



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Modelo Celular de Autismo

D^a Marta Martínez Morgia

2018



UNIVERSIDAD DE MURCIA

**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA HUMANA Y
PSICOBIOLOGÍA**

FACULTAD DE MEDICINA

MODELO CELULAR DE AUTISMO

TESIS DOCTORAL

Marta Martínez Morgia

2018

Directores:

Dr. Carlos Bueno López

Dra. Mari Paz Quesada Rico

Tutor:

Dr. Luis Puelles López

A mi padre

Después de esta etapa de mi vida, de aprendizaje y trabajo intenso me van a faltar páginas para agradecer a las personas que se han involucrado, ayudándome en la realización de esta tesis. Me gustaría comenzar agradeciendo a mi Tutor, Luis Puelles por haberme dedicado su tiempo siempre que lo he necesitado y por haberme dado la oportunidad de aprender de su trayectoria como investigador y profesor; a mi director Carlos Bueno, que me ha enseñado cada uno de los pasos que tenía que dar para llegar hasta aquí, que me ha acompañado a lo largo del camino, ayudándome a resolver los problemas que se me presentaban y que ha conseguido animarme en momentos de agobio; y a mi directora Mari Paz Quesada, siempre dispuesta a ofrecerme su tiempo y sus consejos, por ayudarme a resolver dudas y a organizarme mejor y ser un apoyo siempre que la he necesitado.

Me gustaría agradecer a mis técnicos de laboratorio y amigas Mónica y Loli, que han sido parte fundamental en el desarrollo de mi tesis, facilitando mi trabajo, enseñándome cómo funciona el laboratorio y estando siempre conmigo.

A todos mis compañeros de la Tercera: Ángela, Clara, David, José Eduardo, Lara, María Luisa, Noemí, Paola, Rut y Sergio, gracias por cómo me habéis acogido estos años y por toda esa ayuda que me habéis ofrecido desde el primer día, me siento muy afortunada por haber podido formar parte de vuestro grupo.

A mis chicas: Ana, Esther e Isa, gracias a vosotras me he mantenido cuerda estos últimos meses, gracias por ofrecerme un respiro, por los consejos, por las risas y por animarme siempre a no tirar la toalla.

A mi madrina, que me cuida, me ayuda y me protege desde que nací y que ha sido mi apoyo y mi red de seguridad en el laboratorio, gracias por estar ahí y dejar siempre lo que haces para ayudarme a resolver mis problemas.

Gracias también a Ana, Carmen y Loli por animarme tanto y hacer tan especial mi paso por ese edificio.

Ahora sí, toca dar las gracias a mi familia que es mi mayor apoyo y mi motivación, que sé que están orgullosos de mí y de lo que he conseguido, y que no habría sido así sin ellos. A mis abuelos Juan, Carmen, Salvador y Mela, que han querido tenerme siempre cerca, cuidándome y enseñándome como ser mejor persona. A mi padrino Macario y a mis titos Maria y Mariano por

quererme tanto y preocuparse tanto de mi. A mis primas Paloma y Carmen, con las que he crecido y que son como mis hermanas.

A mi hermano Salva, con el que me río, peleo y comparto tantos momentos. Gracias por dar la chispa a esos días grises.

A Jose, que me ha apoyado siempre y que me ha ayudado a alcanzar mis objetivos. Gracias por estar conmigo cada día, haciéndome ver las cosas más fáciles e intentar sacar siempre lo mejor de mí.

A mi madre, por la educación que me ha dado, por ser un ejemplo de superación, por animarme a seguir luchando por lo que quiero y por luchar tanto por mí, porque hace de mis batallas también las suyas, y por demostrarme que ella siempre estará ahí pase lo que pase y, sobre todo, por todo su amor.

A mi padre, que es mi referente y mi ejemplo a seguir. Gracias por enseñarme por que sientes tanta devoción por esta carrera, he podido entender por qué sacrificas tanto tiempo en esto, gracias por hacerme ver lo importante que es, a través de la investigación, poder ayudar a tantas personas que lo necesitan. Gracias por darme siempre mucho más de lo que te pido y estar siempre que te he necesitado.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico

cDNA: ADN complementario

CME: Células madre embrionarias.

CMN: Células madre neurales.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.

DMEM: Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

EDTA: 2',3'-nucleótido cíclico 3'- fosfodiesterasa.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

FBS: Fetal bovine serum

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico.

GABA: Ácido γ -aminobutírico.

HCl: Ácido clorhídrico

HEPES: Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico.

ICC: Inmunocitoquímica

IPs: Células madre pluripotenciales inducidas.

LP: Ligamento periodontal

LPA: Ligamento periodontal Autismo

LPC: Ligamento periodontal Control

PBS: Tampón fosfato

PCR: Reaccion en cadena de la polimerasa

PD: Pulpa dental

PDA: Pulpa dental Autismo

PDC: Pulpa dental Control

PFA: Paraformaldehido.

P/S: Penicilina/estreptomicina.

qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

Rpm: Revoluciones por minuto.

RT: Temperatura ambiente.

RT-PCR: Transcriptasa inversa de la reacción en cadena de la polimerasa

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SNC: Sistema nervioso central

SYN: Sinapsina

SYP: Sinaptofisina

WB: Western Blot

ÍNDICE

ABSTRACT.....	12
RESUMEN.....	15
INTRODUCCIÓN.....	18
1. Bases biológicas del TEA	22
1.1. Bases genéticas	26
1.2. Bases moleculares del TEA	27
1.3. Importancia de los factores ambientales	28
2. Células Madre	30
2.1. Células Madre Neurales	33
2.2. Células Madre de origen dental	33
2.2.1. Ligamento Periodontal	34
2.2.2. Pulpa Dental	35
OBJETIVOS.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
1. Cultivos Celulares	40
2. PCR-RNA	44
3. Inmunocitoquímica	50
4. Western Blot	53

RESULTADOS.....	58
1. Estudio de la morfología del cultivo	58
2. Características mesenquimales de las células derivadas de LPC y LPA	59
3. Marcador de línea neurogénica	66
4. Cambios celulares en el proceso de diferenciación en cultivo de LPC	67
5. Neurogénesis in vitro de LPC	69
6. Polarización neuronal de las neuronas derivadas de LP	71
7. ICC, WB y Expresión: marcadores de autismo en proliferación y diferenciación neurogénica	80
8. Estudio transcriptómico de genes relacionados con desarrollo de la cresta neural y con posible implicación en la neurobiología del TEA	103
9. Estudio de expresión de proteínas sinápticas en neuronas en cultivo derivadas de LPC y LPA	120
DISCUSIÓN.....	126
1. Importancia de desarrollar un modelo celular de TEA	126
2. Carácter mesenquimal y progenitor de cresta neural de las células de ligamento periodontal y de la pulpa dental	129
3. Diferenciación neural de las células de LP y PD	131
4. Neuronas con TEA	132
CONCLUSIONES.....	139
BIBLIOGRAFÍA.....	141

ABSTRACT

ABSTRACT

ASD is a functional alteration of the cerebral cortex, which presents structural neurodevelopmental anomalies that affect the disposition of neurons, as well as the synaptic function and the pattern of connections within and between cortical columns. From its etiological aspect, ASD has an important genetic load, considering a polygenic disorder, derived from a combination of "de novo" genetic alterations (spontaneous mutations), associated to a predisposition derived from common inherited variations. The main genetic anomalies associated with ASD involve genes that encode proteins of the synapse. In general, they are genes linked to the establishment, maintenance of synapses and synaptic plasticity. Thus, in patients with ASD, alterations in the initial development of the synapses have been described in the connection circuits between complex processing cortical areas (which receive and process multimodal information in combination).

The molecular complexity observed in the predisposition to develop an ASD, together with the diversity of neuronal structural phenotypes, has made animal models reproduce only partially the ASD. To advance in the experimental study it is therefore necessary to develop more representative models, such as cellular models derived from human cells. In recent decades, the development of the biology of stem cells gives us the means to access experimental paradigms about cells derived from individuals with ASD. Currently, IP cell models derived from human cells allow to deepen the molecular and cellular bases of the development of the human brain, as well as the anomalies in this development, which give rise to disorders such as ASD. However, they present inherent problems derived from the experimental manipulation that involves the reprogramming of gene expression.

We propose as a general objective to develop a cellular model of ASD, generating mesenchymal cell cultures derived from the periodontal ligament (LP) and dental

pulp (PD) of teeth of people with autism, to look for cellular and molecular markers of the disease.

For what we propose the following specific objectives:

1. Isolate and amplify mesenchymal stem cells of LP and PD from samples with ASD and controls.
2. Define the cellular and molecular characteristics of these cells.
3. Know the neural potential of these cells.
4. Compare the properties of neuronal cells derived from LP and PD with ASD with cells from control individuals.

We have extracted, cultured and selected mesenchymal cells from LP and PD controls and with ASD. Once the cultures have been amplified, the cells have been induced to differentiate as neurons (passing them to neurogenic medium). We have carried out studies of proteomics (immunocytochemistry and Western blot) and transcriptomics (qPCR), showing the molecular and cellular characteristics of the PD and PD control cells and with ASD.

The results have shown that:

1. Mesenchymal stem cells of LP and PD can be isolated and amplified from samples with ASD and controls.
2. LP and PD cells with ASD and controls have the ability to differentiate into neurons and we have defined the stages of the differentiation process.
3. We can say that neurons derived from mesenchymal cells with ASD present "in vitro" an alteration in the expression of genes and synaptic proteins. These alterations highlight an anomalous distribution of presynaptic markers, together with an alteration in the expression of postsynaptic density proteins.

RESUMEN

RESUMEN

El TEA es una alteración funcional de la corteza cerebral, que presentan anomalías estructurales del neurodesarrollo que afectan a la disposición de las neuronas, así como la función sináptica y el patrón de conexiones dentro y entre columnas corticales. Desde su aspecto etiológico, el TEA tiene una importante carga genética, considerándose un desorden poligénico, derivado de una combinación de alteraciones genéticas "de novo" (mutaciones espontáneas), asociadas a una predisposición derivada de variaciones comunes heredadas. Las principales anomalías genéticas asociadas a TEA implican genes que codifican proteínas de la sinapsis. En general, son genes ligados al establecimiento, mantenimiento de las sinapsis y la plasticidad sináptica. Así, en pacientes con TEA se han descrito alteraciones del desarrollo inicial de las sinapsis en los circuitos de conexión entre áreas corticales de procesamiento complejo (que reciben y procesan de forma combinada información multimodal).

La complejidad molecular observada en la predisposición a desarrollar un TEA, junto con la diversidad de fenotipos estructurales neuronales, ha hecho que los modelos animales reproduzcan solo parcialmente el TEA. Para avanzar en el estudio experimental se hace pues necesario desarrollar modelos más representativos, como son los modelos celulares derivados de células humanas. En las últimas décadas, el desarrollo de la biología de las células madre nos da medios para acceder a paradigmas experimentales sobre células derivadas de individuos con TEA. Actualmente, los modelos de células IPs derivadas de células humanas permiten profundizar en las bases moleculares y celulares del desarrollo del cerebro humano, así como las anomalías en este desarrollo, que dan lugar a trastornos como el TEA. Sin embargo, presentan problemas inherentes derivados de la manipulación experimental que conlleva la reprogramación de la expresión génica.

Nos proponemos como objetivo general desarrollar un modelo celular de TEA, generando cultivos de células mesenquimales derivadas de ligamento periodontal (LP) y pulpa dental (PD) de dientes de personas con autismo, para buscar marcadores celulares y moleculares de la enfermedad.

Para lo que nos proponemos los siguientes objetivos específicos:

- Aislar y amplificar células madre mesenquimales de LP y PD a partir de muestras con TEA y controles.
- Definir las características celulares y moleculares de estas células.
- Conocer la potencialidad neural de estas células.
- Comparar las propiedades de células neuronales derivadas de LP y PD con TEA con células de individuos control.

Hemos extraído, cultivado y seleccionado células mesenquimales de LP y PD controles y con TEA. Una vez se han amplificado los cultivos se ha inducido a las células a diferenciarse como neuronas (pasándolas a medio neurogénico). Hemos realizado estudios de proteómica (inmunocitoquímica y Western blot) y transcriptómica (qPCR), mostrando las características moleculares y celulares de las células de LP y PD control y con TEA.

Los resultados han mostrado que:

- 1- Se pueden aislar y amplificar células madre mesenquimales de LP y PD a partir de muestras con TEA y controles.
- 2- Las células de LP y PD con TEA y controles, tienen la capacidad de diferenciarse en neuronas y hemos definido los estadios del proceso de diferenciación.
- 3- Podemos decir que las neuronas derivadas de células mesenquimales con TEA presentan “in vitro” una alteración en la expresión de los genes y proteínas sinápticas. Estas alteraciones ponen de relieve una distribución anómala de marcadores presinápticos, junto con una alteración en la expresión de proteínas de la densidad postsináptica.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El término autismo se utilizó por primera vez por el psiquiatra Leo Kanner en 1943 en su artículo “Autistic Disturbances of Affective Contact”, en el que reflejó sus observaciones en 11 niños que mostraban “incapacidad para relacionarse de forma normal con las personas y las situaciones desde el comienzo de su vida”. Un año después, Hans Asperger publicó las características conductuales de la psicopatía autista.

Durante los años ochenta se empieza a considerar la importancia de la base genética del autismo después de comprobar que algunos pacientes con Síndrome X frágil presentaban conductas asociadas al autismo (Blomquist et al., 1985). Además, en estudios realizados a hermanos gemelos se descubrió que el autismo es el trastorno neuropsiquiátrico con más alto componente genético, con tasas de aproximadamente 90% entre gemelos, que disminuían al 10% en los mellizos (Greenberg et al., 2001). A principios de los noventa, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó la décima clasificación internacional de enfermedades e incluyó los Trastornos Generalizados del Desarrollo que se caracterizaban por alteraciones en la interacción social, en la comunicación y por la realización de actividades repetitivas y estereotipadas; estando además, estos desordenes generalmente asociados a alteraciones cognitivas. Después, la “American Psychiatric Association” (APA) publicó, en 1995, la cuarta versión del manual diagnóstico y estadístico de los desordenes mentales (DSM-IV) con el apartado de Trastornos Generalizados del Desarrollo, que incluían Síndrome de Asperger, Trastorno desintegrativo infantil, Trastorno de Rett, Trastorno Autista y Trastorno generalizado del desarrollo no especificado en otras categorías. En 2013, la APA revisó la clasificación, cambiando la denominación de Trastornos Generalizados del Desarrollo, que pasó a Trastorno del Espectro Autista (TEA) incluyendo en ese término tres de los cinco Trastornos Generalizados del

Desarrollo: síndrome de Asperger, trastorno autista, y trastorno generalizado del desarrollo no especificado en otras categorías (Torres, 2015).

En la actualidad, sabemos que el trastorno del espectro autista (TEA) es un trastorno del neurodesarrollo que se caracterizan por alteraciones o retrasos en el desarrollo de funciones vinculadas a la maduración del sistema nervioso central, que se inician en la infancia y siguen un curso evolutivo estable. Abarcan una gran variabilidad de manifestaciones clínicas y trayectorias evolutivas; y, en su manifestación fenotípica se caracterizan por deficiencias persistentes en la comunicación e interacción social en diversos contextos, unidas a patrones restrictivos y repetitivos de comportamiento, intereses o actividades (Artigas-Pallarés y Narbona, 2001, 2002; Xavier et al. 2015).

Estos síntomas han de estar presentes en las primeras fases del período de desarrollo de la persona, aunque pueden no manifestarse totalmente hasta que las demandas sociales superan sus limitaciones. También pueden permanecer enmascarados por estrategias aprendidas (APA, DSM-V, 2013).

Actualmente, los criterios diagnósticos del Trastorno de Espectro Autista, según el DSM -V:

A. Déficits persistentes en comunicación social e interacción social a lo largo de múltiples contextos, según se manifiestan en los siguientes síntomas, actuales o pasados:

1. Déficits en reciprocidad socio-emocional
2. Déficits en conductas comunicativas no verbales usadas en la interacción social
- Especificar *la severidad actual (TABLA 1)*

B. Déficits para desarrollar, mantener y comprender relaciones, patrones repetitivos y restringidos de conductas, actividades e intereses, que se manifiestan en, al menos *dos* de los siguientes síntomas, actuales o pasados:

1. Movimientos motores, uso de objetos o habla estereotipados o repetitivos
2. Insistencia en la igualdad, adherencia inflexible a rutinas o patrones de comportamiento verbal y no verbal ritualizado
3. Intereses altamente restringidos, obsesivos, que son anormales por su intensidad o su foco
4. Hiper- o hipo-reactividad sensorial o interés inusual en aspectos sensoriales del entorno
- Especificar *la severidad actual (TABLA 1)*

- C. Los síntomas deben estar presentes en el período de desarrollo temprano** (aunque pueden no manifestarse plenamente hasta que las demandas del entorno excedan las capacidades del niño, o pueden verse enmascaradas en momentos posteriores de la vida por habilidades aprendidas).
- D. Los síntomas causan alteraciones clínicamente significativas** a nivel social, ocupación al o en otras áreas importantes del funcionamiento actual.
- E. Estas alteraciones no se explican mejor por la presencia de una discapacidad intelectual (trastorno del desarrollo intelectual) o un retraso global del desarrollo.** La discapacidad intelectual y el TEA con frecuencia aparecen juntos. Para hacer un diagnóstico de comorbilidad de TEA y discapacidad intelectual, la comunicación social debe estar por debajo de lo esperado en función del nivel general de desarrollo

- *Especificar si:*
 - Se acompaña o no de discapacidad intelectual.
 - Se acompaña o no de un trastorno del lenguaje.
 - Se asocia con una condición médica o genética o con un factor ambiental conocido
 - Se asocia con otro trastorno del neurodesarrollo, mental o del comportamiento
 - Con catatonia

Nivel de severidad	Comunicación social	Intereses restringidos y conducta repetitiva
Nivel 3: requiere un apoyo muy substancial	Déficits severos en habilidades de comunicación social verbal y no verbal que causan alteraciones severas en el funcionamiento, inicia muy pocas interacciones y responde mínimamente a los intentos de relación de otros.	La inflexibilidad del comportamiento, Extrema dificultad de afrontar cambios u conductas restringidas o repetitivos, interfieren marcadamente en el funcionamiento en todas las esferas. Gran malestar o dificultad al cambiar el foco de interés o la conducta.

<p>Nivel 2: requiere un apoyo substancial</p>	<p>Déficits marcados en habilidades de comunicación social verbal y no verbal; los déficit sociales son aparentes incluso con apoyos; inician un número limitado de interacciones sociales; y responden de manera atípica o reducida a los intentos de relación de otros.</p>	<p>El comportamiento inflexible, las dificultades para afrontar el cambio, u otras conductas restringidas/repetitivas, aparecen con la frecuencia suficiente como para ser obvios a un observador no entrenado e interfieren con el funcionamiento en una variedad de contextos. Gran malestar o dificultad al cambiar el foco de interés o la conducta.</p>
<p>Nivel 1: requiere apoyo</p>	<p>Sin apoyos, las dificultades de comunicación social causan alteraciones evidentes. Muestra dificultades iniciando interacciones sociales y ofrece ejemplos claros de respuestas atípicas o fallidas a las aperturas sociales de otros. Puede parecer que su interés por interactuar socialmente está disminuido.</p>	<p>La inflexibilidad del comportamiento causa una interferencia significativa en el funcionamiento en uno o más contextos. Los problemas de organización y planificación obstaculizan la independencia.</p>

Tabla 1: Tabla que especifica los niveles de gravedad del TEA, según el DSM-V. Del 1 al 3, donde 1 es el menor nivel de severidad y 3 el mayor.

Prevalencia del TEA

En los últimos cuarenta años la prevalencia de los trastornos del espectro del autismo (TEA) se ha incrementado significativamente, situándose en la actualidad en 1 caso por cada 100 nacimientos (Elsabbagh et al. 2012), lo que cifraría en más de 450.000 el número de personas con TEA en España.

1. BASES BIOLÓGICAS DEL TEA

Las funciones mentales son el resultado de la actividad de las neuronas que conforman el cerebro. Por lo tanto, entender la función normal es una necesidad para explicar las anomalías que producen trastornos del neurodesarrollo, como el TEA, y abordar un tratamiento adecuado de sus consecuencias. La especial riqueza funcional del cerebro depende del desarrollo de regiones cerebrales con tipos de neuronas característicos que establecen un patrón de conexiones entre ellas. Esto requiere la articulación en el espacio y el tiempo de los procesos moleculares y celulares que construyen la estructura del sistema nervioso central.

Con el avance de la biología molecular y la secuenciación de genomas completos se están empezando a describir los mecanismos por los que la información genética regula los procesos básicos del desarrollo cerebral. Aproximadamente, la mitad de las instrucciones de nuestro genoma se dedica a la construcción del cerebro. El patrón espacio-temporal de estas expresiones (eso es cuándo y dónde se expresan los genes) genera una red de interacciones moleculares que, mediante mecanismos de activación y represión mutua, codifican la forma del embrión y de su cerebro. El desarrollo normal depende, pues, de la secuencia normal del código genético, es decir, de la información que está escrita en los genes; y del equilibrio de su expresión en cantidad, tiempo y espacio, o sea, de la lectura de esta información. Los trastornos del neurodesarrollo están asociados a anomalías funcionales que se manifiestan tempranamente en la vida, con la aparición de trastornos en la conducta, discapacidad intelectual y retraso en el desarrollo psicomotor.

El desarrollo neurológico, entendido como el proceso que culmina con la madurez funcional, discurre desde la vida fetal hasta la adolescencia, incluyendo la poda sináptica que ocurre al inicio de la adolescencia y la mielinización, que finaliza al final de la pubertad. Al nacer, el cerebro inmaduro es influenciado por los estímulos ambientales que pueden modificar la expresión de los genes. Esta interacción gen-ambiente puede ser el origen de anomalías funcionales que conlleven retraso psicomotor y discapacidad intelectual, y también de enfermedades mentales como la esquizofrenia y el TEA (Dierssen y Martínez, 2013; Martínez-Morga y Martínez, 2016; Martínez-Morga et al. 2018).

Los procesos de diferenciación de las células neurales y la formación de circuitos mediante contactos sinápticos entre neuronas (sinaptogénesis) ocurren en el sistema nervioso central durante las últimas fases del desarrollo prenatal y los primeros meses después del nacimiento (Fig.1).

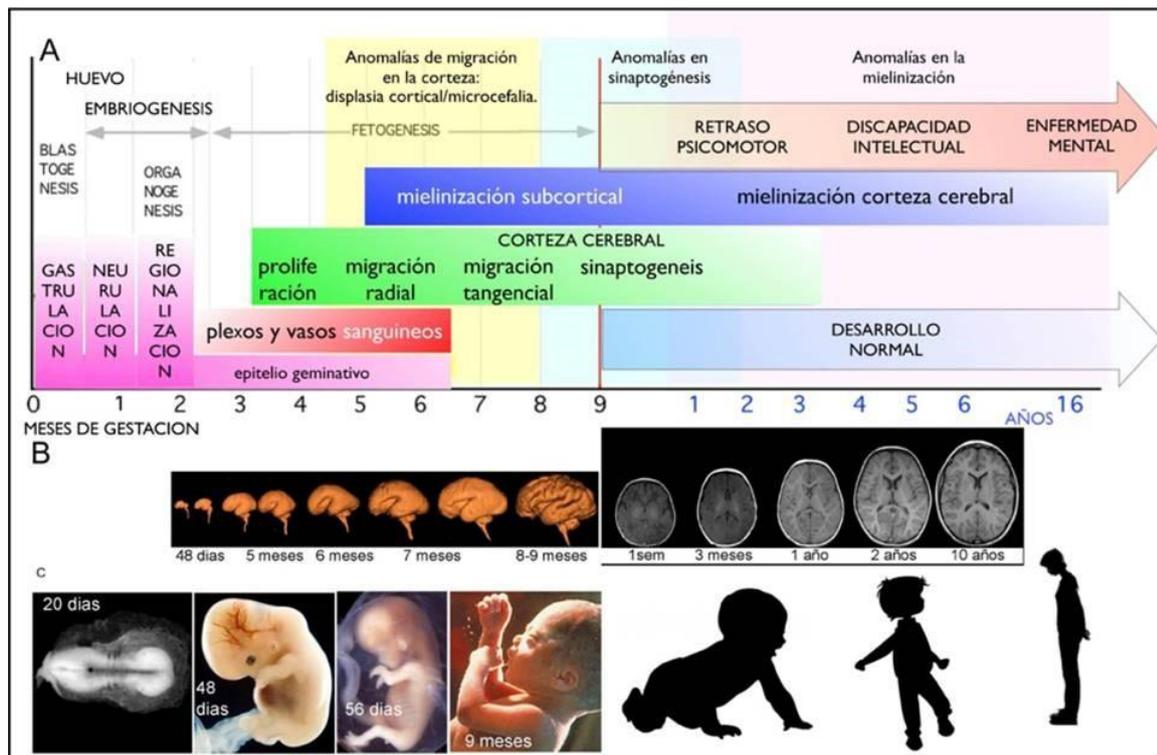


Figura 1: cronograma del desarrollo cerebral prenatal y posnatal. A) Representación gráfica a lo largo del tiempo (eje horizontal) de los principales procesos del desarrollo cerebral en forma de columnas coloreadas. Los efectos de las potenciales alteraciones de los procesos del desarrollo (descritos en la parte superior de la figura) están representados por la flecha en gradiente rojo. B) Reconstrucción morfológica del cerebro en los diferentes estadios del desarrollo prenatal y secciones horizontales de RMN en diferentes edades postnatales. C) Imagen de embriones y niños a diferentes estadios de desarrollo. Tomada de Martínez-Morga y Martínez, 2016.

La actividad de los circuitos neuronales es la base neurobiológica de la conducta y los procesos mentales (emociones, memoria y el pensamiento). La función de los circuitos neuronales presenta una importante capacidad de adaptación, mediante cambios en las propiedades espaciales y temporales de las conexiones entre neuronas del circuito. Así el cerebro construye una respuesta adecuada a los requerimientos de cada situación interna o ambiental. La base estructural de la adaptación neural es la capacidad de modificar la cantidad y la función de las sinapsis neuronales; por lo tanto, lo que definimos como plasticidad neural (neuroplasticidad) se fundamenta en la plasticidad sináptica en los circuitos neuronales (Ismail et al., 2017; Martínez-Morga y Martínez, 2017). Esta plasticidad funcional se logra durante el desarrollo modulando la expresión de un conjunto de genes que regulan mecanismos moleculares y celulares que influyen la dinámica de las conexiones sinápticas. La neuroplasticidad durante

el desarrollo del cerebro presenta patrones temporales heterogéneos, existiendo un periodo crítico de mayor maleabilidad sináptica alrededor del nacimiento, que modula la regulación génica para la formación y consolidación de conexiones neuronales adecuadas mediante la influencia de los estímulos ambientales. Estos actúan sobre un patrón de conexiones específico y regulado por la información genética (lo que hace que los humanos generemos un cerebro humano).

Los estudios de neuroimagen del cerebro humano han sido muy útiles para correlacionar fenotipos de conducta con alteraciones en estructuras cerebrales. En el autismo, los datos actuales de resonancia magnética estructural y funcional sugieren la presencia de anomalías estructurales en múltiples sistemas neuronales implicados en circuitos sociales, entre los que se incluyen: la amígdala, los ganglios basales (núcleo acumbens) y corteza prefrontal. Se piensa que son las alteraciones en la corteza prefrontal, y en especial su conexión con la amígdala cerebral y la corteza parietal y temporal, las que se presentan de manera más constante en los estudios realizados en muestras cerebrales humanas y en modelos animales de TEA (Fig.2).

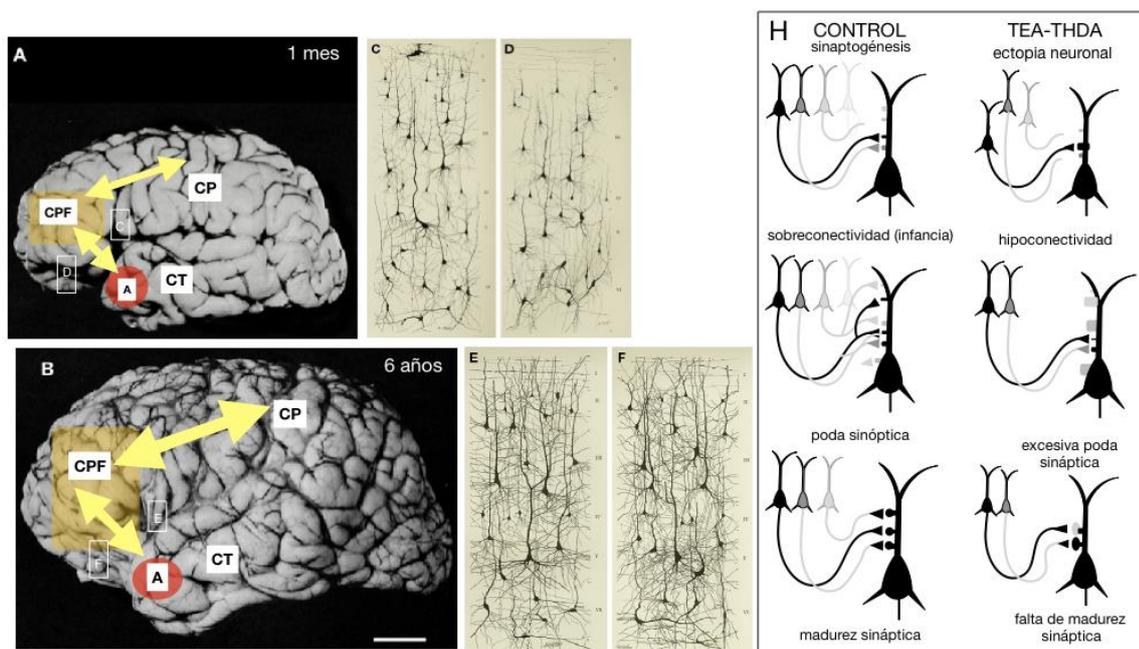
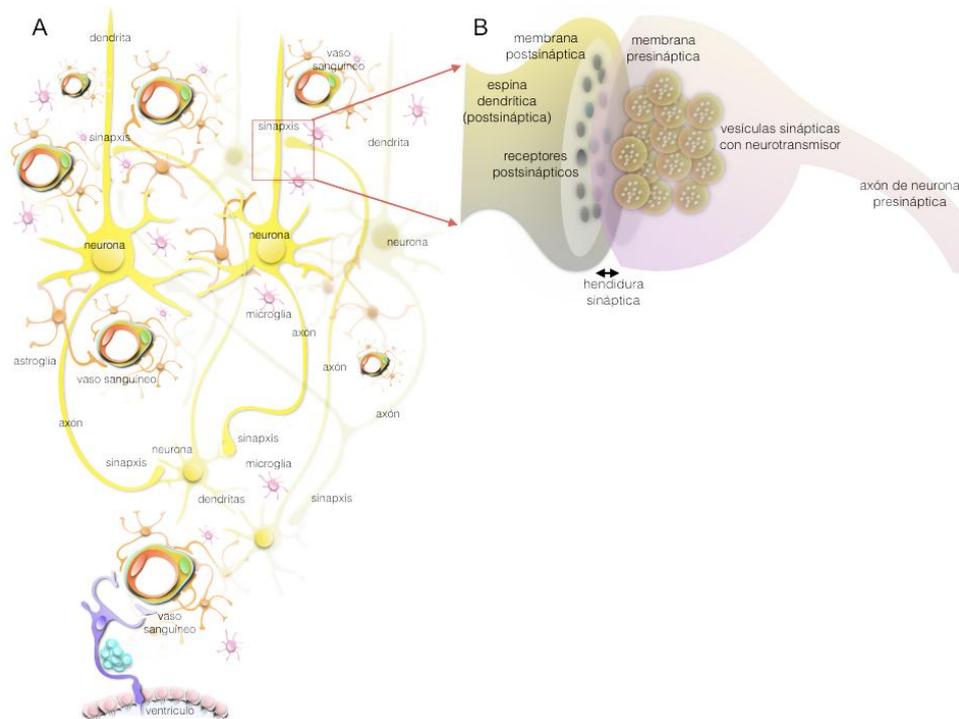


Figura 2: Incremento de la complejidad de la estructura cortical en las etapas postnatales. A, B) Fotografías del hemisferio izquierdo humano de 1 mes (A) y 6 años (B) de edad. C, D) Imágenes representativas de las neuronas piramidales de la corteza frontal precentral (recuadro C en A) y orbitofrontal (recuadro D en A) en el cerebro humano de 1 mes. E, F) Imágenes representativas de las neuronas piramidales de la corteza frontal precentral (recuadro E en B) y orbitofrontal (recuadro F en B) en el cerebro humano de 6 años. Mediante flechas se representan las principales conexiones recíprocas de la corteza prefrontal (CPF) con las cortezas parietal (CP) y temporal (CT), así como con los núcleos amigdalinos (A). H) Esquema de la evolución temporal de los procesos del desarrollo en un cerebro control y un cerebro con TEA-TDAH. Figura tomada de Martínez-Morga et al., 2018.

Casanova y colaboradores (Casanova et al., 2013) han demostrado la presencia de alteraciones estructurales en la corteza cerebral de pacientes con TEA, describiendo un incremento de micro columnas corticales, con neuronas más pequeñas, hiper-excitabilidad intracolumnar y disminución de las conexiones largas de las neuronas corticales. Estas alteraciones están presentes sobretodo en la corteza prefrontal, posiblemente debido a un desarrollo tardío de esta región, que se extiende durante los primeros años de la infancia. Estas alteraciones en la distribución de las neuronas corticales son consecuencia de alteraciones en la proliferación y migración celular durante el desarrollo cerebral, que pueden ser debidos a anomalías genéticas o exposición a tóxicos que afectan a las células germinales neurales (Casanova 2012). La displasia cortical y la hiper-excitabilidad microcolumnar explicarían la relación entre TEA y epilepsia (Strassert et al., 2018).

En conclusión y desde el aspecto neurobiológico, El TEA es una alteración funcional de la corteza cerebral, que presentan anomalías estructurales en la disposición de las neuronas, así como la función sináptica y el patrón de conexiones dentro y entre columnas corticales (Fig. 3). Estas alteraciones afectan fundamentalmente a la corteza prefrontal y sus conexiones, la principal región encefálica implicada en la regulación de la conducta social. A nivel funcional, estas alteraciones producen anomalías en el proceso de neuroplasticidad del desarrollo, como ocurre en otros trastornos neuropediátricos congénitos y adquiridos, como la encefalopatía por hipoxia neonatal, parálisis cerebral, epilepsia, distonía y discapacidad intelectual; así como esquizofrenia (Johnston, 2004).

Figura 3. A) Representación esquemática del tejido cerebral con los distintos tipos celulares que intervienen en el normal desarrollo de la diferenciación neuronal y la formación de sinapsis;



b) Estructura 3D de una sinapsis axodendrítica (terminal axónico sobre una espina dendrítica) de la corteza cerebral. Figura tomada de Martinez-Morga y Martinez, 2017.

1.1 Bases genéticas

Desde su aspecto etiológico, ya hemos visto cómo el TEA tiene una importante carga genética, considerándose un desorden poligénico (múltiples genes implicados con carga patogénica escasa y variable), y por lo tanto, derivado de una combinación de alteraciones genéticas "de novo" (mutaciones espontáneas) asociadas a una predisposición derivada de variaciones comunes heredadas.

Las principales anomalías genéticas asociadas a TEA implican genes que codifican proteínas de la sinapsis (Sala y Verpelli, 2016). Estos codifican proteínas que regulan la transcripción del ADN o la traducción del ARNm, proteínas del citoesqueleto y de membrana, de conexiones intercelulares y de maduración celular. En general, son genes ligados al establecimiento y mantenimiento de las sinapsis y a la plasticidad sináptica que ocurre en el aprendizaje. Así, en pacientes con TEA se han descrito alteraciones del desarrollo inicial de las sinapsis en los circuitos de conexión entre áreas corticales de procesamiento complejo (que reciben y procesan de forma combinada información multimodal), sobre todo de los lóbulos frontal, temporal y parietal, (Hutsler y Casanova., 2016; Geschwind y Levitt, 2007).

