuerpos.
3. Las secciones se incubaron durante toda la noche con el primer anticuerpo (Anticuerpo policlonal o monoclonal anti-GFP) disuelto en una solución de PBS conteniendo 0.25% de Tritón y suero de caballo al 1%.
4. Tras la incubación del primer anticuerpo, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con la misma solución en la que se disolvió el anticuerpo primario.
5. Posteriormente se incubó durante 2 horas el anticuerpo secundario goat anti-rabbit o goat anti-mouse (1:300, de nuevo en la misma solución), que se une a anticuerpos primarios policlonales generados en conejo o monoclonales generados en ratón respectivamente, y que están conjugados con un fluorocromo.
6. Se realizaron 3 lavados del anticuerpo secundario en PBS conteniendo 0.25% Tritón (3x10minutos.).
7. A continuación las muestras se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios para los distintos linajes neurales (tabla 6) a las

concentraciones indicadas preparados en una solución de PBS conteniendo 0.25% de Tritón y suero de caballo al 1%

8. Tras 3 lavados de 10 minutos con la misma solución, las secciones fueron incubados 2 horas con los anticuerpos secundarios correspondientes.
9. Posteriormente se realizó el revelado mediante tinción inmunofluorescente.

Las secciones en las que se llevó a cabo inmunofluorescencia, no se sometieron al proceso de tinción con Cresil Violeta sino que directamente se montaron con el medio de montaje Mowiol/NPG. Para un estudio más detallado de los resultados, las muestras fueron analizadas a través de un microscopio láser confocal LEICA modelo TCS-NT equipado con un láser de Argón de excitación máxima entre 458nm y 514nm (Servicio de Microscopía del Inst. de Neurociencias, Alicante).

Los anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica fueron:

- Monoclonal de rata **anti-AA3-PLP** (isotipo IgG; cedido por el Dr. B. Zalc) (1:25), que reconoce la proteína proteolipídica citoplasmática presente en los oligodendrocitos maduros.
- Policlonal de cabra **anti-DobleCortina (DCX)** (isotipo IgG; Sta Cruz Biotechnology) (1:100), que reconoce un péptido localizado en el terminal carboxilo del Doblecortin de origen humano (proteína altamente expresada en el desarrollo cerebral que interviene en la motilidad celular) (Bedard y Parent, 2004).

- Policlonal de conejo **anti-NF-M** (isotipo IgG; Chemicon) (1:300), reconoce los filamentos intermedios que se encuentran en las células neuronales (Lariviere y Julien, 2004).

También fueron utilizados el anti-TUJ-1, anti-MAP2, anti-GFAP, anti-NG2 y anti-GABA (en este caso, se aumentó la concentración a 1:300), ya descritos anteriormente.

Anticuerpo	Mc/Pc	Especie	Isotipo	Dilución	Casa comercial
Tuj-1	Mc	Ratón	IgG	1:500	Covance
PLP	Mc	Rata	IgG	1:25	Dr. B. Zalc
DCX	Pc	Cabra	IgG	1:100	SC Biotechnology
MAP2	Mc	Ratón	IgG	1:500	Chemicon
GFAP	Mc	Rata	IgG	1:500	Calbiochem
NG2	Pc	Conejo	IgG	1:100	Chemicon
GABA	Pc	Conejo	IgG	1:300	Sigma
NF-M	Pc	Conejo	IgG	1:300	Chemicon

Tabla 6.- Anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica.

Los anticuerpos secundarios (Vector) utilizados en inmunohistoquímica fueron:

Anticuerpo	Reconoce	Dilución
Goat Anti-Mouse (GAM)	Ratón	1:300
Goat Anti-rat	Rata	1:300
Rabbit Anti-Goat	Cabra	1:300
Goat Anti-Rabbit (GAR)	Conejo	1:300

Tabla 7. Anticuerpos secundarios utilizados en inmunohistoquímica.

RESULTADOS

RESULTADOS

1.- AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL

En extensiones sobre portaobjetos de ligamento peridontal humano (hPDL) realizadas inmediatamente después de su extracción, fijadas con PFA al 4% y teñidas con Cresil Violeta, podemos observar dos tipos de poblaciones celulares: células fusiformes de aspecto fibroblástico y alineadas en paralelo a abundantes fibras de colágena, así como acúmulos de células poligonales (Fig. 22), que pueden corresponderse con fibroblastos y células epiteliales de Malassez, respectivamente (ver introducción; Fig. 3). Por lo tanto, en nuestros cultivos de hPDL están representadas estas dos poblaciones celulares.

Se realizó el aislamiento de células procedentes del hPDL siguiendo la metodología propuesta por Yokoi y col., (2007) y Wada y col., (2009). Se

aislaron células del tejido periodontal humano por su capacidad para adherirse a superficies plásticas. Una vez aisladas, las células se cultivaban en medio de cultivo basal al que se añadía un 15% de suero fetal bovino (descrito en Material y Métodos). Cuarenta y ocho horas después de su aislamiento, ya se podían observar pequeñas colonias de células de tipo fibroblástico adheridas a la base del frasco de cultivo que proliferaban. Su aspecto morfológico homogéneo sugiere que los dos tipos de células observadas en el PDL (fibroblásticas y epiteliales) han derivado en cultivo en el mismo tipo de morfología celular o bien se ha seleccionado un único tipo, desapareciendo el otro.

Se analizó, mediante la técnica de RT-PCR, la expresión de genes marcadores de células madre y genes marcadores de células de la cresta neural, tanto en tejido hPDL como de las células en cultivo aisladas de este tejido.

Como resultados se encontró que en el hPDL era posible detectar la expresión de RNAm de genes marcadores de células madre (Oct3/4 y Nestina), y de genes marcadores de células de la cresta neural (Slug, Twist). En células en cultivo aisladas del hPDL era posible detectar la expresión de RNAm de los genes marcadores de células madre Oct3/4, Nestina, Sox2 y Musashi-1(MLS1), y también de los genes marcadores de células de la cresta neural Slug, Twist y Sox9 (Fig. 23A-B). Los análisis de Western Blot verificaron la expresión de Nestina en células en cultivo (Fig. 23C) (Tabla 8).

Marcadores	RT-PCR	WESTERN BLOT
Oct ³ / ₄	+	SD
Nestina	+	+
Sox-2	+	SD
MLS-1	+	SD
Slug	+	SD
Twist	+	SD
Sox-9	+	SD

Tabla 8.- Resultados de la RT-PCR y Western Blot de las células derivadas del hPDL en MB.

FIGURA 22

Figura 22.- Extensión de hPDL.

(A, B) Extensión de hPDL, mostrando el aspecto del tejido más abundante en la extensión: células fusiformes en cadenas lineales y mezcladas con abundantes fibras colágenas; (C, D) De forma esporádica, se pueden identificar grupos de células epiteliales que pueden corresponderse con los "Restos Epiteliales de Malassez", que representan remanentes de la vaina radicular epitelial de Hertwig.

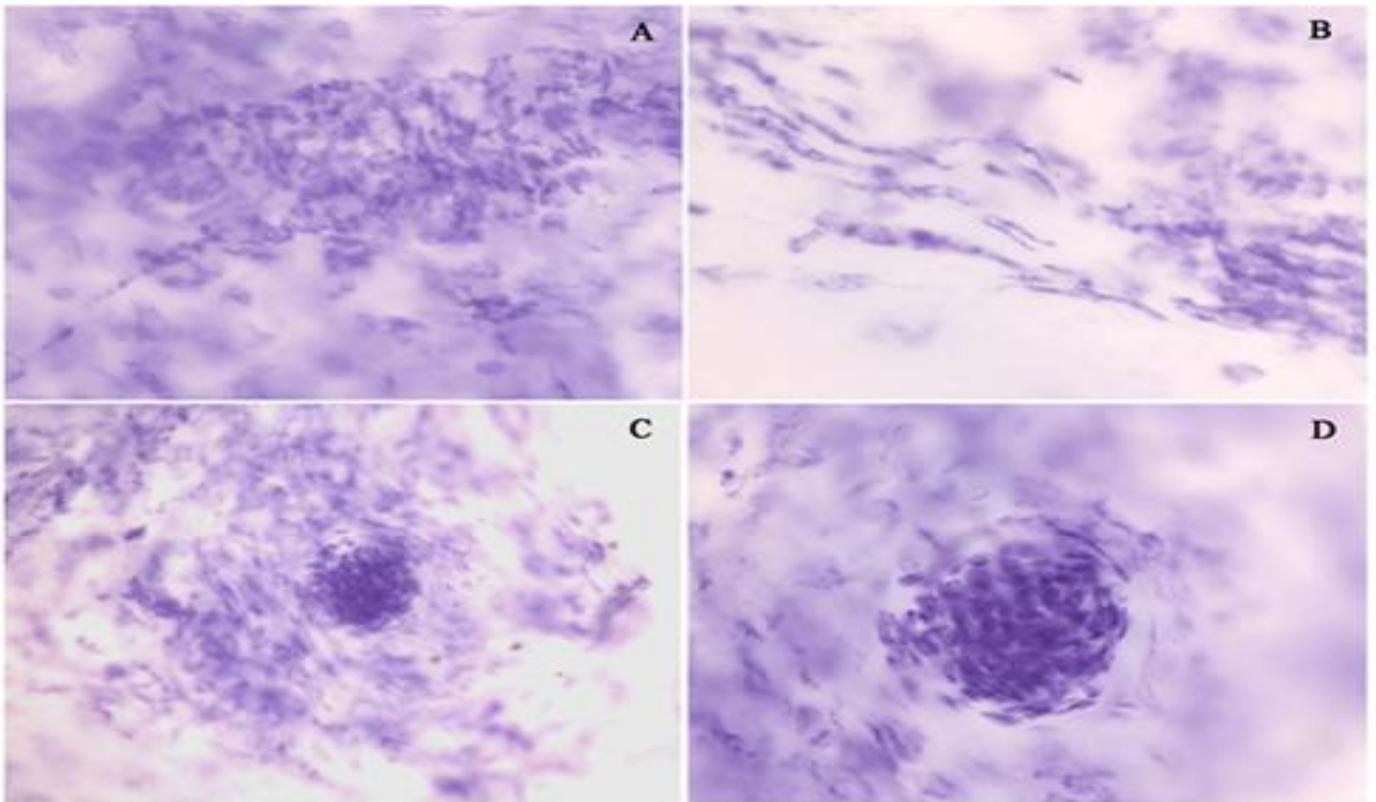


Figura 22.- Extensión de hPDL.

FIGURA 23

Figura 23: Análisis del patrón de expresión genética mediante PCR y Western Blot del hPDL y sus células.

(A) Expresión de RNAm de marcadores de células madre y de células de la cresta neural en tejido periodontal y (B) en células derivadas del hPDL determinada por RT-PCR. +/-, presencia o ausencia de transcriptasa inversa, respectivamente. (C) Análisis Western Blot de células derivadas del hPDL en medio basal para la detección de Nestina. Se utilizó la β -actina como control.

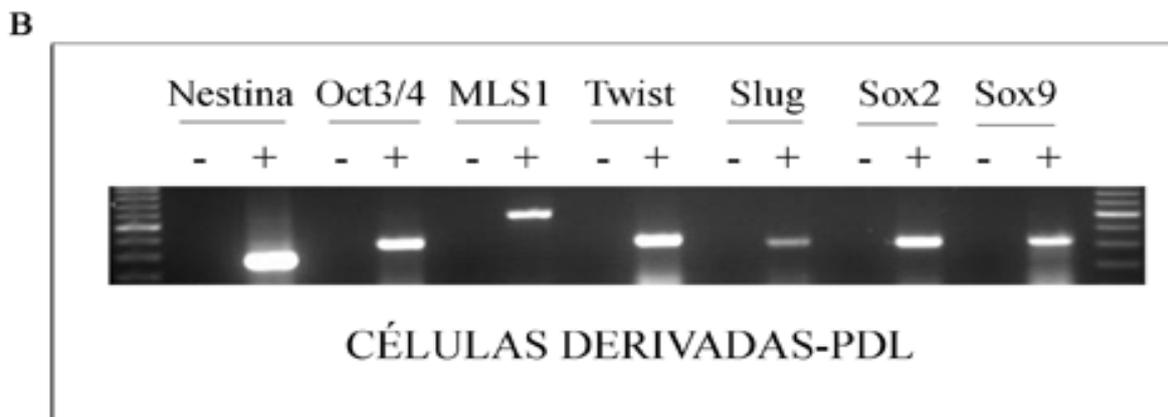
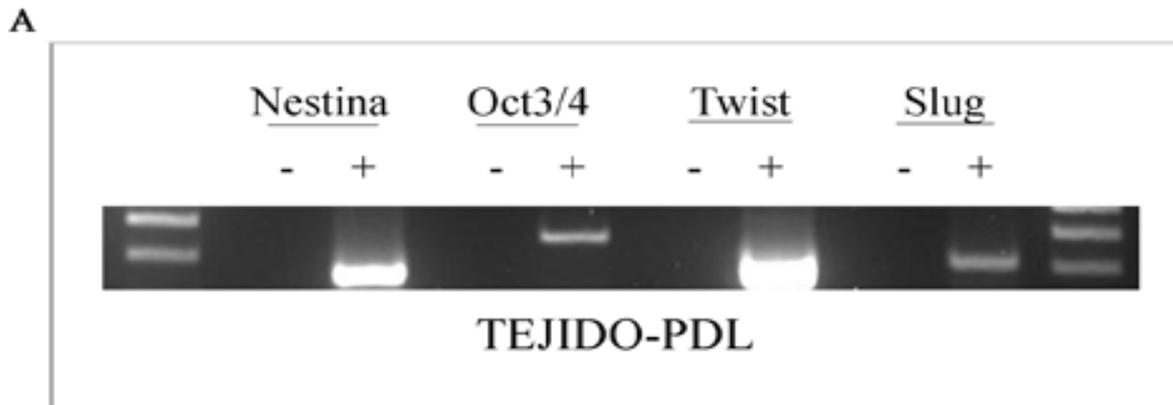


Figura 23.- Análisis del patrón de expresión genética mediante PCR y Western Blot del hPDL y sus células.

Además, las células fueron sembradas en placas de multipocillos (con poli-L-lisina como sustrato de adhesión), se fijaron y se procesaron mediante análisis inmunocitoquímico.

Se detectaron células positivas para las proteínas de superficie CD44 (99.60±0.69%) y CD90 (99.30±1.05%). Además, el 99.11±1.59% fueron inmunopositivas para marcadores de células de la cresta neural como p75^{NTR} (Receptor de baja afinidad del factor de crecimiento neurotrófico NGF) y el 29.62±3.43% lo fueron para el marcador de células madre neural Nestina (Fig. 24-25) (Tabla 9).

No hubo expresión de marcadores de diferenciación neuronal (MAP2, MAP1b) ni marcadores de células de la glía (GFAP, NG2 y O4), ni marcadores de células madre hematopoyéticas (CD117, CD34) (datos no mostrados).

Anticuerpos	ICC	%
CD44	++	99.60±0.69%
CD90	++	99.30±1.05%
p75 ^{NTR}	++	99.11±1.59%
Nestina	+	29.62±3.43%

Tabla 9.- Análisis inmunocitoquímico de las células derivadas del hPDL en MB.

Los resultados descritos sugieren la existencia de células con propiedades moleculares de la cresta neural dentro del hPDL y de las células en cultivo derivadas del mismo.

FIGURA 24

Figura 24: Inmunocitoquímica de las células derivadas del hPDL en Medio Basal.