1.2 Bases moleculares del TEA

Como hemos visto, las evidencias sobre el origen genético del autismo son abundantes. Aunque, en los últimos años se han postulado, al menos, dos mecanismos patogénicos diferentes de predisposición a padecer este trastorno:

- Heterogeneidad genética derivada de la combinación de múltiples variantes comunes, es decir, hasta 150 genes con diferente localización cromosómica.
- Un modo poligénico de herencia, con alteraciones raras de pocos genes, que requiere la combinación de anomalías en varios de estos genes.

Aunque hoy en día se tiende a favorecer el modelo poligénico. Ambos modelos sugieren que las interacciones entre genes (GxG) pueden tener un importante papel patogénico, es decir, la alteración en la expresión de un gen puede depender de otro gen (Abrahams y Geschwind, 2008; Skafidas et al., 2014; Torres, 2015).

En el marco de esta heterogeneidad genética, los estudios moleculares pueden proporcionar la información necesaria para proponer hipótesis explicativas de las relaciones GxG y gen-ambiente (GxA) en el autismo. Muchas de las proteínas con las que hemos estudiado en nuestro trabajo están relacionadas con el neurodesarrollo y son importantes en la función sináptica (Persico y Bourgeron, 2006).

Las proteínas identificadas en la literatura con un papel en la fisiopatología del TEA pueden distribuirse en ocho grupos según la función celular en la que interviene.

FUNCION	PROTEÍNA
Regulación de la transcripción y de la traducción de los ácidos nucleicos	MeCP2, CC2D1A, MBD3, RORA, RSG5, NR3C1
Dinámica del citoesqueleto de actina y andamiaje	CDC42, RHOA
Las proteínas de andamiaje	TUJ1, Nestina, SHANK2, SHANK3,
Los receptores de neurotransmisores y transportadores.	GAD1, GAD65/67, SYNGAP1.
Sistemas de segundos mensajeros	EN1, EN2
Apoptosis	CASP3
Moléculas de adhesión celular.	NG2
Moléculas secretadas	RELN

Tabla 2: Clasificación de las proteínas utilizadas según su función.

1.3 Importancia de los factores ambientales

El origen genético del TEA es un concepto abiertamente aceptado, pero existen evidencias que apoyan la contribución de factores ambientales y epigenéticos en su desarrollo. Junto con una alteración poligénica en el TEA primario (no síndromico) existe un factor ambiental asociado (Skafidas et al., 2014).

Los factores genéticos y ambientales juegan un papel determinante en el riesgo de padecer TEA. La identificación de las etapas del desarrollo en las que existe más vulnerabilidad es de gran importancia para la comprensión de cuándo y en qué circunstancias un niño está en riesgo elevado de desarrollar un TEA. No existe un factor ambiental que, en exclusiva, explique el aumento de la prevalencia del autismo, pero sí, este aumento en las últimas décadas podría deberse a factores ambientales y del estilo de vida, que afectarían las interacciones entre el ambiente y la expresión genética (AxG) en el desarrollo del niño, tanto en el útero materno como en la etapa postnatal. Los factores de riesgo que se han identificado son: agentes infecciosos, medicamentos, sustancias químicas ambientales, dieta y estrés físico/psicológico (Dietert et al., 2011; Lyall

et al., 2014; Dierssen y Martinez, 2013; Martinez-Morga y Martinez, 2016, 2017, Martinez-Morga et al., 2018, Torres, T. 2015).

– **Mecanismos de interacción AxG: procesos epigenéticos**

El término "epigenética" se refiere a los cambios en la cromatina que, aunque no modifican la secuencia de nucleótidos del ADN, si pueden alterar la expresión de diferentes genes. Las alteraciones epigenéticas más frecuentes son la metilación de nucleótidos y las modificaciones de las histonas. Este tipo de cambios pueden verse por factores ambientales o por otros factores como la edad, la dieta, etc. Las modificaciones epigenéticas son estables, con frecuencia heredables en la división celular y sólo son ocasionalmente heredadas por la descendencia en el proceso de formación de los gametos sexuales o meiosis (LaSalle y Yasui, 2009). Las modificaciones epigenéticas y, por tanto, la alteración en la expresión de estos genes diana, podrían dar lugar a diferentes desordenes del neurodesarrollo (LaSalle y Yasui, 2009, 2011).

La complejidad molecular observada en la predisposición a desarrollar un TEA, sobretodo aquella que regula el establecimiento y la función de los contactos sinápticos (Fig. 4), junto con la diversidad de fenotipos estructurales neuronales, ha hecho que los modelos animales reproduzcan solo parcialmente el TEA. Para avanzar en el estudio experimental se hace pues necesario desarrollar modelos más representativos, como son los modelos celulares derivados de células humanas. En las últimas décadas, el desarrollo de la biología de las células madre nos ha permitido acceder a paradigmas experimentales sobre células derivadas de individuos con TEA.

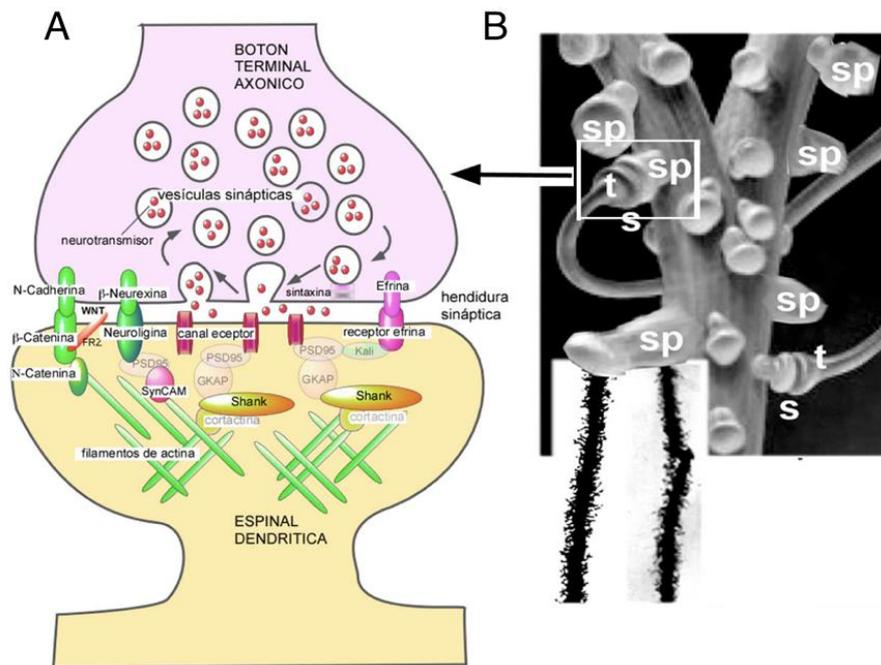


Figura 4: A) Estructura interna de un botón sináptico y de la espina sináptica, donde se han dibujado los principales complejos moleculares que intervienen en la formación y maduración de la sinapsis; B) Imagen de la dendrita apical de una neurona piramidal de la corteza (con dos micrografías de espinas teñidas con el método de Golgi), donde se puede apreciar la

estructura tridimensional de las espinas sinápticas. Figura tomada de Martinez-Morga y Martinez, 2017.

2. CELULAS MADRE

Las células madre son células que se encuentran en todos los organismos pluricelulares y que tienen la capacidad de dividirse y diferenciarse en diversos tipos de células especializadas, además de autorrenovarse para producir más células madre (Scott F. Gilber, 2014)

La mayoría de los tejidos de un organismo adulto, poseen una población de células madre residentes que les permiten la renovación periódica de sus células o su regeneración (Dor Y, Melton DA, 2004). 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 neuronales (Okano, 2002). Algunas células madre adultas son capaces de diferenciarse en más de un tipo celular como las células madre mesenquimales de diferentes tejidos (grasa, médula ósea, músculo, cordón umbilical, etc.) y las células madre hematopoyéticas de médula ósea, mientras que otras son exclusivamente precursoras directas de las células del tejido en el que se encuentran, como por ejemplo las células madre de la piel,

miocardio, intestino o las células madre gonadales (células madre germinales) (Tuch, 2006).

Las células madre presentan dos tipos de divisiones celulares: durante la vida embrionaria, las células madre embrionarias (CME) hacen 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. Las células madre adultas se clasifican 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 et al., 2000; Clarke et al., 2000). La potencialidad diferencial de las células madre está definida por gradientes de información posicional derivados del entorno, pueden cambiar cuando estas células son ubicadas en un nuevo nicho. Durante este proceso de cambio de destino pueden incluso mostrar estados de potencialidad histogénica que normalmente solo se encuentran en el embrión (Wolper, 1994, Anderson et al., 2001). 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 et al., 2001).

En el año 2006 fueron generadas las células madre pluripotenciales inducidas (IPs). Las IPs son células adultas diferenciadas, pero tras la inducción con la inserción de 4 genes en su núcleo (*Oct4*, *Sox2*, *c-Myc*, y *Klf4*), se comportan como células embrionarias con plasticidad histogénica. Estas células han supuesto un nuevo enfoque en la biología y terapia celular (Takahashi et al., 2006), por permitir 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. Estas células IPs son morfológicamente similares a las CME, expresan genes y antígenos de superficie celular idénticos a estas y tienen capacidad de formar teratomas cuando se trasplantan en ratones inmunodeprimidos. Estas células son inmortales y pueden reprogramarse para tipos de células diferenciadas, incluidas las células cerebrales (Yu et al., 2009).

Más recientemente la técnica se ha refinado, hasta el punto que se han obtenido IPs con los genes Oct4 y Sox2 (Huangfu et al., 2008).

Las IPs se han utilizado para estudiar los trastornos del neurodesarrollo, ya que estas células permiten generar modelos celulares de trastornos del neurodesarrollo humano *in vitro* y, de hecho, reconstruir la trayectoria alterada del desarrollo cerebral como se ve en trastornos como el autismo. Los fibroblastos obtenidos a partir de una biopsia cutánea de cualquier individuo se pueden "desprogramar" en células madre pluripotentes inducidas por el ser humano.

Estas IPs derivadas de células humanas se pueden diferenciar en progenitores neuronales y neuronas más maduras *in vitro*, permitiendo así la generación de modelos de trastornos neurológicos específicos del paciente. El laboratorio de la doctora Vaccarino ha demostrado que los IPs derivados de pacientes conservan la firma genética única de los pacientes de los que se derivaron originalmente (Abyzov et al., 2012). Estas células pueden ayudar a evaluar los efectos de alterar la expresión de genes específicos (conocidos o desconocidos) en el desarrollo típico de las células neuronales humanas.

Hasta ahora, nuestro conocimiento y comprensión de los trastornos del neurodesarrollo se ha limitado en gran medida a los hallazgos de los estudios de asociación del genoma completo y los modelos de roedores (Stevens et al., 2012; Grigorenko et al., 2011). Si bien, como hemos señalado anteriormente, los modelos de roedores proporcionan información sobre los procesos fundamentales y evolutivamente conservados, que subyacen al desarrollo neuronal, pero no proporcionan información precisa sobre la patogénesis de la enfermedad humana y no son idóneos para testar de forma clara las vías terapéuticas. Esto se debe a la mayor complejidad funcional, tamaño y diversidad de tipos celulares encontrados en el cerebro humano. Actualmente, los modelos de células IPs derivadas de células humanas nos presentan un medio poderoso para profundizar en las bases moleculares y celulares del desarrollo del cerebro humano, así como las anomalías en este desarrollo, que dan lugar a trastornos como el TEA.

2.1 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. Las 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).

Las células individuales del neuroepitelio (células madre neuroepiteliales) originan en la vida embrionaria todas las células neurales. Mientras que las células gliales (astroglia y oligodendroglia) pueden proliferar a lo largo de toda la vida, las neuronas no tienen capacidad regenerativa. Sin embargo, el hallazgo de células madre neurales en la región subventricular (SVZ) del cerebro adulto (Galli et al., 2003), así como en el giro dentado del hipocampo (Cameron y McKay, 2001) de roedores, supuso un nuevo capítulo de estudio sobre la posibilidad de regenerar neuronas en el cerebro. El mejor marcador de CMN es la Nestina, una proteína de los filamentos intermedios del citoesqueleto celular (Frederiksen y McKay, 1988). Recientemente se han identificado otros marcadores: Musashi-1, una proteína de unión al RNA (Sakakibara et al., 1996; Kaneko et al., 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 et al., 1996).

2.2 Células madre de origen dental

La formación embriológica de los dientes, se caracteriza por una estructurada interacción de células ectodérmicas epiteliales y ectomesénquima originado por la migración de las células de la cresta neural (Fig. 5) (Mitsiadis et al., 2017; Santagati y Rijli, 2003; Sperber 1989). Este tejido ectomesenquimal origina la pulpa dental (PD) y el ligamento periodontal (LP) tanto de leche como permanentes. Las células de PD y LP por sus características mesenquimales, se mantienen en condiciones de células madre mesenquimales. Estas células fueron aisladas inicialmente por Gronthos y cols (2000), mediante digestión enzimática de tejido pulpar. El análisis inmunohistoquímico estas células mostró marcadores similares a las células mesenquimales extraídas de médula ósea. Estudios

posteriores de este mismo grupo confirman que estas células cumplen con los criterios necesarios para ser caracterizadas como células madre mesenquimales, como la capacidad de diferenciarse a adipocitos, células de la cresta neural y odontoblastos (criterios propuestos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT; Dominici et al., 2006).

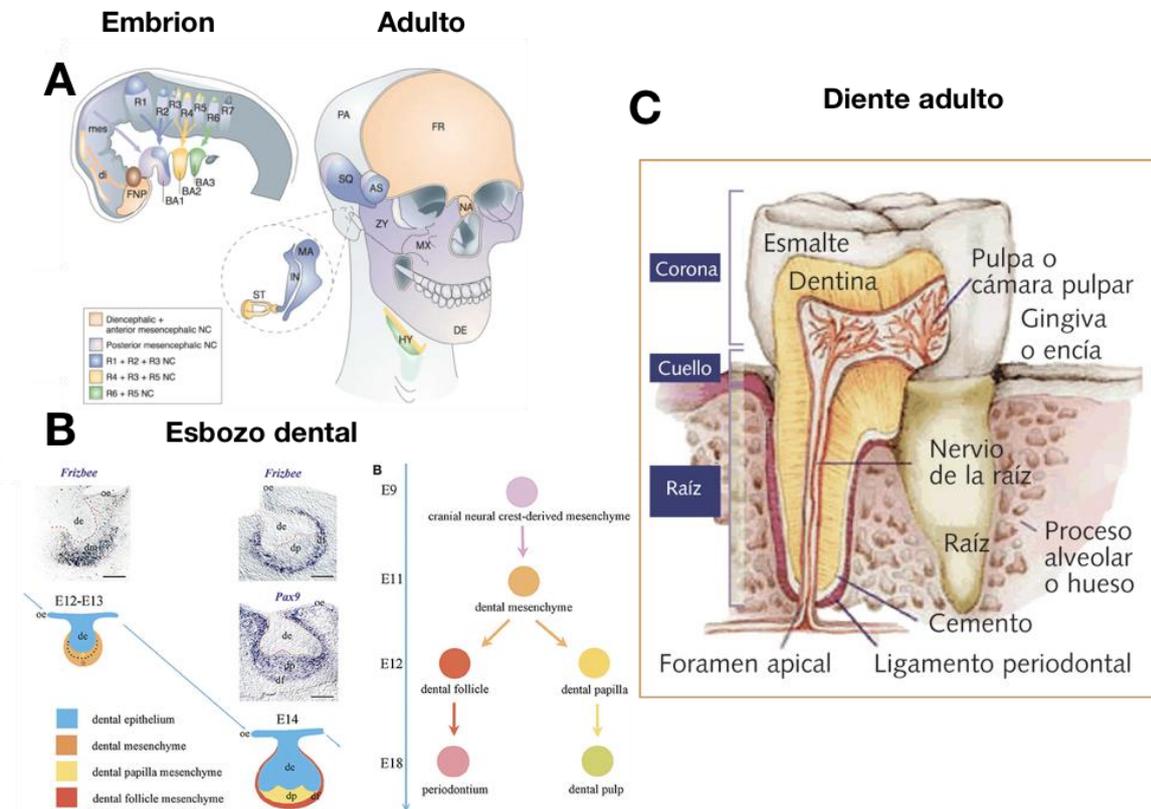


Figura 5: Desarrollo del diente y anatomía dental. A) Distribución de la cresta neural céfalica durante el desarrollo embrionario y derivados óseos de estas células en el cráneo adulto. (Figura modificada de Santagati y Rijli, 2003). B) Desarrollo del esbozo dental en embriones de ratón de E9 a E18, expresando marcadores de células de la cresta neural (*frizbee* y *Pax9*). Se aprecia como el mesénquima dental, que va a formar la PD y el LP provienen de la cresta neural (Figura de Mitsiadis et al., 2017). C) Anatomía del diente adulto.

2.2.1 LIGAMENTO PERIODONTAL

En 2004, Seo y colaboradores publicaron que el LP humano adulto contenía una población de células madre multipotenciales, que podían ser aisladas y expandidas in vitro, identificándolo como un reservorio único de células madre de una fuente tisular accesible (Seo et al., 2004).

En el caso de las células madre adultas en el LP 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 LP pueden también derivar de una población de células perivasculares que conservan capacidad autorregenerativa y multipotencialidad (Seo et al., 2004; Trubiani et al., 2005; Nagatomo et al., 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 et al., 1977; McCulloch et al., 1987).

Después de aislar LP someterlas a determinadas condiciones de cultivo, demostraron capacidad para diferenciarse en células similares a cementoblastos, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, miofibroblastos y células formadoras de colágeno (Nogatomo et al., 2006; Techawattanawisal et al., 2007; Gay et al., 2007; Coura et al., 2008, Kadar et al., 2009). En estudios posteriores se ha investigado el potencial de las LP para dar lugar a células propias del sistema nervioso. Para ello las LP 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 (Fig. 5). 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. 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 et al., 2007). En nuestro laboratorio, trabajos previo nos han permitido conformar su potencialidad neural tanto "in vitro" como "in vivo", así como la expresión de marcadores específicos de progenitores de cresta neural, como Slug, Twist and Sox9 (Bueno et al., 2013).

2.2.2 PULPA DENTAL

La biología celular de las células pulpares dentales fue descrita originalmente por Stanley (1962), siendo consideradas como fibroblastos tras el establecimiento de métodos de cultivo por parte de Pomerat y Contino (1965). Los principales componentes del tejido de la pulpa dental son las células de la pulpa dental, que son células mesenquimales derivadas de la cresta neural (Thesleff, 2003; Janebodin et al, 2011). Algunas de estas células demuestran un alto potencial de crecimiento y poseen múltiples propiedades de diferenciación. Estas poblaciones

de células están presentes no solo en el tejido de pulpa adulto, sino también en la pulpa dentaria decidua y en la papila apical.

Se ha aislado una población de células madre mesenquimales (MSC) a partir de tejido de pulpa dental. Primero se aislaron del tejido de la pulpa de dientes humanos permanentes, y se designaron células madre de la pulpa dental postnatales. Estas células que fueron seleccionadas por su alta tasa de crecimiento, se diferenciaron en osteoblastos, adipocitos y células neuronales. Las células de la PD tienen el potencial de diferenciarse en células neuronales *in vitro e in vivo* (Miura et al., 2003)

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Se propusieron los siguientes objetivos:

- **Objetivo general:** Desarrollar un modelo celular de TEA, generando cultivos de células mesenquimales derivadas de ligamento periodontal y pulpa dental para buscar marcadores celulares y moleculares de la enfermedad.

- **Objetivos específicos:**
 1. Aislar y amplificar células madre mesenquimales de ligamento periodontal y pulpa dental a partir de muestras con TEA y Controles.
 2. Definir las características celulares y moleculares de estas células.
 3. Conocer la potencialidad neural de estas células.
 4. Comparar las propiedades de células neuronales derivadas de LP y PD con TEA con células de individuos control.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES:

- **Aislamiento de las células de ligamento periodontal y pulpa dental.**
 - Las extracciones dentales se realizaron en el Hospital de San Juan (Alicante). Se recogieron 4 dientes de leche de niños (2 niños diagnosticados de TEA y 2 de niños control). Los dientes de leche se depositaron en tubos (Falcon) con medio de cultivo células, compuesto por: DMEM High Glucose (Biowest), antibióticos: 5.000U/ml Penicillin y 5.000U/ml Streptomycin (Lonza), y Fungizona 2,50ug/ml (Gibco).
 - Las muestras fueron guardadas a 4°C y transportadas en hielo hasta el edificio LAIB-Arrixaca (Murcia), donde fueron procesadas.
 - La extracción de células dentales se realizó en condiciones de esterilidad en una cabina de seguridad tipo II con flujo vertical una cabina de seguridad biológica tipo II.
 1. Los dientes de leche se colocaron en una placa de Petri con PBS estéril (Gibco), antibióticos: Penicilina/Streptomicina, 100ug/ml (Lonza), y Fungizona, 2,50ug/ml (Gibco).
 2. Se retiró, en cada caso, el ligamento periodontal (fundamentalmente del tercio medio), y la pulpa dental (interior del diente), con la ayuda de unas pinzas y un bisturí. Se extrajo ligamento periodontal de 2 dientes (uno de un niño con TEA y otro de un niño CONTROL) y pulpa dental del los otros 2 dientes de leche (mismo anterior).

3. Después, se traspasó el ligamento periodontal y la pulpa dental (junto con el PBS) a un tubo (Falcon) y se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos, tras lo que se descartó el sobrenadante y se procedió a realizar la disgregación enzimática:

- Al precipitado celular se añadió una solución de proteasas: Colagenasa tipo I (3mg/ml; Worthington Biochem) y dispasa (4mg/ml; GIBCO) durante 1 hora a 37°C.
- Una vez pasada la hora, las proteasas se inactivaron añadiendo un volumen igual o mayor de medio de cultivo celular DMEM muy frío.
- Se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm
- Se descartó de nuevo el sobrenadante y se añadió el Medio de Cultivo Completo con antibióticos y antifúngicos,

• **Cultivo de células de Ligamento periodontal y pulpa dental.**

1. 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. Los pasos a seguir eran los siguientes:

- La suspensión celular se agitó y se depositaron 10 ul de la misma en un tubo (Eppendorf), se añadió 10 ul 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:

- $N^{\circ} \text{ células viables/ml} = n^{\circ} \text{ células vivas contadas} \times 10000 \times \text{factor de dilución}$

- N° células totales/ml = (n° células vivas contadas + muertas contadas) x 10000 x factor de dilución.
- %Viabilidad = $\frac{n^{\circ} \text{ de células viables}}{n^{\circ} \text{ de células totales}} \times 100$

n° de células totales

- Se multiplica el número de células por 10000, ya que el volumen correspondiente a la región contada en la cámara Neubauer es de 0.1mm³.
- Tras hacer el recuento y la estimación de la viabilidad, se ajustó la solución celular a 1x10⁵ células/ml y se sembró 3ml de la misma por frasco de cultivo de 25 cm² (Sarstedt). Las células se cultivaron en una estufa de cultivos celulares a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.
2. Las células aisladas del ligamento periodontal crecen adheridas al plástico de la placa de cultivo. Para su cultivo, expansión y mantenimiento, se utilizó un medio de cultivo celular que denominamos “Medio de Cultivo Completo”, compuesto por DMEM High Glucose (Biowest) y suplementado con los siguientes componentes:
- Fetal Bovine Serum, 15% (Biowest)
 - Penicilina/Streptomocina, 100ug/ml (Lonza)
 - L-Glutamine, 200mM (Lonza)
 - Fungizona, 2,50ug/ml (Gibco).
3. 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 un pase a otro frasco de mayor tamaño o a dos frascos de igual tamaño:
- Se retiraba el medio de cultivo del frasco que contenía las células, y se hacía un lavado, añadiendo PBS estéril hasta cubrir la superficie del frasco donde se encuentran adheridas las células, después se retiraba el PBS y se añadía Tripsina 0.25% + EDTA 1mM (disgregación enzimática) en cantidad suficiente para cubrir la superficie 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. La mezcla era centrifugada durante 5 minutos a 1000 rpm, se desechaba el sobrenadante y se resuspendían las células en 1 ml de medio de cultivo completo. 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 o en dos del mismo tamaño y se vuelven a depositar los frascos en las estufas de cultivos a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. El medio de cultivo celular completo era cambiado con una frecuencia de 3 veces por semana aproximadamente, atemperando siempre los medios que se van a añadir a los frascos a 37°C.
4. Por otro lado, para la proliferación y mantenimiento de células madre neuronales, se utilizó otro medio de cultivo que denominamos “Medio de Diferenciación” compuesto por DMEM F12 + Glutamax, 1X (Gibco) al que añadimos los siguientes componentes:
- Hepes Buffer, 5mM (Gibco)
 - Glucosa, 0,6% (Sigma)
 - N2 Supplement, 100X (Gibco)
 - Penicilina/Streptomycin, 100ug/ml (Lonza)
 - MEM NEAA, 100X (Gibco)
 - EGF(Epidermal Growth Factor, Pepro-Tech), 20ug/ml (R&D Systems)
 - FGF basic (Fibroblast Growth Factor, Pepro-Tech), 20ug/ml (R&D Systems)

El medio de diferenciación era cambiado con una frecuencia de 3 veces por semana aproximadamente, atemperando siempre los medios que se van a añadir a los frascos a 37°C.

5. Para tener una reserva de células almacenadas que permitiera llevar a cabo la investigación, se congelaron células en proliferación.
- Se llevó a cabo con un medio de congelación compuesto por un 90% de suero (Fetal Bovine Serum, Biowest) y un 10% de DMSO (dimetil sulfóxido, SIGMA), que evita la cristalización del agua dentro del citoplasma. Se añadió 1 ml de suspensión celular (aproximadamente 1×10^6 células/ml) por cada vial. Posteriormente, los viales fueron almacenados en una cámara frigorífica de -80°C durante 2 horas.

- Para su descongelación y siembra de nuevo en cultivo, cada vial con 1×10^6 células se descongeló sumergiéndolo 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 1 ml de medio de cultivo completo. 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.

2. PCR-RNA

• Extracción de RNA.

- El RNA de las células en cultivo se extrajo mediante el reactivo TRIzol (Invitrogen Life Technologies), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se lavaron con PBS 1X, se les añadió 1 ml de Trizol y se homogeneizaron mediante pipeteo repetitivo, pasándolas a continuación a un tubo de 1.5 ml (en este punto las células pueden congelarse a -80°C hasta 3 meses). Para la fase de separación, los homogeneizados se incubaron 5 min a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos núcleo-proteína. A continuación, se añadió 0.2 ml de cloroformo por cada 1 ml de Trizol, se agitó manualmente durante 15 segundos y se incubó 2-3 min a temperatura ambiente. Luego los tubos se centrifugaron durante 15 min a 12.000 xg y a 4°C . Para precipitar el RNA, se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se añadió 0.5 ml de isopropanol por cada 1 ml de Trizol. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 10 min a 12.000 xg y a 4°C . El precipitado, que contiene el RNA, se lavó con 1 ml de etanol al 75 % por cada 1 ml de Trizol, se le dio un *vortex* y se centrifugó 5 min a 7.500 xg y a 4°C . Finalmente, el RNA precipitado y lavado, se dejó secar a temperatura ambiente y se disolvió en $35 \mu\text{l}$ de H_2O libre de RNasas.

• RT-PCR.

- A continuación, $1 \mu\text{g}$ de RNA se retro-transcribió a cDNA mediante una RT-PCR utilizando el kit comercial *iScript cDNA Synthesis Kit* (BIO-RAD). Para ello, se mezcló el volumen de RNA que corresponde a $1 \mu\text{g}$ y se añadió H_2O hasta $15 \mu\text{l}$ en sus correspondientes tubos de $200 \mu\text{l}$. Se hizo una Master Mix que

contenía 4 µl de *5x iScript Reaction Mix* y 1 µl de *iScript Reverse Transcriptase* por cada muestra y de ella se repartió 5 µl a cada tubo que contenía el RNA. Se colocaron los tubos en un termociclador LifeEco (modelo TC-96/G/H(b)C) y la RT-PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 5 min a 25°C para la unión de los *primers*, 20 min a 46 °C para la transcripción inversa y 1 min a 95°C para inactivar la reacción.

- Las concentraciones de cDNAs se midieron en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) y se obtuvo unos ratios de pureza de unos 1.88 para 260/280 y de 2 para 260/230.
- **RT-PCR específica de microRNAs**
 - Para el estudio específico de la expresión de miRNAs, el RNA total se convirtió a cDNA utilizando el kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) y los primers específicos de microRNA-132 y de microRNA-16 de los kits *TaqMan MicroRNA Assays* (Applied Biosystems). Para ello, se hizo una dilución previa de los RNAs a 1:100, de ésta se pasaron 10 ng de RNA a tubos de PCR y se completó hasta 5 µl con H₂O. Se prepararon RNAs de la misma muestra tanto para el miRNA-132 como para el miRNA-16. Y para cada una de ellas, se preparó una Master Mix que contenía 0.15 µl de *dNTP mix*, 1 µl de *Multiscribe RT enzyme* (50 U/µl), 1.5 µl de *10x RT Buffer*, 0.19 µl de *RNase Inhibitor* (20 U/µl) y 4.16 µl de H₂O. De esta mezcla, se puso 7 µl en cada tubo de PCR preparado con el RNA y se añadió 3 µl de 5X RT-primer del miRNA-132 ó miRNA-16, como correspondiera, y los tubos se pasaron a un termociclador LifeEco (modelo TC-96/G/H(b)C) con el siguiente programa: 30 min a 16°C, 30 min a 42°C y 5 min con 85°C.
- **PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)**
 - La qPCR permite cuantificar de forma relativa los niveles de expresión de un determinado gen o microRNA entre diferentes muestras y así poder compararlas. La detección de la amplificación de los diferentes productos de PCR, se realizó mediante dos métodos químicos según los protocolos de los fabricantes: *SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus)* (Takara) para los genes y *TaqMan MicroRNA Assays* (Applied Biosystems) para analizar el miRNA-132. Todas las detecciones se realizaron por triplicado en un sistema *StepOne Plus Real-Time PCR* (Applied Biosystems) y los análisis de expresión se realizaron con el software *StepOne* usando el método de Delta de Ct. Todos los valores obtenidos se normalizaron con el control endógeno GAPDH para los genes codificantes y con miRNA-16 para el miRNA-132.

- Concretamente, para la cuantificación de la expresión génica, se preparó una Master Mix compuesta por 5 µl de *2X SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus)*, 0.2 µl de 10 µM Primer Sentido (S), 0.2 µl de 10 µM Primer AntiSentido (AS), 0.2 µl de *50X ROX Reference Dye* y 2.4 µl de H₂O para cada muestra. De cada cDNA se puso 100 ng, por triplicado en diferentes pocillos de la misma placa, y se añadió 8 µl de la Master Mix a cada uno de ellos. A cada placa también se añadió un control negativo por triplicado, que consiste en Master Mix sin cDNA. Y las condiciones de la PCR fueron: 30 seg a 95°C para una desnaturalización inicial, seguida de 40 ciclos de 5 seg a 95°C y 30 seg a 60°C. La reacción se terminó con una curva de disociación de 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C y 15 seg a 95°C, que permite visualizar el amplicón obtenido y así confirmar que amplificamos sólo el fragmento deseado y que la reacción ha salido correctamente.
- Las secuencias de los primers que se han utilizado para el estudio de la expresión génica (tabla 3) se han diseñado con *Primer3 (v. 0.4.0)* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) o se han escogido del Primerbank (CASP3, SYNGAP1, CC2D1A, BDNF y GAPDH) (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>). Las secuencias de los primers que se han utilizado para la amplificación de NR3C1 se han obtenido del artículo de Vukojenic V. et al, J. Neurosci 2014.

Gen	Secuencia del primer (5'→3')	Posición	Producto (pb)
GAD1	S-AGGCAATCCTCCAAGAACCT AS- GGTGGAGCGATCAAATGTCT	EX4-Ex5 NM_000817.2	208
SIRT1	S- GCAGATTAGTAGGCGGCTTG AS- TCTGGCATGTCCCACATCA	Ex8-Ex9 NM_012238.4	152
CASP3	S- CATGGAAGCGAATCAATGGACT AS- CTGTACCAGACCGAGATGTCA	Ex4-Ex5 NM_004346	139
EN1	S-GTCAA AACTGACTCGCAGCA AS- AACTCCGCCTTGAGTCTCTG	Ex1-Ex2 NM_001426.3	182
RORA	S-TGCCACCTACTCCTGTCCTC AS- CTGCATCCGGTGTCTCTGTA	Ex4-Ex5 NM_134261.2	187

RHOA	S-GCTGGGCAGGAAGATTATGA AS-ACGTTGGGACAGAAATGCTT	Ex3-Ex4 NM_001664.3	149
RAC1	S- TGGAGAAACGTACGGTAAGGA AS- GGA CTCACAAGGGAAAAGCA	Ex4-Ex5 NM_018890.3	90
BDNF	S-TAACGGCGGCAGACAAAAAGA AS- TGCACTTGGTCTCGTAGAAGTAT	Ex4 NM_001143811	117
MeCp2A	S-GCTCCATCATCCGTGACC AS- CCTCTCCAGTTACCGTGAA	Ex3-Ex4 NM_004983.1	129
SYNGAP1	S-CGAGTCCAGTCGCAACAAACT AS- GATGGAGCTTTTTAGCCGTCG	Ex3-Ex5 NM_006772	202
NR3C1	S-CTTCAGAACAGCAACATT AS-GACTCTCATTCGTCTCTT	Ex2 NM_000176.2	144
CDC42	S-GCCTATCACTCCAGAGACTGC AS- GTGCAGGGCATTGTGCATTA	Ex5-Ex6 NM_001791.3	114
MKI67	S- CAGACTCCATGTGCCTGAGA AS- CCCAGTTCGATTTTTCTGTCA	Ex14-Ex15 NM_002417.4	206
CC2D1A	S-CCAAGCTCATACGGCAGCA AS- TCCTCCGCCAACTTTTCAAAC	Ex15-Ex17 NM_017721	106
SHANK3	S-CGGTTTCTGGGAGGGAAC AS-GTCGTAGGAGCCCACTGTGT	Ex12-Ex13 NM_033517.1	154
NTRK2	S-CTGGTGGGCAATCCATTTAC AS- TCACCTGCCACACTACAGGA	Ex8-Ex9 NM_006180.4	236
GAPDH	S-TCTTCTTTTGGCTGCCAG AS- AGCCCCAGCCTTCTCCA	Ex1-Ex5 NM_002046.6	370

Tabla 3: Primers utilizados en la qPCR, su posición en la secuencia del mRNA y tamaño del producto que amplifican.

- Por otro lado, para la cuantificación relativa del miRNA-132, se utilizaron los ensayos *TaqMan MicroRNA Assay* (Applied Biosystems) con ID: 457 para miRNA-132 e ID: 391 para miRNA-16. Específicamente, se preparó una Master Mix conteniendo 0.5 µl de *20X TaqMan Small RNA Assay*, 5 µl de *2X TaqMan*

Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems), y 3.5 µl de H₂O por muestra. Se distribuyó 1 µl del producto de RT-PCR por triplicado y se le añadió 9 µl de la Master Mix. De la misma manera se incluyó un control negativo por triplicado. Las condiciones de PCR del *StepOne Plus* fueron: 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C. Los ensayos *TaqMan* están optimizados y su eficiencia está confirmada por el fabricante; su diseño compuesto por un par de primers y una sonda hacen innecesaria la curva de disociación al final de la reacción.

- **Extracción de ADN, modificación con bisulfito sódico y PCR específica de metilación (MSP).**
 - El ADN de todas las células en cultivo se extrajo mediante el kit *Blood & Cell Culture DNA Kit* (Qiagen, cat no. 13323) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, 500 ng de ADN fueron modificados con bisulfito sódico utilizando el kit *EpiTect Bisulfite Kit* (Qiagen) tal y como describe el protocolo del fabricante. Dicha modificación consiste en la conversión de todas las citosinas no-metiladas del ADN en uracilos, mientras que las citosinas metiladas permanecen sin cambios. La metilación del ADN que se da en los dinucleótidos CpG agrupados en regiones menores de 500 pb, llamadas islas CpGs, se sitúan en regiones reguladoras de los genes y pueden influir en su regulación transcripcional. Con el tratamiento con bisulfito, obtenemos diferentes secuencias para DNA metilado y no-metilado. Brevemente, este protocolo que hemos utilizado implica la conversión de citosinas no-metiladas mediante el tratamiento con bisulfito sódico, la unión de las secuencias de DNA obtenidas a columnas EpiTect, la desulfonación del DNA unido a la membrana mediante centrifugación y posteriores lavados para eliminar el agente desulfonante, y finalmente la elución de la columna del ADN puro convertido. Este ADN está listo para poder ser utilizado en una PCR específica de metilación (MSP), que permite identificar si el fragmento del gen de interés se encuentra metilado o no-metilado, ya que se amplifica con primers específicos de metilación (M) y de no-metilación (U), basados en los cambios producidos en la secuencia del ADN por el tratamiento con bisulfito sódico. La MSP se realizó con el kit *GoTaq G2 Hot Start Polymerase* (Promega, M7405). De esta manera, para cada muestra se preparó una Master Mix por duplicado, con la diferencia de incluir el par de primers específicos de M o de U, conteniendo así: 5 µl de *5X Green GoTaq Flexi Buffer*, 2.5 µl de 2 mM dNTPs, 1.5 µl de 25mM MgCl₂, 0.5 µl primer sentido (M ó U), 0.5 µl primer antisentido (M ó U), 0.125 µl de *GoTaq G2 Hot Start polymerase* (5 U/ µl), 2 µl del ADN modificado y

12.875 µl de H₂O. Las muestras se pusieron en un termociclador LifeEco (modelo TC-96/G/H(b)C) con el programa: 2 min a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a T_m (específica de cada gen; ver tabla 4) y 1 min a 72°C, para finalizar con una elongación de 5 min a 72°C. En cada MSP, se incluyeron controles de DNA metilado y no-metilado, además de un control negativo sin ADN. El ADN amplificado se visualizó en gel de agarosa al 2% en TAE 1X. Los primers utilizados (Tabla 4) se diseñaron utilizando el software *Methyl Primer Express* (Applied Biosystems).

Gen	Secuencia del primer (5'→3')	Producto (pb)	T_m (°C)
RORA	MS: AGAGGGAGTTTCGGAGTTC MA: GCTCTTACGAACGAATTCCT US: GATAGAGGGAGTTTTGGAGTTT UA: CTCACTCTTACAAACAAATTCCT	170	59
UBE3A	MS: TCGGGGTGATTATAGGAGAC MA: TAAACGACGAATAACGAACG US:GGTTTGGGGTGATTATAGGAGAT UA:ATAACAACAATAACAACACC	130	59
GAD1	MS: TGTTTTTGCCTCGGATTAGTC MA: TATTAATAATCCGCTCCCGC US: GTTTGTTTTTGTGTTGGATTAGTT UA: TATTAATAATCCACTCCCACATT	122	59
RELN*	MS: CGGGGTTTTGACGTTTTTCG MA: CGCCCTCTCGAACTAACTCGACG US: GTGGGGTTTTGATGTTTTTTG UA: CACCCTCTCAAATAACTCAACA	184	60
EN2	MS: GGATTTAAAGGTGGTTTTCGC MA: ACTAATTCTCCGAAAACGCC US: GTGGATTTAAAGGTGGTTTTGT UA: ACTAATTCTCCAAAACACCCT	174	60
CC2D1A	MS: TCGTCGGTGATTGATAGAC MA: ACTATCGCGAACTACGAAAA US: AGTTTGTGGTGATTGATAGAT	143	57

	UA:ACTATCACAAACTACAAAAACAA	
--	----------------------------	--

Tabla 4: Secuencias de los primers para ADN metilado sentido y antisentido (MS y MA), y para ADN no-metilado (US y UA). Tamaños del amplicón en pares de bases (bp) y temperatura a la que hibridan los primers al DNA en la MSP.

* La secuencias de los primers de RELN para la MSP han sido obtenidos del artículo [1] Abdolmaleky HM *et al.* Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2005.

- **Análisis Estadístico**

- Para todos los análisis estadísticos se ha utilizado el software Sigmaplot v12.0. La significación estadística entre los valores de expresión génica de las diversas muestras se ha realizado aplicando el test del Análisis de la Varianza con un factor (ANOVA), seguido por el método Holm–Sidak para determinar las diferencias entre ellas. Los valores se han analizado como la media \pm desviación estándar de la media. Valores $p < 0.05$ se han considerado significativamente diferentes.

3. INMUNOCITOQUÍMICA

Se utilizaron placas de cultivo de 4 pocillos a las que añadimos una suspensión para facilitar la adhesión celular. La preparación del sustrato de adhesión se realizaba mediante el siguiente protocolo:

1. Se diluyó Poli-L-Lisina (SIGMA) al 0,01% en H₂O (SIGMA) y se depositaron 250ul de esta dilución en cada pocillo, tras lo que se incubó la placa en una estufa a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con H₂O miliQ estéril a cada pocillo y se retiró el exceso de sustrato para que quedara bien seco. Posteriormente, se sembraron 300 ul de suspensión celular en cada pocillo con aproximadamente 1×10^4 células en medio de cultivo completo y se incubaba en una estufa para cultivos celulares a 37°C y con el 5% de CO₂.
2. Cuando las células alcanzaron la confluencia necesaria, se fijaron con paraformaldehído (PFA, Merck) al 4% en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.4 durante 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave con PBS 1X (pH 7.4).

3. Después de la fijación, las células se bloquearon durante 2 horas con una solución de PBS, con 5% 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. Después del bloqueo, las células se incubaron durante toda la noche con el primer anticuerpo disuelto en una solución de PBS con 0.25% de Tritón y suero de caballo al 1%.
5. Tras la incubación del primer anticuerpo, se realizaron 3 lavados de 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave con la misma solución en la que se disolvió el anticuerpo primario.
6. Posteriormente, se llevó a cabo el proceso de revelado, con 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 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.
Tras los lavados, se incubó el anticuerpo secundario fluorescente durante 2 horas a temperatura ambiente, en agitación suave y protegido de la luz. Los anticuerpos secundarios 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). Tras la incubación, se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave.
7. A continuación se añadió DAPI (1:500), que se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave. y se volvió a lavar con PBS 1X de 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave.

Los anticuerpos primarios utilizados en la ICC fueron los siguientes:

ANTICUERPO	Especie	Mc/Pc	Isotipo	Dilución	Casa Comercial
CASP3	Conejo	Pc	IgG		Cell Signaling
CD44	Ratón	Mc	IgG	1:250	BD Pharmingen
CD90	Ratón	Mc	IgG	1:50	BD Pharmingen
ChAT	Cabra	Pc	IgG	1:100	Chemicon
EN1	Conejo	Pc	IgG	1:1.000	Abcam
EN2	Conejo	Pc	IgG	1:50	ThermoFisher
FGF-8	Ratón	Mc	IgG	20ug/ml	R&D Systems
GABA	Conejo	Pc	IgG	1:300	Sigma
GAD1	Conejo	Pc	IgG	1:200	Abcam
GAD65/67	Conejo	Pc	IgG	1:300	Sigma
MeCP2	Conejo	Pc	IgG		Santa Cruz Tecn.
Nestina	Ratón	Mc	IgG	1:200	Chemicon
NG2	Conejo	Pc	IgG	1:300	Chemicon
NGF p75	Conejo	Pc	N/A	1:500	Chemicon
O4	Ratón	Mc	IgM	1:1.000	Chemicon
PSD95	Cabra	Pc	IgG	1ug/ml	Abcam
SHANK3	Conejo	Pc	IgG	2ug/ml	Novusbio
Sinapsina1	Conejo	Pc	IgG	1:1.000	Novusbio
Sinaptofisina	Conejo	Pc	IgG	1ug/ml	Abcam
SIRT1	Conejo	Mc	IgG	1:150	Abcam
SOX10	Conejo	Pc	IgG	1:1.000	Abcam
Tuj-1	Ratón	Pc	IgG	1:1.000	Biolegend

Tabla 5: Anticuerpos utilizados en este trabajo en Inmunocitoquímica.

WESTERN BLOT

El western Blot es una técnica analítica utilizada para el estudio de proteínas. Este método, permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica. La especificidad del Western Blot se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés.

Con la técnica de Western Blot se puede estimar el tamaño de una proteína, confirmar la presencia de modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, y ser utilizado para comparar cuantitativamente los niveles de proteínas entre muestras.

1. Preparación de la muestra: Se realizó una extracción de proteínas a partir de pellets celulares depositados previamente a -80°C . Para ello, preparamos RIPA a 1X diluido en PBS estéril y añadiendo inhibidores de proteasas. Se resuspendió el pellet celular en PBS estéril y se traspasó a un tubo eppendorf, donde se realizaron 3 lavados de PBS estéril frío y centrifugando 5 minutos a 2.500g (en una centrífuga previamente atemperada a 4°C). Entonces se añadió la suspensión de RIPA y los inhibidores de proteasas, se agita suavemente y se deja 15 minutos en hielo, después volvemos a centrifugar 10 minutos a 20.000g (4°C) y se transfirió el sobrenadante a tubos limpios para almacenarlos a -80°C . Para medir la concentración de proteínas se añadió en una placa P96 5ul de las muestras de proteínas extraídas a la que se añadió 245ul de Bradford Reagent (Sigma-aldrich) atemperado previamente a temperatura ambiente y se llevo a la máquina de medición , que nos indicó las medidas en un documento Excel.
2. Una vez con la muestra preparada, se procedió a realizar los geles de acrilamida, bisacrilamida, dependiendo su concentración del tamaño de la proteína a estudiar, en nuestro estudio realizamos geles de entre el 8 y el 10% de acrilamida (que forma moléculas que polimerizan para formar cadenas), bisacrilamida (que forman uniones con las cadenas de acrilamida para formar un entramado), además se añadió agua destilada, tampón Tris HCl (0,5M pH8,8) que mantiene el pH adecuado, dodecilsulfato de sodio (SDS al 10%) que mantiene la linealidad y la uniformidad de carga de las proteínas según la electroforesis, persulfato de amonio (PSA al 10%) para

la generación de radicales libres que catalizan la reacción de polimerización y TEMED que aumenta la generación de radicales libres por el persulfato de amonio.

Estos reactivos se mezclaron y se vertieron en un molde formado por el conjunto de dos cristales, con una separación que marca el grosor del gel, (gel separador). La acrilamida polimeriza en aproximadamente 30 minutos, después se añadió otro gel con acrilamida de menos porcentaje (gel concentrador) y se colocaron los peines que marcan el hueco para añadir la muestra.

3. Con el gel polimerizado se extrajo del molde y se retiraron los peines y se depositó en un soporte para el tanque de electroforesis, y se cubrió de una solución previamente preparada y guardada a 4°C de Tris-Glycina 1X con SDS. Una vez allí se cargaron las muestras (20ug de proteína) combinadas con un tampón de carga con la ayuda de una pipeta y calentadas a 95°C durante 5 minutos para asegurar la desnaturalización, también se añadió en el primer hueco de cada gel un marcador de pesos moleculares. Entonces se sometió a un campo eléctrico generado por una fuente de alimentación. Las proteínas cargadas negativamente, cuando se someten a un campo eléctrico, migran al electrodo positivo. Debido a que el SDS iguala la carga en todas las proteínas, la tasa de migración viene determinada por su peso molecular; las moléculas más pequeñas migran más rápidamente que aquellas con pesos moleculares mayores. El progreso en el gel se monitoriza observando el frente coloreado por el colorante presente en el tampón de carga y el marcador de pesos moleculares.
4. Una vez la electroforesis del gel ha terminado, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. La membrana es un soporte sólido que une e inmoviliza las proteínas, permitiendo así que la hibridación de un anticuerpo las pueda detectar. Previamente a la transferencia, tanto el gel como la membrana se equilibran en una solución previamente enfriada que contiene Tris-Glycina y metanol. Después se colocó en un molde específico de transferencia en el que están en contacto gel y membrana y protegidos por papeles de filtro y almohadillas, se depositó este molde en un tanque con la misma solución y se conectó a una fuente de alimentación donde permaneció durante toda la noche a 4°C.
5. Al retirar la membrana del molde comprobamos con los colorantes del tampón de carga si la transferencia se ha realizado de forma adecuada, además también utilizamos el colorante rojo Ponceau para teñir la

membrana y asegurarnos tanto de la eficacia de la transferencia como de la adecuada carga de las muestras.

6. Después bloqueamos la membrana incubándola con una solución con leche en polvo diseñada para reducir los lugares de unión no específicos al anticuerpo. La leche en polvo al 5% se diluyó en TBS (Tampón Tris salino) al que añadimos también detergente Tween 20. La incubamos durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del proceso de bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido en leche en polvo al 2% con TBS y Tween 20 durante toda la noche a 4°C en agitación suave. Después de la incubación con el anticuerpo primario, se procedió a la eliminación del excedente mediante tampones de lavado (leche en polvo al 2% con TBS y Tween 20) dejándolos durante 10 minutos a temperatura ambiente en agitación suave. Entonces se procedió a incubar el anticuerpo secundario HRP durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación suave y se volvió a lavar con TBS.
7. La detección de las proteínas en la membrana se llevo a cabo por colorimetría. Utilizamos Pierce ECL que ha sido conjugado previamente a un enzima (peroxidasa) que convierte el colorante en un producto insoluble que es visible en la membrana. La cantidad de colorante convertido es proporcional al cantidad en la muestra. La intensidad de la tinción fué medida por espectrofotometría.

Los anticuerpos primarios utilizados en WB fueron los siguientes:

ANTICUERPO	Especie	Mc/Pc	Isotipo	Dilución	Casa Comercial
CASP3	Conejo	Pc	IgG	1:1.000	Cell Signaling
EN1	Conejo	Pc	IgG	1:1.000	Abcam
EN2	Conejo	Pc	IgG	1:1.000	ThermoFisher
GAD1	Conejo	Pc	IgG	1:1.000	Abcam
MeCP2	Conejo	Pc	IgG	1:500	Santa Cruz Tecn.
PSD95	Cabra	Pc	IgG	2ug/ml	Abcam
SHANK3	Conejo	Pc	IgG	1ug/ml	Novusbio
Sinapsina1	Conejo	Pc	IgG	1:1.000	Novusbio
SIRT1	Conejo	Mc	IgG	1:10.000	Abcam
B-Actin	Ratón	Mc	IgG	1:7.000	Santa Cruz Tecn.

Tabla 5: Anticuerpos utilizados en este trabajo en Western Blot.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Estudio de la morfología del cultivo

El estudio morfológico del cultivo de células de ligamento periodontal (LP) y pulpa dental (PD) se realizó en los pases 4 al 6 para todas las muestras. Se observaron bajo microscopio 6 placas T75 y 10 placas P4 por muestra.

En los cultivos de células en proliferación, cuando la confluencia era de aproximadamente del 70% de la superficie de la placa, pudimos observar que las células de LP tenían aspecto fusiforme en cadenas lineales y tamaño homogéneo (Fig. 6). En las células de PD, observamos también un predominio de células alargadas, pero con la aparición frecuente de células con morfología poligonal variable. En los cultivos de LP no se observaron células esféricas con aspecto neuronal; sin embargo, en la pulpa encontramos mayor número de estas células, con una distribución dispersa y en cantidad muy variable en los diferentes cultivos.

Comparamos los cultivos celulares de control y autismo y no encontramos diferencias significativas en cuanto a la morfología celular (Fig. 6). Durante los sucesivos pases se observó que en el LP se alcanzaba la confluencia celular en el mismo tiempo en LP control (LPC) y LP de autismo (LPA). Sin embargo, se llegaba antes (2-3 días aproximadamente) a confluencia en la muestra PD control (PDC) que en la muestra PD de autismo (PDA).

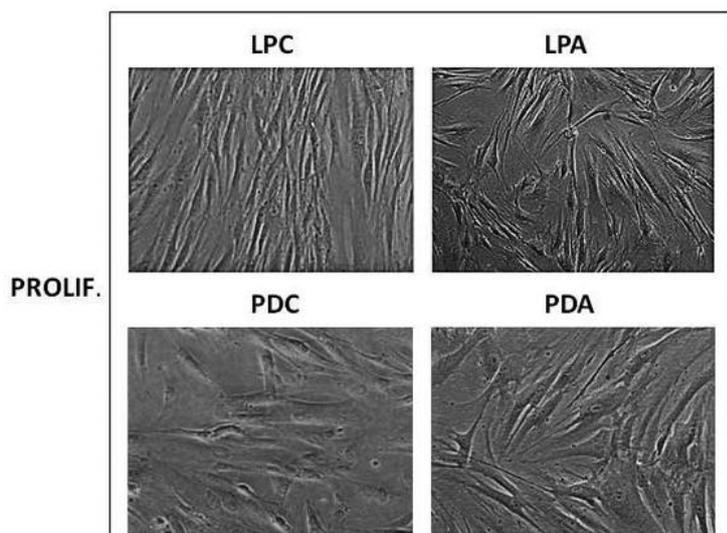


Figura 6: Morfología fusiforme de células en cultivo. En proliferación las células de LP y PD tanto de controles como derivadas de dientes con TEA presentan un aspecto alargado y fusiforme. En los cultivos de PD aparecen con mayor frecuencia células de aspecto poligonal e irregular.

2. Características mesenquimales de las células derivadas de LPC y LPA

Según trabajos previos, se había visto el carácter multipotente de células estromales de origen mesenquimal (MSCs) de las células de ligamento periodontal (Bueno et al. 2012) y pulpa dental (Tatullo et al., 2015). Para ello se utilizó una selección de anticuerpos definidos como marcadores de MSCs por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT; Dominici et al., 2006).

Nuestro trabajo pretende desarrollar un estudio comparativo de las características celulares de MSCs con autismo y controles. Primero, hemos de determinar si las células con autismo cumplen las características de MSCs. Por razones de tiempo y homogeneidad en los cultivos, así como similitud en morfología entre LP y PD, hemos estudiado los procesos celulares de forma exhaustiva solo en células derivadas de LP. Para determinar si las células de LPA cumplen propiedades de MSCs, hemos seleccionado 5 marcadores de MSCs:

- **Nestina:** reconoce un filamento intermedio específico de células indiferenciadas (Frederiksen y McKay, 1988; Gritti y col., 1996; Fuchs y Weber, 1994). Es una proteína que en los humanos está codificada por el gen NES. Nestina es una proteína de filamento intermedio de tipo VI. Estas proteínas de filamentos intermedios se expresan principalmente en células nerviosas donde están implicadas en el crecimiento del axón (Guérette et al., 2007; Michalczyk et al., 2005). En la inmunocitoquímica, se ve la nestina acumulada en el citoplasma, que revela la morfología celular característica del cultivo (Fig. 7). Las células son positivas al anticuerpo anti-nestina y no se han apreciado diferencias entre células control y células con autismo.

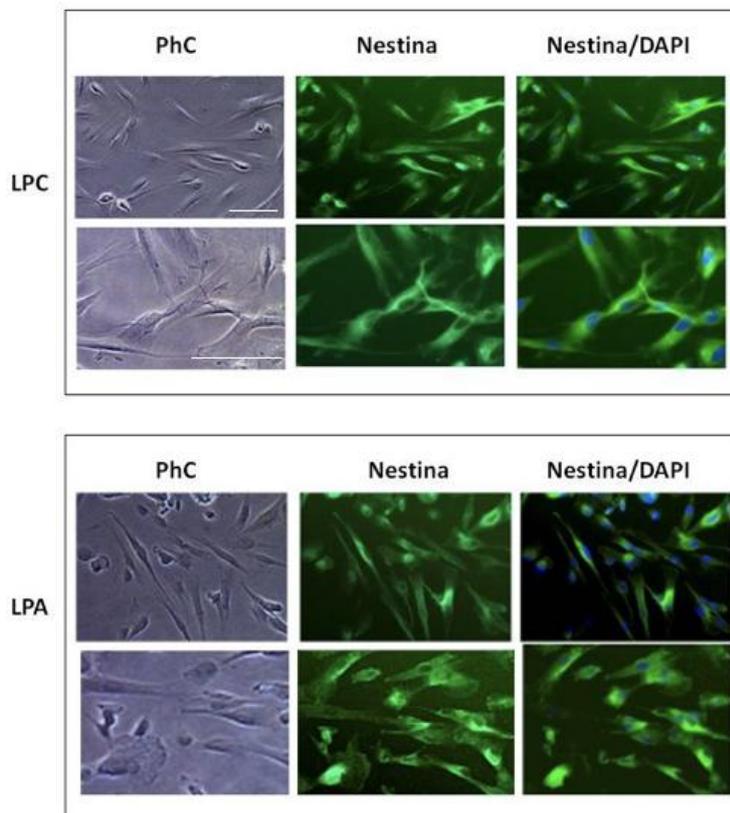


Figura 7: Cultivos celulares en medio de proliferación antes de confluencia. Las células de LPC aparecen con morfología fusiforme y expresando homogéneamente nestina. Fotografías por contraste de fases [izquierda], inmunocitoquímica [centro] y inmuno+DAPI [derecha]. Las células de LPA muestran una morfología y expresión de nestina similar a las de LPC. Barra de escala: 100 μ m.

- **CD90:** es un marcador de superficie celular asociado a células madre mesenquimales (Mayani y col., 1994; Isacke y col., 2000). CD90 puede usarse como un marcador para una variedad de células madre y para los procesos axonales de neuronas maduras (Avril et al., 2017). Las células de nuestro cultivo presentan expresión de CD90, acumulándose el inmunoprecipitado principalmente en la membrana celular, como corresponde a la localización de la proteína (Fig. 8). Este marcador se expresa de forma parecida tanto en ligamento periodontal control como en el autismo.

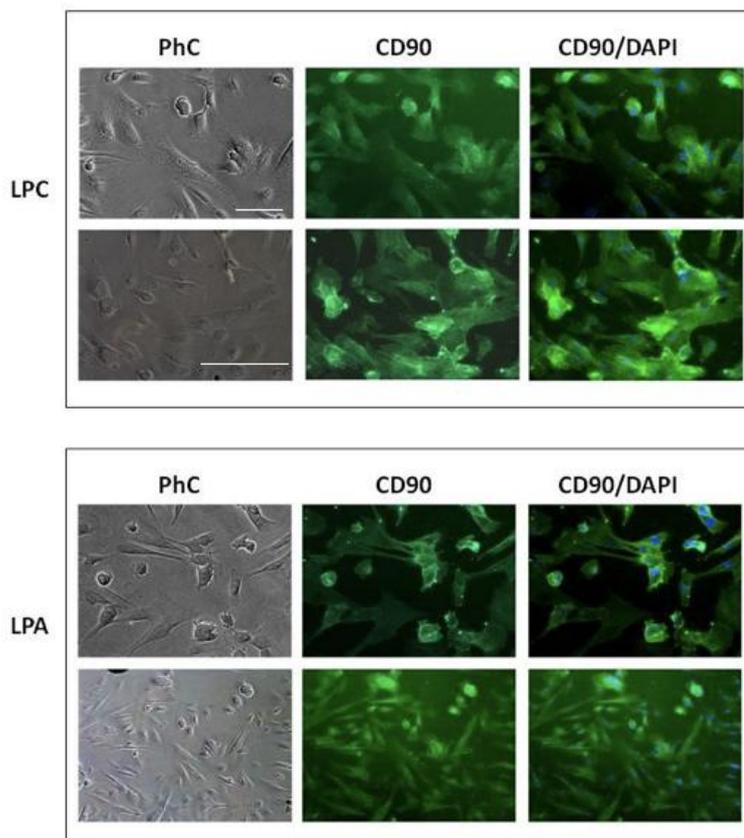


Figura 8: Cultivos celulares en medio de proliferación antes de confluencia. Las células de LPC aparecen con morfología fusiforme y expresando de forma homogénea CD90 en la superficie celular. Fotografías por contraste de fases [izquierda], inmunocitoquímica [centro] y inmuno+DAPI [derecha]]. Las células de LPA muestran una morfología y expresión de CD90 similar a las de LPC. Barra de escala: 100 μm .

- **CD44:** es un marcador de superficie de células madre mesenquimales. También se expresa en la mayoría de los linfocitos, en monocitos, granulocitos, timocitos y fibroblastos (Isacke y col., 2000). El antígeno CD44 es una glicoproteína de superficie implicada en las interacciones célula-célula, la adhesión celular y la migración. En humanos, el antígeno CD44 está codificado por el gen CD44 en el cromosoma 11 (Spring et al., 1966). Las células de cultivos expresan este marcador de células madre mesenquimales, y no se aprecian diferencias entre en ligamento periodontal control y autismo (Fig. 9).

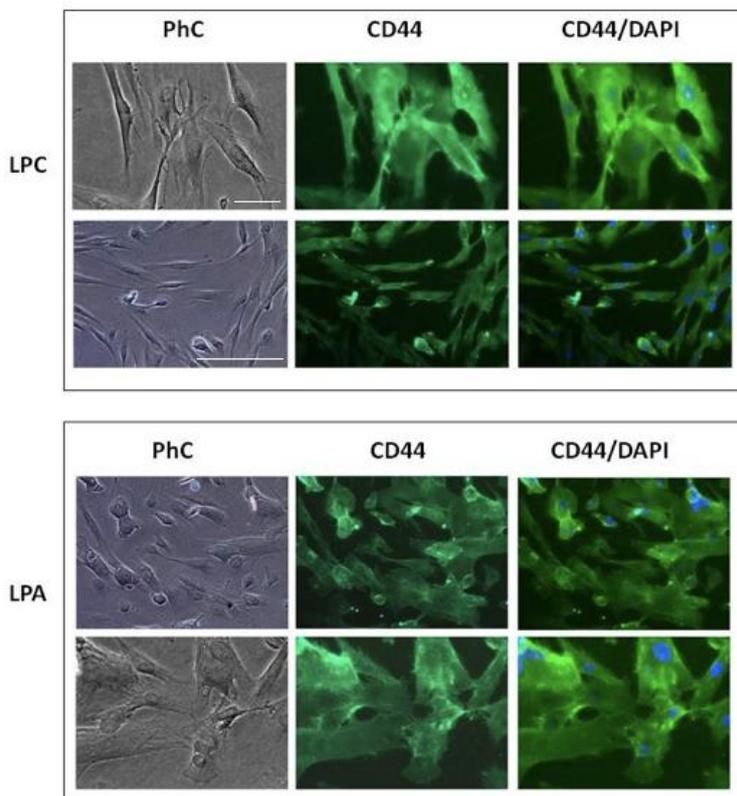


Figura 9: Cultivos celulares en medio de proliferación antes de confluencia. Las células de LPC aparecen con morfología fusiforme y expresando de forma homogénea CD44 en la superficie celular. Fotografías por contraste de fases [izquierda], inmunocitoquímica [centro] y inmuno+DAPI [derecha]]. Las células de LPA muestran una morfología y expresión de CD44 similar a las de LPC. Barra de escala: 100 μ m.

- **TUJ1**, reconoce la proteína β -tubulina 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). -En nuestra experiencia este marcador se expresa de forma homogénea y constante en nuestras células de LP en proliferación, no apreciamos diferencias entre las muestras de LPC y LPA (Fig. 10 A, B; 11) (Bueno et al., 2013). Las células indiferenciadas de LP mostraban un núcleo elipsoidal aplanado, a menudo localizado en el centro de la célula y con un volumen nuclear alrededor de $925'356 \pm 52'6184 \mu m^3$ (Fig. 10 D).

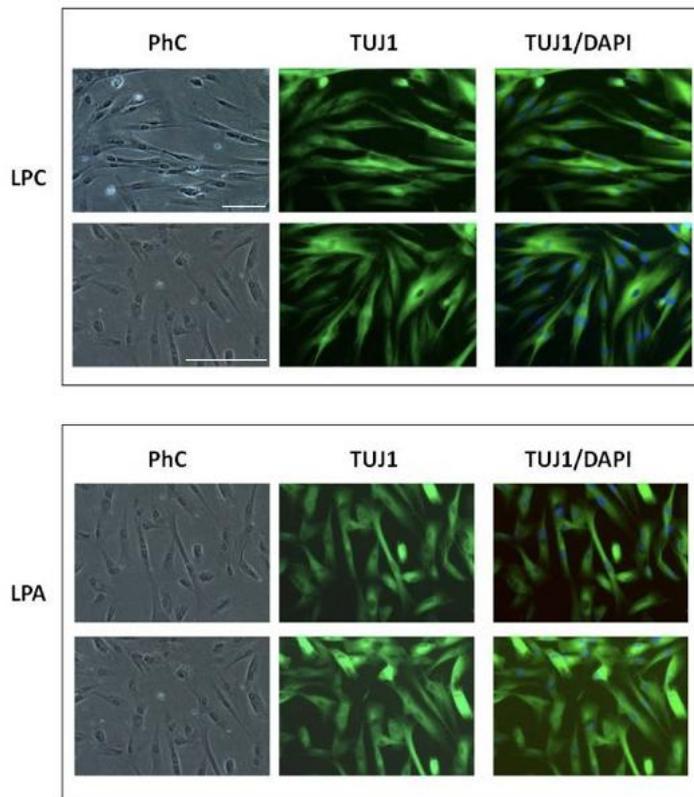


Figura 10: Inmunodetección de la expresión de Tuj1 en LPC y determinación de forma y tamaño núcleo. A) Las células indiferenciadas expresan de forma homogénea Tuj1. B-D) Estudio de la forma y tamaño de los núcleos. Las células de LPC mostraban un núcleo aplastado y elipsoidal a menudo localizado en el centro de la célula. Barra de escala: 25 μm .

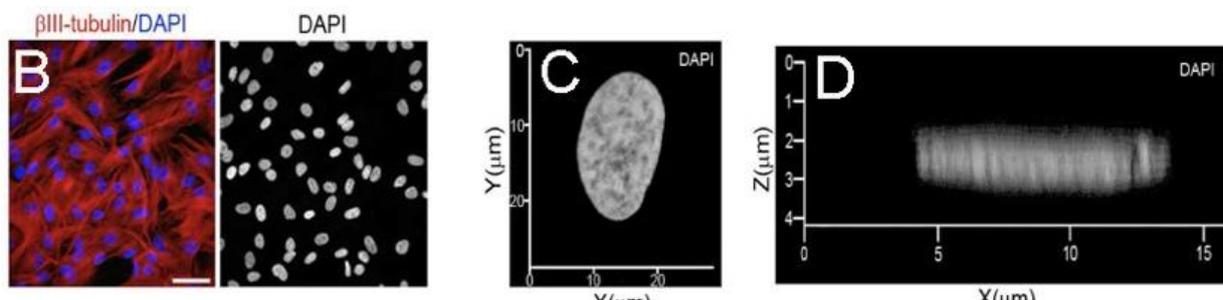
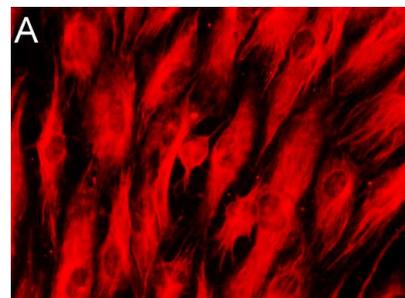


Figura 11: Cultivos celulares en medio de proliferación antes de confluencia. Las células de LPC aparecen con morfología fusiforme y expresando de forma homogénea Tuj1. Fotografías por contraste de fases [izquierda], inmunocitoquímica [centro] e inmuno+DAPI [derecha]. Las células de LPA muestran una morfología y expresión de Tuj1 similar a las de LPC. Barra de escala: 100 μm

- **NG2.** Esta molécula transmembrana puede estar unida a la membrana del plasma o secretada y asociada con la matriz extracelular (Nishiyama et al., 1995). Se cree que desempeña un papel en funciones como la adhesión celular, la comunicación célula-célula y célula-matriz extracelular, migración y metástasis, proliferación y crecimiento axonal, guía y regeneración. Las células NG2-positivas incluyen precursores de oligodendrocitos (*OPC*; Levine y Nishiyama, 1996) y otras poblaciones de células progenitoras, tales como condroblastos, mioblastos y pericitos (Ozerdem et al., 2001). No encontramos diferencias en la expresión de NG2 entre LPC y LPA (Fig. 12).

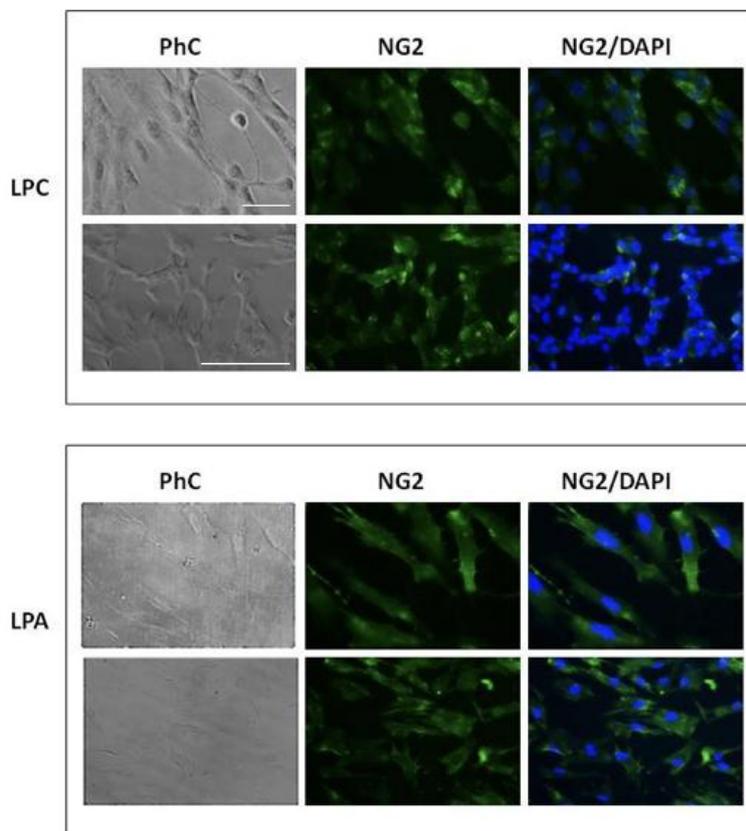


Figura 12: Cultivos celulares en medio de proliferación antes de confluencia. Las células de LPC aparecen con morfología fusiforme y expresando NG2. Fotografías por contraste de fases [izquierda], inmunocitoquímica [centro] y inmuno+DAPI [derecha]. Las células de LPA muestran una morfología y expresión de NG2 similar a las de LPC. Barra de escala: 100 μ m.

En resumen, hemos demostrado el carácter de MSCs de nuestras células de LPC y LPA en cultivo por la presencia de Nestina, como marcador de células progenitoras indiferenciadas; así como las proteínas de superficie CD44 y CD90, como marcadores de células mesenquimales. La expresión de NG2 y Tuj1 como marcadores de progenitores neurales y de cresta neural (Fig. 13A). Para completar el estudio con un panel de marcadores más amplio de células progenitoras de cresta neural hemos realizado un estudio transcriptómico y proteómico más detallado, determinando la expresión de Slug, Twist, Oct3/4, Sox9 y Sox10, siguiendo nuestros resultados previos en LP (Bueno et al., 2012).

Las células de LPA en fase proliferativa expresan los mismos marcadores que las células de LPC (Fig. 13 B-E):

- Marcadores de células madre: Oct3/4, Nestina y Sox2.

- Marcadores de células de la cresta neural: Slug, Twist, Sox10 and Sox9, así como Fgf8b y sus receptores (p75^{NTR}, FGFR1-4).