Fotomicrografías mostrando inmunocitoquímica de (A) CD44, (B) CD90, (C) p75^{NTR} y (D) Nestina en células derivadas del hPDL en medio basal. Se utilizó dapi como tinción nuclear (azul). Escala de la barra=100µm.

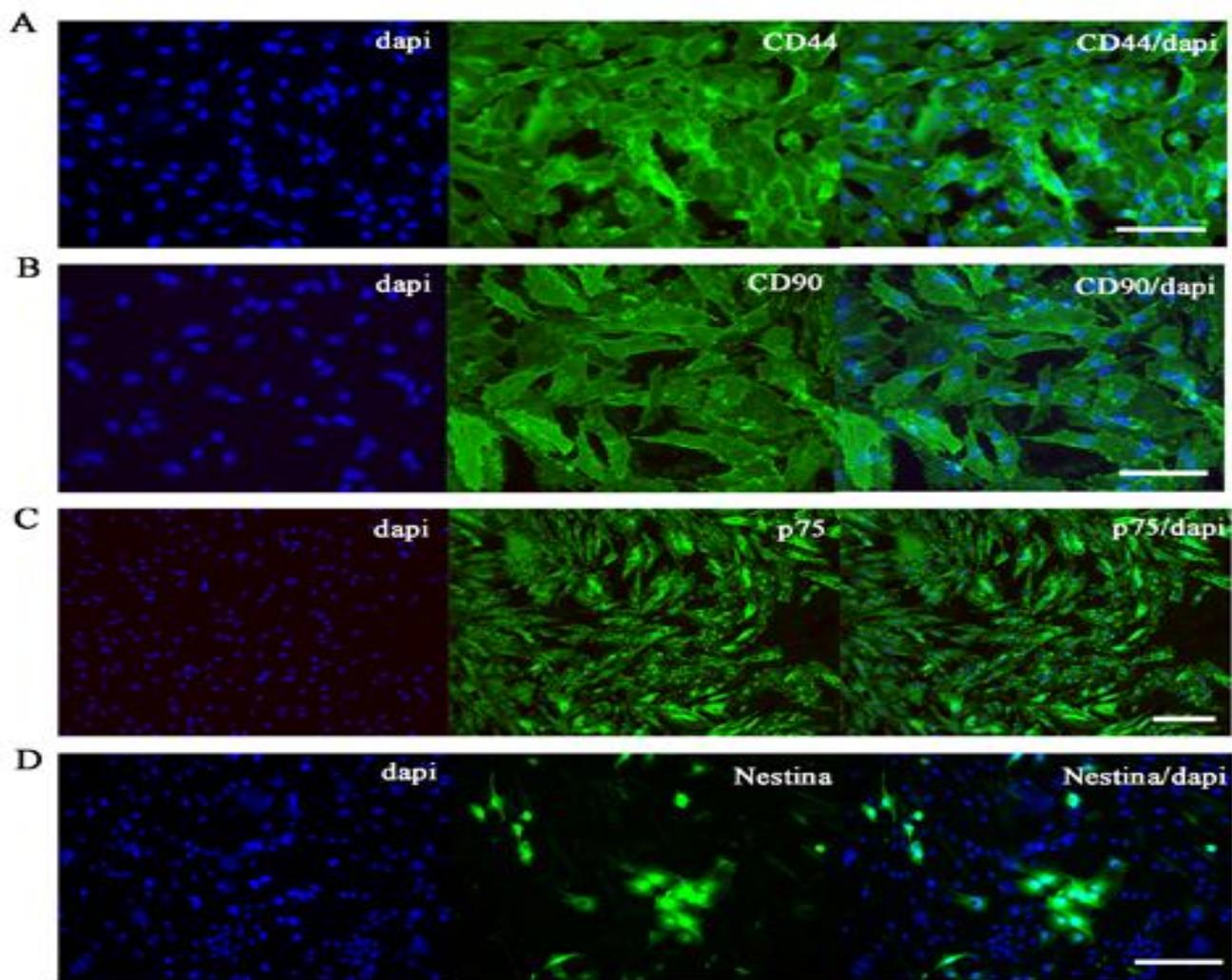


Figura 24.- Inmunocitoquímica de las células derivadas del hPDL en Medio Basal.

FIGURA 25

Figura 25: Porcentaje de CD44, CD90, p75 y Nestina en células derivadas del hPDL en medio basal determinado por inmunocitoquímica.

Porcentaje de células CD44⁺, CD90⁺, p75^{NTR+} y Nestina⁺ en células derivadas del hPDL en medio basal. Los datos representan la media \pm S.E.M. (n=3).

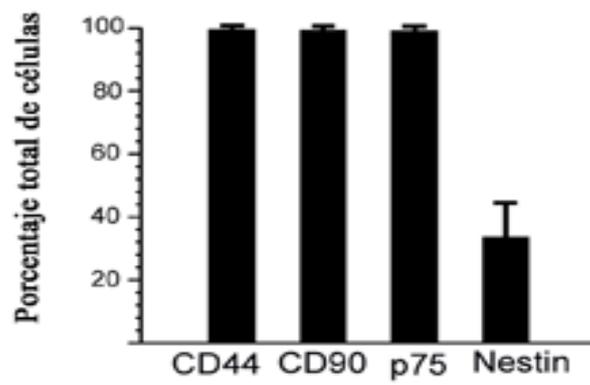


Figura 25.- Porcentaje de CD44, CD90, p75 y Nestina en células derivadas del hPDL en medio basal determinado por inmunocito química.

2.- SOBREENPRESIÓN DE eGFP TRANSGÉNICO

Uno de los objetivos de este trabajo es evaluar el potencial de las células derivadas del hPDL para su uso en estudios de sustitución celular y terapia genica ex vivo. El desarrollo de los procedimientos para el marcaje genético óptimo de las células derivadas del hPDL es crucial para el éxito de estas estrategias terapéuticas, con el fin de proporcionar un correcto entendimiento de la biología de las células trasplantadas.

Se comprobó si las células derivadas del hPDL podían ser modificadas genéticamente en cultivo para la expresión del gen marcador eGFP.

Las células fueron transfectadas mediante electroporación con el vector de expresión p(eGFP)IRES1hyg (como se describe en Material y Métodos).

Veinticuatro horas después de la transfección, la fluorescencia fue visible en el $27,08 \pm 1,37\%$ de las células (Fig. 26A-B).

Las células eGFP transfectadas, un mes después de la selección continua por droga (higromicina), presentaban una alta proliferación en cultivo donde el $81,75 \pm 1,65\%$ de las células fueron fluorescentes bajo el microscópico (Fig. 26A-B).

Es importante mencionar que no se observaron cambios proliferativos ni morfológicos en las células transfectadas durante un largo periodo de tiempo (meses).

Los procedimientos adecuados para el marcaje genético de las células derivadas del hPDL son los que garantizan que las células conserven sus

propiedades fluorescentes después de la diferenciación. Para ello, las células derivadas del hPDL, sobreexpresando eGFP, fueron expuestas a un medio de inducción neural libre de suero (como se describe en Material y Métodos). El número de células fluorescentes tras 10 días en medio de cultivo de inducción neural fue de $74.86 \pm 1.59\%$ (Fig. 26A-B).

También se decidió estudiar la expresión de eGFP en subclones aislados de las células derivadas del hPDL.

Los subclones eGFP⁺ de las células derivadas del hPDL cultivadas en medio basal fueron aislados por dilución limitante. Se aislaron un total de 58 clones, de los cuales 51 fueron fluorescentes bajo el microscopio 26 días después del aislamiento. Estos subclones expresaron Nestina y mostraron una fluorescencia alta y estable eGFP⁺ (Fig. 27).

Los resultados descritos anteriormente indican que la transfección de DNA mediante electroporación en células derivadas del hPDL da lugar a una expresión estable del marcador genético eGFP. Trabajar con células derivadas del hPDL con el propósito de la manipulación genética es posible ya que se pudo proceder al aislamiento de células clonales con propiedades homogéneas. Clonalidad, homogeneidad y estabilidad han sido siempre considerados como valiosas propiedades de un producto potencial clínico (Martínez-Serrano y col., 1997; Sayles y col., 2004).

FIGURA 26

Figura 26: Estabilidad de la expresión de eGFP en las células derivadas del hPDL.

(A) Fotomicrografías mostrando fase de contraste (PhC) e imágenes fluorescentes de células eGFP⁺ transfectadas en medio basal (24h y 21 días después de la transfección y la selección) y en medio inductor neural (10 días). (B) Porcentaje de células eGFP⁺ en medio basal (24h y 21 días después de la transfección y la selección) y en medio inductor neural (10 días). Los datos representan la media \pm S.E.M. (n=3). Abreviaturas: bm, Medio Basal; im, Medio inductor.

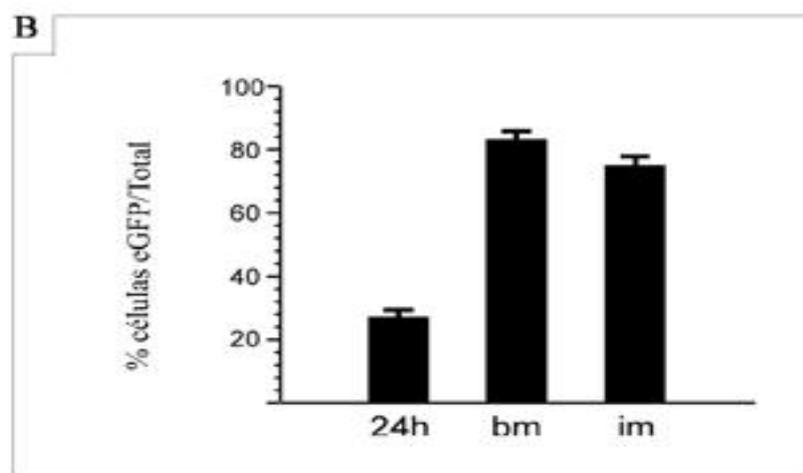
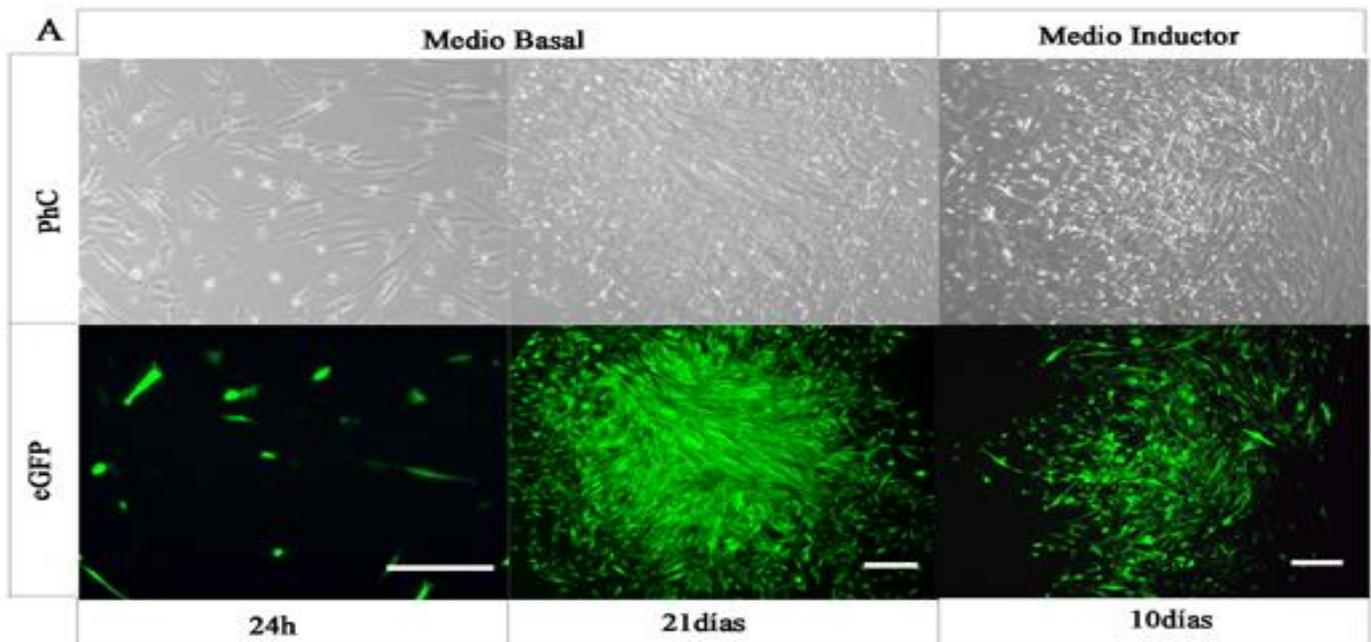


Figura 26.- Estabilidad de la expresión de eGFP en las células derivadas del hPDL.

FIGURA 27

Figura 27: Expresión de eGFP transgénico: Formación de colonias celulares.

Un ejemplo de formación de colonias en cultivo derivadas de células del hPDL transfectadas y marcadas con eGFP y Nestina. El dapi es utilizado para marcar el núcleo (azul). Escala de barra=100 μ m.

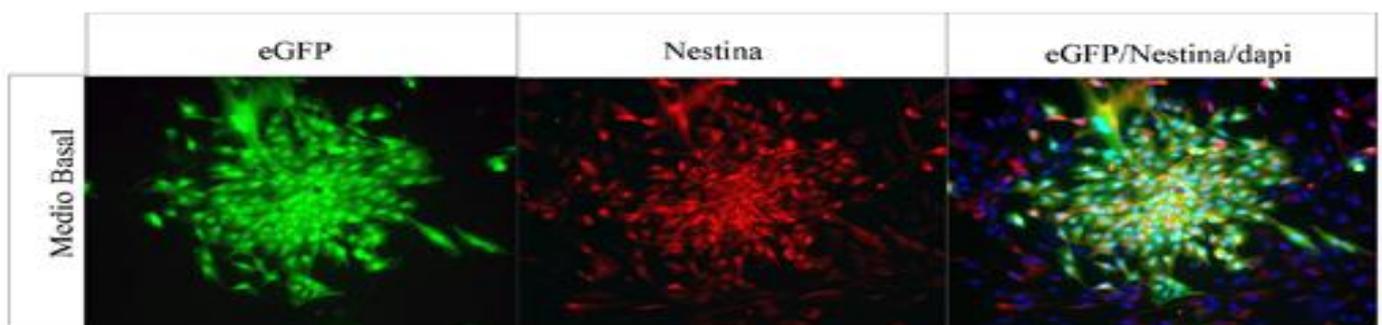


Figura 27.- Expresión de eGFP transgénico: Formación de colonias celulares.

3.- GENERACIÓN DE ESFERAS DERIVADAS DEL CULTIVO DE CÉLULAS DEL hPDL

El sistema de cultivo de formación de neuroesferas ha sido ampliamente investigado para conseguir el aislamiento de células madre multipotenciales a partir de diversos tejidos (Marshall y col., 2007).

Se generaron esferas flotantes libres a partir del cultivo de las células del hPDL eGFP⁺ mediante la aplicación de medio de inducción neural sin suero (como se describe en Material y Métodos). La mayoría de las células se observaron flotando en el medio después de un día en cultivo. Las células individuales formaron pequeñas esferas en pocos días (Fig. 28A). Las esferas continuaron aumentando de tamaño, llegando a ser relativamente grandes después de una semana en cultivo (Fig. 28B). Se recogieron las esferas flotantes y fueron sembradas en una placa multipocillos con poli-L-lisina como sustrato de adhesión. Las esferas se adhirieron y empezaron a formar una monocapa celular sobre la base (Fig. 28C-D). Es importante mencionar que las células retuvieron sus propiedades fluorescentes después de la formación de esferas. La expresión de eGFP fue rápidamente detectada sin necesidad de amplificación inmunocitoquímica.

Los resultados descritos anteriormente indican que es posible generar un sistema de cultivo de formación de neuroesferas a partir de células derivadas de hPDL aplicando un medio de cultivo libre de suero y con la presencia de bFGF y EGF.

FIGURA 28

Figura 28: Generación de esferas derivadas del hPDL.

(A) Al aplicar el medio de inducción neural a las células derivadas del hPDL se generaron esferas flotantes. (B) Las esferas fueron recogidas y sembradas en multipocillos utilizando como sustrato de adhesión poli-L-lisina. (C, D) Las esferas se unieron y formaron una monocapa al fondo del pocillo. Escala de barra=100 μ m.

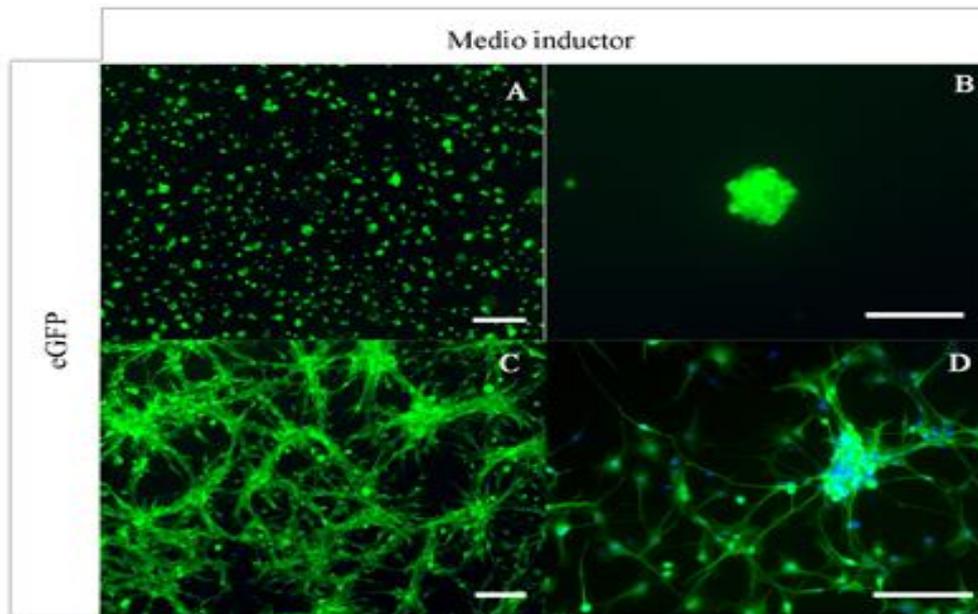


Figura 28.- Generación de esferas derivadas del hPDL.

4.- POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN NEURAL DE LAS CÉLULAS DERIVADAS DEL hPDL.

Tras tres semanas de inducción neural, se pudieron observar diferencias interesantes en las PDLSCs con respecto a los cultivos celulares en medio basal.

Se observó una distinta adhesión en las células, debido fundamentalmente a la ausencia de suero en el medio inductor. Para conseguir que estas células se adhirieran a la placa de cultivo, se utilizó como sustrato de adhesión la poli-L-lisina.

Tras la exposición a un medio de inducción neural la morfología de las células derivadas del hPDL cambió totalmente, dejando de ser de tipo fibroblástica o fusiforme y desarrollando una gran variabilidad. Se observaron células unipolares, bipolares y multipolares con prolongaciones citoplasmáticas de complejidad variable, desde prolongaciones únicas y simples a otras formando una red de procesos altamente compleja (Fig. 29).

Para estudiar el potencial de diferenciación neural de las células derivadas del hPDL, los cultivos se mantuvieron durante 21 días en medio de inducción neural y posteriormente se realizaron estudios de inmunocitoquímica. Para caracterizar las células derivadas del hPDL se utilizaron anticuerpos específicos para antígenos asociados con diferentes fenotipos neurales.

Se detectaron células positivas para marcadores neuronales como β -III-tubulina (TUJ1), proteína 1b asociada a microtúbulo (MAP1b), proteína 2 asociada a microtúbulo (MAP2), proteína de filamento intermedio tipo VI

(Nestina), proteína nuclear específica de neuronas (NeuN), ácido γ -aminobutírico (GABA), ácido glutámico descarboxilasa (GAD65-67), transportador de membrana plasmática GABA de alta afinidad (GAT-1), acetilcolintransferasa (Chat) y sinaptofisina (Fig. 30A-B) (Tabla 10).

Las células derivadas del hPDL también fueron inmunopositivas para marcadores gliales como la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), proteoglicano condroitín sulfato (NG2) y el antígeno de superficie O4 (Fig. 30C) (Tabla 10).

Un $39.66 \pm 3.22\%$ de las células expresaron el marcador neural TUJ1. Además, el $13.85 \pm 1.59\%$ de las células derivadas del hPDL diferenciadas fueron inmunopositivas para el marcador glial GFAP. Un porcentaje menor ($13.05 \pm 2.15\%$) de las células derivadas del hPDL mostraron expresión de NG2 (Fig. 30D).

Anticuerpos	Medio Basal	Medio Neural
p75 ^{NTR}	+	SD
Tuj-1	SD	+
MAP1b	-	+
MAP2	-	+
Nestina	+	+
NeuN	SD	+
GABA	SD	+
GAD65/67	SD	+
GAT-1	SD	+
Chat	SD	+
Sinaptofisina	SD	+
GFAP	-	+
NG2	-	+
O4	-	+

Tabla 10.- Fenotipo neural de las PDLSCs en Medio Basal y en Medio Inductivo Neural.

Los resultados descritos anteriormente demuestran que las células derivadas del hPDL tienen la capacidad para diferenciarse en células similares a las células neurales.

FIGURA 29

Figura 29: Cambios morfológicos de las células derivadas del hPDL producidos tras la inducción neural.

Fotomicrografías de las células derivadas del hPDL antes y después de la inducción neural. Las células derivadas del hPDL mostraban una apariencia plana y poligonal en medio basal. Tras la exposición al medio de inducción neural, las células derivadas del hPDL desarrollaron un cuerpo esférico con procesos bipolares o multipolares, formando parte de una red de procesos densa y compleja. Escala de barra=100µm.

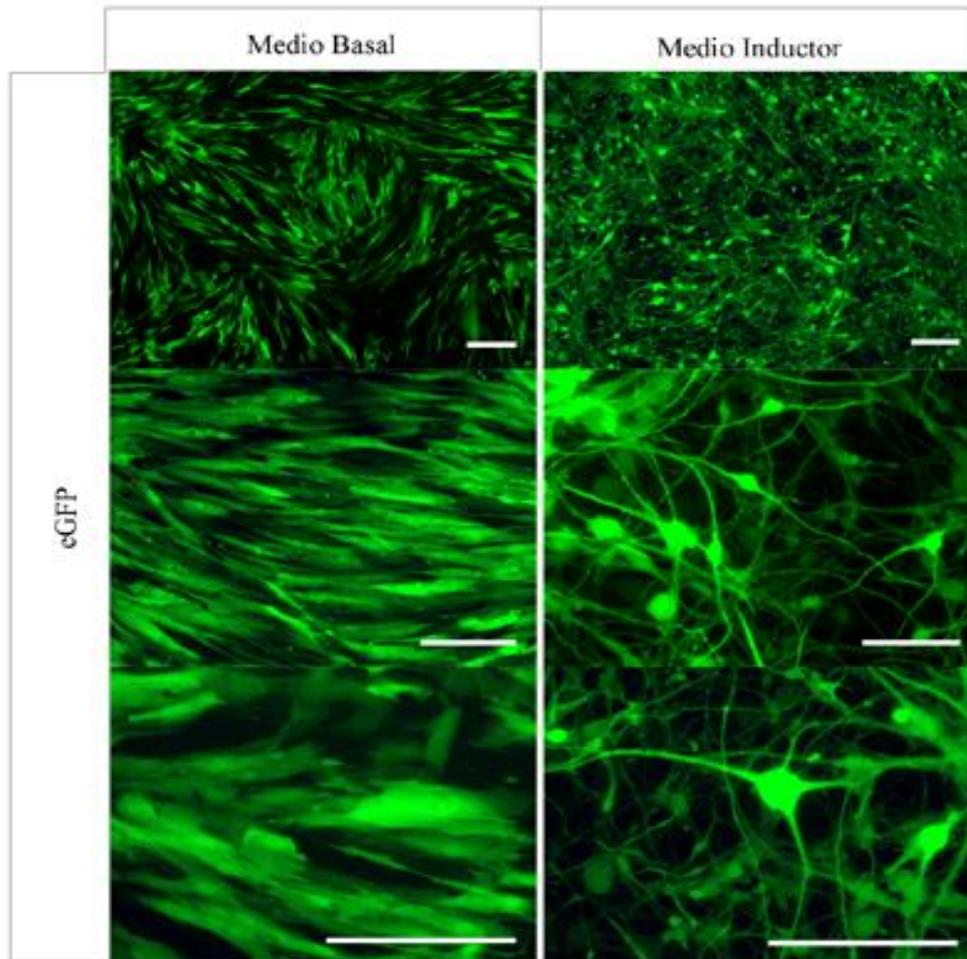


Figura 29.- Cambios morfológicos de las células derivadas del hPDL producidos tras la inducción neural.

FIGURA 30

Figura 30: Potencial de diferenciación neural de las células derivadas del hPDL.

Fotomicrografías ilustran la inmunohistoquímica para marcadores neuronales **(A,B)** y marcadores gliales **(C)** de células derivadas del hPDL que expresan eGFP de forma estable después de 21 días en medio de cultivo de inducción neural. Los núcleos fueron marcados con dapi (azul). Escala de barra=100µm. **(D)** Porcentaje de TUJ1⁺, GFAP⁺ y NG2⁺ de las células derivadas del hPDL después de 21 días en medio de inducción neural determinado por inmunohistoquímica.

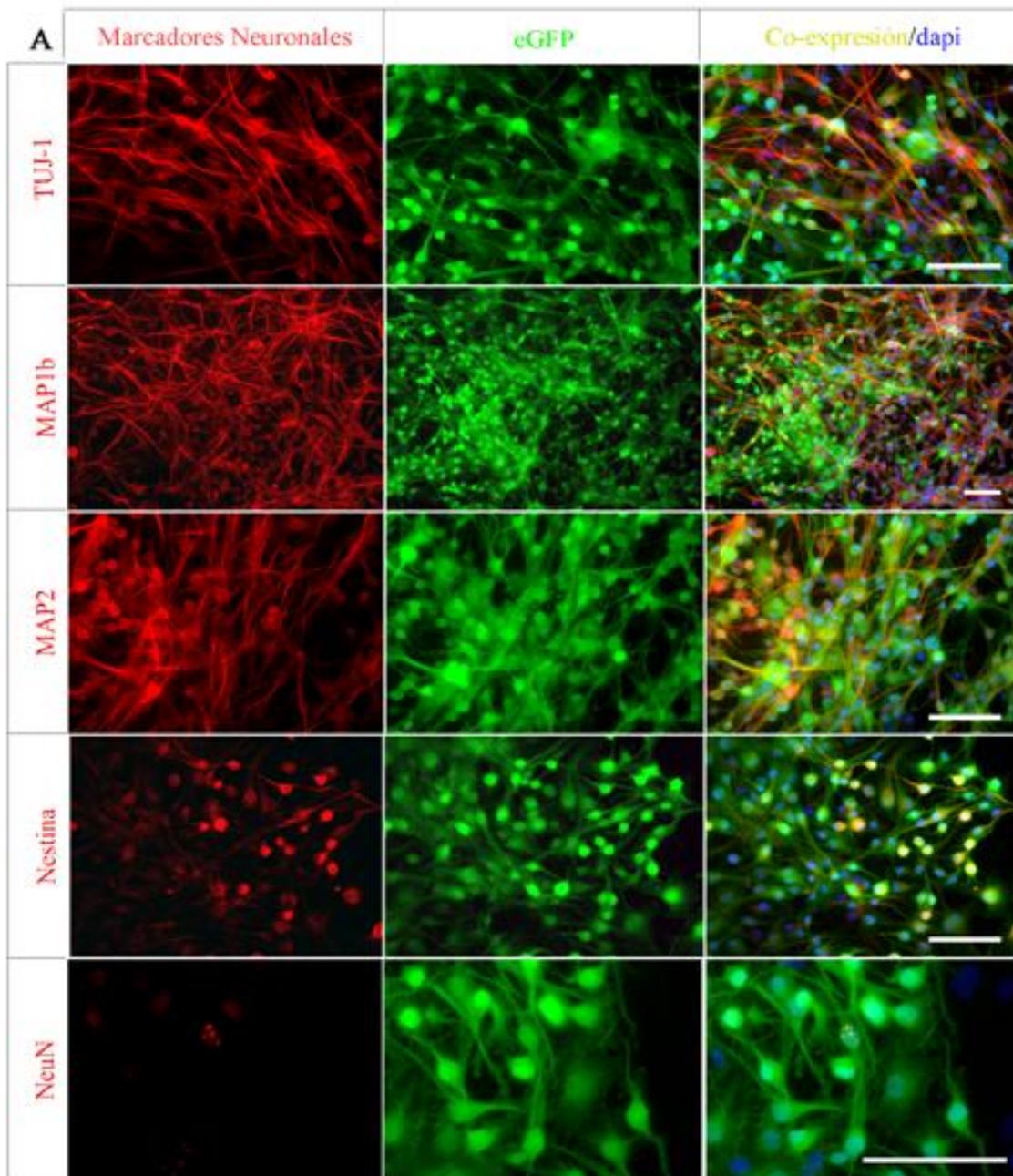


Figura 30.- Inmunocitoquímica de células derivadas del hPDL en medio inductor.