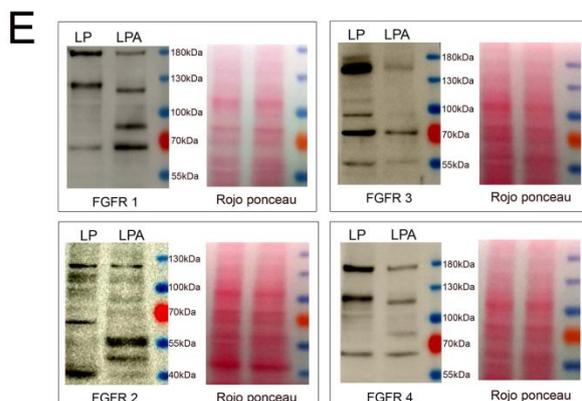
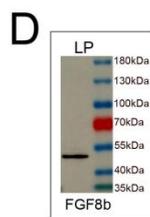
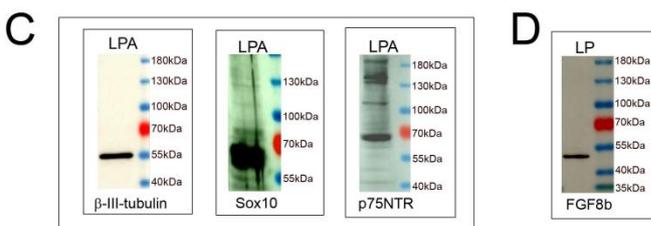
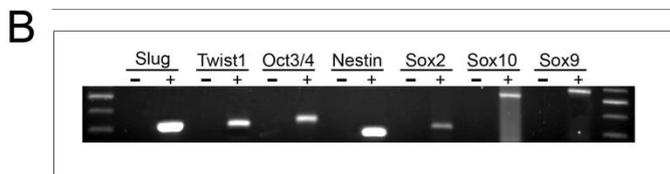
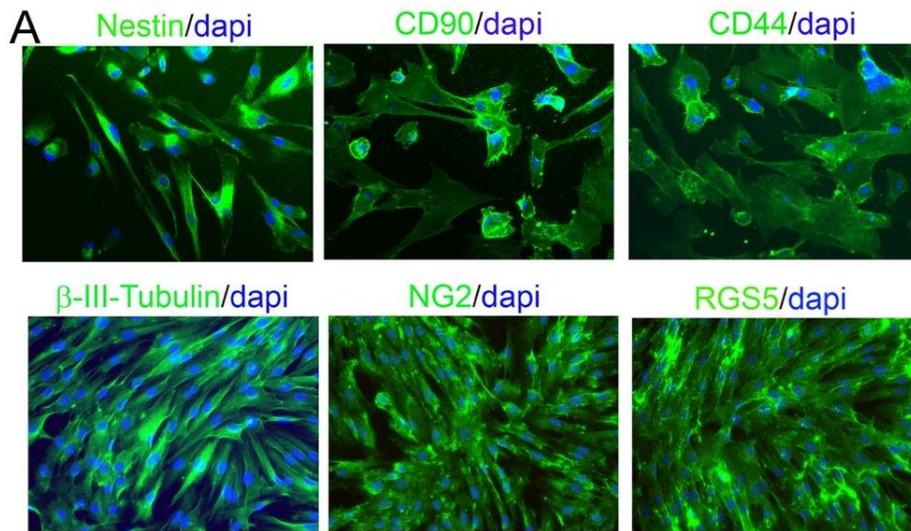


Figura 13: Expresión de marcadores de MSCs de cresta neural. A) Detección por ICC de la expresión de nestina, CD90 y CD44, B-III Tubulina (Tuj1), NG2 y RSG5 en LPA. B) Estudio por PCR de la transcripción de marcadores de células madre (Oct3/4, Nestina, SOX2) y de células de la cresta neural (SLUG, TWIST, SOX10 y SOX9) en LPA. C) Estudio proteómico por WB de la expresión de marcadores de progenitores de cresta neural en LPA: B-III Tubulina, SOX10 y NTR p75 en LPA. D) Detección por Western de la expresión de Fgf8b en LPC. E) Detección de proteínas (Westernblot) de receptores de Fgf en células de LPC y LPA.

3. Marcador de línea neurogénica

- **GAD65/67.** La descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) es una enzima que cataliza la descarboxilación del glutamato a GABA y CO₂. En mamíferos, GAD existe en dos isoformas con pesos moleculares de 67 y 65 kDa (GA₆₇ y GAD₆₅), que están codificados por dos genes diferentes: GAD1 y GAD2, respectivamente (Erlander et al., 1992),.

GAD67 y GAD65 se expresan en progenitores neuronales y neuronas donde el GABA se utiliza como neurotransmisor (interneuronas inhibitoras). Fuera del sistema nervioso central *GAD1* (gen que codifica GAD67) se expresa en células derivadas de la cresta neural, como el mesenquima del esbozo de los dientes durante el desarrollo (Tamamaki et al., 2003) y en neuronas de los ganglios dorsales (Hanack et al., 2017).

En nuestros cultivos de LP hemos detectado la expresión de GAD65/67, observando un significativo incremento de la intensidad inmunocitoquímica en LP con autismo (LPA) (Fig. 14).

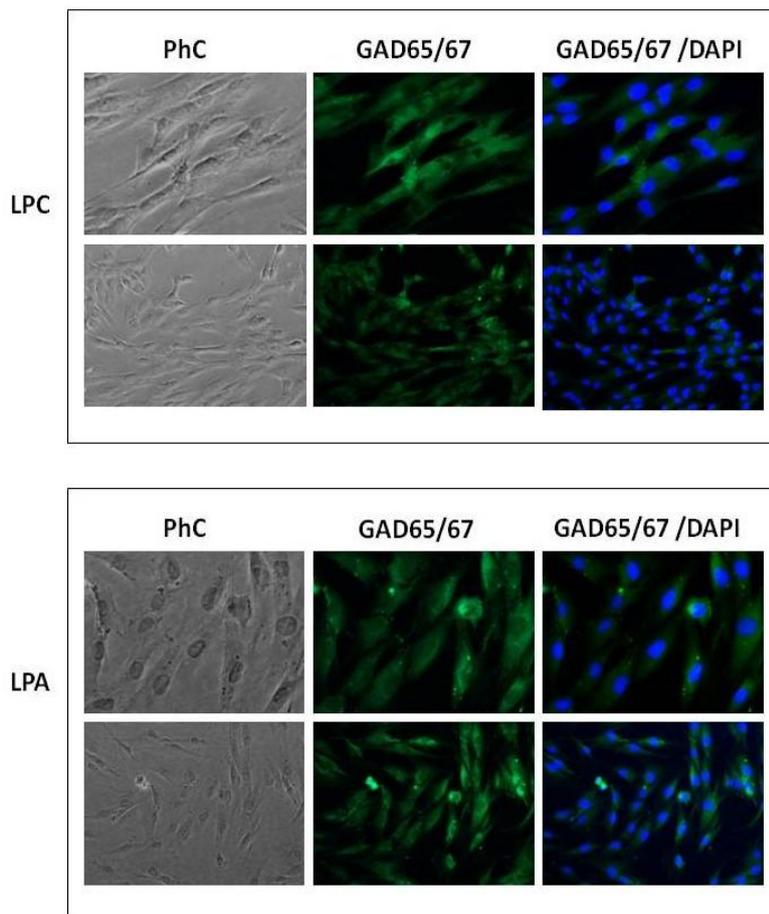


Figura 14: Cultivos celulares en medio de proliferación antes de confluencia. Las células de LPC aparecen con morfología fusiforme y expresando GAD65/67. Fotografías por contraste de fases [izquierda], inmunocitoquímica [centro] e inmuno+DAPI [derecha]. Las células de LPA muestran una expresión de mayor intensidad que las de LPC.

La homogeneidad en la expresión de los marcadores analizados sugiere la presencia de células con características similares en el LPC y la PDA. La metodología seguida para el cultivo basado en las propiedades de adherencia de las células mesenquimales ha permitido el aislamiento de una población homogénea de células que presentan características de células madre estromales de carácter mesenquimal y de origen en la cresta neural.

4. Cambios celulares en el proceso de diferenciación en cultivo de LPC

Hemos estudiado de forma precisa la secuencia de cambios estructurales que ocurre durante la diferenciación neuronal de LP y no de la PD por la mayor homogeneidad celular observada en los cultivos primarios de LP en fase proliferativa. Además, tenemos una mayor experiencia en estas células por los trabajos previos de nuestro laboratorio sobre la potencialidad neurogénica de las células de LPC (Bueno et al., 2012) y en su utilización como modelo para el estudio de Ataxia de Friedreich (Jones et al., 2012).

Se han analizado las características morfológicas de las LPC en condiciones de proliferación y diferenciación neural, incluyendo la forma celular, la superficie celular, el citoesqueleto y la morfología nuclear.

En condiciones de proliferación, las células de LP muestran una morfología similar a fibroblastos con microvellosidades de baja densidad en la superficie celular (Fig. 15 A), microfilamentos de actina y microtúbulos de β -III tubulina, orientados paralelamente al eje longitudinal de la célula (Fig. 15 B). Las células de LP mostraron expresión espontánea de marcador neural β -III tubulina, incluso sin haber sido sometidas a inducción neural (Foudah et al., 2014). Esta proteína citoesquelética es considerada de forma generalizada como neuronal marcador en la neurobiología del desarrollo y la investigación con células madre (Flynn, 2013). El análisis de Western blot ha verificado también la expresión de β -III tubulina en LP (Fig. 15 C).

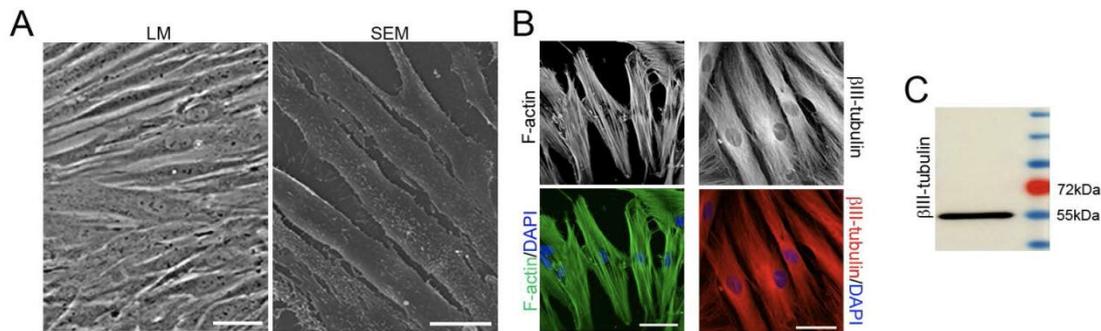


Figura 15: Cambios morfológicos en cultivos de LPC en fase proliferativa. (A y B) A) Las células de LP indiferenciadas presentaron una morfología similar a fibroblastos que, al ser observadas con microscopía de barrido (SEM), y presentan microvellosidades de baja densidad en su superficie. B) Se detectan por inmunocitoquímica microfilamentos de actina y microtúbulos de β -III tubulina orientados paralelamente al eje longitudinal de la célula. C) El análisis de transferencia de Western blot verificó la expresión de β -III tubulina. Los marcadores de tamaño de proteína (en kilodaltons) están indicados en el costado del panel.

Para el estudio de la potencialidad neurogénica de los cultivos de LP y PD se cambió el medio de cultivo por el medio neurogénico (ver material y métodos). Durante el cultivo en este medio se ha observado la ausencia de actividad proliferativa y cambios de la morfología celular a lo largo de los 20 días de cultivo. Sin embargo, las células PDC mantuvieron cierta actividad proliferativa aproximadamente durante 2 días después de haber retirado el medio de cultivo y añadido el medio de diferenciación.

Después de 14 días de condiciones de diferenciación neuronal, las células del LPC mostraban morfologías diferentes: células esferoides con procesos cortos, células muy irregulares, así como células fusiformes de aspecto unipolar o bipolar. Aprecian también células multipolares con pequeños cuerpos celulares, alta refringencia y múltiples procesos ramificados (Fig. 16 A) y tamaños muy variables (Fig. 16 B). El análisis preciso de estas células reveló diferentes formas nucleares, incluyendo núcleos lobulados conectados por un puente internuclear (Fig. 16 D). Los resultados indican que los cultivos neurogénicos de células de LPC a las 14 días en medio de diferenciación contienen simultáneamente células en diferentes etapas de diferenciación neuronal.

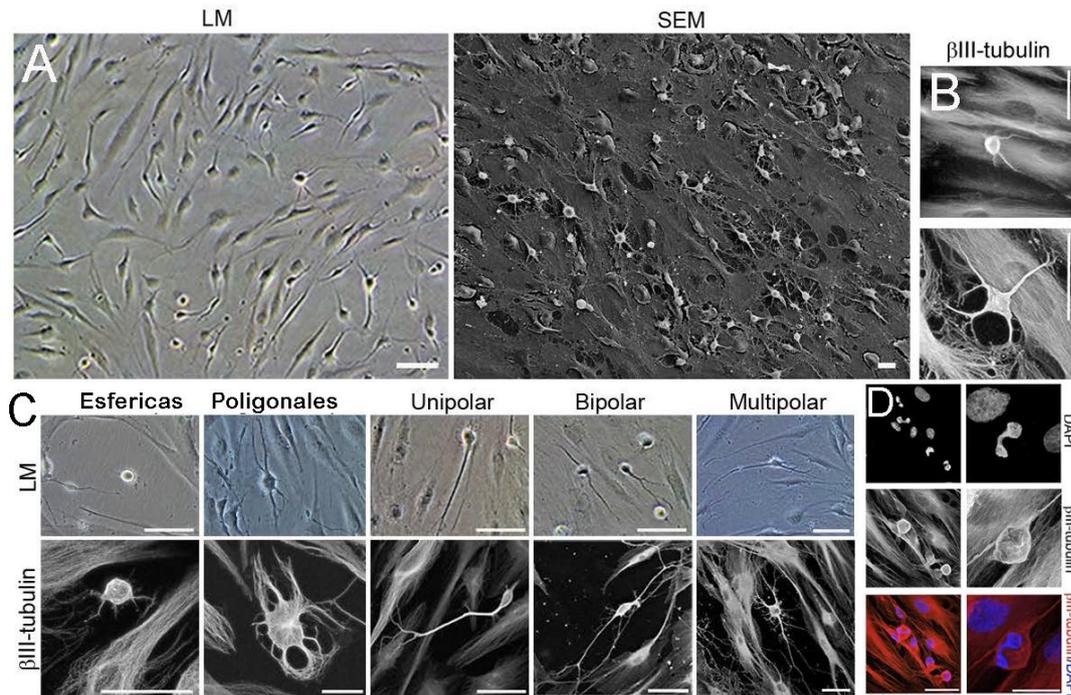


Figura 16: Estudio estructural de las células de LPC durante el cultivo en medio de diferenciación neurogénica. A) Fotografías en microscopía de contraste de fases (LM) y microscopía electrónica de barrido (SEM) para mostrar la heterogeneidad morfológica de las células tras 14 días de cultivo. B) Se observan diferentes tamaños celulares. C) Diferentes tipologías celulares. D) Apariencia heterogénea de los núcleos celulares, revelados por el marcaje con DAPI. Barra de escala: 25 μ m.

5. Neurogénesis in vitro de LPC

Hemos descrito que las células de LPC sometidas al cultivo neurogénico experimentan un dramático cambio de forma y tamaño. Adoptan primero formas muy irregulares y aplanadas, que van contrayéndose gradualmente hacia células esféricas con pequeños cuerpos celulares de alta refringencia (Fig. 17 A). Se observa remodelación del citoesqueleto durante los cambios morfológicos que ocurren cuando las células adquieren aspecto esférico. Los microfilamentos de actina se desplazan hacia regiones corticales: A diferencia de la actina, β -III tubulina parece acumularse alrededor del núcleo (Fig. 17 B). La red de microfilamentos de actina y β -III tubulina casi se pierde en las células esféricas (Fig. 17 C). Las micrografías de microscopía electrónica de barrido muestran que las células de LPC también experimentan cambios dramáticos en las características de la superficie celular. En condiciones de proliferación permanecen muy planas, presentando microvellosidades de baja densidad en su superficie, pero a medida que las células se redondean a forma casi esférica hay

un marcado aumento en el número de microvellosidades (Fig. 17 D). La superficie de las células esféricas está casi desprovista de microvellosidades (Fig. 17 E).

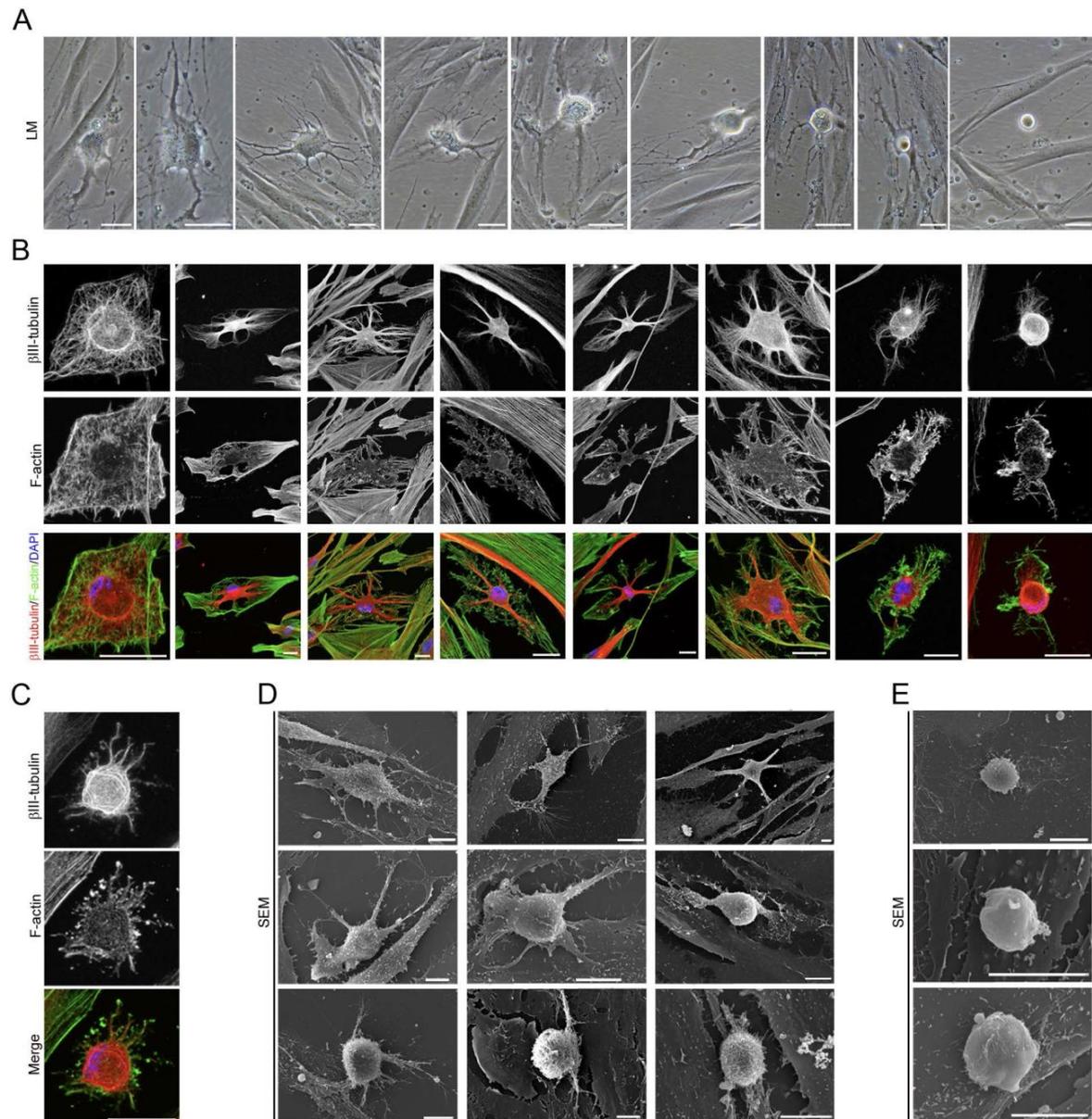


Figura 17: Diferenciación neural in vitro de células de LPC. A) Después de 3-4 días en cultivo neurogénico, las células presentan un cambio de forma y tamaño, primero adoptando formas irregulares y luego contrayéndose gradualmente hacia células esféricas. B) Se observa remodelación del citoesqueleto durante estos cambios morfológicos. Los microfilamentos de actina se acumulan en la región cortical. A diferencia de la actina, tub-III tubulina que se acumula alrededor del núcleo. C) la red del citoesqueleto casi se pierde en las células esféricas. D) Las micrografías electrónicas de barrido muestran que hay un marcado aumento en la densidad de microvellosidades a medida que las células se esferifican. E) La superficie de las células esféricas esta casi desprovisto de microvellosidades. Las barras de escalado son de 25 μm en las imágenes de microscopio óptico y 10 μm en el escaneo de micrografías electrónicas. LM, microscopía de luz; SEM, microscopía electrónica de barrido.

6. Polarización neuronal de las neuronas derivadas de LP.

El análisis morfológico reveló que las neuronas derivadas de LPC muestran una secuencia de desarrollo morfológico muy similar a lo descrito en cultivos de células dissociadas preparados a partir de cerebro de roedores (Tahirovic and Bradke., 2009; Takano et al., 2015; Tahirovic, S., and Bradke, F. (2009). Las neuronas derivadas de LPC comienzan su desarrollo como esferas redondeadas, que iniciaron el crecimiento de neuritas en un lugar único en la membrana plasmática; primero haciéndose unipolar (etapas 1-2; Fig. 18 A). Estas células unipolares evolucionan a células que muestran varias neuritas cortas alrededor del cuerpo celular (etapa 3; Fig. 18 B). El estudio de la organización del citoesqueleto durante la fase esférica mostró que la red de microfilamentos de actina y β -III tubulina se ha re-organizado: la β -III tubulina estaba densamente acumulada debajo de la membrana celular del soma y de neuritas (Fig. 18 A, B), mientras que los microfilamentos de actina se encontraron principalmente en las neuritas celulares (Fig. 18 C). Observamos que las neuronas derivadas LP producen neuritas que presentan en sus extremos formaciones de cono de crecimiento (Fig. 18 C, D). El dominio central del cono de crecimiento contiene microtúbulos de β -III tubulina y el dominio periférico está compuesto de haces radiales de actina (Fig. 18 D), similar al típico espacial organización descrita en las neuronas en cultivo (Foster y Smith, 1988; Blanquie y Bradke., 2018). Las micrografías electrónicas de barrido también mostraron que el cono de crecimiento de las neuronas derivadas de LP contiene filopodios y vesículas en la superficie celular (Fig. 18 E), lo que sugiere la adición y extensión de la membrana en conos de crecimiento es mediada por la exocitosis de los componentes vesiculares, como ha sugerido Ros y colaboradores (2015).

En etapas posteriores del proceso de diferenciación, las neuronas derivadas de LP adoptaron gradualmente una morfología más compleja, generando varios procesos neuríticos (etapa 4; Fig. 18 F) y adquiriendo identidades de tipo dendrítico y axonal, dando lugar a una variedad de morfologías características de neuronas (Fig. 18 G). El siguiente paso, la etapa 5, es la polarización funcional del axón y las dendritas, incluida la formación de espinas dendríticas y la ramificación axonal terminal. Las espinas dendríticas son protrusiones de la membrana dendrítica de tamaño micrométrico (Hering y Sheng., 2001). Dependiendo de los tamaños relativos de la cabeza y el cuello dendríticos, se pueden subdividir en diferentes categorías, incluyendo filopodiales, hongos, espinas delgadas, rechonchas y ramificadas (von Bohlen Und Halbach., 2009). Las espinas dendríticas son compartimentos ricos en actina que emergen de los ejes dendríticos ricos en microtúbulos de las principales neuronas (Merriam et al.,

2013). Por otro lado, según la complejidad morfológica y la función, la ramificación del axón se agrupa en diferentes categorías: arborización, bifurcación y la formación de colaterales (Gibson y Ma., 2011). Nuestro análisis morfológico reveló que las neuronas derivadas de LPC se desarrollaron dominios similares a axones y dendríticos bien diferenciados. Estos tipos de procesos difieren en el patrón estructural (Fig. 18 H-D). El estudio de la distribución de β -III tubulina y F-actina demostró que estas neuronas desarrollan múltiples procesos de tipo dendrita ramificada con estructuras dendríticas similares a espinas (Fig. 18 H).

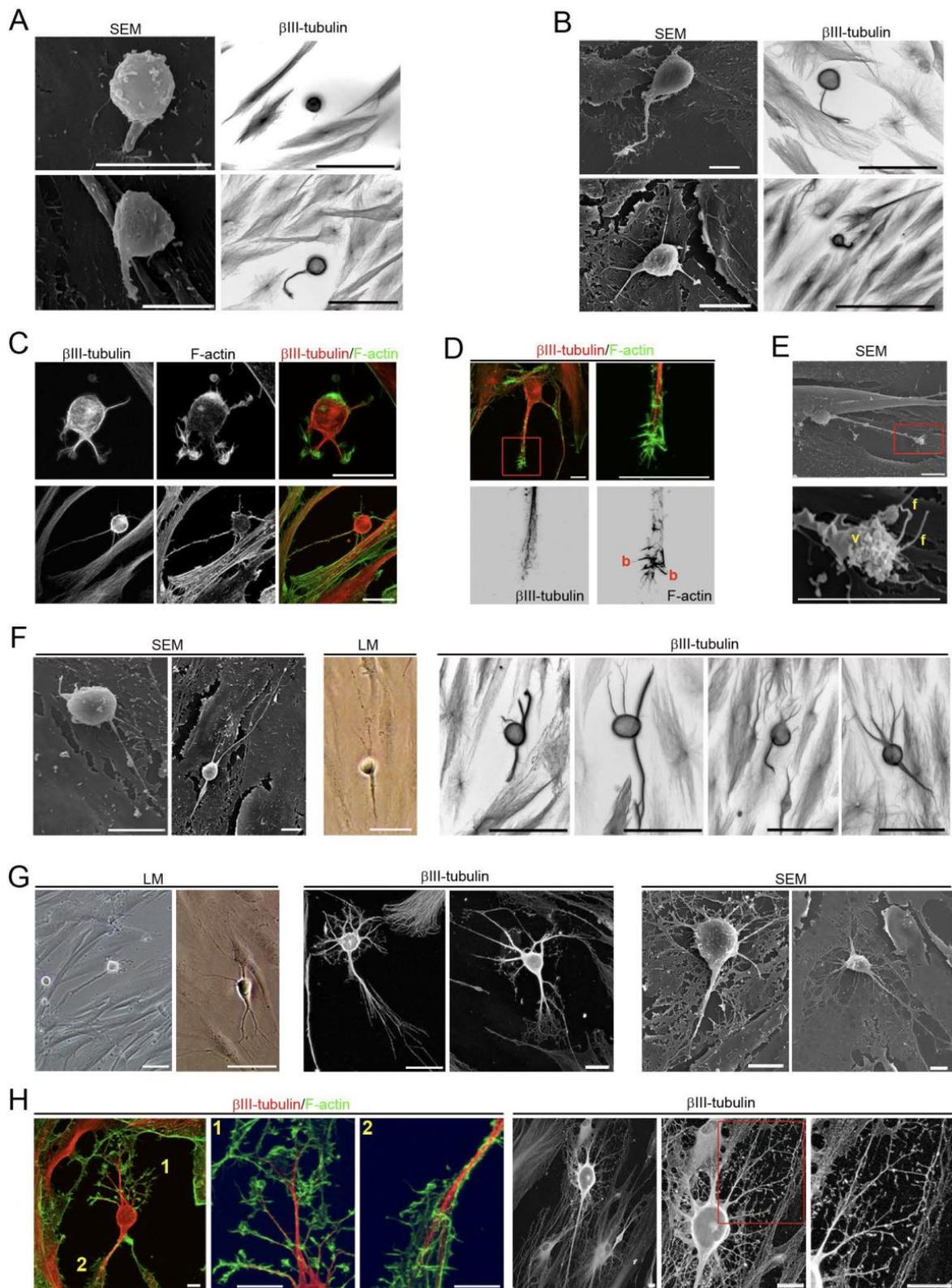


Figura 18: Polarización neuronal de las neuronas derivadas de hPDLSCs.

A) neuronas derivadas de LP comienzan su diferenciación como esferas redondeadas que inician el crecimiento de neuritas en un punto de la membrana de plasmática. B) En un estadio más maduro se transforman en células que contienen varias neuritas cortas alrededor del cuerpo celular. C) la red del citoesqueleto se re-organiza. La B-III tubulina se acumula densamente

debajo de la membrana celular del cuerpo y de neuritas, mientras que los microfilamentos de actina se encuentran principalmente en las neuritas. D) El cono de crecimiento se compone de haces radiales de actina F y un eje central que contiene microtúbulos de β -III tubulina. E) Micrografías que muestran que el cono de crecimiento también contiene filopodios y vesículas en la superficie de la célula. F y G) En etapas posteriores del desarrollo, las neuronas adoptan gradualmente una morfología compleja (F) dando lugar a una variedad de formas similares a neuronas (G). H) La proteína citoesquelética β -III tubulina y la tinción con F-actina mostraron procesos parecidos a axones y dendritas (los números e insertos señalan las áreas que se muestran en mayor aumento). Las barras de escalado son de 25 μm en las imágenes de microscopio óptico y 10 μm en el escaneo de micrografías electrónicas de barrido. SEM, microscopía electrónica de barrido; LM, microscopía de luz; b, paquetes de actina; v, vesículas, f, filopodia.

Las micrografías electrónicas de barrido mostraron que las neuronas derivadas de LP presentan múltiples ramificaciones de tipo dendrítico con protuberancias de forma de espinas con formas diversas, muy similares a filopodios y hongos (Fig. 19 A). Estas neuronas muestran diferentes tipos de estructuras en sus ramificaciones axonales: en forma de bifurcación (Fig. 19 B), arborización (Fig. 19 C) y formación de colateral (Fig. 19 D).

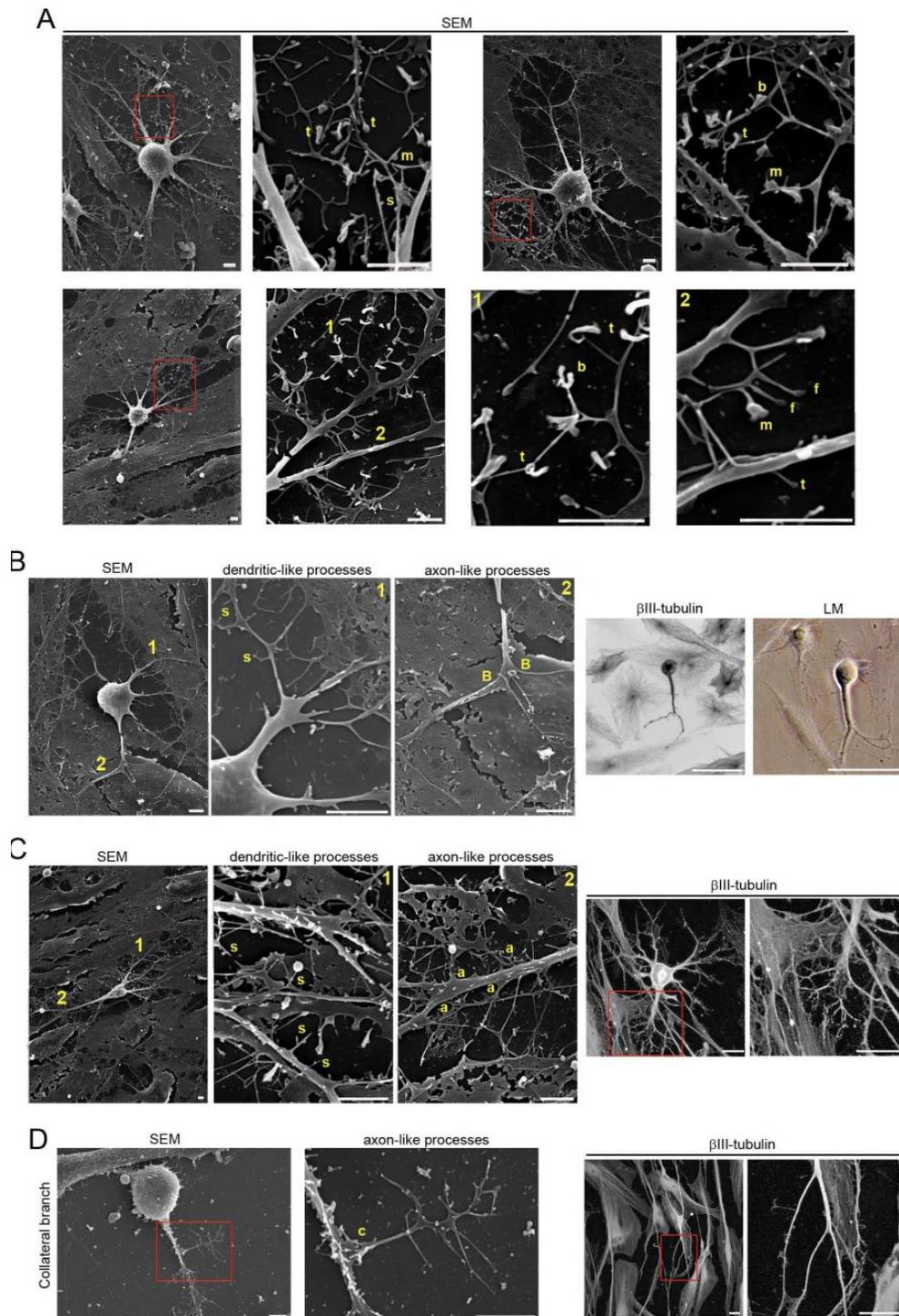


Figura 19: Las neuronas derivadas de LP desarrollan dendritas y axones.

A) Las micrografías electrónicas de barrido muestran que las neuronas derivadas de LP desarrollan múltiples procesos ramificados con protrusiones similares espinas dendríticas de diferentes tipos: filopodiales, hongos, delgadas, rechonchas y ramificadas. B-D) Las neuronas también muestran diferentes tipos de ramificación axonal terminal, que incluyen bifurcación (B), arborización terminal (C) y formación de colaterales (D) (los recuadros y números localizan las áreas que se muestran en mayor aumento). Las barras de escalado son 25 μm en imágenes microscópicas y 5 μm en las micrografías electrónicas de barrido. SEM, microscopía electrónica de barrido; LM, microscopía por contraste de fase; s, protuberancias parecidas a espinas; f,

filopodium; m, hongo; t, delgado; achaparrado; b, ramificado. (B) bifurcación; a, arborización; c, formación colateral.

El último paso en la polarización neuronal de las neuronas de roedores en cultivo es la formación de sinapsis. Los tipos más frecuentes de comunicación sináptica incluyen axodendrítica, axosomática, axoaxónica y sinapsis dendrodendríticas. El análisis morfológico reveló neuronas derivadas de LP presentan especializaciones sugerentes de que están conectadas entre sí (Figura 20 A) a través de diferentes tipos de interacciones tipo sinapsis, incluyendo sinapsis dendrodendríticas, axoaxónicas y axodendríticas (Figura 20 B).