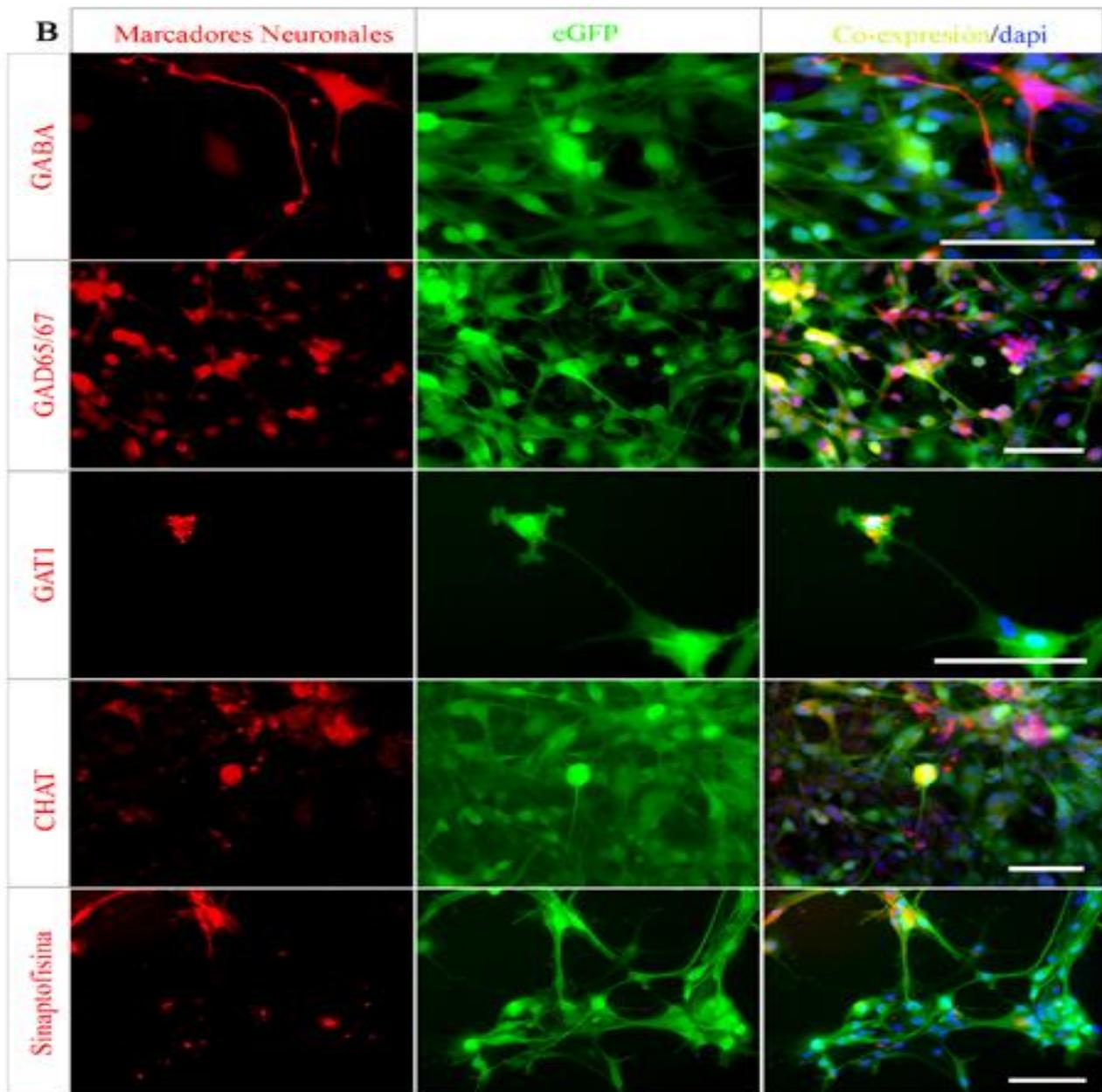


Figura 30.- Inmunocitoquímica de células derivadas del hPDL en medio inductor.

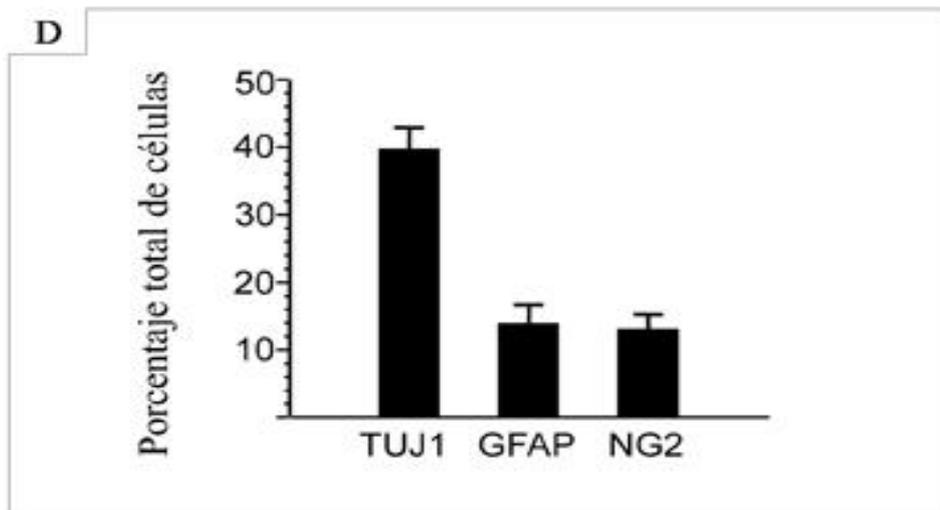
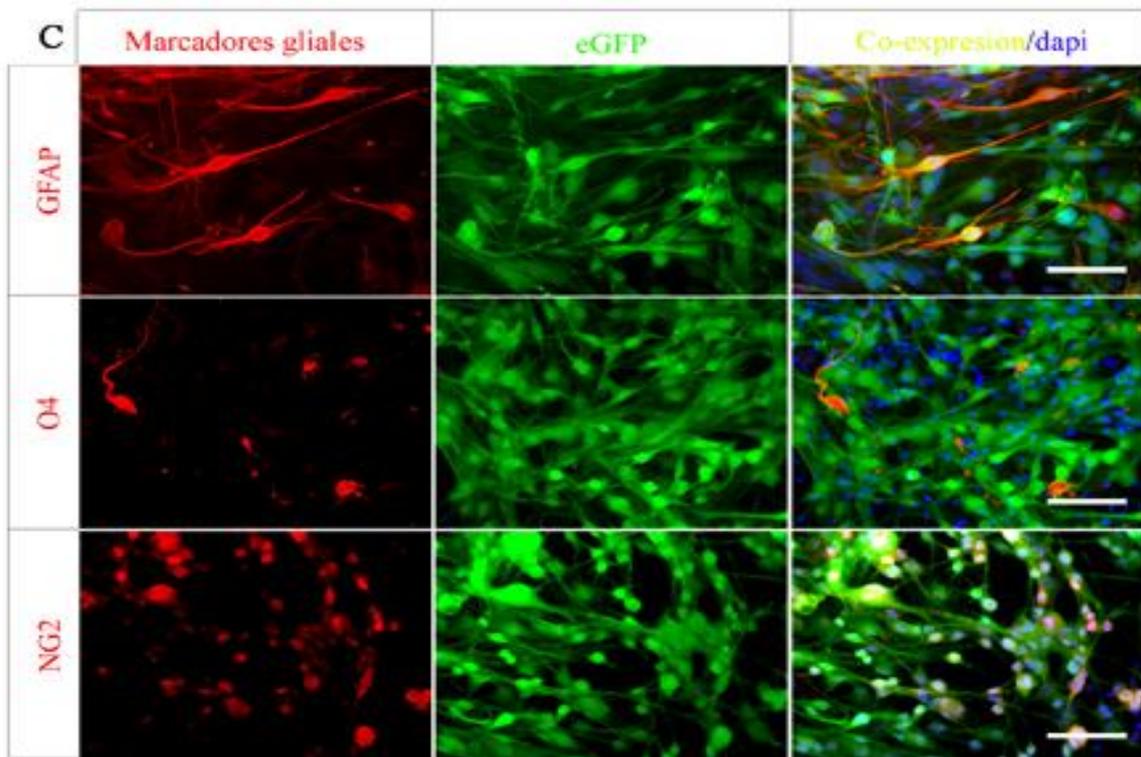


Figura 30.- Inmunocitoquímica de células del hPDL en medio inductor.

5.- EXPERIMENTOS IN VIVO.

Se evaluó el potencial neural in vivo de las células derivadas del hPDL mediante el trasplante en cerebro de ratón adulto. Debido a los efectos mutagénicos y antimitóticos de la BrdU o la H3-timidina, se diseñaron los experimentos con células no marcadas, y se confió únicamente en la detección fluorescente de la proteína eGFP. Las células derivadas del hPDL que sobreexpresaban eGFP, se cultivaron durante 21 días en medio de inducción neural y fueron injertadas en el hipocampo de 15 ratones inmunodeprimidos. Los animales fueron analizados 1 mes más tarde.

De los 15 animales trasplantados, 10 contuvieron los injertos vitales durante todo el tiempo señalado y mostraron resultados de interés para este estudio, como determina la presencia de las células teñidas positivamente para eGFP (Fig. 31). Los análisis histológicos revelaron que no existen signos de daño tisular debido al trasplante ni crecimiento celular incontrolado en ninguno de los animales trasplantados.

La expresión de un marcador genético como eGFP en las células derivadas del hPDL permite, por primera vez, la evaluación de una total integración, migración y diferenciación de las células, con un gran detalle morfológico celular.

Los injertos de células derivadas del hPDL fueron detectados en el hipocampo, incluyendo la capa granular del giro dentado y las capas celulares CA1, CA2 y CA3 hipocampales, y en el núcleo Th Paraventricular un mes después del trasplante.

Algunos de los injertos de las células derivadas del hPDL aparecen persistiendo como nichos de células madre, ya que células eGFP+ podían ser localizadas en el epitelio ventricular (VE) y en la zona subventricular (SVZ) de la pared ventricular anterolateral. Las células derivadas del hPDL fueron también detectadas en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo un mes después del trasplante (Fig. 31-32).

Las células del hPDL injertadas se diferenciaron morfológicamente (Fig. 31-32). Este dato puede indicar que esas células podrían responder a señales de supervivencia locales o de diferenciación, pero también sugiere que han experimentado una diferenciación terminal.

Los estudios de inmunohistoquímica revelaron tinción para los marcadores neuronales Doblecortina (DCX), Neurofilamento M (NF-M), γ -ácido aminobutírico (GABA), la proteína fibrilar acídica de la glía (GFAP) y el proteoglicano de condroitín sulfato (NG2) en las células injertadas derivadas del hPDL eGFP+ (Fig. 33). No se observaron los marcadores TUJ-1, MAP2 ni PLP.

Estas observaciones demuestran que las células derivadas del hPDL sobreviven al trasplante, se integran, migran y generan células similares a las neurales en el cerebro de ratón adulto.

FIGURA 31

Figura 31: Trasplante en hipocampo de ratón adulto de células derivadas del hPDL transfectadas con eGFP en medio inductor neural.

Integración y migración del injerto de células del hPDL en cerebro de ratón adulto al mes del trasplante. Fotomicrografías de secciones coronales mostrando el trasplante marcado con eGFP y Cresil violeta. Escala de barra=1000µm. Vistas magnificadas de la región de los injertos. Escala de barra=100µm. Abreviaturas: LV, Ventrículo lateral; DG, Giro dentado; SGZ, Zona subgranular; CA1, Área CA1 del hipocampo del huésped; PVA, núcleo TH paraventricular; D3V, 3º ventrículo dorsal.

A

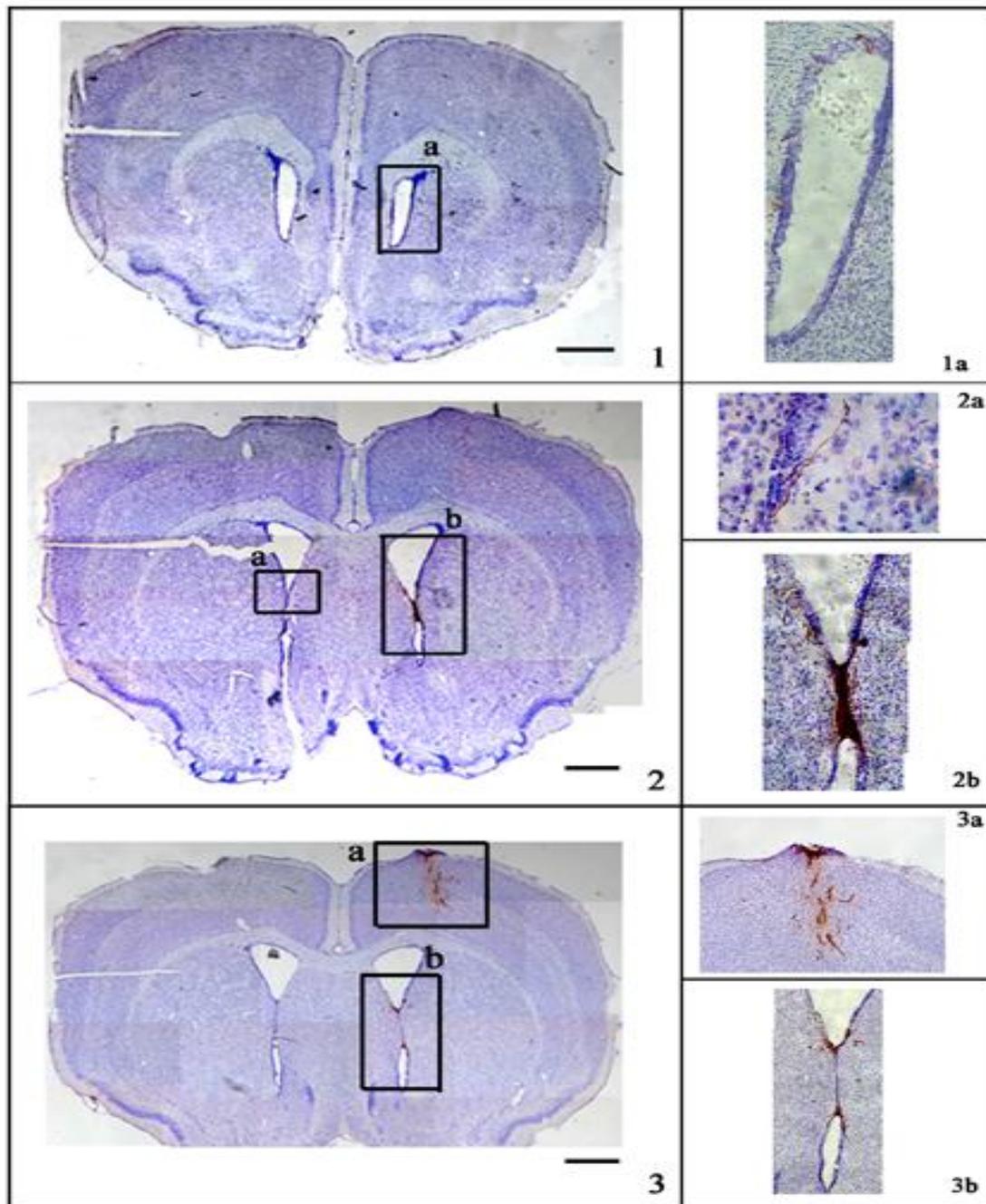


Figura 31.- Integración y migración de las células derivadas del PDL tras un mes del trasplante en cerebro de ratón adulto.

B

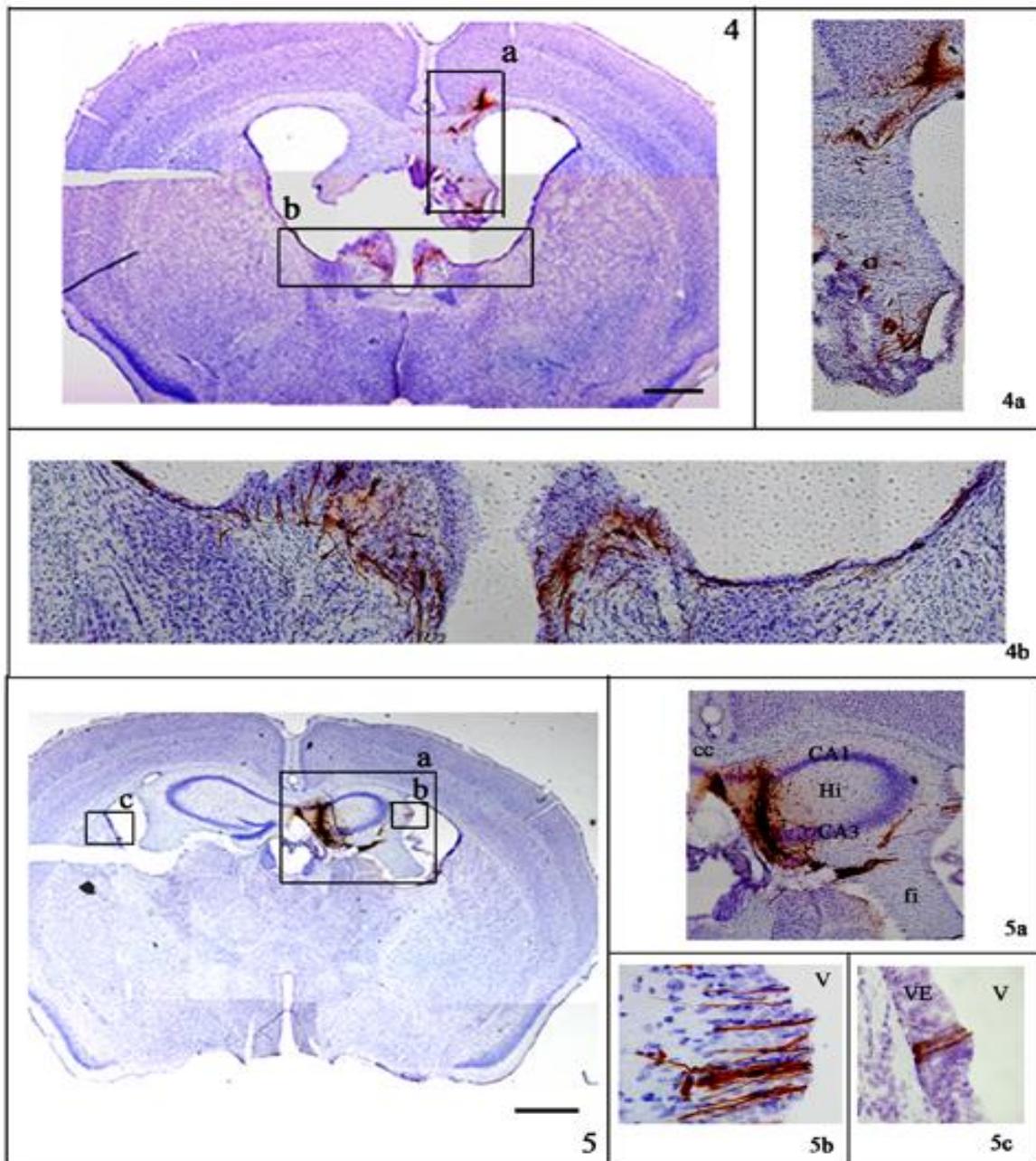


Figura 31.- Integración y migración de las células derivadas del hPDL tras un mes del trasplante en cerebro de ratón adulto.

C

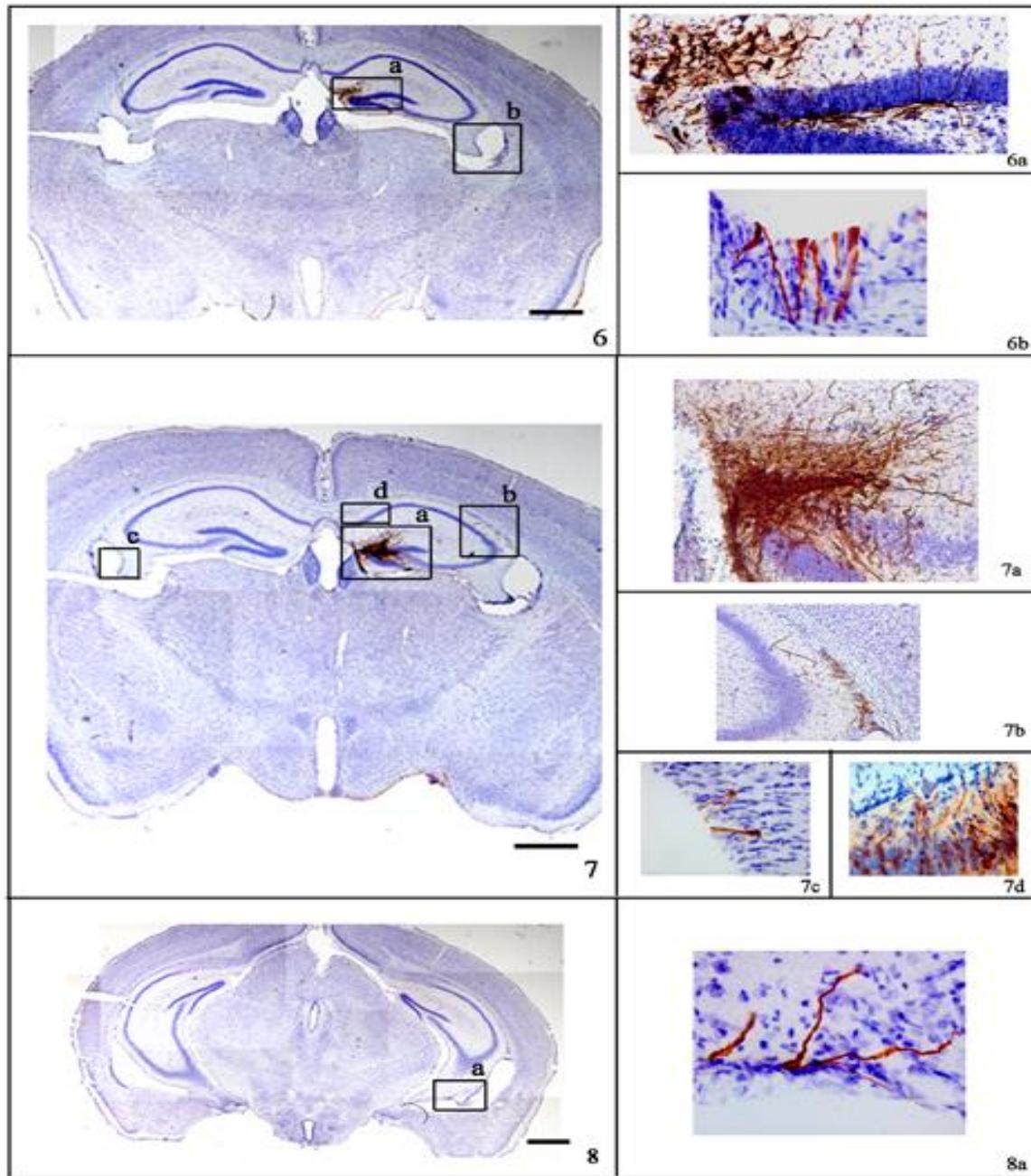


Figura 31.- Integración y migración de las células derivadas del PDL tras un mes del trasplante en cerebro de ratón adulto.

FIGURA 32

Figura 32: Morfología celular detallada de las células derivadas del hPDL en diferentes regiones del trasplante.

Detalle morfológico de los injertos celulares del hPDL en diferentes regiones del trasplante. Escala de barra=100 μ m.

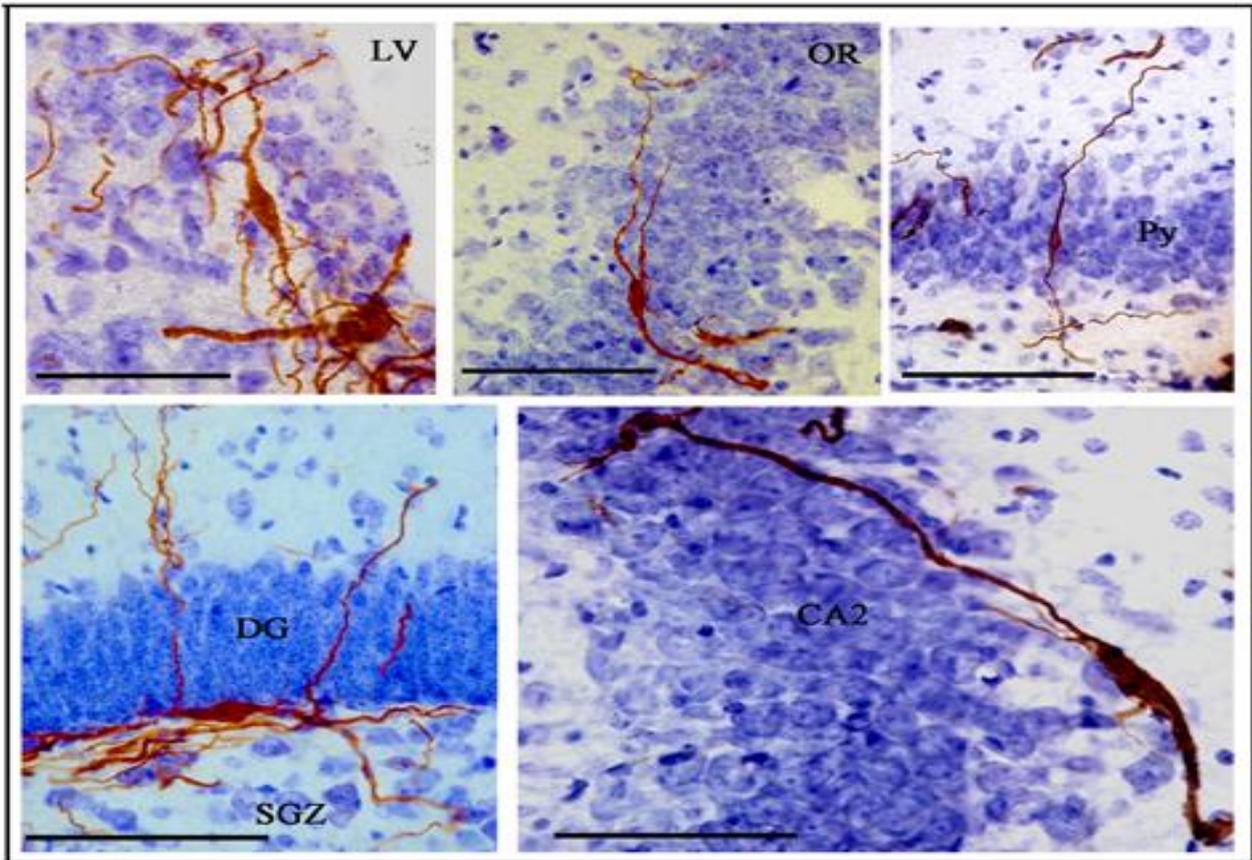


Figura 32.- Morfología celular detallada de las células derivadas del hPDL en diferentes regiones del trasplante.

FIGURA 33

Figura 33: Expresión de marcadores neurales de células trasplantadas derivadas del hPDL.

Los trasplantes fueron marcados con eGFP (verde) y con DCX, GFAP, NG2, NF-M y GABA (rojo). Los núcleos fueron marcados con dapi (azul). Las proyecciones ortogonales confirman la co-localización de eGFP y marcadores neurales en los injertos celulares del hPDL GFP⁺. Escala de barra=20µm. Abreviaturas: LV, Ventrículo lateral; OR, Estrato oriens del hipocampo; Py, capa piramidal del hipocampo; DG, Giro dentado; SGZ, Zona subgranular; CA2, Área CA2 del hipocampo del huésped.

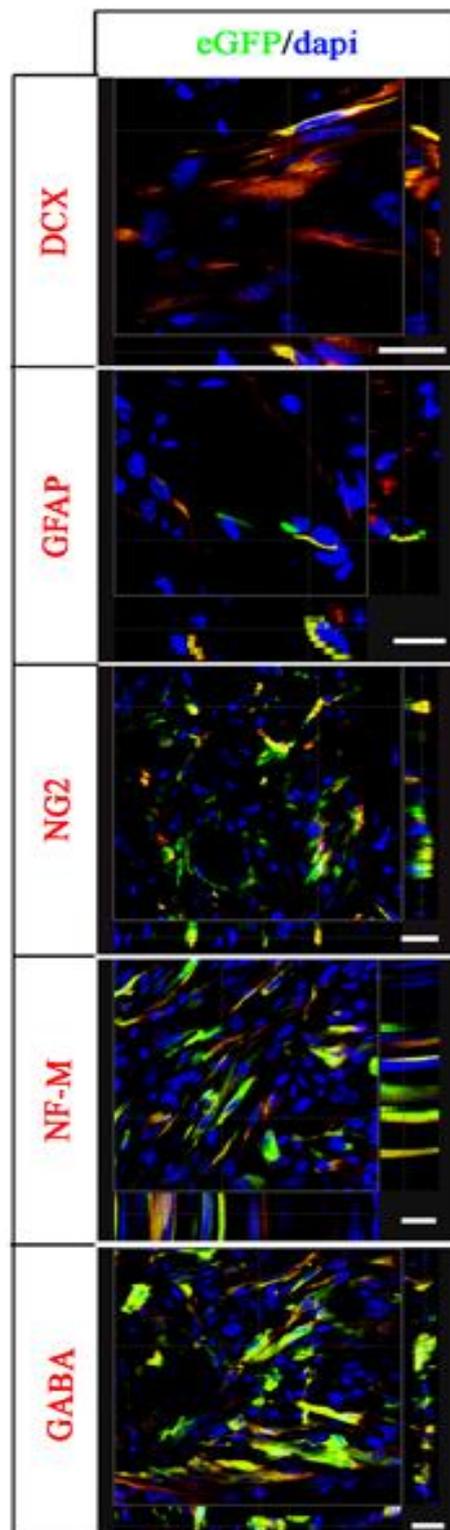


Figura 33.- Expresión de marcadores neurales de células trasplantadas derivadas del hPDL

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En los últimos años han sido numerosos los trabajos que han explorado la plasticidad de las células madre derivadas de tejidos adultos. Recientemente se han descubierto las propiedades regenerativas de las células madre adultas de la médula ósea y de otras fuentes, como la grasa y el cordón umbilical. Existe un gran cuerpo de evidencia en modelos animales que demuestra que las células madre adultas son capaces de regenerar tejidos de las diferentes capas embrionarias (miocardio, hígado, sistema nervioso central, etc). Estos estudios han permitido los primeros ensayos clínicos de reparación tisular en los seres humanos, abriendo un nuevo campo para el que se ha acuñado el término terapia celular. Además, estas células no plantean los problemas inmunológicos, éticos o de potencial génesis tumoral relacionados con las células madre embrionarias, lo que las hace candidatas ideales para los ensayos clínicos (Kulbatski, 2010; Patel y col., 2010).

El uso de células madre adultas en la medicina regenerativa es prometedor, ya que son fáciles de aislar y pueden ser expandidas in vitro (Brignier y col., 2010;

Hipp y col., 2008; Moraleda y col., 2006). Sin embargo, todavía se desconocen muchos de los mecanismos básicos que subyacen en estos procesos de reparación, y es necesario investigar nuevas fuentes de células madre debido a la necesidad clínica de regenerar tejidos dañados o sustituirlos por otros nuevos.

Experimentos previos han demostrado que la médula ósea humana y el tejido de la pulpa dental (en dientes deciduos y permanentes) adultos contienen células madre capaces de diferenciarse en osteoblastos/ odontoblastos, adipocitos, y células similares a las neurales (Gronthos y col., 2000; Gronthos y col., 2002; Shi y Gronthos, 2003). Del mismo modo, recientemente, se ha descubierto que el hPDL contiene una población de células madre multipotenciales postnatales que pueden ser aisladas y cultivadas in vitro (Seo y col., 2004), constituyendo una fuente tisular accesible y única.

Datos preliminares sugieren que estas células tienen capacidad para expresar un fenotipo mesodérmico, diferenciándose en células similares a cementoblastos, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, miofibroblastos y células formadoras de colágeno (Nagatomo y col., 2006; Techawattanawisal y col., 2007; Gay y col., 2007; Coura y col., 2008, Kadar y col., 2009).