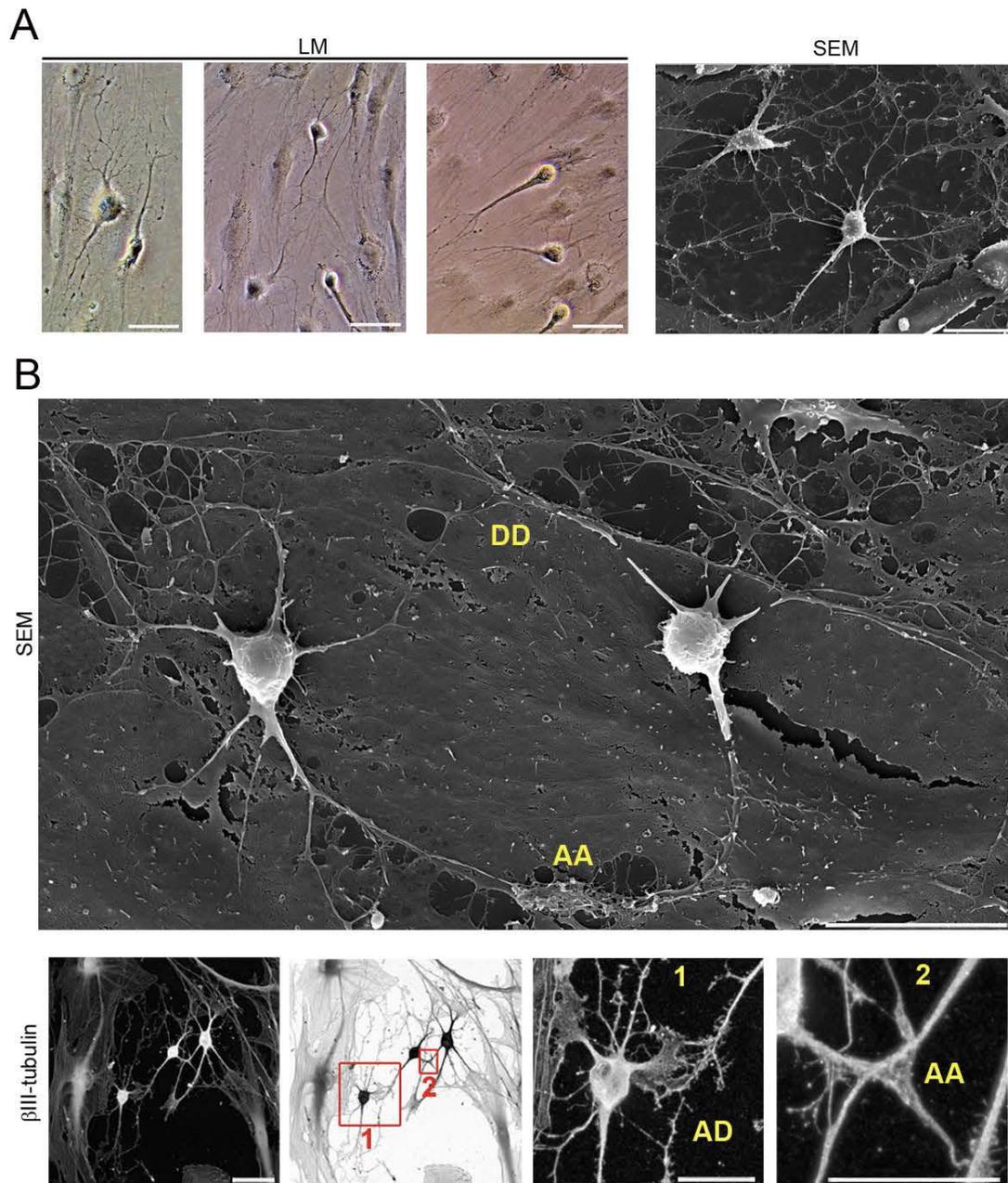


Figura 20: Las neuronas derivadas de LP están conectadas por regiones similares a sinapsis.

A, B) Las neuronas derivadas de LP se conectan entre sí (A) a través de diferentes tipos de sinapsis, como interacciones, que incluyen sinapsis similares a dendrodendríticas, axoaxónicas y axodendríticas (B). Barra de escala: 25 μ m. SEM, microscopía electrónica de barrido; LM, microscopía por contraste de fase; DD, sinapsis dendrodendríticas; AA, sinapsis axoaxónicas; AD, sinapsis de tipo axodendríticas.

La presencia de estructuras sinápticas se exploró mediante el estudio de expresión de proteínas asociadas a sinapsis: conexina 43 (Cx43) para localizar sinapsis eléctricas (uniones tipo gap), mientras que sinaptofisina (SYP) y sinapsina1(SNP) se utilizaron para localizar el desarrollo de sinapsis químicas (Fig. 21). Estas proteínas se localizaron casi exclusivamente en células con morfología neuronal de los cultivos estudiados. La expresión de Cx43, mostró un patrón de expresión que reveló contactos puntiformes entre los extremos de las dendríticas (Fig. 21 A, 1) y las terminales axónicas (Fig. 21 A, 2) con prolongaciones y el cuerpo de otras células. Las neuronas presentaban escaso marcaje de Cx43 en el soma o en el eje de las dendritas y axones donde no se aprecian contactos con estructuras positivas a α -tubulina. Aparece también marcaje de Cx43 en el cuerpo neuronal, acumulado en el área perinuclear (Fig. 21A).

La detección de las proteínas presinápticas mostró una distribución muy diferente de la sinaptofisina (SYP) y Sinapsina1 (Fig. 21 B, C). Mientras que la SYP se detecta por inmunocitoquímica en todo el soma neuronal de forma homogénea (Fig. 21 B), con un cierto gradiente con incremento de expresión hacia los polos terminales de las neuritas; la sinapsina1 se detecta solo en zonas de terminales axónicas sobre el soma y/o dendritas neuronales (Fig. 21 C, 1) o en terminales axónicos contactando con células indiferenciadas (Fig. 21 C, 2).

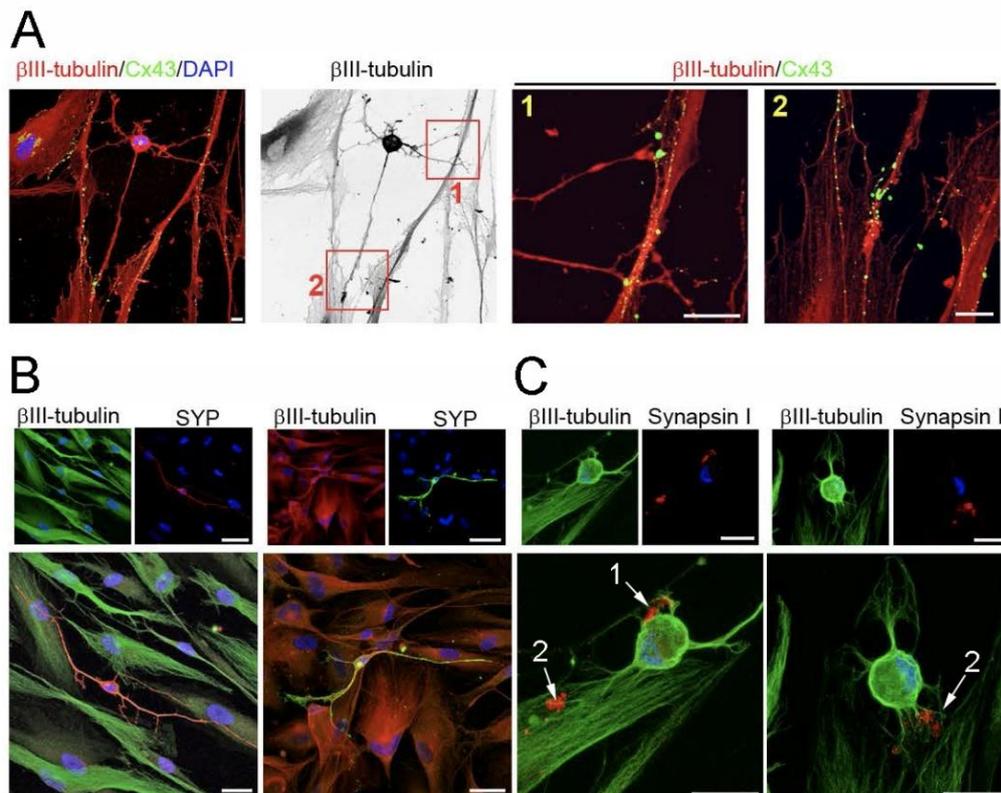


Figura 21: Expresión de proteínas sinápticas por inmunofluorescencia.

A) La expresión de Cx43 reveló contactos puntiformes entre los extremos de las dendríticas (A, 1) y las terminales axónicas (A, 2) con prolongaciones y el soma de otras células. Aparece también marcaje de Cx43 en el cuerpo neuronal, acumulado en el área perinuclear. B) Expresión de sinaptofisina en las neuronas derivadas de LPC, mostrando una distribución por el soma, con gradiente en las neuritas que tiende a incrementarse hacia los polos terminales de estas. Hay una intensa expresión en una región esférica de localización nuclear. C) Inmunomarcaje de sinapsina 1 localizado exclusivamente en campos terminales de axones sobre dendritas (1) y somas celulares. Barra de escala: 25 μ m.

El patrón de expresión de SYP en las distintas fases morfológicas de las células en diferenciación neuronal nos ha permitido determinar la aparición y distribución de esta proteína en relación con la maduración neuronal. En las etapas esférica y con pocas ramificaciones se observa intensa inmunoreactividad en el soma, sin que aparezca SYP en las neuritas proximales con una distribución escasa y dispersa en las ramificaciones terminales de las neuritas (Fig. 22 A); la proteína va distribuyéndose por las prolongaciones de forma progresiva (Fig. 22 B); acumulándose de forma selectiva en el árbol terminal de aquella con aspecto axónico (Fig. 22 C).

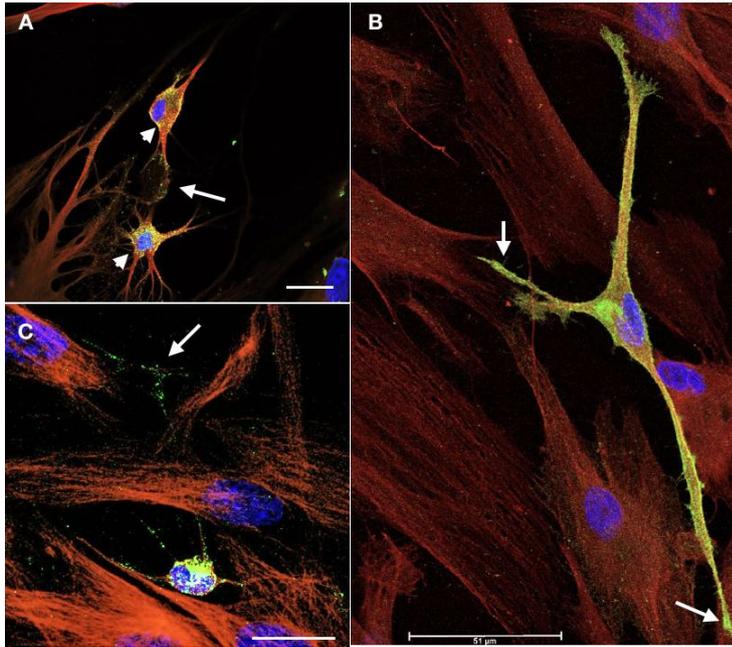


Figura 22: Expresión de SYP en las fases madurativas de las neuronas derivadas de LP. A) Célula con pocas prolongaciones, mostrando cómo la SYP en el cuerpo celular (punta de flecha) y se distribuye hacia los terminales dendríticos (flecha). B) la SYP se distribuye por las prolongaciones dendríticas y se acumula en su polo terminal del axón. D) En las neuronas maduras la SYP se localiza en el soma y se distribuye por las prolongaciones, acumulándose en la ramificación terminal del axón (flecha). Barra de escala: 25 μm .

7. ICC, WB y Expresión: marcadores de autismo en proliferación y diferenciación neurogénica.

Como se ha descrito en la introducción el diagnóstico de TEA hace referencia a la expresión fenotípica de unas alteraciones del neurodesarrollo que afectan a la construcción y maduración del sustrato neurobiológico de la conducta: la maduración de las neuronas y su patrón de conectividad. Un modelo celular de una enfermedad debe permitir reproducir lo más fielmente posible los procesos y mecanismos que actúan de forma primaria a nivel celular y subcelular en la enfermedad; es decir, aquellos elementos potencialmente patogénicos observables en células individuales, como son: la supervivencia celular (que será relevante para determinar en número de células neurales), la maduración funcional de las neuronas (relevante para el desarrollo madurativo de la actividad mental) y la sinaptogénesis (como sustrato elemental de la actividad neuronal). Descartamos la posibilidad de reproducir en un modelo celular de autismo aquellos aspectos dependientes del patrón de conectividad, que depende de señales entre neuronas heterogéneas con características territoriales complejas, y que no se pueden reproducir con fidelidad en un modelo *in vitro*.

Por lo tanto, hemos seleccionado para nuestro estudio comparativo entre células control y células con autismo una serie de marcadores representativos

de aspectos celulares y relacionados patogénicamente con autismo. El estudio comparativo de LPC versus LPA y PDC versus PDA contempla: (1) la detección inmunocitoquímica y análisis cuantitativo de las células en cultivo proliferativo y neurogénico; (2) la presencia de proteína por Western blot (WB) en ambas condiciones de cultivo, con un análisis semicuantitativo basado en la luminosidad de las bandas; y (3) comparando también en ambas condiciones, la expresión de cada gen mediante la cuantificación relativa de su ARNm, utilizando la técnica de PCR cuantitativa.

Aceptando que el resultado del cultivo es la obtención de una población celular inmadura, con características embrionarias, de esbozo dental (cultivo proliferativo) y de diferenciación neural (cultivo neurogénico), hemos explorado también la expresión de estos marcadores, en embriones de ratón, en células del esbozo dental y/o neuronas derivadas de la cresta neural. Para ello hemos consultado las bases de datos de expresión por hibridación in situ: Eurexpress a día embrionario de 14.5 (<http://www.eurexpress.org>) y Allen Brain Atlas a día embrionario de E15.5 (<http://developingmouse.brain-map.org>).

Expresión de marcadores

- **CASP3** es una proteína que se reconoce como marcador de la apoptosis, ya que es parcial o totalmente responsable de la segmentación proteolítica de muchas proteínas clave para la función celular. Las modificaciones en los patrones de muerte neuronal durante el desarrollo producen variaciones en el tamaño del cerebro y de la densidad celular de la corteza cerebral. Alteraciones en el tamaño cerebral y cambios en la densidad celular se han relacionado con el TEA (Casanova 2012; Dong et al., 2018).

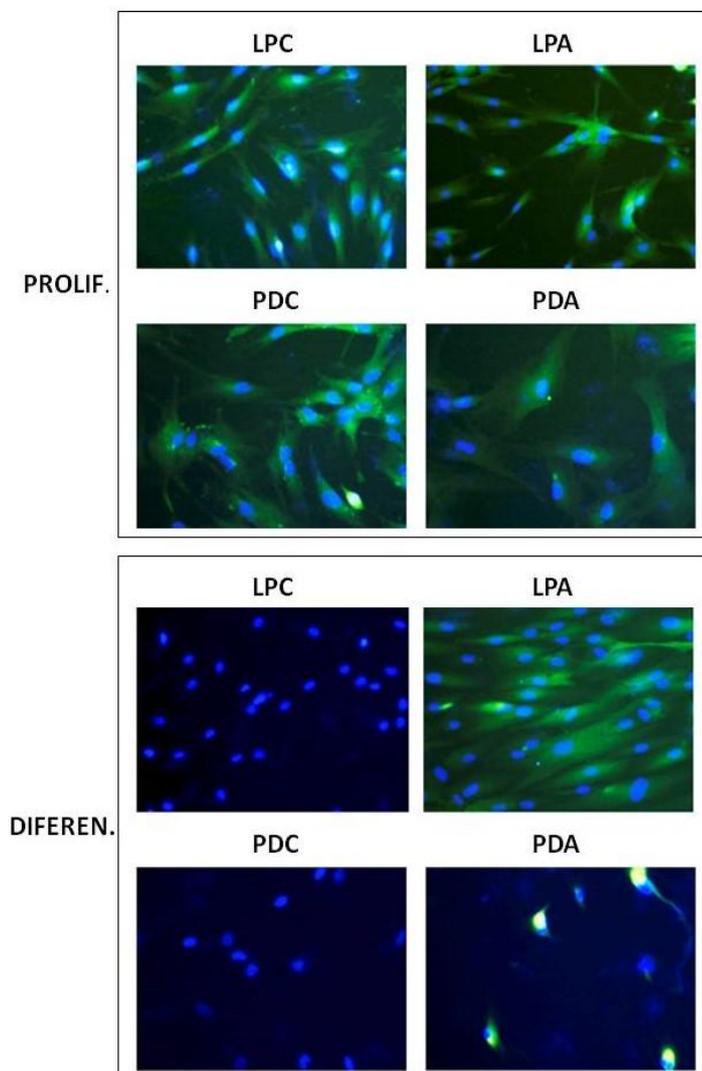


Figura 23: Microfotografías que muestran la inmunodetección de CASP3 en cultivos de células en proliferación y en diferenciación de ligamento y pulpa dental. (primera fila 200X y segunda fila 400X). En cultivos neurogénicos hemos observado que CASP3 no se expresa en las dos muestras celulares de control (LPC y PDC), mientras que las células con autismo expresan CASP3.

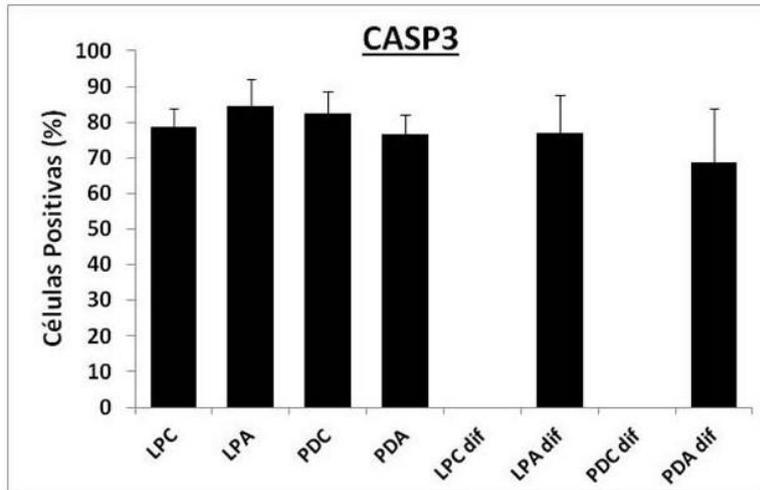


Figura 24: Histograma que ilustra el número de células positivas para CASP3 en relación con el número total de células en el cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). La proporción de células positivas para CASP3 es similar en cultivo proliferativo tanto en control como en autismo para las poblaciones celulares de LP y PD.

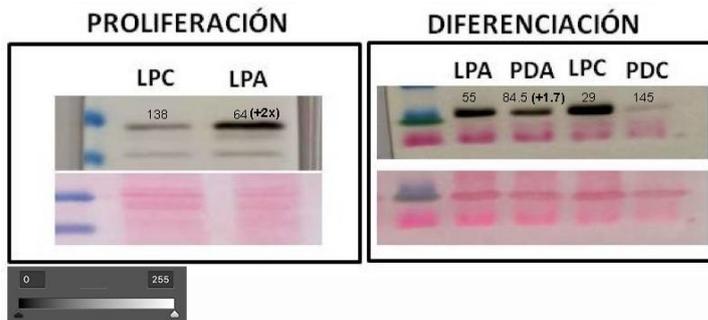


Figura 25: Imágenes de Western realizado en los cultivos celulares. Línea superior: Western con bandas inmunopositivas para CASP3, mostrando la mayor presencia de proteína en LPA que en LPC en cultivos en proliferación;

así como la no detección de CASP3 en PDC en diferenciación. Los números representan los datos semi-cuantitativos de luminosidad media relativa de la superficie de la banda realizado por el programa Photoshop (insert inferior izq. muestra los valores del patrón de grises).

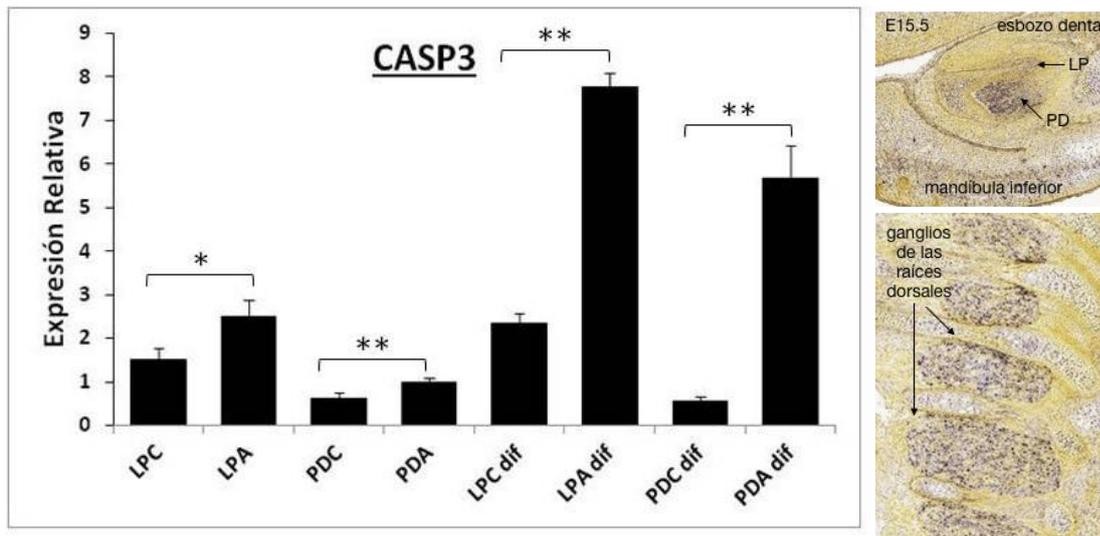


Figura 26: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de CASP3 en las células en cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). Se han detectado diferencias significativas, con mayor expresión en autismo, en la detección de CASP3-mRNA entre LPC y LPA ($p < 0,002$), PDC y PDA ($p < 0,001$) en proliferación. En diferenciación se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre control y autismo tanto para LP como PD, con una mayor expresión en las muestras con autismo. Imagen histológica de la expresión de CASP3 en el esbozo dental, de forma selectiva en las células de la PD y el LP, y en las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales (derivados de la cresta neural), en embriones de ratón de E15,5 (Imagen del Allen Brain Atlas).

En las muestras de Ligamento Periodontal Control y Autismo en proliferación detectamos $78,8 \pm 5,1\%$ de células positivas para LPC y un $84,5 \pm 7,5\%$ de células positivas en LPA, por lo que no existían diferencias significativas en inmunocitoquímica (Fig. 23, 24). En WB detectamos doble cantidad de proteína en LPA que en LPC (Fig. 25) y en transcripción (a través de qPCR) volvimos a ver mayor cantidad en la expresión de LPA que en LPC ($p < 0,002$) (Fig. 26). Por otro lado, en las muestras de PDC y Autismo en proliferación existía un $82,4 \pm 6,3\%$ células positivas en PDC y un $76,5 \pm 5,6\%$ para PDA, de modo que no encontramos diferencias significativas entre las muestras (Fig. 25). Sí se encontró una diferencia significativa en expresión del gen entre PDA y PDC ($p < 0,001$) siendo mayor la cantidad encontrada en PDA (Fig. 26).

Se repitieron los experimentos en las muestras con las células en diferenciación. No se detectó la proteína CASP3 en LPC en la inmunocitoquímica, mientras que en LPA había $77,0 \pm 1,08\%$ células positivas (Fig. 24). En el WB sorprendió la

presencia de proteína CASP3 en los cultivos neurogénicos de LPC, hasta casi el doble que en LPA de LPC (Fig. 25). En la expresión del gen volvimos a ver mayor cantidad en LPA que en LPC ($P < 0,001$) (Fig. 26). Por último, en las muestras de PDC y PDA en diferenciación encontramos que, de nuevo, no pudimos detectar la proteína en la muestra de PDC (confirmado con poca expresión en WB; Fig. 24 y 25), pero sí en células PDA ($68,8 \pm 15,0\%$), en WB detectamos casi el doble de proteína en PDA que en PDC (Fig. 25) y en expresión existe mayor cantidad en PDA que en PDC ($P = 0,001$) (Fig. 26).

Como análisis global de la detección de CASP3 podemos decir que se observa una expresión importante de esta proteína en las células de LP y PD. Hemos observado mayor expresión del gen y la proteína en las células con autismo que en los controles, sobretodo en células en diferenciación neural. La diferenciación reprime la presencia basal de células CASP3+ en los cultivos de células con autismo (tomada como la detectada en proliferación). Sin embargo la diferenciación aumenta muy significativamente la presencia de la proteína en las células del cultivo.

- **MeCP2** interviene en la regulación de la expresión genética como regulador transcripcional. Mutaciones en MeCP2 se han relacionado con síndromes asociados a la interacción social como el Síndrome de Rett y el TEA (Horvath y Monteggia, 2018; Lyst and Bird, 2015).

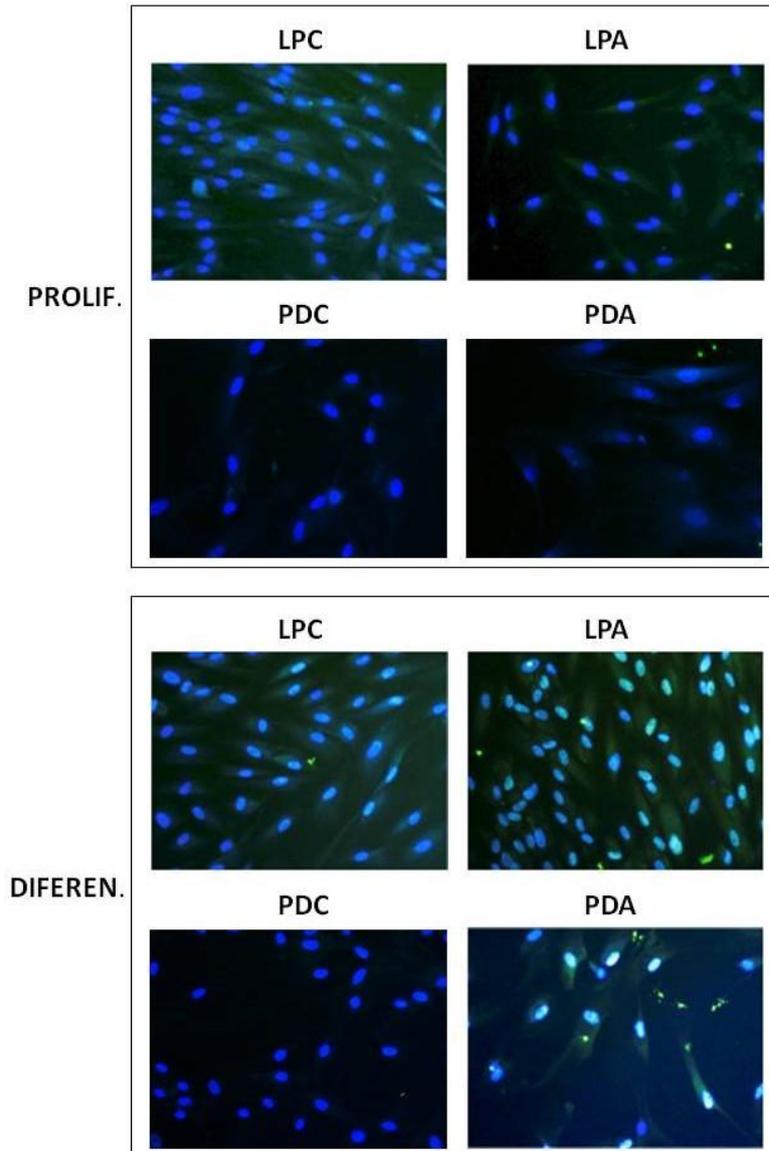


Figura 27: Microfotografías que muestran la inmunodetección de MeCP2 en cultivos de células en proliferación (primera fila a 200X y segunda fila a 400X) y en diferenciación de ligamento y pulpa dental.

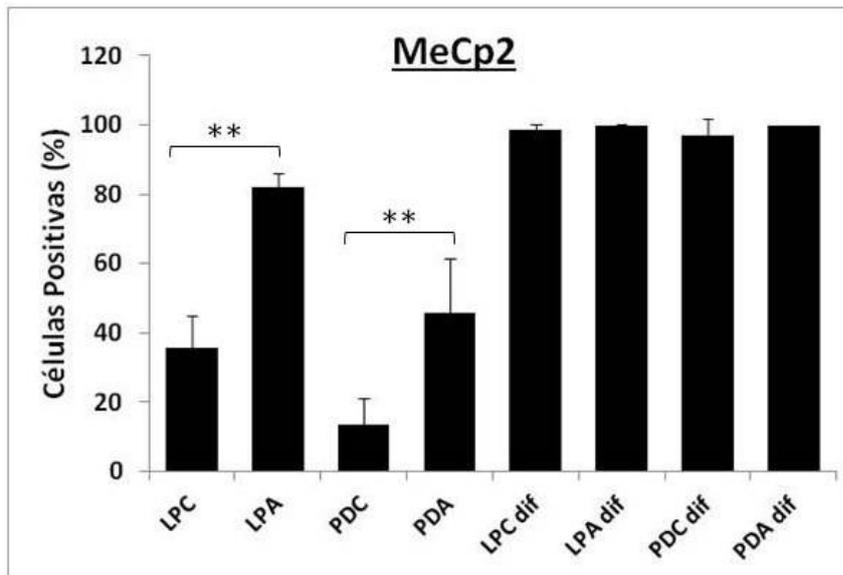


Figura 28: Histograma que ilustra el número de células positivas (núcleo positivo) para MeCP2 en relación con el número total de células en el cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). El número total de células positivas en los cultivos

en proliferación para MeCP2 es mayor en la muestra con autismo que en la muestra control tanto en ligamento como en pulpa. En las células en diferenciación, la cantidad de células positivas aumenta de forma generalizada con respecto a las muestras en proliferación, pero sin diferencias destacables entre C y A.

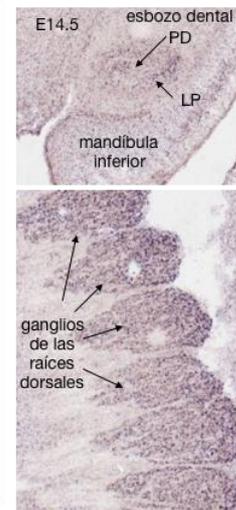
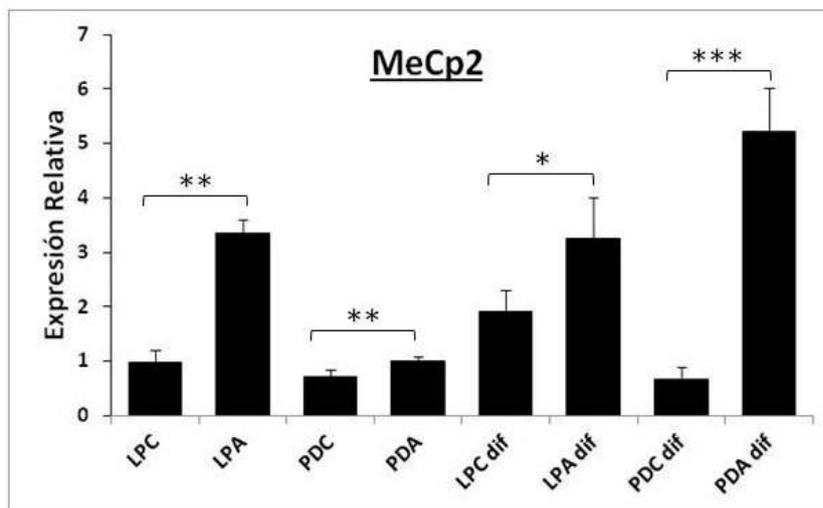


Figura 29: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de MeCP2 en las células en cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). encontramos mayor cantidad en LPA que en LPC ($p < 0,001$) y mayor también en PDA que en PDC ($p = 0,001$), en las muestras en proliferación. Por otro lado, en las muestras en diferenciación encontramos una diferencia significativa ($p = 0,020$) con mayor expresión en LPA, se observo de nuevo mayor expresión en PDA que en PDC ($p < 0,001$). Imagen histológica de la expresión de MeCP2 en el esbozo dental, de forma selectiva en las células de la PD y el LP, y en las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales (derivados de la cresta neural), en embriones de ratón de E14,5 (Imagen de Eurexpress).

En las muestras de LPC y LPA en proliferación detectamos 35,6+-9,5% de células positivas para LPC y un 84,82,2+-3,9% de células positivas en LPA, lo que nos indicaba una diferencia significativa con mayor presencia de células MeCP2 en cultivos de LPA que en controles ($P<0,001$) (Fig. 27 y 28). Nos conseguimos obtener datos fiables de los experimentos que se realizaron por WB. En transcripción volvimos a ver mayor cantidad en la expresión de MeCP2 en cultivos de LPA que en LPC ($P<0,001$) (Fig. 29). Por otro lado, en las muestras de PDC y PDA en proliferación existía un 13,3+-8,0% de células positivas en PDC y un 45,9+-15,6 para PDA, por lo que existía una diferencia significativa entre las muestras. También volvimos a ver una mayor transcripción de MeCP2 en PDA que en PDC ($P=0,001$)(Fig. 29).

En las muestras con las células en diferenciación encontramos un 98,5+-1,8% de células positivas para LPC y 99,6+-0,8% para LPA, sin diferencia significativa entre los cultivos (Fig. 27 y 28); pero en transcripción si encontramos una diferencia significativa ($P<0,020$) con mayor expresión en LPA (Fig. 29). Para las muestras de PDC con 97,2+-4,6 células positivas y PDA con 100+-0% células positivas no encontramos diferencias significativas (Fig. 27 y 28), y en transcripción, se observó mayor expresión en PDA que en PDC ($<0,001$)(Fig. 29).

Como análisis global tenemos que señalar que las células con autismo presentan mayor expresión de MeCP2, tanto en niveles de proteína como en expresión del gen. LA diferenciación neural supone un significativo incremento de la expresión de MeCP2.

- **EN1.** Codifica proteínas (factores de transcripción) que se han implicado en el control de la formación de patrones estructurales y de mapas sinápticos durante el desarrollo del sistema nervioso central (Benayed et al., 2005, 2009).

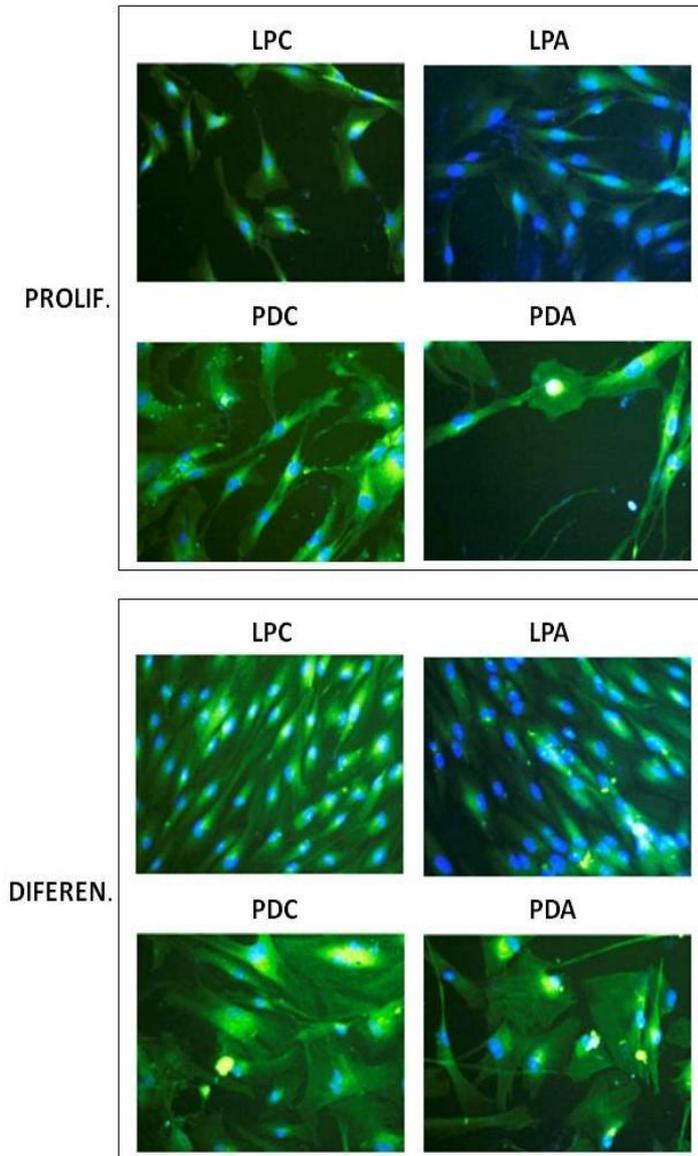


Figura 30: Microfotografías que muestran la inmunodetección de EN1 en cultivos de células en proliferación y en diferenciación de ligamento y pulpa dental (primera fila a 200X y segunda fila a 400X).

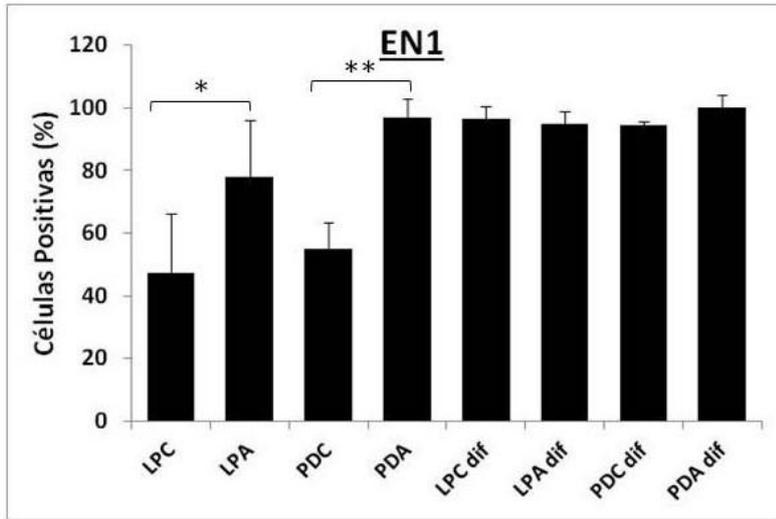


Figura 31: Histograma que ilustra el número de células con núcleo positivo para EN1 en relación con el número total de células en el cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). La proporción de células positivas para EN1 con respecto a la cantidad de células totales es mayor en las muestras de

autismo en proliferación (tanto en LP ($p < 0,006$) como en PD ($p < 0,001$)). En los cultivos de células en diferenciación, aumenta la proporción de células positivas en todas las muestras, sin diferencias significativas entre ellas.

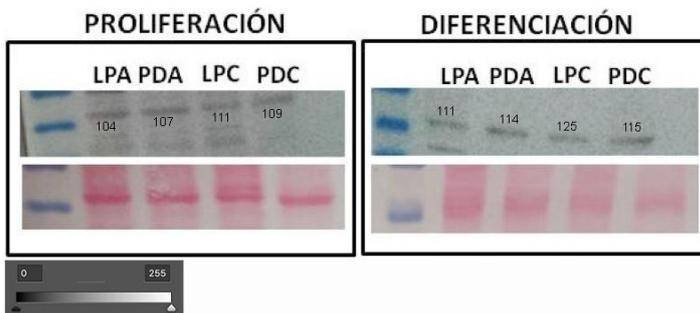


Figura 32: Imágenes de Western realizado en los cultivos celulares. Línea superior: Western con bandas inmunopositivas para EN1, mostrando la presencia de la proteína en los cultivos celulares de LP y PD controles y con autismo. Los números representan los datos semi-cuantitativos de luminosidad

media relativa de la superficie de la banda realizado por el programa Photoshop (insert inferior izq. muestra los valores del patrón de grises).

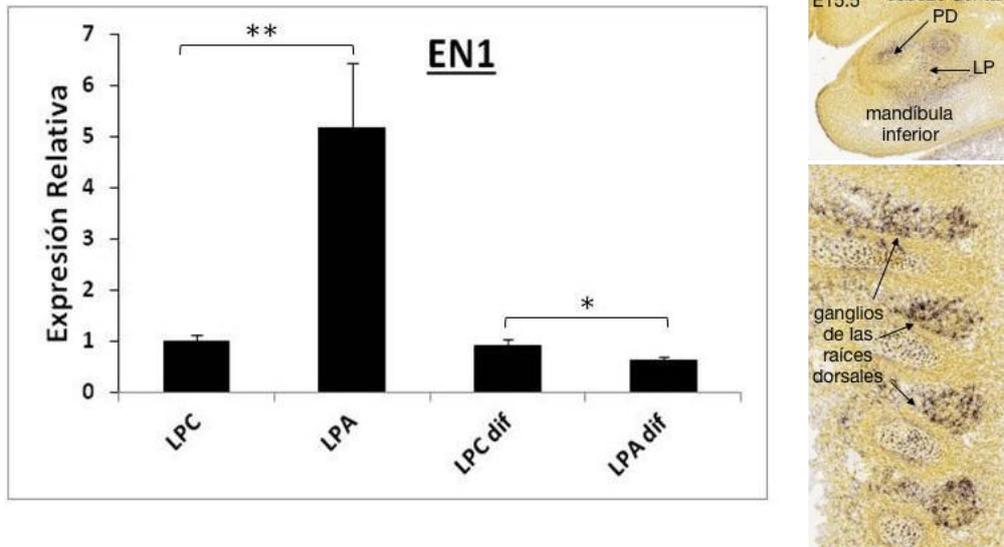


Figura 33: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de EN1 en las células en cultivo de LP. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). Encontramos mayor cantidad en LPA que en LPC ($p < 0,001$). Por otro lado, en las muestras en diferenciación encontramos una diferencia significativa ($p < 0,020$) con mayor expresión en LPC que en LPA. Imagen histológica de la expresión de EN1 en el esbozo dental, de forma selectiva en las células de la PD y el LP, y en las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales (derivados de la cresta neural), en embriones de ratón de E15,5 (Imagen del Allen Brain Atlas).

En las muestras en proliferación, en LPC existía un 47,4+-19,0% de células positivas para EN1 y en LPA un 77,9+-18,3%, con una diferencia significativa ($P < 0,006$) (Fig. 30 y 31), en Western blot no encontramos diferencias (Fig. 32), pero en transcripción se observó una diferencia significativa ($P = 0,001$) con mayor expresión en LPA (Fig. 33). En Pulpa observamos un 55,0+-8,4% de células positivas en LPC y un 96,9+-6,3% de células positivas en LPA, con una diferencia significativa ($P < 0,001$), en western blot no encontramos diferencias significativas (Fig. 32).

Con las células en diferenciación observamos un 96,5+-1,2% de células positivas en LPC y un 94,8+-4,2% de células positivas en LPA, sin diferencias significativas (Fig. 30 y 31). En western blot tampoco encontramos diferencias significativas y en transcripción si que encontramos una diferencia significativa ($p < 0,001$) con mayor expresión en LPA. En las muestras de pulpa, observamos un 94,6+-4,1% de células positivas en PDC y un 100+-0% de células positivas en PDA, sin diferencias significativas, en western tampoco encontramos diferencias significativas (Fig. 30-32). El estudio transcriptómico de EN1 en PD no produjo resultados valorables.

En resumen, EN1 se expresa de forma aumentada en células indiferenciadas de LP y PD con autismo. Una vez diferenciadas, ambos tipos celulares incrementan la expresión de la proteína EN1, con la represión de la expresión del gen en el LP.

- **EN2.** Codifica proteínas (factores de transcripción) que se han implicado en el control de la formación de patrones y mapas sinápticos durante el desarrollo del sistema nervioso central. Comparte patrón espaciotemporal de expresión con EN1 y ha sido relacionado con predisposición a padecer TEA (Benayed et al., 2005, 2009).

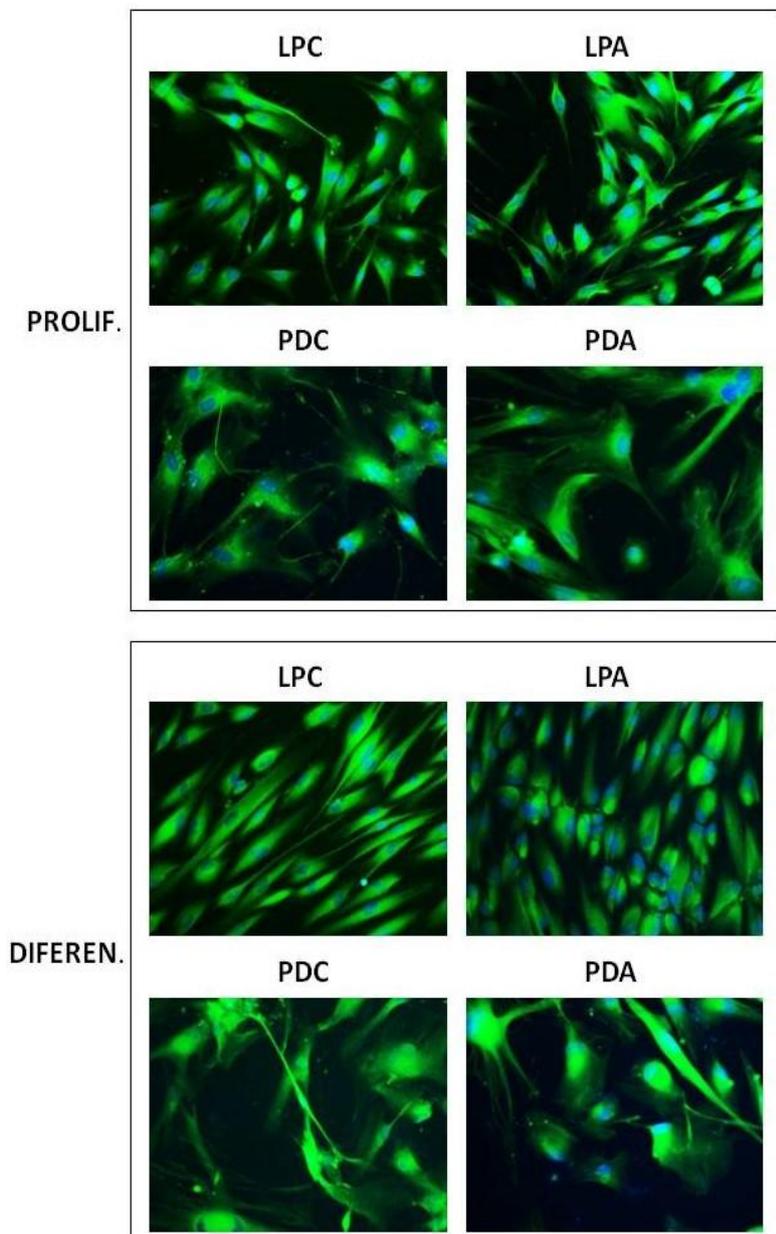


Figura 34: Microfotografías que muestran la inmunodetección de EN2 en cultivos de células en proliferación y en diferenciación de ligamento y pulpa dental (primera fila a 200X y segunda fila a 400X).

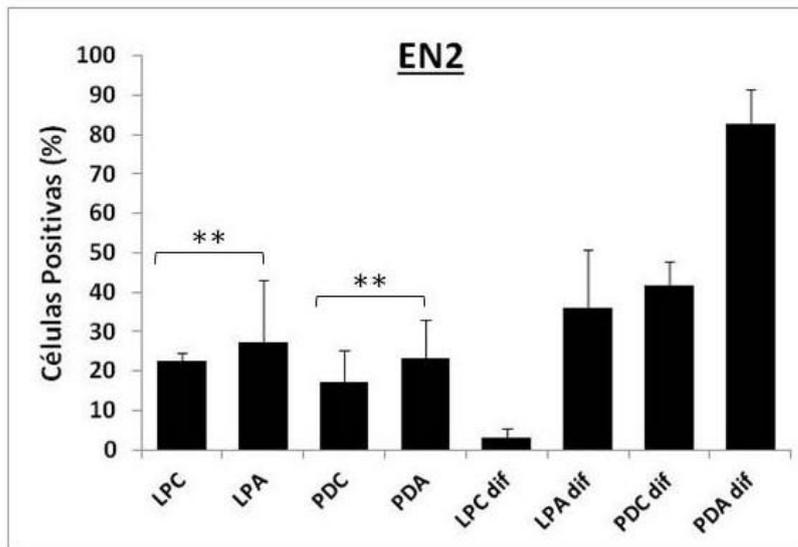


Figura 35: Histograma que ilustra el número de células con núcleo positivo para EN2 en relación con el número total de células en el cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). Se aprecia un incremento en el número de células

EN2 positivas en los cultivos neurogénicos y en el autismo, con relación a los cultivos proliferativos y células control, respectivamente.

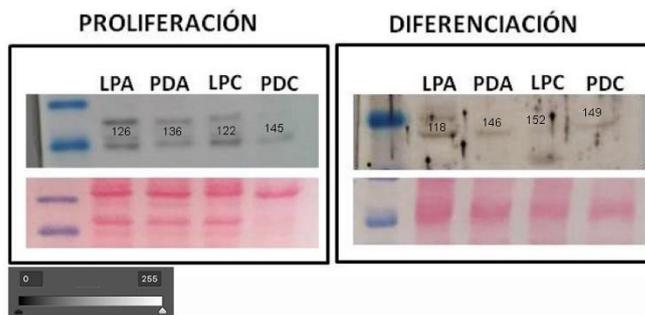


Figura 36: Imágenes de Western realizado en los cultivos celulares. Línea superior: Western con bandas inmunopositivas para EN2, mostrando la presencia de la proteína en los cultivos celulares de LP y PD controles y con autismo. Los números representan los datos semi-

cuantitativos de luminosidad media relativa de la superficie de la banda realizado por el programa Photoshop (insert inferior izq. muestra los valores del patrón de grises).

En las muestras de Ligamento Periodontal Control y Autismo en proliferación detectamos 22,7±1,8% de células positivas para LPC y un 27,2±15,9% de células positivas en LPA, sin diferencias significativas (Fig. 34 y 35). En western, observamos escasa diferencia en la expresión de EN2 (Fig. 36). En las muestras de PDC y PDA en proliferación existía un 17,3±8,0% de células positivas en PDC y un 23,3±9,7% para PDA, de nuevo sin diferencia significativa (Fig. 35) y en western vimos mayor cantidad de proteína en PDA que en PDC (Fig. 36).

En las muestras con las células en diferenciación encontramos un 3,0+-2,5% de células positivas para LPC y 36,1+-14,8% para LPA, lo que nos indicada una diferencia significativa ($P<0,001$) (Fig. 34 y 35), en WB encontramos claras diferencias con mayor expresión en LPA que en LPC (Fig. 36). Para las muestras de PDC con 41,9+-5,9% células positivas y PDA con 82,8+-8,5% células positivas encontramos una diferencia significativa ($P<0,001$) (Fig. 35), por último, en WB no se encontraron diferencias significativas para estas muestras (Fig. 36).

No hemos encontrado expresión de significativa de EN2 en los derivados de la cresta neural (esbozo dental y ganglios de la raíz dorsal) en los estudios de hibridación in situ de los datos publicados en el Allen Brain Atlas ni en Eurexpress. Tampoco hemos detectado expresión de EN2 en los cultivos celulares con los primers diseñados. La presencia de la proteína tanto en inmunocitoquímica como WB sugiere que el diseño de estos primers no ha sido adecuado.

La proteína EN2 esta mas expresada en las células con autismo que en las células control, aunque no hemos podido demostrar diferencias con significación estadística. Ahora bien, en células diferenciadas la proteína aumenta de forma muy importante, sobretodo en células con autismo, donde las diferencias encontradas si son significativas.

- **SHANK3.** Son proteínas de la sinapsis que conectan receptores de neurotransmisores, canales iónicos y otras proteínas de membrana postsináptica con el citoesqueleto de actina y las vías de señalización acopladas a proteína G. Las proteínas Shank también juegan un papel en la formación de sinapsis y en la maduración de las espinas dendríticas (Sheng y Kim, 2000). (*The Shank family of scaffold proteins.* Sheng M¹, Kim EJ Cell Sci. 2000 Jun;113 (Pt 11):1851-6.)

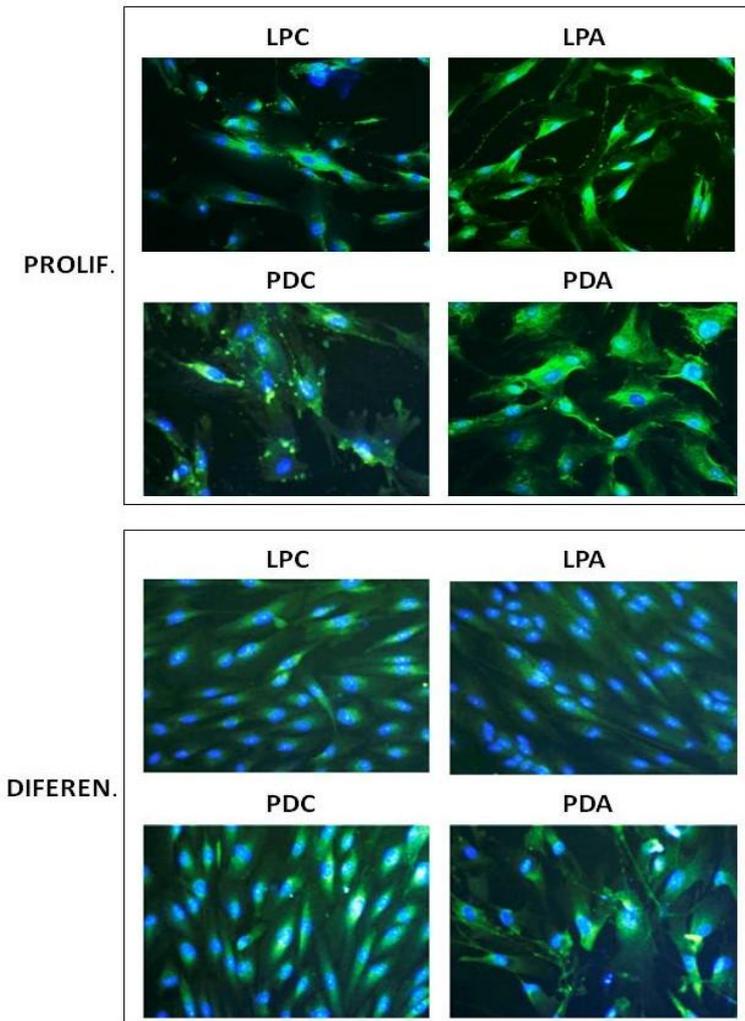


Figura 37: Microfotografías que muestran la inmunodetección de SHANK3 en cultivos de células en proliferación y en diferenciación de ligamento y pulpa dental (primera fila a 200X y segunda fila a 400X).

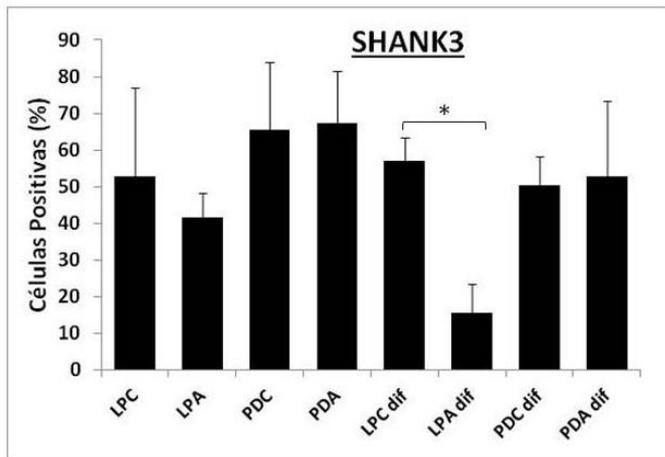


Figura 38: Histograma que ilustra el número de células positivas para SHANK3 en relación con el número total de células en el cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas).

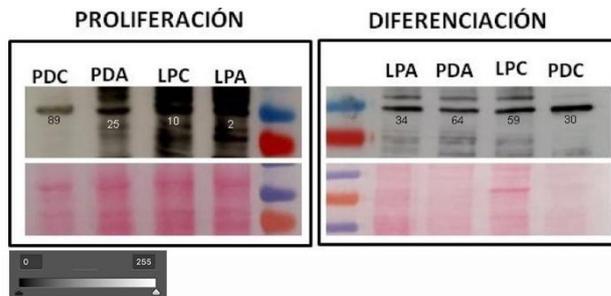


Figura 39: Imágenes de Western realizado en los cultivos celulares. Línea superior: Western con bandas inmunopositivas para SHANK3, mostrando la presencia de la proteína en los cultivos celulares de LP y PD controles y con autismo. Los números representan los datos semi-cuantitativos de luminosidad media relativa de la superficie de la banda realizado por el programa Photoshop (insert inferior izq. muestra los valores del patrón de grises).

inmunopositivas para SHANK3, mostrando la presencia de la proteína en los cultivos celulares de LP y PD controles y con autismo. Los números representan los datos semi-cuantitativos de luminosidad media relativa de la superficie de la banda realizado por el programa Photoshop (insert inferior izq. muestra los valores del patrón de grises).

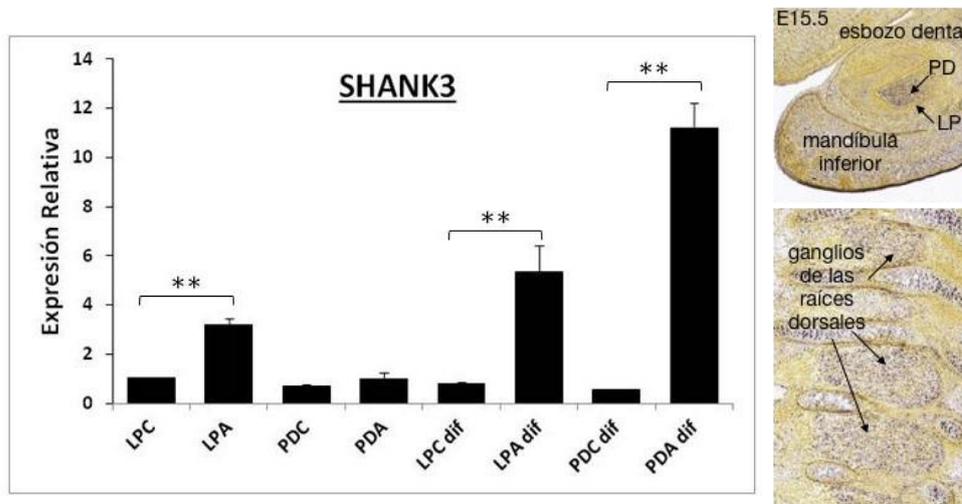


Figura 40: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de SHANK3 en las células en cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). Encontramos mayor cantidad en LPA que en LPC ($P < 0,001$) y mayor también en PDA que en PDC ($p < 0,001$) en las muestras en proliferación. Por otro lado, en las muestras en diferenciación encontramos una diferencia significativa ($p < 0,001$) con mayor expresión en LPA que en LPC, se observó de nuevo mayor expresión en PDA que en PDC ($p < 0,001$). Imagen histológica de la expresión de SHANK3 en el esbozo dental, de forma selectiva en las células mesenquimales de la PD y muy poco en el LP, y en las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales (derivados de la cresta neural), en embriones de ratón de E15,5 (Imagen del Allen Brain Atlas).

En las muestras en proliferación obtuvimos los siguientes resultados: LPC con $52,7 \pm 24,2\%$ de células positivas para SHANK3 y LPA con $41,7 \pm 6,5\%$ de células positivas, sin diferencias significativas (Fig. 37 y 38). En WB tampoco se encontraron diferencias significativas (Fig. 39) y en transcripción observamos mayor expresión en LPA que en LPC ($P < 0,001$) (Fig. 40); en las muestras de pulpa dental detectamos $65,44 \pm 18,5\%$ células positivas en PDC y $67,3 \pm 14\%$ de células positivas en PDA, sin diferencias significativas (Fig. 37 y 38), tampoco observamos diferencias significativas ni en WB ni en transcripción (Fig. 39 y 40, respectivamente).

En las muestras en diferenciación encontramos $57,1 \pm 6,3\%$ de células positivas en LPC y $15,5 \pm 8,1\%$ células positivas en LPA, con una diferencia significativa ($p = 0,015$) (Fig. 37 y 38), en WB no se detectaron diferencias (Fig. 39), pero en transcripción se observó una diferencia significativa en transcripción ($p < 0,001$) con mayor expresión del gen en LPA (Fig. 40). Por último, en las muestras de pulpa dental en diferenciación se observó un $50,3 \pm 8,0\%$ de células positivas en PDC y un $58,8 \pm 20,6\%$ de células positivas

en PDA, sin diferencias significativas ni en inmunocitoquímica (Fig. 38) ni en WB (Fig. 39), en transcripción si observamos una diferencia significativa ($P < 0,001$) con mayor expresión en PDA (Fig. 40).

En relación con MeCP2 se observa que hay diferencias entre células control y con autismo, sobretodo en cultivos diferenciados. Mientras que el LPC expresa mas proteína que el control, tanto el LP como la PD autistas transcriben mas el gen *MeCP2* que las neuronas control.

- **SIRT1.** La sirtuina 1 regula mediante un mecanismo epigenético la actividad de MeCP2, acetilando su promotor y modificando, por lo tanto, la expresión de BDNF. Es fundamental para el mantenimiento de la plasticidad sináptica (Zocchi y Sassone-Corsi, 2012).

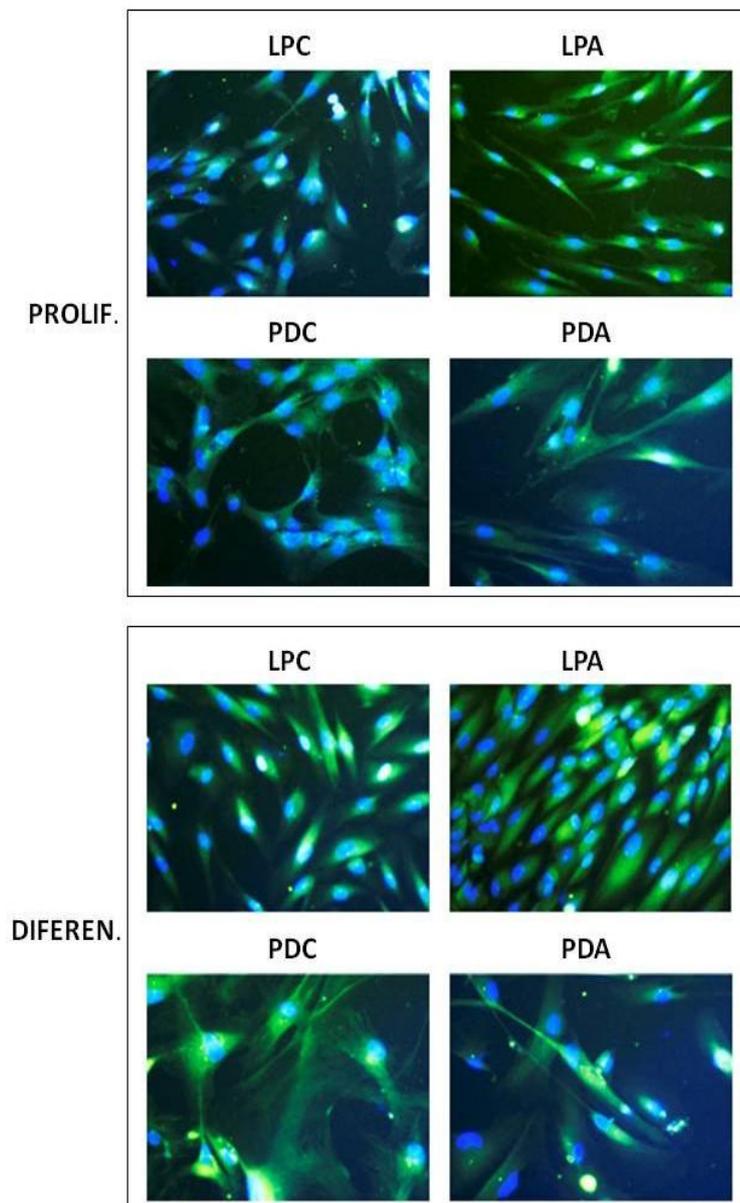


Figura 41: Microfotografías que muestran la inmunodetección de SIRT1 en cultivos de células en proliferación y en diferenciación de ligamento y pulpa dental (primera fila a 200X y segunda fila a 400X).

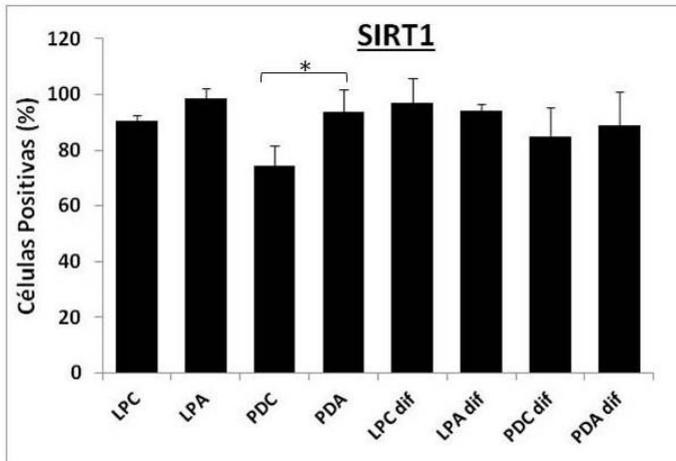


Figura 42: Histograma que ilustra el número de células positivas para SIRT1 (con núcleo positivo) en relación con el número total de células en el cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas).

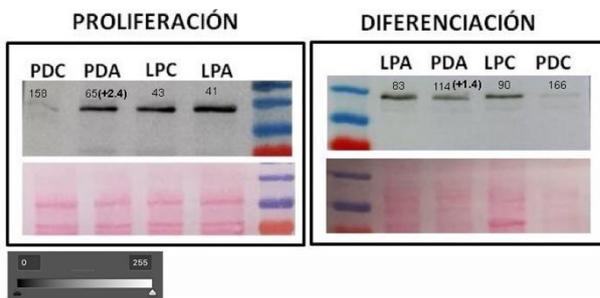


Figura 43: Imágenes de Western realizado en los cultivos celulares. Línea superior: Western con bandas inmunopositivas para SIRT1, mostrando la presencia de la proteína en los cultivos celulares de LP y PD controles y con

autismo. La proteína SIRT1 es mas del doble de abundante en PDA que en PDC en proliferación; y 1,4 veces mas abundante en PDA que PDC en diferenciación. En LP, aunque las diferencias no son tan aparentes, se expresa mas en células autistas que en controles. Los números representan los datos semi-cuantitativos de luminosidad media relativa de la superficie de la banda realizado por el programa Photoshop (insert inferior izq. muestra los valores del patrón de grises).

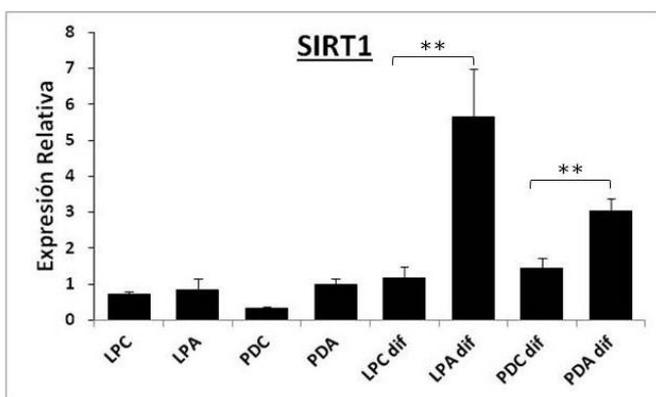


Figura 44: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de SIRT1 en las células en cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). Encontramos mayor cantidad en LPA que en LPC ($p < 0,001$) y mayor también en PDA que en PDC ($p < 0,001$), en las muestras en proliferación. Por otro

lado, en las muestras en diferenciación encontramos una diferencia significativa ($p < 0,001$) con mayor expresión en LPA que en LPC, se observo de nuevo mayor expresión en PDA que en PDC ($p < 0,001$). La expresión de Sirt1 no ha sido estudiada en el Allen Brain Atlas y en Euroexpress no se detecta expresión a E14.5.

En las muestras de Ligamento Periodontal Control y Autismo en proliferación detectamos 90,5+-8,9% de células positivas para LPC y un 98,5+-2% de células positivas en LPA, por lo que no existían diferencias significativas en inmunocitoquímica (Fig. 41 y 42), en WB no detectamos diferencias y en transcripción tampoco (Fig. 43 y 44, respectivamente). Por otro lado, en las muestras de PDC y PDA en proliferación existía un 74,4+-10,7% células positivas en PDC y un 93,6+-7,5% para PDA, con una diferencia significativa ($P=0,048$) (Fig. 41 y 42), en WB se encontró diferencia (Fig. 43), ya que en PDC no se detectó banda de proteína y en PDA sí, en transcripción no se encontraron diferencias significativas (Fig. 44).

En los experimentos de las muestras con las células en diferenciación encontramos un 97,1+-2,4% en LPC y un 94,3+-3,8% en LPA, sin diferencias significativas (Fig. 41 y 42), en WB tampoco se encontraron diferencias (Fig. 43) y en transcripción si se observó una diferencia ($p<0,001$) con mayor expresión del gen en LPA (Fig. 44). En las muestras de pulpa dental en diferenciación encontramos que, de nuevo, no hay diferencias significativas entre PDC con 84,8+-12,1% células positivas y 89,0+-8,3% en PDA (Fig. 41 y 42), en WB no detectamos banda en PDC, pero sí en PDA (Fig. 43) y en transcripción vimos una diferencia significativa ($P<0,001$) con mayor expresión en LPA (Fig. 44).

SIRT 1 está presente en los cultivos celulares de LP y PD. El gen SIRT1 está sobre expresado en células diferenciadas de LPA y PDA en relación a sus controles. Esto indica una posible alteración combinada en la regulación epigenética de la expresión de BDNF en células con TEA, tanto por alteraciones en MeCP2 como de SIRT1.

- **GAD1.** El gen GAD1 codifica en el cerebro maduro la proteína GAD67, enzima implicado en la síntesis del neurotransmisor GABA. Se expresa en diversos tipos celulares derivados de la cresta neural, y entre ellos progenitores del esbozo de los dientes (Chang et al., 2011) .

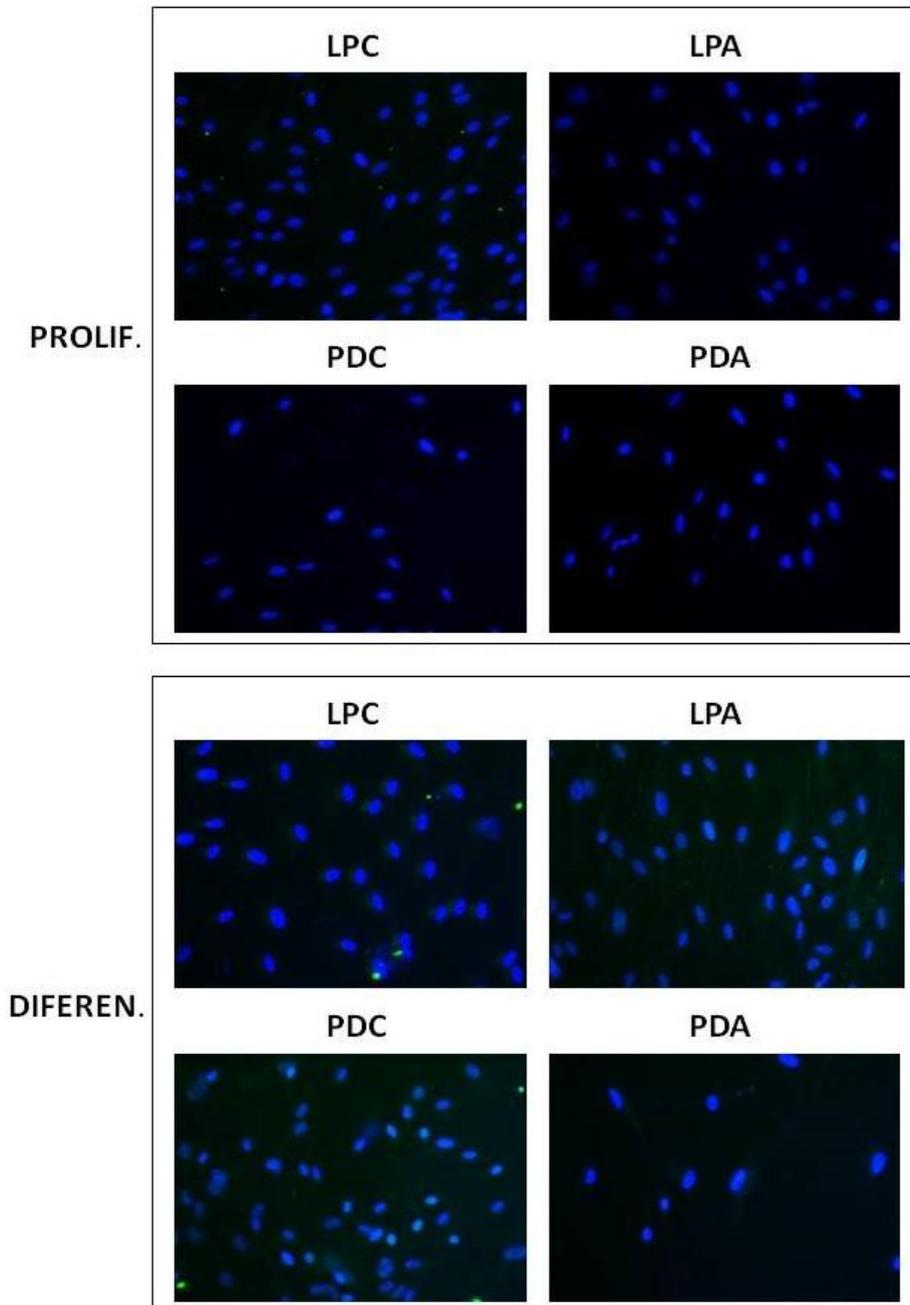


Figura 45: Microfotografías que muestran la inmunodetección de GAD1 en cultivos de células en proliferación y en diferenciación de ligamento y pulpa dental (primera fila a 200X y segunda fila a 400X).