Pero además, las PDLSCs parecen tener capacidad de diferenciarse en células del sistema nervioso. Esto podría estar en relación con su origen embrionario en la cresta neural. Varios estudios recientes mostraron que células madre derivadas de la cresta neural pueden ser aisladas de diferentes tejidos adultos (Widera y col., 2009; Techawattanawisal y col., 2007; Coura y col., 2008).

El aislamiento y la manipulación de células madre derivadas de la cresta neural autólogas, obtenidas del ligamento periodontal humano (hPDL) podría ser una

fuente accesible de células madre neurales adultas para su uso en el reemplazo celular y la transferencia de genes en los enfermos del sistema nervioso central.

Los datos aportados por esta memoria de tesis doctoral, sugieren la existencia de una subpoblación de células madre en el ligamento periodontal humano que retiene la habilidad para diferenciarse en células neurales. Demostrándose así, que estas células, cuyo grado de compromiso parecía hacerles tener restringido el destino de su diferenciación, son capaces de exhibir cierto grado de plasticidad in vivo.

Nuestros resultados indican que una subpoblación del hPDL es capaz de, (i) generar neuroesferas en cultivo con un comportamiento similar a las células madres neurales, y con habilidad de diferenciación en los tres linajes neurales. (ii) Tras un mes después de ser trasplantadas intracerebralmente, son capaces de diferenciarse en los tres linajes neurales así como de integrarse en nichos descritos para células madre neurales del cerebro adulto. (iii) La transfección de DNA por electroporación en las células derivadas del hPDL permite la expresión estable de un DNA exógeno (eGFP).

1.- POTENCIALIDAD NEURAL IN VITRO DE LAS PDLSCs.

Uno de los principales objetivos de este estudio es ampliar los datos acerca de la capacidad de diferenciación neural in vitro de las células madre del hPDL.

El ligamento periodontal deriva del folículo dental, el cual es considerado como células ectomesénquimales derivadas de la cresta neural (Ten Cate, 1997). La cresta neural se compone de una población de células pluripotentes que migran

hacia el primer arco branquial para participar en el desarrollo dental. La cresta neural puede diferenciarse en dos tipos celulares, ectodérmicos y mesodérmicos (Le Douarin y col., 2004).

Para averiguar el potencial de diferenciación neural de las PDLSCs, examinamos la expresión de marcadores neurales, tanto en un medio idóneo para el cultivo de células del PDL (medio de cultivo celular basal) (Seo y col., 2004) como en condiciones específicas para el desarrollo exclusivo en proliferación y diferenciación de células madre neurales (medio de cultivo celular definido) (Gritti y col., 2001).

Bajo condiciones de proliferación en medio de cultivo basal, las células derivadas del hPDL expresan las proteínas de superficie CD44 y CD90, al igual que las células madre derivadas de la pulpa dental humana (Agha-Hosseini y col., 2010), el marcador de células madre neural Nestina y el marcador celular de la cresta neural p75^{NTR}.

Bajo condiciones de cultivo de inducción neural, comprobamos que las células derivadas del hPDL pueden proliferar formando neuroesferas y mostraron su capacidad para diferenciarse en neuronas (expresión de TUJ-1, MAP2, MAP1b, GAD65/67, GABA, NeuN, Chat, GAT y Sinaptofisina), astrocitos (expresión de GFAP), y oligodendrocitos (expresión de NG2 y O4), quedando así patente la potencialidad neural in vitro de las células derivadas del hPDL.

Tras llevar a cabo el análisis mediante RT-PCR, se descubrieron marcadores de células madre neurales (Oct 3/4, Nestina, Sox2 y Musashi1) y un subconjunto de células expresaron marcadores de la cresta neural (Slug, Twist y Sox9); la expresión de RNAm no sólo se estudió en las células derivadas del hPDL, sino también en el tejido periodontal humano.

Es importante mencionar que las células derivadas del hPDL tras el cultivo inductor no sólo expresaron marcadores neuronales, sino que también cambiaron drásticamente su morfología, desarrollando cuerpos celulares esféricos, con procesos bipolares o multipolares formando parte de una red densa y compleja de procesos neuríticos.

Tras la inducción neural, la formación de neuroesferas sugiere una iniciación en la diferenciación neural. Además encontramos una escasa proliferación, congruente con la pérdida de potencialidad que sufren las células madre adultas a medida que se diferencian. Cuando estas células son sembradas con un sustrato de adhesión, en este caso la poli-L-lisina, se induce la adhesión celular que impide la formación de neuroesferas y permite que pueda observarse claramente un cambio en su morfología.

La gran influencia de las células de la cresta neural dentro del proceso de formación del diente, parece influir en la capacidad de las PDLSCs para diferenciarse a células del sistema nervioso. Esto es más evidente cuando hemos encontrado expresión de Slug, Twist y Sox9 en estas células mediante RT-PCR en estado basal, y de Nestina y p75^{NTR} en el estudio inmunocitoquímico de las mismas, sugiriendo la presencia de células indiferenciadas con características similares a las células de la cresta neural. De igual manera, en estudios previos, también se encontró expresión de marcadores de la cresta neural en experimentos in vitro con DPSCs (Rodríguez, 2009) que confirmaría la influencia de la cresta neural en la odontogénesis.

Aunque las células de la pulpa y el folículo dental son frecuentemente definidos como ectomesenquimales, tras una gran cantidad de estudios se ha demostrado que los tejidos periodontales, incluido el cemento, derivan de la cresta neural (Lumsden, 1988; Hildebrand y col., 1995). Además, Pierre y col. (2006)

sugirieron en una publicación reciente que todas las células madre adultas podrían ser progenie de la cresta neural. Por lo que la existencia de precursores en zonas próximas al diente podría ser explicada por la ontogenia del diente humano. En este contexto es importante señalar que los dientes adultos están abundantemente inervados, por lo que se necesita una gran plasticidad neural local para el recambio celular (Widera y col., 2007).

Además, varios factores neurotróficos como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), o el factor neurotrófico derivado de la glía son altamente expresados en el desarrollo dental humano (Nosrat y col., 2002).

Estos datos indican la posible existencia de células madre neurales próximas al diente, o que las células madre neurales y las células que dan lugar a los tejidos dentales tienen una ontogenia común. El papel fisiológico de estas células en el humano adulto puede ser el potencial reemplazo de tejido dental y/o neuronal degenerado por enfermedades como las periodontales (Bartold y col., 2006).

Otra explicación compatible con los resultados obtenidos, la expresión de marcadores neurales, estaría de igual manera relacionada con el origen dental. Tras la formación de la corona y, posteriormente, la raíz dental quedan en el espacio periodontal pequeños cúmulos de células que proceden de los restos embrionarios epiteliales de la vaina radicular de Hertwig, responsable de la formación de la raíz dental. Estas células tienen un origen común con las del sistema nervioso, el ectodermo, y son llamados restos epiteliales de Malassez (ERM).

Varios estudios han investigado la expresión de diferentes tipos de proteínas por los ERM. Esas proteínas pueden ser clasificadas ampliamente en 2 grupos,

citoqueratinas y neuropeptidos. Los ERM pueden expresar neuropeptidos incluyendo el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), sustancia P (SP), péptido intestinal vasoactivo (VIP), receptor de tirosina quinasa A (TrkA)- un receptor de gran afinidad del factor de crecimiento nervioso (NGF)- y la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) (Rincon y col., 2006). En un estudio en el año 2000, se observó la inmunoreactividad del NGF en las células de los ERM a nivel de la región cervical y de la furca en molares de ratas, pero no en otro tipo de células no neurales como osteoblastos, fibroblastos, odontoblastos o cementoblastos (Yamashiro y col., 2000)

2.- POTENCIALIDAD NEURAL IN VIVO DE LAS PDLSCs.

El sistema nervioso central (SNC) tiene una capacidad muy limitada respecto a la regeneración celular, por lo que se investigan los trasplantes de progenitores neurales derivados de células madre embrionarias o autólogas como una de las principales estrategias para la regeneración del mismo (Anderova y col., 2006; Lacza y col., 2003).

Debido a los problemas éticos, inmunológicos y teratogénicos que generan los trasplantes de células madre embrionarias, y a los resultados, en cuanto a capacidad de proliferación y potencialidad para la neurogénesis de las células madre derivadas de tejido adulto, las investigaciones se están centrando en estas últimas.

En el caso de las DPSCs, los resultados que hasta ahora se han obtenido en estudios in vivo, sugieren una interesante capacidad neurogénica de estas

células. Miura y col. (2003) trasplantaron células de pulpa dental humana de dientes temporales en el hipocampo de ratones inmunodeprimidos. A los 10 días del trasplante comprobaron la persistencia de estas células en el hipocampo de ratón, pero con la adquisición del marcador neural NF-M. No obstante, los autores no especifican en su trabajo si las células trasplantadas estaban o no diferenciadas y si co-expresaban más marcadores neurales.

Un estudio preliminar publicado en 2008 consistió en el trasplante de células procedentes de la pulpa dental humana en un modelo aviar, donde se evaluaron los resultados durante las primeras 72 horas. En este estudio demostraron que las DPSCs y SHED que se habían integrado en el SNC, provocaban una respuesta endógena neural y coexpresaban marcadores neurales como β -III tubulina y NF-M (Arthur y col., 2008).

En otro estudio publicado también en 2008, en el que se trasplantaron células de la pulpa dental de mono en un modelo murino, no pudieron establecer resultados concluyentes de sus células ya que la expresión de eGFP disminuía con el tiempo (Huang y col., 2008).

En un estudio muy reciente (Király y col., 2011) los resultados obtenidos fueron muy esperanzadores al observar como DPSCs neuronalmente prediferenciadas migraban desde el líquido cefalorraquídeo hasta la lesión provocada mediante frío en la corteza cerebral de ratas, con un aumento de marcadores neurales y de la actividad electrofisiológica de dichas células.

Tanto en el caso de las DPSCs como las PDLSCs, su origen en relación con la cresta neural y su potencialidad neural demostrada en estudios previos, los hace muy atractivos como posible fuente donante de células madre adultas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas mediante terapia celular.

En el caso de las células derivadas del hPDL no hay prácticamente datos publicados hasta la fecha acerca del potencial in vivo de las mismas.

En el presente trabajo de investigación se trasplantaron células derivadas del hPDL, prediferenciadas neuralmente en cultivo, en el hipocampo de ratones *nude* adultos y, tras un mes, se obtuvo como resultados en los experimentos realizados, que los injertos de células derivadas del hPDL sobreviven al trasplante, se integran, migran y generan células humanas DCX+, NF-M+, GABA+, GFAP+ y NG2+ en el cerebro de ratón adulto, marcadores de los tres linajes celulares del sistema nervioso. Las células derivadas del hPDL injertadas se detectaron por todo el hipocampo, incluyendo la capa granular del giro dentado, las capas celulares CA1, CA2 y CA3 hipocampales, en la corteza dorsal y el epítalamo, un mes después del trasplante.

Algunas de las células derivadas del hPDL injertadas pudieron ser localizadas en nichos de células madre neurales como el epitelio ventricular, la zona subventricular (SVZ) de la pared del ventrículo anterolateral y también en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo.

Trabajos anteriores sugieren que las células madre neurales en la SVZ se corresponden con una población de astrocitos que tienen uno o dos procesos primarios (Quiñones-Hinojosa y col., 2006; Garcia y col., 2004) y que los precursores neuronales primarios en el SGZ tienen los cuerpos celulares en el SGZ y un proceso radial que penetra hacia la capa granular, y se disponen tangencialmente a lo largo de la SGL en el límite del giro dentado (Alvarez-Buylla y col., 2002). Interesantemente, se observó una morfología similar de las células derivadas del hPDL localizadas en los nichos de células madre: la región subventricular y la subgranular.

Todos los resultados apoyan y amplían los estudios previos que muestran que el hPDL puede contener células madre que derivan de la cresta neural (Techawattanawisal y col, 2007; Coura y col., 2008).

Las células derivadas del hPDL han sido ampliamente estudiadas en trabajos anteriores pero es necesario realizar más experimentos in vivo que demuestren la integración de las mismas en el sistema nervioso, utilizando células humanas y modelos murinos que confirmen la seguridad de estas células antes de plantear ensayos clínicos en humanos.

3.- SOBREEXPRESIÓN DE eGFP TRANSGÉNICO

Es importante usar un buen marcador de células donantes que no se diluya con las divisiones para no perder en ningún momento su localización y tratar de excluir el posible fenómeno de fusión (Greco y Recht, 2003).

Se ha demostrado que las células derivadas del hPDL podían ser convenientemente modificadas en cultivo con vectores no-virales para la expresión de producto génico externo. La disminución en la expresión génica in vivo ha sido un problema general para la aplicación de terapias génicas ex vivo, particularmente con el uso de ingeniería de células madre (Johansen y col., 2002). En este estudio, se demuestra que la transfección de DNA por electroporación en las células derivadas del hPDL permite la expresión estable de eGFP. No se observó un silenciamiento de la expresión del transgén tanto in vitro como in vivo.

La expresión estable de eGFP+ en los subclones de las células derivadas del hPDL hizo posible el aislamiento de clones celulares de propiedades homogéneas, característica considerada importante para un producto potencial clínico (Martinez-Serrano y Björklund,1997; Sayles y col., 2004).

Los resultados descritos anteriormente indican que las células derivadas del hPDL parecen ser una herramienta atractiva para la transferencia estable de genes externos o la aplicación de factores de crecimiento en el sistema nervioso central.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral, podemos deducir las siguientes conclusiones:

- 1.- Sugieren la existencia de células con propiedades moleculares de células madre y de células de la cresta neural dentro del ligamento periodontal humano y de las células en cultivo derivadas del mismo.
- 2.- Es posible expresar la proteína exógena eGFP de manera estable en células derivadas del ligamento periodontal humano, tanto in vitro como in vivo, sin necesidad de utilizar vectores derivados de virus, asegurando así, una transferencia génica más segura y fiable. La expresión estable de la proteína eGFP permite estudiar in vivo la biología celular y molecular de células derivadas del ligamento periodontal humano.
- 3.- Es posible generar un sistema de cultivo de formación de neuroesferas a partir de células derivadas de hPDL aplicando un medio de cultivo libre de suero y con la presencia de bFGF y EGF.

4.- Las células derivadas del hPDL tienen la capacidad in vitro para diferenciarse en células similares a las células neurales.

5.- Los injertos de células derivadas del hPDL sobreviven al trasplante, se integran, migran y generan células similares a las neurales en el cerebro de ratón adulto.

6.- El injerto y las propiedades de diferenciación de las células derivadas del hPDL en el cerebro de ratón adulto indican que podrían ser una fuente potencial para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, siendo para ello necesario un conocimiento exhaustivo en la biología de las mismas, explorando su caracterización, selección, expansión y comportamiento in vivo.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aasen T., Raya A., Barrero M.J., Garreta E., Consiglio A., González F., Vassena R., Bilic J., Pekarik V., Tiscornia G., Edel M., Boue S. & Izpisua Belmonte J.C. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* 26(11):1276-84.
- Agha-Hosseini F., Jahani M.A., Jahani M., Mirzaii-Dizgah I. & Ali-Moghaddam K. (2010). In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp. *Clin. Transplant.* 24:23-28.
- Alison M.R., Poulson R., Jeffery R., Dhillon A.P., Quaglia A., Jacob J., Novellis M., Prentice G., Williamson J. & Wright N.A. (2000). Hepatocytes from nonhepatic adult stem cells. *Nature.* 406(6793):257.
- Álvarez-Buylla A. & Nottebohm F. (1988). Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature.* 335:353-354.
- Álvarez-Buylla A., Seri B. & Doetsch F. (2002). Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res. Bull.* 57:751-758.
- Anderova M., Kubinova S., Jelitai M., Neprasova H., Glogarova K., Prajerova I., Urdzikova L., Chvatal A. & Sykova E. (2006). Transplantation of embryonic neuroectodermal progenitor cells into the site of a photochemical lesion: immunohistochemical and electrophysiological analysis. *J. Neurobiol.* 66, 1084–1100.

- Anderson D.J., Gage F.H. & Weissman I.L. (2001). Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat. Med.* 7:393-395.
- Aoi T., Yae K., Nakagawa M., Ichisaka T., Okita K., Takahashi K., Chiba T. & Yamanaka S. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*. 321(5889):699-702.
- Armiñán A., Gandía C., Bartual C., García-Verdugo J.M., Lledó E., Mirabet V., Llop M., Barea J., Montero J.A. & Sepúlveda P. (2009). Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and GATA4 nuclear translocation in tissue specific mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 18(6):907-18.
- Arthur A., Rychkov G., Shi S., Koblar S.A. & Gronthos S. (2008). Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells*. 26(7):1787-95.
- Avery J.K. & Chiego D.J. (2007). *Principios de histología y embriología bucal con orientación clínica*. (3ª ed). Madrid: Elsevier España.
- Barbería E. (1995). *Odontopediatría*. Barcelona: Editorial Masson.
- Barquiner J., Pellicer M. & Pétriz J. (2005). Therapeutic applications of stem cells. *Med. Clin.* 124(13):504-11.
- Bartold P.M., Xiao Y., Lyngstaadas S.P., Paine M.L. & Snead M.L. (2006). Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration. *Periodontology* 2000. 41:123-135.
- Bedard A. & Parent A. (2004). Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 151(1-2):159-68.
- Bjornson C.R.R., Rietze R.L., Reynolds B.A., Magli M.C. & Vescovi A.L. (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283:534-537.
- Blau H.M., Brazelton T.R. & Weimann J.M. (2001). The evolving concept of a stem cells: entity or function? *Cell*. 105:829-841.
- Bloom G.S., Luca F.C. & Vallee R.B. (1984). Widespread cellular distribution of MAP-1a (microtubule-associated protein 1A) in the mitotic spindle and on interphase microtubules. *J. Cell Biol.* 98: 331-40.

- Bonilla S., Alarcón P., Villaverde R., Aparicio P., Silva A. & Martínez S. (2002). Haematopoietic progenitor cells from adult bone marrow differentiate into cells that express oligodendroglial antigens in the neonatal mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* 15:575-582.
- Brazelton T.R., Rossi F.M.V., Keshet G.I. & Blau H.M. (2000). From marrow to brain: expression of neural phenotypes in adult mice. *Science* 290:1775-1779.
- Brignier A.C. & Gewith A.M. (2010). Embryonic and adult stem cell therapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125: 336-344.
- Burgoyne R.D., Cambay-Deakin M.A., Lewis S.A., Sarkar S. & Cowan N.J. (1988). Differential distribution of β -tubuline isotypes in cerebellum. *EMBO J.* 7:2311-2319.
- Cameron H.A. & McKay R.D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 435:406-417.
- Carranza F.A., Newman M. & Takei H.H. (2003). *Periodontología Clínica.* (9^o ed.). México: McGraw Hill.
- Casaccia-Bonnet P., Gu C., Khursigara G. & Chao M.V. (1999). p75 Neurotrophin Receptor as a Modulator of Survival and Death Decisions. *Microsc. Res. Tech.* 45:217-224.
- Cheng P.H., Snyder B., Fillos D., Ibegbu C.C., Huang A.H. & Chan A.W. (2008). Postnatal stem/progenitor cells derived from the dental pulp of adult chimpanzee. *BMC Cell Biol.* 9:20.
- Choi K.D., Yu J., Smuga-Otto K., Salvatiello G., Rehrauer W., Vodyanik M., Thomson J.A. & Slukvin I. (2009). Hematopoietic and Endothelial Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells.* 27(3):559-567.
- Chung I.H., Yamaza T., Zhao H., Choung P.H., Shi S. & Chai Y. (2009). Stem cell property of postmigratory cranial neural crest cells and their utility in alveolar bone regeneration and tooth development. *Stem Cells.* 27(4):866-77.
- Clarke D.L., Johansson C.B., Wilbertz J., Veress B., Nilsson E., Karlström H., Lendahl U. & Frisén J. (2000). Generalized potential of adult neural stem cells. *Science.* 288:1660-1663.

- Collignon J., Sockanathan S., Hacker A., Cohen-Tannoudji M., Norris D., Rastan S., Stevanovic M., Goodfellow P.N. & Lovell-Badge R. (1996). A comparison of the properties of Sox-3 and Sry and two related genes Sox-1 and Sox-2. *Development*. 122:509-522.
- Coura G.S., Garcez R.C., de Aguiar C.B., Álvarez-Silva M., Magini R.S., Trentin A.G. (2008). Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. *J. Periodont Res.* 43:531-536
- Damier P. & Brachet P. (2000). Parkinson: la eficacia de los trasplantes. *Mundo Científico*. 212, 32-35.
- Davy P. & Allsopp R. (2009). Balancing out the ends during iPSC nuclear reprogramming. *Cell Stem Cell*. 4(2):95-6.
- Demura T., Tashiro G., Horiguchi G., Kishimoto N., Kubo M., Matsuoka N., Minami A., Nagata-Hiwatahi M., Nakamura K., Okamura Y., Sassa N., Suzuki S., Yazaki J., Kikuchi S. & Fukuda H. (2002). Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression programs during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:15794-15799.
- Doetschman T., Shull M., Kier A. & Coffin J.D. (1993). Embryonic stem cell model systems for vascular morphogenesis and cardiac disorders. *Hypertension*. 22:618-629.
- Donovan P.J. (1994). Growth factor regulation of mouse primordial germ cell development. *Curr. Topics Dev. Biol.* 29:189-225.
- Ebert A.D., Yu J., Rose F.F. Jr, Mattis V.B., Lorson C.L., Thomson J.A. & Svendsen C.N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*. 457(7227):277-80.
- Eglitis M.A. & Mezey E. (1997). Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4080-4085.
- Evans M.J. & Kaufman M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292(5819):154-6.
- Fitzgerald M, Chiego JD, Heys DR. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol* 1990; 35:707-715.

- Frederiksen K. & McKay R. (1988). Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells from the mammalian. *CNS. J. Neurosci.* 8:1144-1151.
- Fuchs E. & Segre J.A. (2000). Stem cells: A new lease on life. *Cell.* 100:143-155.
- Fuchs E. & Weber K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 63:345-382.
- Galli R., Borello U., Gritti A., Minasi M.G., Bjornso C., Coletta M., Mora M., De Angelis M.G.C., Fiocco R., Cossu G. & Vescovi A.L. (2000). Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 3:986-991.
- Galli R., Gritti A., Bonfanti L. & Vescovi A.L. (2003). Neural stem cells: an overview. *Circ. Res.* 92:598-608.
- Gandía C., Armiñán A., García-Verdugo J.M., Lledó E., Ruiz A. Miñana M.D. Sanchez-Torrijós J., Payá R., Mirabet V., Carbonell-Uberos F., Llop M., Montero J.A. & Sepúlveda P. (2008). Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells.* 26(3):638-45.
- García A.D., Doan N.B., Imura T., Bush T.G. & Sofroniew M.V. (2004). GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat. Neurosci.* 7:1233-1241.
- Gay I.C., Chen D. & MacDougall M. (2007). Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod. Craniofac. Res.* 10(3):149-60.
- Gómez M.E. & Campos A. (2002). *Histología y Embriología Bucodental.* (2ª ed). Madrid: Editorial Panamericana.
- Gould T.R., Melcher A.H. & Brunette D.M. (1977). Location of progenitor cells in periodontal ligament of mouse molar stimulated by wounding. *Anat. Rec.* 188:133-141.
- Greco B. & Recht L. (2003). Somatic plasticity of neural stem cells: fact or fancy? *J. Cell Biochem.* 88:51-6.
- Green H. (1991). Cultured cells for the treatment of disease. *Sci. Am.* 265:96-102.

- Gritti A., Galli R. & Vescovi A.L. (2001). Cultures of Stem Cells of the Central Nervous System. En: *Protocols for Neural Cell Culture*. (3rded.). Totowa, NJ, EEUU: Fedoroff S. & Richardson A. Humana Press. 173-197.
- Gritti A., Parati E.A., Cova L., Frolichsthal P., Galli R., Wanke E., Faravelli L., Morassutti D.L., Roisen F., Nickel D.D. & Vescovi L. (1996). Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J. Neurosci.* 16:1091-1100.
- Gritti A., Vescovi A.L. & Galli R. (2002). Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential. *J. Physiol.* 96:81-90.
- Gronthos S., Mankani M., Brahimi J., Gehron Robey P. & Shi S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(25):13625-13630.
- Gronthos S., Brahimi J., Li W., Fisher L.W., Cherman N., Boyde A., DenBesten P., Gehron Robey P. & Shi S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.* 81(8):531-535.
- Guastella J., Nelson N., Nelson H., Czyzyk L., Keynan S., Miedel M.C., Davidson N., Lester H.A. & Kanner B.I. (1990). Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science.* 249(4974):1303-6.
- Hakelien A.M., Landsverk H.B., Robl J.M., Skalhegg B.S. & Collas P. (2002). Reprogramming fibroblast to express T-cell functions using cell extracts. *Nat. Biotechnol.* 20:460-466.
- Hamamoto Y., Nakajima T. & Ozawa H. (1989). Ultrastructural and histochemical study on the morphogenesis of epithelial rests of Malassez. *Arch. Histol. Cytol.* 52:61-70.
- Herzog E.L., Chai L. & Krause D.S. (2003). Plasticity of marrow derived stem cells. *Blood.* 102:3483-3493.
- Hildebrand C., Fried K., Tuisku F & Johansson C.S. (1995). Teeth and tooth nerves. *Prog. Neurobiol.* 45:165-222.
- Hipp J. & Atala A. (2008). Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Rev.* 4:3-11.

- Houser C.R., Crawford G.D., Barber R.P., Salvaterra P.M. & Vaughn J.E. (1983). Organization and morphological characteristics of cholinergic neurons: an immunocytochemical study with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. *Brain Res.* 266(1):97-119.
- Huang A.H., Snyder B.R., Cheng P.H. & Chan A.W. (2008). Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. *Stem Cells.* 26(10):2654-63.
- Huang C.Y., Peláez D., Bendala J.D., García-Godoy F. & Cheung HS. (2009). Plasticity of stem cells derived from adult periodontal ligament. *Regen. Med.* 4(6):809-21.
- Huangfu D., Osafune K., Maehr R., Guo W., Eijkelenboom A., Chen S. Muhlestein W. & Melton D.A. (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* 26(11):1269-75.
- Ianus A., Holz G.G., Theise N.D. & Hussain M.A. (2003). In vivo derivation of glucose competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J.Clin.Investi.* 111:843-850.
- Ikuta K., Kina T., MacNeil I., Uchida N., Peault B., Chien Y.H. & Weissman I.L. (1992). Development of gamma delta T-cell subsets from fetal hematopoietic stem cells. *Ann NY Acad. Sci.* 651:21-32.
- Iohara K., Zheng L., Ito M., Ishizaka R., Nakamura H., Into T., Matsushita K. & Nakashima M. (2009). Regeneration of dental pulp after pulpotomy by transplantation of CD31(-)/CD146(-) side population cells from a canine tooth. *Regen Med.* 4(3):377-85.
- Isacke C. & Horton M. (2000). *The adhesión molecule factsbook.* (2^a ed). Londres: Editorial Paperback.
- Ivanovski S., Gronthos S., Shi S. & Bartold P.M. (2006). Stem cells in the periodontal ligament. *Oral Dis.* 12(4): 358-63.
- Johansen J., Rosenblad C., Andsberg K., Moller A., Lundberg C., Björlund A. & Johansen T.E. (2002). Evaluation of Tet-on system to avoid transgene down-regulation in ex vivo gene transfer to the CNS. *Gene Ther.* 9:1291-1301.

- Kádár K., Kiraly M., Porcsalmy B., Molnar B., Racz G.Z., Blazsek J., Kallo K., Szabo E.L., Gera I., Gerber G., Varga G. (2009). Differentiation potential of stem cells from human dental origin - Promise for tissue engineering. *J. Physiol. Pharmacol.* 60 Suppl 7:167-175.
- Kaneko Y., Sakakibara S., Imai T., Suzuki A., Nakamura Y., Sawamoto K., Ogawa Y., Toyama Y., Miyata T. & Okano H. (2000). Musashi 1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev. Neurosci.* 22:138-152.
- Keller G. & Snodgrass H.R. (1999). Human embryonic stem cells: the future is now. *Nat Med.* 5(2):151-2.
- Kim J.B., Zaehres H., Wu G., Gentile L., Ko K., Sebastiano V., Arauzo-Bravo J.M., Ruau D., Han D.W., Zenke M. & Schöler H.R. (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature.* 454(7204):646-50.
- Király M., Kádár K., Horváthy D.B., Nardai P., Rác G.Z., Lacza Z., Varga G. & Gerber G. (2011). Integration of neuronally predifferentiated human dental pulp stem cells into rat brain in vivo. *Neurochem.* [Epub ahead of print].
- Kondo T. & Raff M. (2000). Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science.* 289:1754-1757.
- Koussoulakou D.S., Margaritis L.H. & Koussoulakos S.L. (2009). A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. *Int. J. Biol. Sci.* 5(3):226-43.
- Krause D.S., Theise N.D., Collector M.I., Henegariu O., Hwang S., Gardner R., Neutzel S. & Sharkis S.J. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105:369-377
- Krebsbach P. & Gehron P. (2002). Dental and Skeletal Stem Cells: Potential Cellular Therapeutics for Craniofacial Regeneration. *J. Dent. Educ.* 66(6):766-773.
- Kulbatski I. (2010). Stem/Precursor cell-based therapy: The importance of circumventing immune suppression by transplantating autologous cells. *Stem Cell Rev.* 6(3):405-10.

- Lacza Z., Horvath E. & Busija D.W. (2003). Neural stem cell transplantation in cold lesion: a novel approach for the investigation of brain trauma and repair. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 11:145–154.
- Lagasse E., Commors H., Al Dhalimy M., Reitsma M., Dohse M., Osborne L., Wang X., Finegold M., Weissman I.L. & Grompe M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* 6:1229-1234.
- Lariviere R.C. & Julien J.P. (2004). Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J. Neurobiol.* 58:131-48.
- Le Douarin N.M., Creuzet S., Couly G. & Dupin E. (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development.* 131: 4637-4650.
- Lee J.E., Hollenberg S.M., Zinder L., Turner D.L., Lipnick N. & Weintraub H. (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-lopp-helix protein. *Science.* 268:836-844.
- Lee S.H., Lumelsky N., Studer L., Auerbach J.M. & Mckay R.D. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 18:675-679.
- Levine J.M. & Nishiyama A. (1996). The NG2 chondroitin sulfate proteoglycan: a multifunctional proteoglycan associated with immature cells. *Perspectives on developmental neurobiology.* 3:245-59.
- Lewis J. (1998). Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9:538-589.
- Lindhe J. (2000). *Periodontología clínica e implantología odontológica.* (3^a ed). Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Liu Y. & Rao M.S. (2003). Transdifferentiation-fact or artifact. *J. Cell. Biochem.* 88:29-40.
- Loh Y.H., Agarwal S., Park I.H., Urbach A., Huo H., Heffner G.C., Kim K., Miller J.D., Ng K. & Daley G.Q. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood.* 113(22):5476-9.
- Lowry W.E., Richter L., Yachechko R., Pyle A.D., Tchieu J., Sridharan R., Clark A.T. & Plath K. (2008). Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105(8):2883-8.