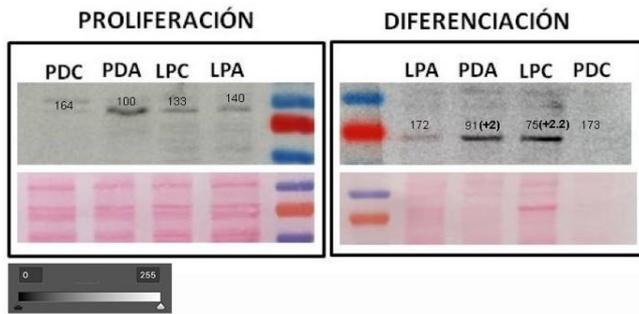


Figura 46: Imágenes de Western realizado en los cultivos celulares. Línea superior: Western con bandas inmunopositivas para GAD1, mostrando la presencia de la proteína en los cultivos celulares de LP y PD controles y con autismo. La proteína GAD1 es mas abundante en PDA que en PDC en proliferación; y 2 veces mas abundante en PDA que PDC en diferenciación. En LP, las diferencias son muy claras en células en diferenciación, donde se expresa mas del doble en células control que en autistas. Los números representan los datos semi-cuantitativos de luminosidad media relativa de la superficie de la banda realizado por el programa Photoshop (insert inferior izq. muestra los valores del patrón de grises).

abundante en PDA que en PDC en proliferación; y 2 veces mas abundante en PDA que PDC en diferenciación. En LP, las diferencias son muy claras en células en diferenciación, donde se expresa mas del doble en células control que en autistas. Los números representan los datos semi-cuantitativos de luminosidad media relativa de la superficie de la banda realizado por el programa Photoshop (insert inferior izq. muestra los valores del patrón de grises).

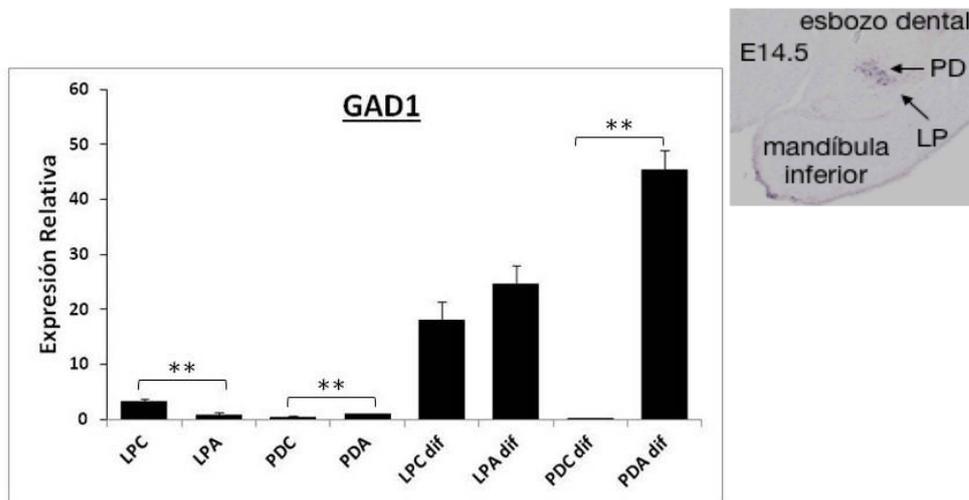


Figura 47: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de GAD1 en las células en cultivo mediante qPCR. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). Imagen histológica de la expresión de GAD1 en el esbozo dental, de forma selectiva en las células de la PD. No se detecta expresión en las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales, en embriones de ratón de E14,5 (Imagen de Eurexpress).

Los experimentos de inmunocitoquímica no dieron resultados valorables, aunque se realizaron varios intentos con el anticuerpo utilizándolo a diferentes concentraciones (Fig. 45), pero el Ab si que nos permitió obtener datos claros en WB (Fig. 46). Con las muestras en proliferación, obtuvimos una mayor cantidad de proteína en LPC que LPA y en transcripción encontramos una mayor cantidad de expresión del gen en LPC que en LPA ($p < 0,001$) (Fig.

47). En PDC en proliferación detectamos menor tamaño de banda que en PDA (Fig. 46), y en transcripción también se observó mayor expresión en PDA que en PDC ($p < 0,001$) (Fig. 47).

Los experimentos con las muestras en diferenciación nos mostraron un tamaño de banda en LPC que en LPA, con una diferencia de más del doble en su luminosidad (Fig. 46), pero sin diferencias significativas en transcripción ($p < 0,001$) (Fig. 47). En las muestras de pulpa dental en diferenciación si encontramos una diferencia entre PDC y PDA, con un mayor tamaño de banda en PDA (más del doble en disminución de luminosidad), al igual que en transcripción, que también observamos mayor expresión en PDA que en PDC ($p < 0,001$) (Fig. 46 y 47, respectivamente).

Por lo tanto, GAD1 está incrementado en las células con TEA en cultivos de diferenciación, tanto a nivel proteínico como transcripcional.

8. Estudio transcriptómico de genes relacionados con desarrollo de la cresta neural y con posible implicación en la neurobiología del TEA.

En este apartado hemos estudiado comparativamente la transcripción en LP y PD control y con TEA de genes que hemos usado como marcadores celulares previamente (*Nestina* y β -III-Tubulina), para completar su estudio de expresión; así como otros genes identificados con posible implicación directa en la neurobiología del TEA (*NR3C1*, *CDC42*, *SHANK2*, *SYNGAP1*, *MIKI67*, *RELN*, *MIRNA132*, *CC2D1A*, *MBD3*, *NTRK2*, *RORA*, *BDNF* y *RAO1*). Junto al análisis de expresión mediante PCR cuantitativa en los cultivos celulares, hemos explotado su patrón de expresión por hibridación in situ en las células del esbozo dental y ganglios de las raíces dorsales de embriones de ratón durante el desarrollo (E14.5 en Euxpress o E15.5 en Allen Brain Atlas).

- **Nestina.** Gen NES que codifica una proteína de filamento intermedio específico de células neuroepiteliales indiferenciadas. Ya lo hemos visto expresado en células mesenquimales del diente, como marcador necesario para su caracterización.

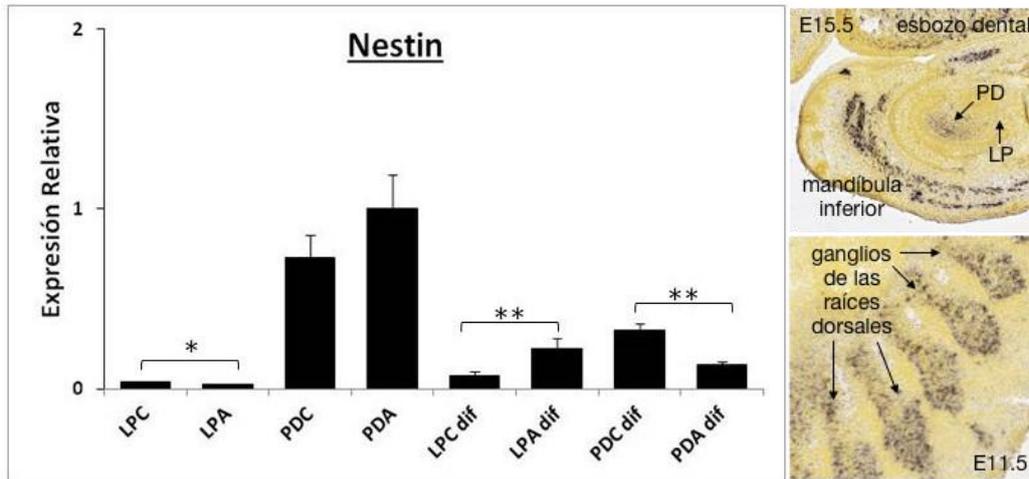


Figura 48: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de *Nestina* en las células en cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). La significación estadística de las diferencias de expresión se señala con *: (*) valor de $p < 0,05$ y $> 0,001$; (**) $p < 0,001$. Imagen histológica de la expresión de *Nestina* en el esbozo dental, de forma selectiva en las células de la PD y el LP, y en las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales (derivados de la cresta neural), en embriones de ratón de E15,5 (Imagen del Allen Brain Atlas).

En las muestras en proliferación, en LPC había más expresión de NES que en LPA, con una diferencia significativa de $p < 0,037$ (Fig. 48). Entre PDC y PDA no existen diferencias estadísticamente significativas. Con las células en diferenciación observamos mayor expresión en LPC que en LPA ($< 0,001$) y también mayor expresión en PDC que en PDA ($< 0,001$) (Fig. 48).

- **B-III Tubulina (TUJ1).** La es BIII-tubulina una proteína de los microtúbulos del citoesqueleto de las neuronas, considerado un marcador específico para las células neuronales.

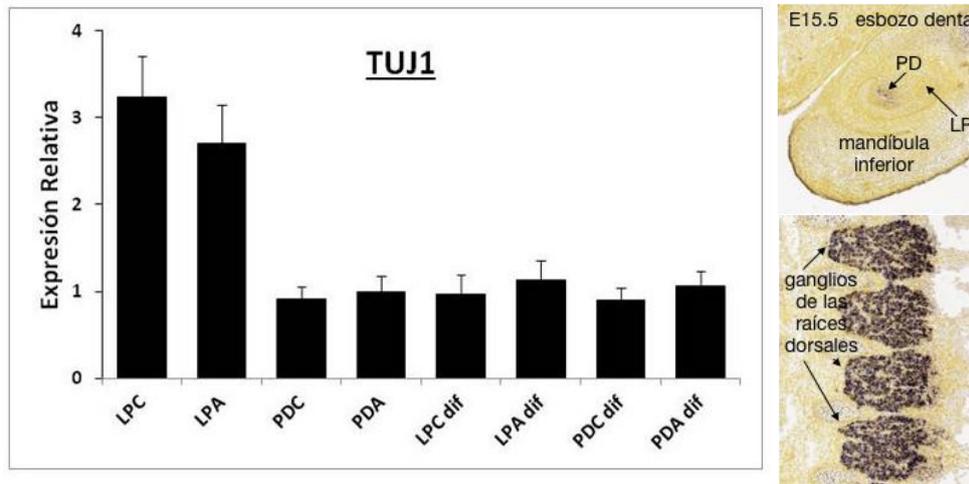


Figura 49: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de β III-Tubulina en las células en cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). Imagen histológica de la expresión de β III-Tubulina en el esbozo dental, de forma selectiva en las células de la PD, y en las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales (derivados de la cresta neural), en embriones de ratón de E15,5 (Imagen del Allen Brain Atlas).

No hemos detectado ninguna diferencia significativa entre las muestras controles y con TEA, aunque las células de LP expresan el gen de la β III-tubulina de forma muy abundante en relación con los otros tipos de cultivos realizados (Fig. 49). Durante el desarrollo del ratón se expresa fuertemente en las neuronas jóvenes del sistema nervioso periférico (derivadas de la cresta neural).

- **NR3C1.** Este gen codifica el receptor de glucocorticoides, que puede funcionar como un factor de transcripción sobre los genes de respuesta de glucocorticoides para activar su transcripción. Está involucrado en respuestas inflamatorias, proliferación celular y diferenciación en tejidos diana (Lu y Cidlowski, 2005).

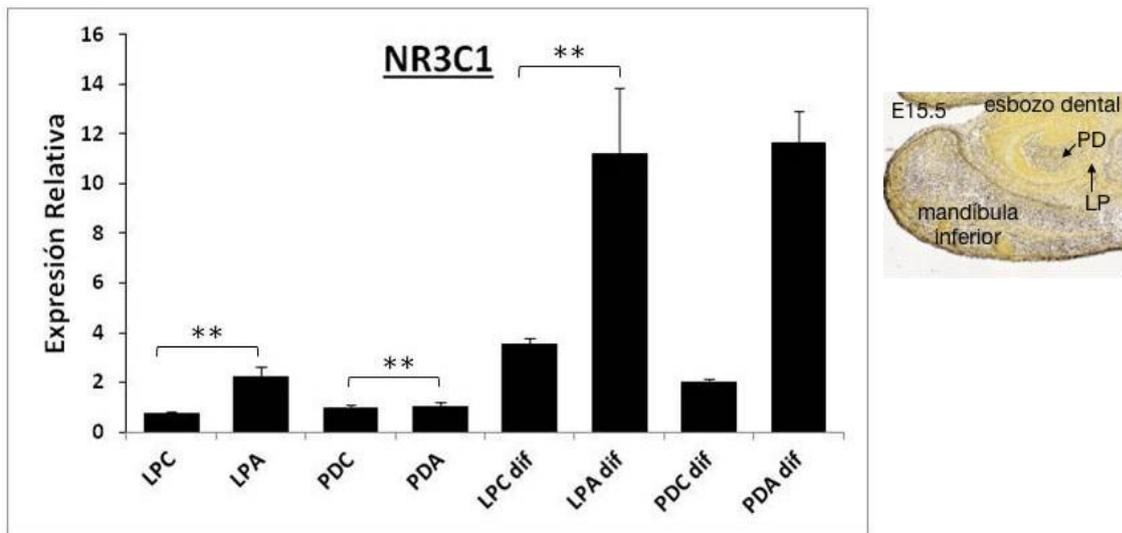


Figura 50: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de NR3C1 en las células en cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). La significación estadística de las diferencias de expresión se señala con *: (*) valor de $p < 0,05$ y $> 0,001$; (**) $p < 0,001$. Imagen histológica de la expresión de *Nr3c1* en el esbozo dental, de forma selectiva en las células de la PD. No se ha detectado expresión por hibridación in situ en las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales (derivados de la cresta neural), en embriones de ratón de E14.5 o E15,5 (Eurexpress y Imagen del Allen Brain Atlas, respectivamente).

En concordancia con las alteraciones descritas anteriormente en la expresión de los factores epigenéticos MeCP2 (Fig. 29) y SIRT1 (Fig.44), en incremento de expresión de *NR3C1* en células con TEA (Fig. 50) en relación con las células control, nos revela una alteración de los mecanismos epigenéticos.

- **CDC42.** El gen que codifica una proteína con actividad GTPasa, conocida como Cdc42, implicada en los mecanismos de organización del citoesqueleto (como e establecimiento de la polaridad celular) y en la regulación del ciclo celular (Farhan et al., 2016).

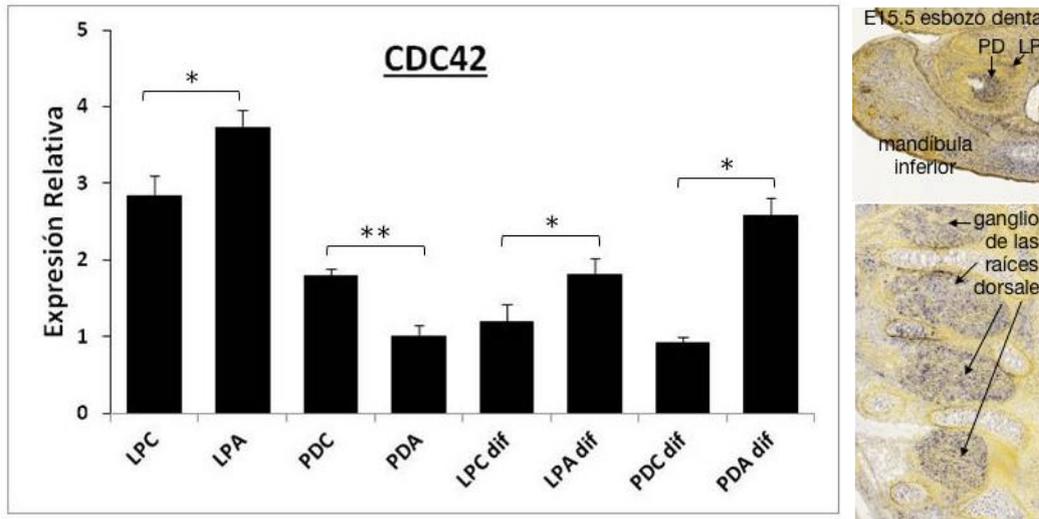


Figura 51: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de CDC42 en las células en cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). La significación estadística de las diferencias de expresión se señala con *: (*) valor de $p < 0,05$ y $> 0,001$; (**) $p < 0,001$. Imagen histológica de la expresión de *Cdc42* en el esbozo dental, de forma selectiva en las células de la PD y el LP, y en las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales (derivados de la cresta neural), en embriones de ratón de E15,5 (Imagen del Allen Brain Atlas).

Hemos encontrado (Fig. 51), en las muestras en proliferación, una diferencia significativa, con mayor expresión en LPA ($p=0,033$) que en LPC, en cambio también hemos visto una diferencia significativa con mayor expresión en PDC ($p < 0,001$). En las muestras en diferenciación encontramos mayor expresión en LPA ($0,002$) y en PDA ($p < 0,001$).

- **SHANK2.** Este gen codifica una proteína que es un miembro de la familia Shank de proteínas sinápticas, que funcionan como andamios moleculares en la densidad postsináptica (Lim et al., 1999).

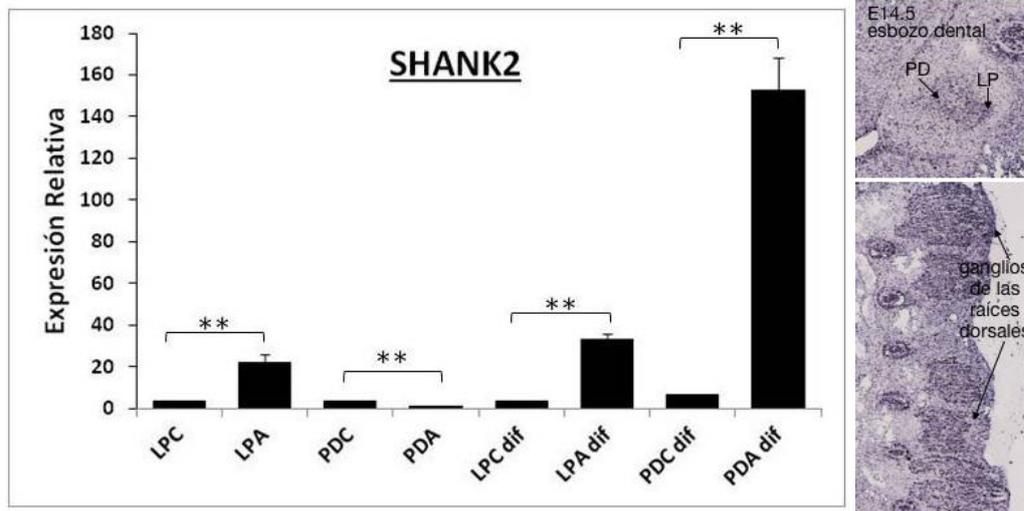


Figura 52: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de SHANK2 en las células en cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). La significación estadística de las diferencias de expresión se señala con *: (*) valor de $p < 0,05$ y $> 0,001$; (**) $p < 0,001$. Imagen histológica de la expresión de *Shank2* en el esbozo dental en las células de la PD y el LP, y en las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales (derivados de la cresta neural), en embriones de ratón de E14,5 (Eurexpress).

En las muestras en proliferación (Fig. 52), en LPA había más expresión que en LPC, con una diferencia significativa de $p < 0,001$. En PDC hay más expresión que en PDA ($p < 0,001$). Con las células en diferenciación (Fig. 52) observamos mayor expresión en LPA que en LPC ($< 0,001$) y también mayor expresión en PDA que en PDC ($< 0,001$).

Vemos como las moléculas presentes en la densidad postsináptica SHANK2 (Fig. 52) y SHANK3 (Fig. 40) presentan un patrón de expresión similar: mayor expresión en células diferenciadas (medio neurogéncico) y en células con TEA que controles.

- **SYNGAP1**. Gen que codifica una proteína de la densidad postsináptica activadora de Ras-GTPasa, que es crítica para el desarrollo de la función sináptica (Kim et al., 1998)

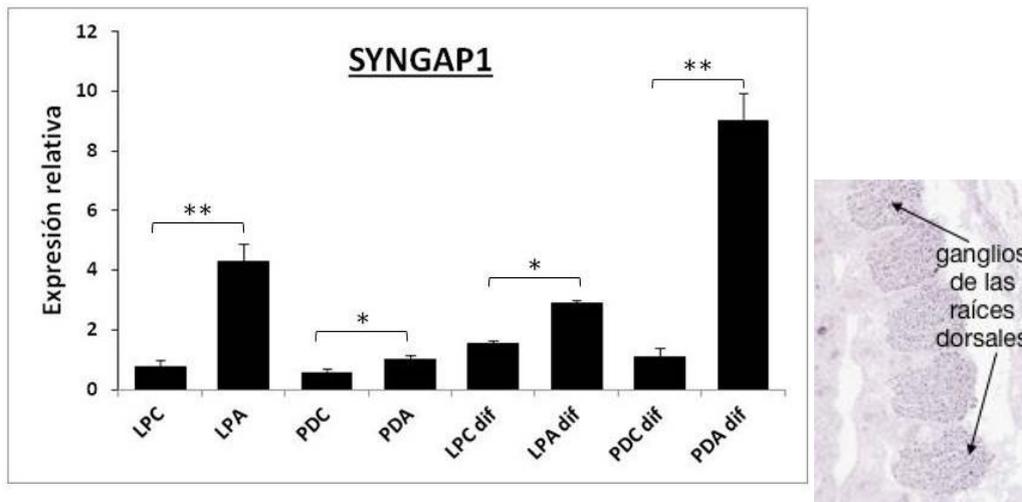
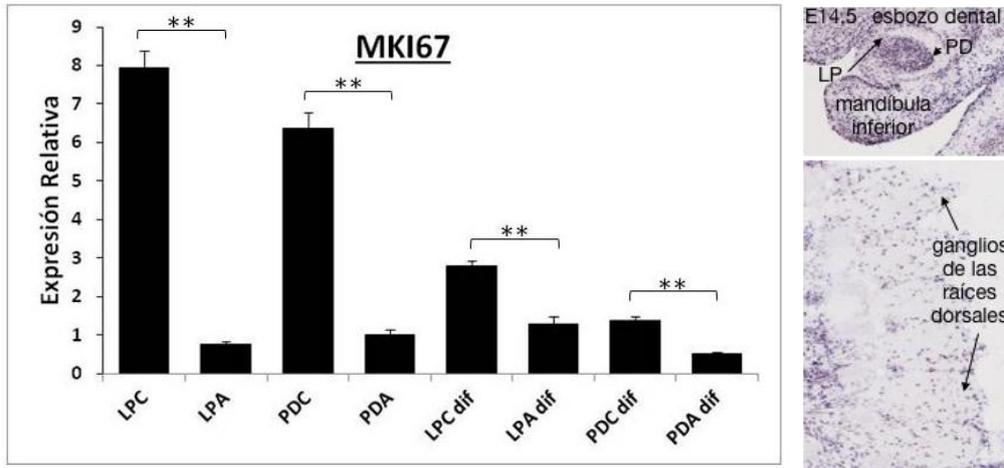


Figura 53: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de *SYNGAP1* en las células en cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). La significación estadística de las diferencias de expresión se señala con *: (*) valor de $p < 0,05$ y $> 0,001$; (**) $p < 0,001$. Imagen histológica de la expresión de *Syngap1* en las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales (derivados de la cresta neural), en embriones de ratón de E14,5 (Eurexpress). No se ha detectado expresión en el esbozo dental.

Hemos podido observar, en las muestras en proliferación, una diferencia significativa, con mayor expresión en LPA ($p < 0,001$), también hemos visto una diferencia significativa con mayor expresión en PDA ($p = 0,002$). En las muestras en diferenciación encontramos mayor expresión en LPA ($p = 0,002$) y en PDA ($p < 0,001$).

La expresión de *SYNGAP1* se expresa mas en células diferenciadas que en no diferenciadas, y mas en células con TEA que células control. De la misma manera que lo hacen otras proteínas de la densidad postsináptica: SHANK2 (Fig. 52) y SHANK3 (Fig. 40).

- **MKI67**. Este gen codifica una proteína nuclear necesaria para la proliferación celular (Cuylen et al., 2016)



LA relación de la expresión de *MKI67* con la división celular que muy patente en la expresión aumentada en los cultivos en proliferación de LPC y PDC sobre los cultivos en diferenciación ($p < 0,001$) (fig. 54). Por otro lado, el déficit en su expresión en células con TEA en relación con las células control ($p < 0,001$) (fig. 54), puede indicar una alteración en la proliferación celular.

- **RELN.** Gen que codifica una proteína crucial para la regulación de los procesos de migración, posicionamiento y polaridad neuronal en el desarrollo del cerebro. Además de este importante papel en el desarrollo temprano, la reelina continúa funcionando en el cerebro adulto modulando la plasticidad sináptica (Kon et al., 2017).

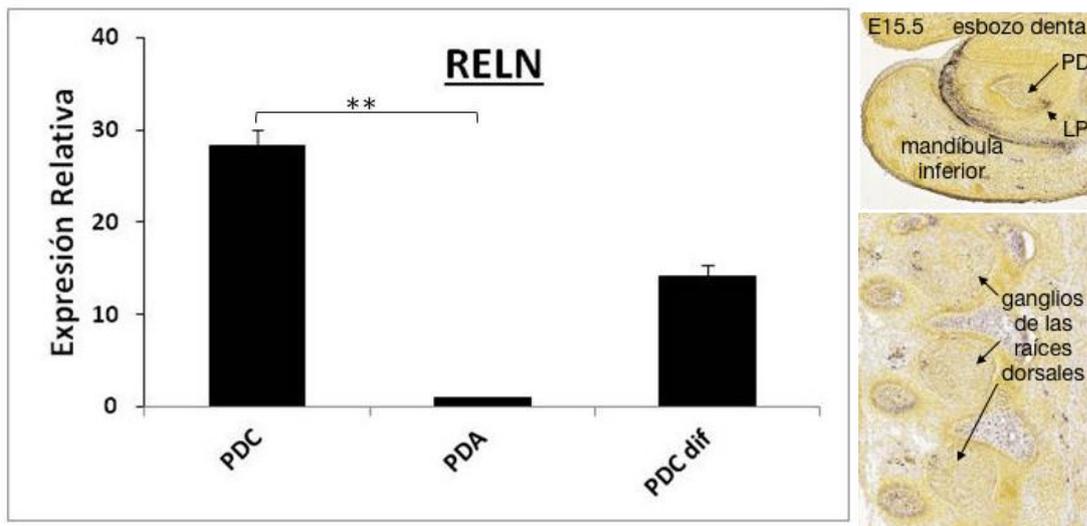


Figura 55: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de RELN en las células en cultivo. Solo pudimos determinar la expresión en cultivos en proliferación de PDC y PDA; así como los de FDC en diferenciación. La significación estadística de las diferencias de expresión se señala con *: (*) valor de $p < 0,05$ y $> 0,001$; (**) $p < 0,001$. Imagen histológica de la expresión de *Reln* en el esbozo dental, de forma selectiva en las células del LP, y escasa en las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales (derivados de la cresta neural), en embriones de ratón de E15,5 (Imagen del Allen Brain Atlas).

En este caso, solo pudimos detectar una diferencia significativa en la expresión de RELN entre PDC y PDA en proliferación, con mayor expresión en PDC ($< 0,001$).

- **MiRNA-132.** Funcionan para regular los niveles de expresión de otros genes por varios mecanismos, generalmente reduciendo los niveles de proteína a través de la escisión de mRNA o la represión de su traducción. Se han descrito varios objetivos para miR-132, incluidos los mediadores del desarrollo neurológico, la transmisión sináptica, la inflamación y la angiogénesis (Vo et al., 2005).

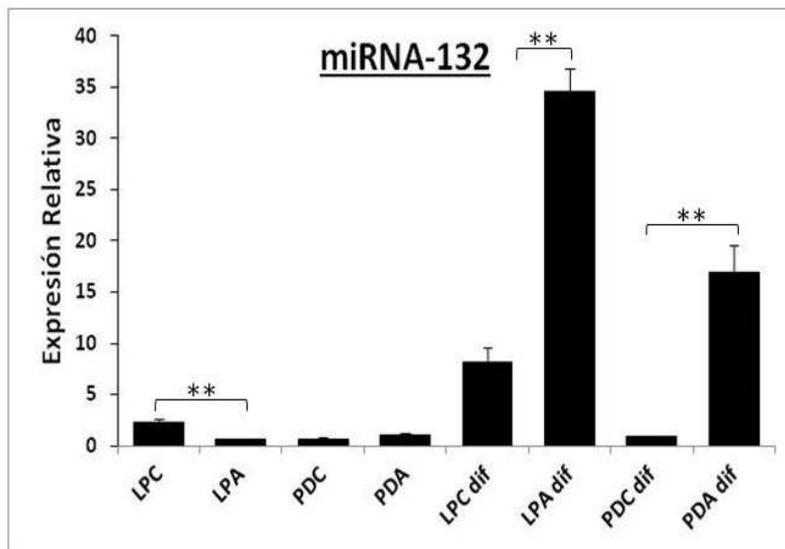


Figura 56: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de *miRNA-132* en las células en cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). La significación estadística de las diferencias de expresión se señala con *: (*) valor de $p < 0,05$ y $> 0,001$; (**) $p < 0,001$. La expresión de este miRNA no se ha explorado en ninguno de los registros de expresión consultados (Eurexpress y Allen Brain Atlas).

Observamos, en las células en proliferación, mayor expresión en LPC que en LPA ($p < 0,001$), entre las muestras PDC y PDA no existen diferencias significativas (Fig. 56). En las muestras en diferenciación, había una diferencia significativa de $p < 0,001$ con mayor expresión tanto en LPA como en PDA (Fig. 56).

- **CC2D1A.** Codifica una proteína que regula múltiples vías de señalización intracelulares. Mutaciones autosómicas recesivas en el gen CC2D1A causan fenotipos cognitivos que incluyen discapacidad intelectual, TEA, así como convulsiones (Mazzini et al., 2014).

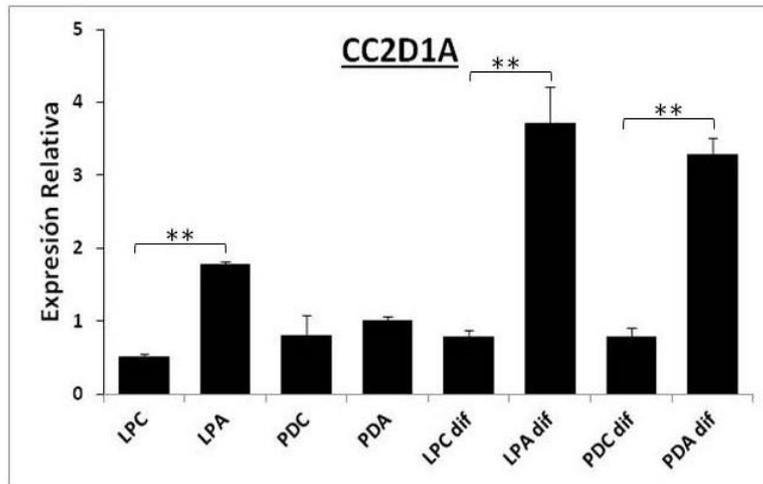


Figura 57: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de CC2D1A en las células en cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). La significación estadística de las diferencias de expresión se señala con *: (*) valor de $p < 0,05$ y $> 0,001$; (**) $p < 0,001$. La expresión de CC2D1A no se ha explorado en ninguno de los registros de expresión consultados (Eurexpress y Allen Brain Atlas).

En las células en proliferación, detectamos mayor expresión en LPA que en LPC ($p < 0,001$), entre las muestras PDC y PDA no existen diferencias significativas (Fig. 57). En las muestras en diferenciación, había una diferencia significativa de $p < 0,001$ con mayor expresión tanto en LPA como en PDA (Fig. 57).

- **MBD3.** Gen que codifica una proteína con actividad sobre la remodelación del nucleosoma, que mantiene la pluripotencia de las células madre embrionarias reprimiendo la expresión de un subconjunto de genes relacionados con el desarrollo y la organogénesis (Hirasaki et al., 2018)

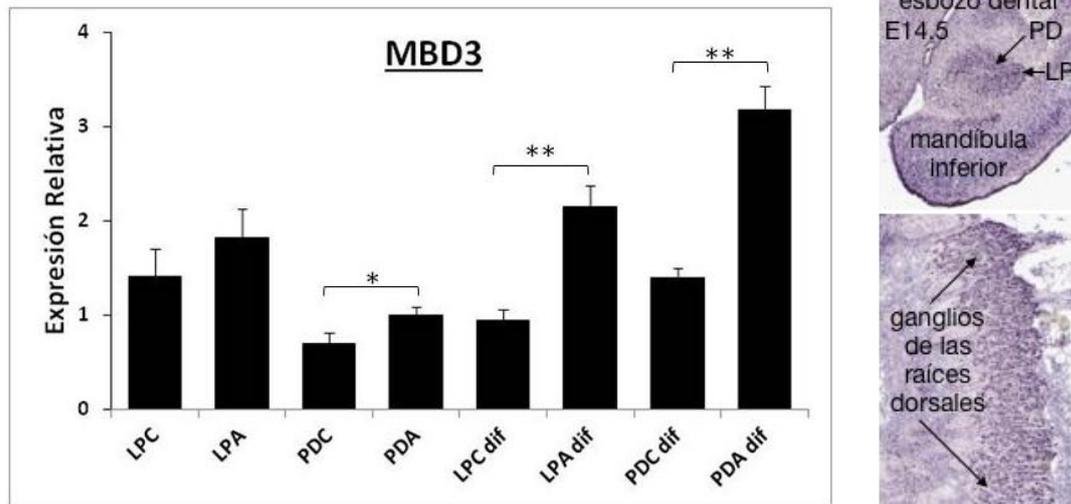


Figura 58: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de *MBD3* en las células en cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). La significación estadística de las diferencias de expresión se señala con *: (*) valor de $p < 0,05$ y $> 0,001$; (**) $p < 0,001$. Imagen histológica de la expresión de *Mbd3* en el esbozo dental, de forma selectiva en las células del LP, y escasa en las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales (derivados de la cresta neural), en embriones de ratón de E14,5 (Eurexpress).