- Lumsden A. (1998). Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development* 103:155-170.
- Maas R, Bei M. The genetic control of early tooth development. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8(1):4-39
- Marion R.M., Strati K., Li H., Tejera A., Schoeftner S., Ortega S., Serrano M. & Blasco M.A. (2009). Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 4(2):141-54.
- Marshall G.P., Reynolds B.A. & Laywell E.D. (2007). Using the neurosphere assay to quantify neural stem cells in vivo. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 8:141-145.
- Martínez-Serrano A. & Björklund A. (1997). Immortalized neural progenitor cells for CNS gene transfer and repair. *Trends Neurosci.* 20:530-538.
- Mayani H. & Lanndslorp P.M. (1994). Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. *Blood.* 83: 2410.
- Mezey E., Chandross K.J., Harta G., Maki R.A. & Mckercher S.R. (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290:1779-1780.
- Mezey E., Key S., Vogelsang G., Szalayova I., Lange G.D. & Crain B. (2003). Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:1364-1369.
- McCulloch C.A., Nemeth E., Lowenberg B. & Melcher A.H. (1987). Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *Anat. Rec.* 219:233-242.
- McGuire M.K., Scheyer E.T., Nunn M.E. & Lavin P.T. (2008). A pilot study to evaluate a tissue-engineered bilayered cell therapy as an alternative to tissue from the palate. *J. Periodontol.* 79(10):1847-56.
- Miletich I. & Sharpe P.T. (2004). Neural crest contribution to mammalian tooth formation. *Birth Defects Res. C. Embryo. Today.* 72(2):200-12.

- Miura M., Gronthos S., Zhao M., Lu B., Fisher L.W., Gehron Robey P. & Shi S. (2003). SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(10):5807-5812.
- Moraleda J.M., Blanquer M., Bleda P., Iniesta P., Ruiz F., Bonilla S., Cabanes C., Tabares L. & Martínez S. (2006). Adult stem cell therapy: dream or reality? *Transpl. Immunol.* 17:74-77.
- Moraleda J.M., Ruiz F., Blanquer M. & Arriba F. (2004). ¿Que son las células madre? *Hematología Mol.* 3:2-5.
- Morrison S.J. (2001). Stem cell potential: Can anything make anything? *Curr. Biol.* 11:R7-R9.
- Morsczeck C., Götz W., Schierholz J., Zeilhofer F., Kühn U., Möhl C., Sippel C. & Hoffmann K.H. (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 24(2):155-65.
- Morsczeck C., Ernst W., Florian C., Reichert T.E., Proff P., Bauer R., Müller-Richter U. & Driemel O. (2008). Gene expression of nestin, collagen type I and type III in human dental follicle cells after cultivation in serum-free medium. *Oral Maxillofac. Surg.* 12(2):89-92.
- Morsczeck C., Petersen J., Völlner F., Driemel O., Reichert T. & Beck H.C. (2009). Proteomic analysis of osteogenic differentiation of dental follicle precursor cells. *Electrophoresis.* 30(7):1175-84.
- Mullen R.J., Back C.R. & Smith A.M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.* 116:201-211.
- Nagatomo K., Komaki M., Sekiya I., Sakaguchi Y., Noguchi K., Oda S., Muneta T. & Ishikawa I. (2006). Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J. Periodontal Res.* 41(4):303-10.
- Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Okita K., Mochiduki Y., Takizawa N. & Yamanaka S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* 26(1):101-6.
- Nosrat I., Seiger A., Olson L. & Nosrat C.A. (2002). Expression patterns of neurotrophic factor mRNAs in developing human teeth. *Cell Tissue Res.* 310:177-187.

- Nosrat I.V., Smith C.A., Mullally P., Olson L. & Nosrat C.A. (2004). Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur. J. Neurosci.* 19(9):2388-98.
- Nosrat I.V., Widenfalk J., Olson L. & Nosrat C.A. (2001). Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Dev. Biol.* 238(1):120-32.
- Ohi Y., Qin H., Hong C., Blouin L., Polo J.M., Guo T., Qi Z., Downey S.L., Manos P.D., Rossi D.J., Yu J., Hebrok M., Hochedlinger K., Costello J.F., Song J.S., Ramalho-Santos M. (2011). Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat. Cell Biol.* [Epub ahead of print].
- Okano H. (2002). Stem cell biology of the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 69:698-707.
- Omatsu-Kanbe M., Shibata M., Yamamoto T., Isono T. & Matsuura H. (2004). Actin filaments play a permissive role in the inhibition of store-operated Ca²⁺ entry by extracellular ATP in rat brown adipocytes. *Biochem J.* 381(Pt2):389-96.
- Park I.H., Lerou P.H., Zhao R., Huo H. & Daley G.Q. (2008a). Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 3(7):1180-6.
- Park I.H., Zhao R., West J.A., Yabuuchi A., Huo H., Ince T.A., Lerou P.H., Lensch M.W. & Daley G.Q. (2008b). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature.* 451(7175):141-6.
- Park I.H. & Daley G.Q. (2009). Human iPS cell derivation/reprogramming. *Curr Protoc. Stem Cell Biol.* Chapter 4: Unit 4A.1.
- Patel S.A., King C.C., Lim P.K., Habiba U., Dave M., Porecha R. & Rameshwar P. (2010). Personalizing Stem Cell Research and Therapy: The Arduous Road Ahead or Missed Opportunity? *Curr. Pharmacogenomics Person Med.* 8:25-36.
- Patten B. (1968). *Human embryology* (3rd ed). Nueva York: McGrawHill.
- Pevny L. & Rao M. (2003). The stem-cell menagerie. *Trends Neurosci.* 26:351-359.

- Pierret C., Spears K., Maruniak J.A. & Kirk M.D. (2006). Neural crest as the source of adult stem cells. *Stem Cells Dev.* 15:286-291.
- Poblet E., Jiménez-Acosta F. & Rocamora A. (1994). QBEND/10 (anti-CD34 antibody) in external root sheath cells and follicular tumors. *J. Cutan. Pathol.* 21:224-8.
- Podrygajlo G., Tegenge M.A., Gierse A., Paquet-Durand F., Tan S., Bicker G. & Stern M. (2009). Cellular Phenotypes Of Human Model Neurons (NT2) After Differentiation In Aggregate Culture. *Cell Tissue Res.* 336, 439-52.
- Price J. & Williams B.P. (2001). Neural stem cells. *Curr Opin Neurobiol.* 11:564-567.
- Priller J., Persons D.A., Klett F.F., Kempermann G., Kreutzberg G.W. & Dimagl U. (2001). Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J. Cell Biol.* 155:733-738.
- Qian X., Davis A.A., Goderie S.K. & Temple S. (1997). FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. *Neuron.* 18:81-93.
- Quiñones-Hinojosa A., Sanai N., Soriano-Navarro M., González-Pérez O., Mirzadeh Z., Gil-Perotin S., Romero-Rodríguez R., Berger M.S., García-Verdugo J.M. & Álvarez-Buylla A. (2006). Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J. Comp. Neurol.* 494:415-434.
- Raff M.C., Fields K.L., Hakomori S., Mirski R., Pruss R.M. & Winter J. (1979). Cell type-specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells in culture. *Brain Res.* 174:283-308.
- Reynolds B.A., Tetzlaff W. & Weiss S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* 12:4565-4574.
- Reynolds B.A. & Weiss S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710.
- Reynolds B.A. & Weiss S. (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev. Biol.* 175:1-13.

- Reynolds R. & Hardy R. (1997). Oligodendroglial progenitors labeled with the O4 antibody persist in the adult rat cerebral cortex in vivo. *J. Neurosci. Res.* 47:455-470.
- Riederer B. & Matus A. (1985). Differential expression of distinct microtubule-associated proteins during brain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:6006-9.
- Rincon J.C., Young W.G. & Bartold P.M. (2006). The epithelial cell rests of Malassez – a role in periodontal regeneration? *J. Periodont. Res.* 41:245252.
- Ripamonti U., Petit J.C. & Teare J. (2009). Cementogenesis and the induction of periodontal tissue regeneration by the osteogenic proteins of the transforming growth factor-beta superfamily. *J. Periodontal Res.* 44(2):141-52.
- Rodríguez F. (2009). Aislamiento, caracterización y plasticidad de las células madre de pulpa dental. Tesis presentada en la Universidad de Murcia para la obtención del título de doctor.
- Rosenbaum A.J., Grande D.A. & Dines J.S. (2008). The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: A global assessment. *Organogenesis.* 4(1):23-7.
- Ross M.H., Romrell L.J. & Kaye G.I. (1998). *Histología. Texto y atlas color.* (3^o ed). México: Editorial Médica Panamericana.
- Sakakibara S., Imai T., Aruga J., Nakajima K., Yasutomi D., Nagata T., Kurihara Y., Uesugi S., Miyata T., Ogawa M., Mikoshiba K. & Okano H. (1996). Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cells. *Dev. Biol.* 176:230-240.
- Sasaki R., Aoki S., Yamato M., Uchiyama H., Wada K., Okano T. & Ogiuchi H. (2008). Neurosphere generation from dental pulp of adult rat incisor. *Eur J. Neurosci.* 27(3):538-48.
- Sayles M., Jain M. & Barker R.A. (2004). The cellular repair of the brain in Parkinson's disease-past, present and future. *Transpl. Immunol.* 12:321-342.
- Seo B., Miura M., Gronthos S., Bartold P.M., Batouli S., Brahim J., Young M., Gehron Robey P., Wang C.Y. & Shi S. (2004). Investigation of

multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 364:149-155.

Seo B., Miura M., Sonoyama W., Coppe C., Stanyon R., Shi S. (2005). Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J. Dent. Res.* 84:907-912.

Shamblott M.J., Axelman J., Wang S., Bugg E.M., Littlefield J.W., Donovan P.J., Blumenthal P.D., Huggins G.R. & Gearhart J.D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:13726-13731.

Shi S. & Gronthos S. (2003). Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow and Dental Pulp. *J. Bone. Miner. Res.* 18(4):696-704.

Sloan A.J. & Waddington R.J. (2009). Dental pulp stem cells: what, where, how? *Internat. J. Paed. Dent.* 19(1): 61–70.

Soria B., Roche E., Berna G., Leon-Quinto T., Reig J.A. & Martin F. (2000). Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes.* 49:157-162.

Stemple D.L. & Anderson D.J. (1992). Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell.* 71:973-985.

Stocum D.L. (2002). Development. A tail of transdifferentiation. *Science.* 298:1901-1903.

Takahashi K. & Yamanaka S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126(4):663-76.

Tashiro K., Sawada T., Inoue S. & Yanagisawa T. (2002). Development of oxytalan fibers in the rat molar periodontal ligament. *J. Periodontal Res.* 37(5):345-352.

Techawattanawisal W., Nakahama K., Komaki M., Abe M., Takagi Y., Morita I. (2007). Isolation of multipotent stem cells from adult rat periodontal ligament by neurosphere-forming culture system. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 357(4):917-23.

Temple S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature* 414:112-117.

- Ten Cate A.R. (1997). The development of the periodontium – a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontol* 2000. 13:9-19.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S. & Jones J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282:1145-1147.
- Towbin H., Staehelint T. & Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76(9):4350-4.
- Tropepe V., Coles B.L., Chiasson B.J., Horsford D.J., Elia A.J., McInnes R.R. & van der Kooy D. (2000). Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science*. 287:2032-2036.
- Trottier S., Geffard M. & Evrard B. (1989) Co-localization of tyrosine hydroxylase and GABA immunoreactivities in human cortical neurons. *Neurosci. Lett*. 106:76-82.
- Trubiani O., Di Primio R., Traini T., Pizzicannella J., Scarano A., Piattelli A. & Caputi S. (2005). Morphological and cytofluorometric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded ex vivo from periodontal ligament. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol*. 18(2):213-221.
- Ventura C., Cantoni S., Bianchi F., Lionetti V., Cavallini C., Scarlata I., Foroni L., Maioli M., Bonsi L., Alviano F., Fossati V., Bagnara G.P., Pasquinelli G., Recchia F.A. & Perbellini A. (2007). Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *J. Biol. Chem*. 282(19):14243-52.
- Wada N., Menicanin D., Shi S., Bartold P.M. & Gronthos S. (2009). Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *J. Cell. Physiol*. 219:667-676.
- Wang X., Montini E., Al-Dhalimy M., Lagasse E., Finegold M. & Grompe M. (2002). Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. *Am. J. Pathol*. 161:565-574.
- Weissman I.L. (2000). Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 100:157-168.

- Widera D., Grimm W.D., Moebius J.M., Mikenberg I., Piechaczek C., Gassmann G., Wolff N.A., Thévenod F., Kaltschmidt C. & Kaltschmidt B. (2007). Highly efficient neural differentiation of human somatic stem cells, isolated by minimally invasive periodontal surgery. *Stem Cells Dev.* 16(3):447-60.
- Widera D., Zander C., Heidbreder M., Kasperek Y., Noll T., Seitz O., Saldamli B., Sudhoff H., Sader R., Kaltschmidt C. & Kaltschmidt B. (2009). Adult palatum as a novel source of neural crest-related stem cells. *Stem Cells.* 27:1899-1910.
- Wiedenmann B. & Franke W.W. (1985). Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles *Cell.* 41(3):1017-28.
- Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J. & Campbell K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature.* 385:810-813.
- Woelfel J.B. & Scheid R.C. (1998). *Anatomía dental. Aplicaciones clínicas.* (5ª ed). Barcelona: Masson – Williams & Wilkins.
- Wolpert L. (1994). Positional information and pattern formation in development. *Dev. Genet.* 15:485-490.
- Yamashiro T., Fujiyama K., Fukunaga T., Wang Y. & Takano-Yamamoto T. (2000). Epithelial rests of Malassez express immunoreactivity of TrkA and its distribution is regulated by sensory nerve innervation. *J. Histochem. Cytochem.* 48:979–984.
- Yang X., Zhang W., Van den Dolder J., Walboomers X.F., Bian Z., Fan M. & Jansen J.A. (2007). Multilineage potential of STRO-1+ rat dental pulp cells in vitro. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 1(2):128-35.
- Yang Z.H., Zhang X.J., Dang N.N., Ma Z.F., Xu L., Wu J.J., Sun Y.J., Duan Y.Z., Lin Z. & Jin Y. (2009). Apical tooth germ cell-conditioned medium enhances the differentiation of periodontal ligament stem cells into cementum/periodontal ligament-like tissues. *J. Periodontal Res.* 44(2):199-210.
- Yao S., Pan F., Prpic V. & Wise G.E. (2008). Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J. Dent. Res.* 87(8):767-71.

- Yokoi T., Saito M., Kiyono T., Iseki S., Kosaka K., Nishida E., Tsubakimoto T., Harada H., Eto K., Noguchi T., Teranaka T. (2007). Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. *Cell Tissue Res.* 327:301-311.
- Yu J., Hu K., Smuga-Otto K., Tian S., Stewart R., Slukvin I.I. & Thomson J.A. (2009). Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science.* 324(5928):797-801.
- Zhang X., Klueber KM., Guo Z., Lu C. & Roisen F.J. (2004). Adult human olfactory neural progenitors cultured in defined medium. *Exp. Neurol.* 186(2):112-23.