Hemos encontrado (Fig. 58), en las muestras en proliferación, que entre LPC y LPA existen diferencias significativas, en PDA si existe mayor expresión que en PDC ($p=0,027$). En las muestras en diferenciación encontramos mayor expresión en LPA ($< 0,001$) y en PDA ($< 0,001$).

- **NTRK2.** Gen que codifica el receptor quinasa B de la tropomiosina (TrkB), receptor de los factores de crecimiento BDNF/ NT-3 (Malenka et al., 2009).

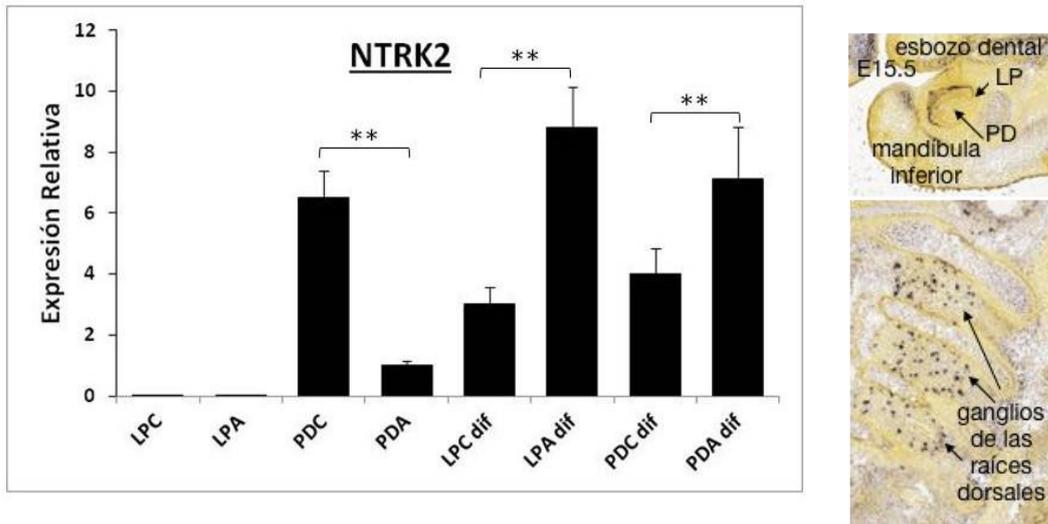


Figura 59: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de *NTRK2* en las células en cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). La significación estadística de las diferencias de expresión se señala con *: (*) valor de $p < 0,05$ y $> 0,001$; (**) $p < 0,001$. Imagen histológica de la expresión de *Ntrk2* en el esbozo dental, de forma selectiva en las células del LP, y intensa en neuronas de los ganglios de las raíces dorsales (derivados de la cresta neural), en embriones de ratón de E15,5 (Allen Brain Atlas).

En las muestras en proliferación hemos detectado que entre LPC y LPA no existen diferencias significativas, en PD si existe mayor expresión que en PDA que en PDC ($p < 0,001$) (Fig. 59). En las muestras en diferenciación encontramos mayor expresión en LPA ($p < 0,001$) y en PDA ($p < 0,001$) (Fig. 59).

- **RORA.** Gen que codifica una proteína que es esencial para el desarrollo de cerebelo a través de la regulación directa de los genes expresados en las células de Purkinje (Sidman et al., 1962).

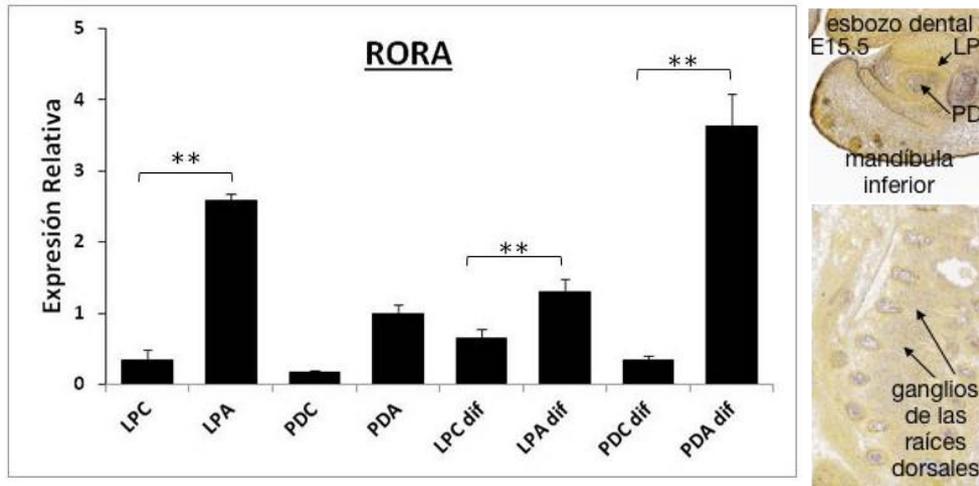


Figura 60: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de RORA en las células en cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). La significación estadística de las diferencias de expresión se señala con *: (*) valor de $p < 0,05$ y $> 0,001$; (**) $p < 0,001$. Imagen histológica de la expresión de Rora en el esbozo dental, de forma selectiva en las células del LP, y muy débil en neuronas de los ganglios de las raíces dorsales (derivados de la cresta neural), en embriones de ratón de E15,5 (Allen Brain Atlas).

Observamos, en las células en proliferación, mayor expresión en LPA que en LPC ($p < 0,001$), entre las muestras PDC y PDA no existen diferencias significativas (Fig. 60). En las muestras en diferenciación, había una diferencia significativa de $p < 0,001$ con mayor expresión tanto en LPA como en PDA (Fig. 60).

- **RHOA**. Codifica una proteína asocia con la regulación del citoesqueleto, principalmente la formación de fibras de estrés de actina y la contractilidad de la actomiosina, también se considera como un factor regulador de la transcripción, la progresión del ciclo celular y la transformación celular (Kiss et al., 1997).

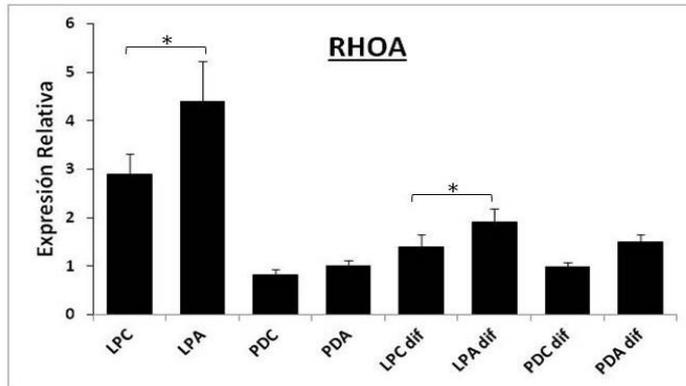


Figura 61: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de *RHOA* en las células en cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). La significación estadística de las diferencias de expresión se señala con *: (*) valor de $p < 0,05$ y $> 0,001$; (**) $p < 0,001$. La expresión de *Rhoa* no se ha explorado en ninguno de los registros de expresión consultados (Eurexpress y Allen Brain Atlas).

Hemos encontrado, en las muestras en proliferación, que existe mayor expresión en LPA que en LPC ($p=0,012$) (Fig. 61), pero entre PDC y PDA no existen diferencias significativas. En las muestras en diferenciación encontramos mayor expresión en LPA ($p_0,048$) y entre PDC y PDA no existen diferencias significativas (Fig. 61).

- **BDNF.** Gen que codifica el factor neurotrófico derivado de cerebro. Actúa sobre ciertas neuronas del sistema nervioso, ayuda a mantener la supervivencia de las neuronas existentes y fomenta el crecimiento y la diferenciación de nuevas neuronas y sinapsis (Acheson et al., 1995).

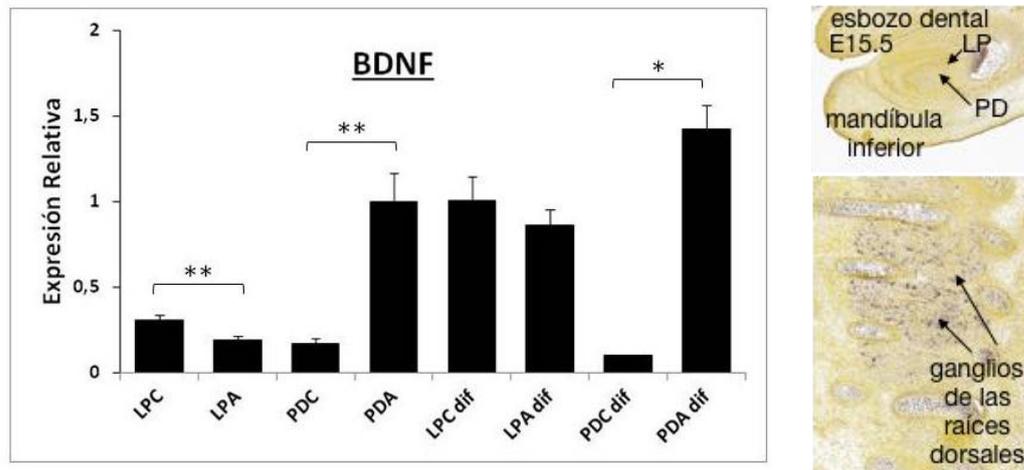


Figura 62: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de *BDNF* en las células en cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). La significación estadística de las diferencias de expresión se señala con *: (*) valor de $p < 0,05$ y $> 0,001$; (**) $p < 0,001$. Imagen histológica de la escasa expresión de *Bdnf* en el esbozo dental, pero intensa en neuronas de los ganglios de las raíces dorsales (derivados de la cresta neural), en embriones de ratón de E15,5 (Allen Brain Atlas).

Observamos, en las células en proliferación, mayor expresión en LPC que en LPA ($p < 0,001$), entre las muestras PDC y PDA, existe mayor expresión en PDA que en PDC ($p < 0,001$) (Fig. 62). En las muestras en diferenciación, no existen diferencias significativas entre LPC y LPA, pero sí había una diferencia significativa de $p < 0,017$ con mayor expresión tanto en PDA que en PDC (Fig. 62).

- **RAC1**. Codifica la proteína Rac1, que es una proteína G de señalización de la familia familia Rho GTPasa. Los miembros de esta superfamilia parecen regular una gran variedad de eventos celulares, incluido el control de la translocación de GLUT4 a la captación de glucosa, crecimiento celular, reorganización del citoesqueleto y la activación de las proteínas quinasas (Ueda et al., 2010)

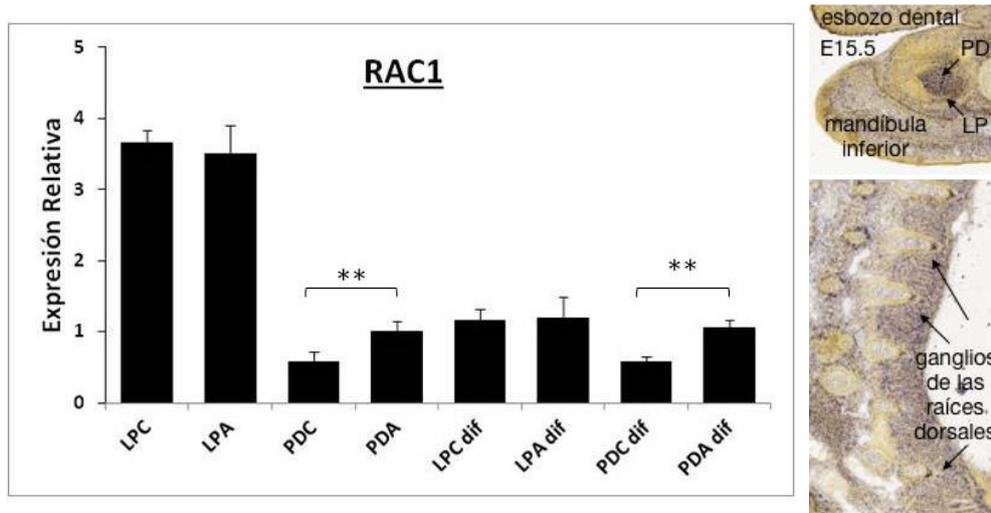


Figura 63: Histograma que representa los resultados obtenidos tras la cuantificación de la expresión (mRNA) de *RAC1* en las células en cultivo. Los cultivos en proliferación (4 primeras columnas) y los cultivos en diferenciación (4 últimas columnas). La significación estadística de las diferencias de expresión se señala con *: (*) valor de $p < 0,05$ y $> 0,001$; (**) $p < 0,001$. Imagen histológica de la intensa expresión de *Rac1* en el esbozo dental, de forma selectiva en las células del PD y del LP; así como la expresión en neuronas de los ganglios de las raíces dorsales (derivados de la cresta neural), en embriones de ratón de E15,5 (Allen Brain Atlas).

Hemos podido detectar (Fig. 63), en las muestras en proliferación, que entre LPC y LPA no existen diferencias significativas, en PDA si existe mayor expresión que en PDC ($p < 0,001$). En las muestras en diferenciación no encontramos diferencias entre LPC y LPA, y existe mayor expresión en PDA que en PDC ($p < 0,001$).

9. Estudio de expresión de proteínas sinápticas en neuronas en cultivo derivadas de LPC y LPA.

Hemos detectado la expresión de moléculas relacionadas con la sinapsis en células neurales derivadas de LP (Fig. 21). Además la expresión de la proteína sináptica SYP durante la maduración neuronal de las células de LP en cultivo ha mostrado un patrón de distribución característico en relación por los estadios madurativos (Fig. 22), lo que sugiere la aparición en el cultivo de contactos sinápticos molecularmente maduros. Por lo tanto, el estudio comparativo del patrón de proteínas sinápticas en neuronas derivadas de LPC y LPA puede identificar fenotipos de TEA relacionados con la generación y distribución sináptica en nuestro modelo celular.

- Expresión de SYP (Fig. 64): En las neuronas derivadas de LPC la proteína SYP se detecta distribuida por el cuerpo celular y las prolongaciones, con un patrón puntiforme (Fig. 64A-D). Se aprecia un acúmulo perinuclear con intensa inmunoreactividad de aspecto esférico (Fig. 64B, C; flecha), con patrón de distribución de predominio periférico e incremento progresivo de inmunofluorescencia hacia los extremos de las neuritas. En el caso de neuronas derivadas de LPA (Fig...E-H)), se aprecia un patrón homogéneamente difuso, con mayor intensidad en el soma, donde se sigue observando el acúmulo perinuclear esférico de expresión (Fig. 64 E, F; flecha). En las neuritas hay una distribución irregular y sin incremento hacia los extremos.

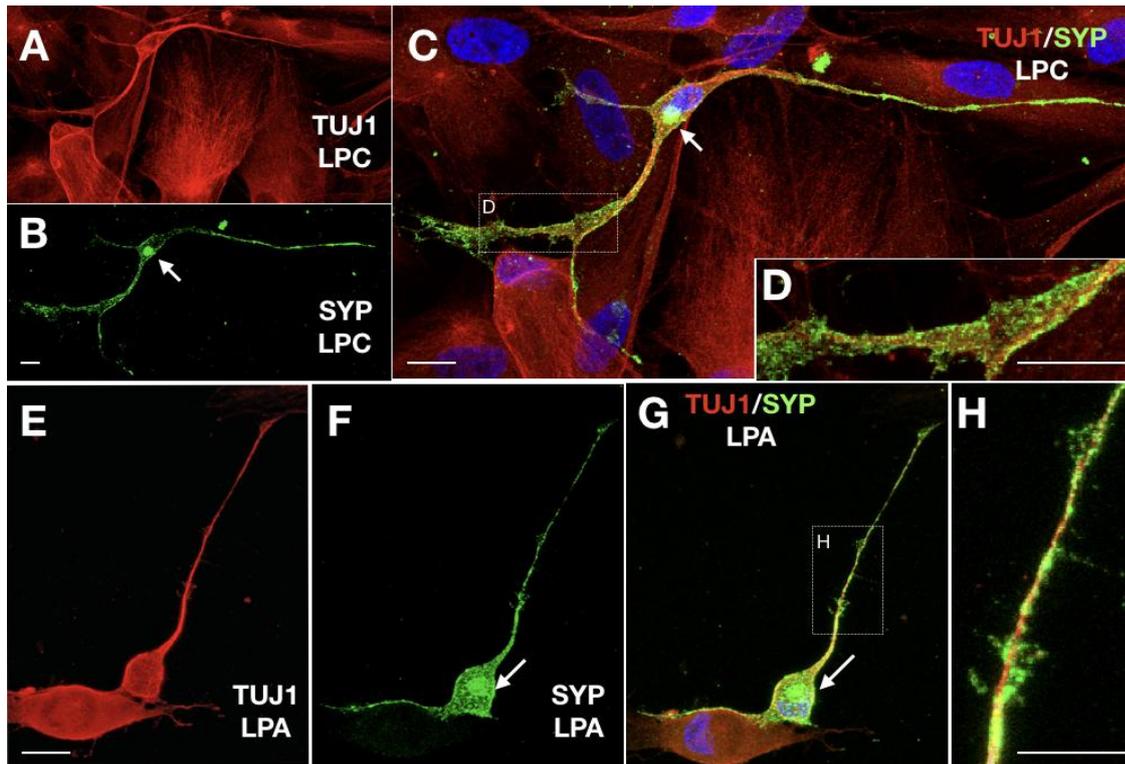


Figura 64: Expresión de SYP en neuronas derivadas de LPC y LPA. A-D) En neuronas de LPC la expresión de SYP se localiza en el cuerpo celular y las neuritas. Aparece un acumulo inmunopositivo, perinuclear y esférico (flecha en B,C). La expresión predomina en la región submembranaria de la células y las neuritas, con una acumulación progresiva hacia el extremo de estas (C,D). E-H) En LPA el patrón de expresión es homogéneo y difuso en el cuerpo celular, con la presencia del cúmulo perinuclear (flecha en F,G). En las neuritas hay una distribución irregular y sin acumulo distal claro (G,H). Barra de escala: 25 μ m.

Durante la diferenciación de las células de LP hemos podido observar el patrón de distribución de la SYP (Fig. 22). Hemos estudiado el patrón de maduración de la expresión de SYP en neuronas con TEA (Fig. 65): observamos que la proteína se acumula en el soma de forma intensa desde las fases de células esférica y esfera con pocas prolongaciones, sin distribuirse por las neuritas (Fig. 64 A, B). En estadios madurativos posteriores la distribución de SYP hacia las neuritas se hace de forma irregular (Fig. 64 C, D).

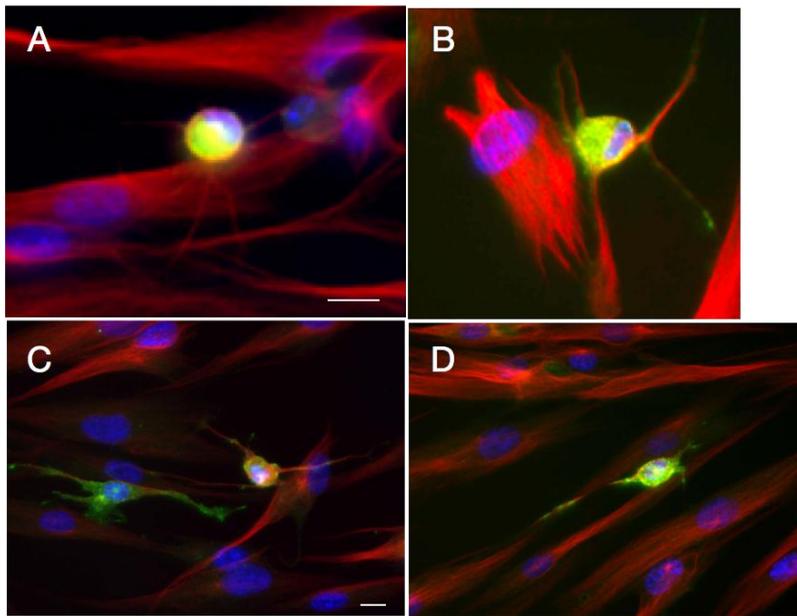


Figura 65: Desarrollo de la expresión de SYP en las neuronas derivadas de LPA. A, B) En las fases de células esféricas y con pocas prolongaciones se observa como la proteína se acumula de forma intensa en el cuerpo celular, sin parecer expresión en las neuritas. C, D) Con el desarrollo madurativo de las neuronas, la proteína comienza a detectar en las neuritas de forma dispersa. Barra de escala: 25 μ m.

- Expresión de SYN (Fig. 66): Como hemos descrito antes, en las neuronas derivadas de LPC la proteína SYP se detecta localizada en forma de acúmulos granulares en relación con las ramificaciones terminales (flecha) y sobre el cuerpo (punta de flecha) (Fig. 66 A-C). En el caso de neuronas derivadas de LPA (Fig. 66 D-F), se aprecia un patrón más difuso de aspecto granular disperso en las terminales neuríticas (flecha), sin que aparezca expresión en el cuerpo neuronal.

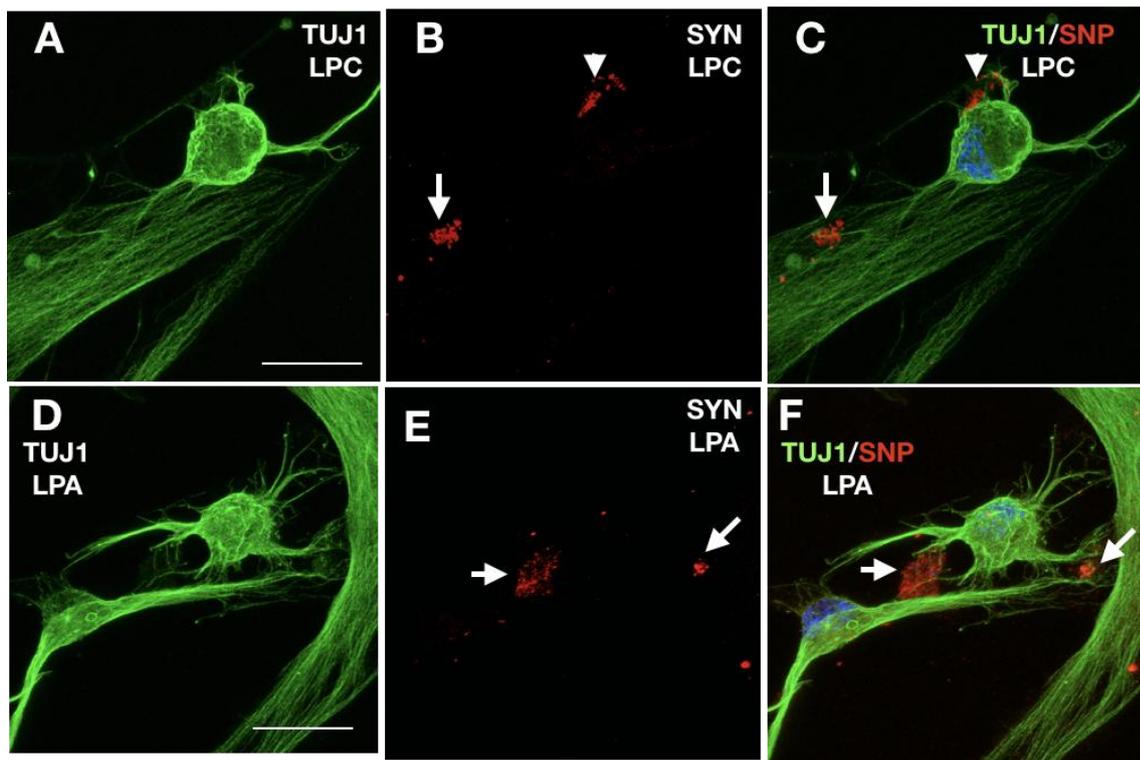


Figura 66: Expresión de SYN en neuronas derivadas de LPC y LPA. A-C) En neuronas de LPC la expresión de SYN se localiza en acúmulos granulares en relación con las ramificaciones terminales (flecha) y sobre el cuerpo (punta de flecha). D-F) En neuronas derivadas de LPA la SYN muestra un patrón mas difuso de aspecto granular disperso en las terminales neuríticas (flecha). Barra de escala: 25 μ m.

- Expresión de Cx43 (Fig. 67): En las neuronas derivadas de LPC la proteína Cx43 se detecta localizada en forma de pequeños acúmulos distribuidos de forma precisa en los contactos entre neuritas celulares (flechas en Fig. 67 B-E), sin observarse inmunoreactividad en la superficie del cuerpo neuronal o sobre las superficies libres de las prolongaciones (Fig. 67 A-E). Se observa un pequeño acumulo denso dentro del núcleo celular. En el caso de neuronas derivadas de LPA (Fig. 67 F-I), se aprecia un patrón mas difuso de los puntos inmunoreactivos, sobre el soma y neuritas, sin tener relación con contactos celulares (flechas en Fig. 67 I). Se observa también el pequeño acumulo denso dentro del núcleo celular. Por lo tanto, además de una mayor ramificación neurítica, las neuronas derivadas de LPA presentan un patrón alterado de la localización de Cx43, y posiblemente de la formación de sinapsis eléctricas mediadas por uniones tipo gap, con un incremento de la expresión y una distribución difusa.

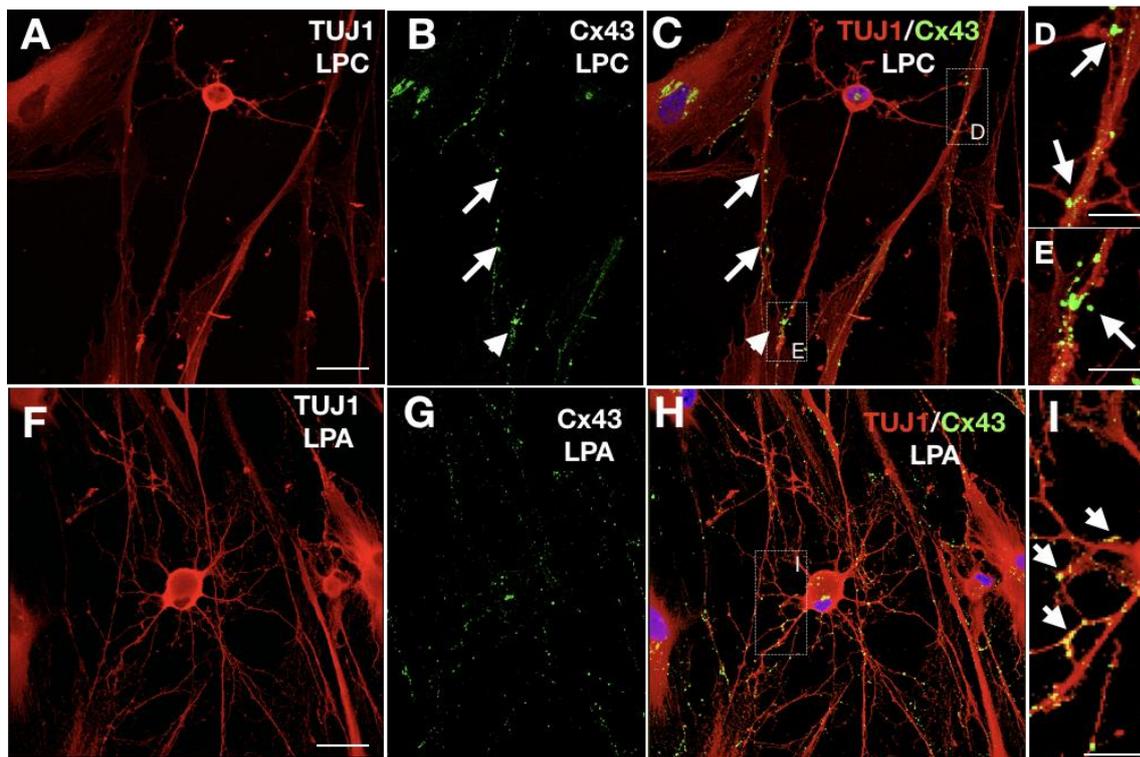


Figura 67: Expresión de Cx43 en neuronas derivadas de LPC y LPA. A-E) En neuronas de LPC la expresión de Vx43 se localiza en acúmulos granulares discreto en relación con el contacto entre las ramificaciones terminales (flechas en B-E), sin observarse expresión en el resto de las superficies celulares. Se observa también un pequeño acumulo denso dentro del núcleo celular. F-I) En neuronas derivadas de LPA la expresión de Cx43 muestra un patrón mas disperso en las terminales neuríticas y cuerpo neuronal, sin relación con contactos celulares (flecha en I). Barra de escala: 25 μm en A,B,C,F,G,H y 10 μm en D,E,I.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Importancia de desarrollar un modelo celular de TEA

El avance en el conocimiento en biomedicina se ha fundamentado en una aproximación reduccionista al estudio científico de las enfermedades y sus causas. Este reduccionismo se basa en descomponer los procesos complejos de la biología en elementos simples que pueden ser un objeto experimental y que permiten ser abordados con pretensión de entenderlos mecanicistamente. Esta aproximación reduccionista sigue siendo parcialmente válida para abordar el estudio de los mecanismos primarios que subyacen al desarrollo de enfermedades complejas en humanos. Por lo tanto, parece necesario disponer de modelos experimentales (celulares y animales) en los que se reproduzcan de una manera adecuada procesos patogénicos relevantes de la enfermedad que queremos estudiar. Cuando las causas de una enfermedad son bien conocidas, los modelos de la enfermedad son factibles y caracterizados por reproducir el patrón patogénico, aunque a veces las manifestaciones clínicas esperables no aparecen o lo hacen parcialmente. Un ejemplo paradigmático con las enfermedades por mutación de un gen, donde modelos animales o celulares pueden obtenerse en mutantes naturales o experimentales de este gen. El creciente descubrimiento de genes relacionados con TEA debería suponer un poderoso instrumento para descubrir la convergencia entre las rutas moleculares y los procesos celulares en el TEA, así como para identificar dianas terapéuticas relevantes.

Como hemos visto el TEA es un proceso con un importante componente genético (que se ha llegado a establecer entre un 50% y un 90% (Chahrour et al., 2017, Chaste et al., 2017; Huguet y Bourgeron, 2016). La abundancia y la pleiotropía funcional de los genes que hasta ahora se han relacionado con el TEA (Fuxe et al., 2018; Weiner et al., 2017), junto con la presencia de manifestaciones clínicas exclusivamente humanas, como las alteraciones en el desarrollo del lenguaje y de capacidades socio-cognitivas (Mundy et al., 2018), hacen que el estudio del TEA en modelos animales, haya sido poco exitoso a la hora de trasladar los resultados obtenidos en avances clínicos significativos. Sin embargo, estos estudios en modelos animales han proporcionado importantes datos sobre la implicación de procesos celulares, y rutas moleculares que los regulan (Chahrour et al., 2017). Por otro parte, la identificación de genes relacionados con el TEA no sindrómico proviene de dos fuentes: estudios genéticos en pacientes y aparición de síntomas de TEA en mutaciones en animales de experimentación. En ambos casos los modelos animales relacionados con ellas reproducen de forma muy parcial algunos síntomas de TEA, lo que hace muy difícil diseñar experimentos demostrativos de la relación directa de la alteración genética con los síntomas de TEA. La revisión realizada por Ricceri et al., (2017) describe cómo la mayoría de mecanismos que hay hoy en día se relacionan con el desarrollo de TEA tienen un modelo de ratón representativo; aunque solo en casos de TEA asociado a procesos congénitos del neurodesarrollo, como Síndrome de X frágil y la esclerosis tuberosa, han podido reproducir modelos molecularmente apropiados por conocer los genes cuyas mutaciones las producen (genes *FMR1* y *TSC1* y *2*, respectivamente).

Parece evidente que han de buscarse modelos mas apropiados para abordar de una forma mas eficiente para su translación clínica el estudio de los procesos biológicos que subyacen a este proceso. Un procedimiento que esta recibiendo cada vez más atención es el derivar células neuronales a partir de tejidos de los enfermos con TEA. Este modelo asegura que los patrones genéticos que subyacen al trastorno conductual están presentes en el modelo. Nos parece una aproximación adecuada en tanto que es un modelo humano, en el pueden ser estudiados procesos autónomos celulares (dependientes exclusivamente de la función celular). Es estos procesos podrían incluir el desarrollo de estructuras de interacción intercelulares, como son los contactos celulares y sinapsis. Es evidente que este modelo podrá abordar de una forma muy parcial el desarrollo y función circuitos definidos anatómicamente y de los fenotipos que implican poblaciones neuronas en regiones específicas del cerebro, cómo es el caso de la actividad en las columnas de la corteza cerebral

y las conexiones cortico-corticales (Casanova et al., 2013; Geschwind and Levitt, 2007, Golden et al., 2018; Hustler y Casanova, 2016; Palmen et al., 2004; Saillour y Chelly, 2017; Zeng et al., 2017). Una clara ventaja del modelo celular humano es que puede ser de gran utilidad para evidenciar los cambios celulares y moleculares originados por los factores ambientales actuando sobre las neuronas con TEA. La importancia de esta capacidad de testar el efecto de factores ambientales adquiere mayor relevancia cuando recordamos el importante papel de estos factores en el desarrollo de TEA no sindrómico (Chahrour et al., 2017, Chaste et al., 2017; Huguet y Bourgeron, 2016); entre ellos, y de gran interés actual podemos nombrar la importancia de desequilibrios en el estado inmunitario e inflamatorio (Malkova y Hsiao, 2017; Ohja et al., 2018).

El modelo celular que más se ha prodigado recientemente, y del que más información se está obteniendo acerca de la biología celular del TEA es la obtención de neuronas a partir de células pluripotentes inducidas (iPCs). Estas células se originan de fibroblastos de una persona que tiene diagnóstico de TEA a las que se les induce "in vitro" la sobre expresión de genes del desarrollo, revirtiendo su fenotipo diferenciado hacia un fenotipo embrionario con potencialidad de originar la mayoría de células del organismo, entre ellas, neuronas (Takahashi y Yamanaka, 2006; Yu et al., 2007). Múltiples trabajos han demostrado que las neuronas inducidas de las iPCs derivadas de pacientes con TEA, y otras enfermedades (Johnstone et al., 2018), reproducen "in vitro" fenotipos celulares identificados en muestras tisulares y celulares de modelos animales y pacientes (Deshapande et al., 2017; Kathuria et al., 2018; Kelleher and Bear, 2008; Muotri, 2017).

Si bien, como hemos visto, las neuronas derivadas de iPSc muestran fenotipos celulares característicos del TEA, entre ellos los relativos a las alteraciones sinápticas, existen datos que demuestran características diferenciales con neuronas derivadas de progenitores neurales (Kathuria et al., 2018). Esto muestra que los procesos sufridos por las células inducidas in vitro a convertirse en progenitores pluripotentes, o que incluso la diferenciación in vitro a neuronas, puede determinar la aparición de características peculiares en estas neuronas en relación con las neuronas derivadas de células madre neurales. Incluso, se han observado diferencias muy significativas en la caracterización molecular de neuronas procedentes de iPCs obtenidas de fibroblastos o de células de pulpa dental (Chen et al., 2013). Ante estos datos hemos optado por el desarrollo y la caracterización experimental de neuronas derivadas de cultivo primario de ligamento periodontal y de pulpa dental, por

ser células derivadas de la cresta neural, y por lo tanto con potencial natural a general neuronas y, además, de fácil obtención a partir de dientes de leche y extracciones dentales.

Los estudios sobre la neurobiología del TEA están coincidiendo en señalar que el fenotipo conductual característico del TEA se puede explicar por alteraciones en las conexiones neurales. Horwitz et al., (1988) ya propuso que el autismo era consecuencia de un estado de desconexión entre regiones de la corteza cerebral y entre la corteza y regiones subcorticales, en concordancia con la idea de que las alteraciones del comportamiento eran derivadas de un estado de desconexión entre circuitos cerebrales (Geschwind, 1965). Por lo tanto, cada vez esta más aceptado que el TEA es un trastorno que fundamentalmente es causado por alteraciones en las sinapsis, calcificándose como una sinaptopatía (Baig et al., 2017; Goeliner y Aberle, 2011; Ismail et al., 2016; Verpelli et al., 2013; Toro et al., 2010).

Si bien hay datos sobre modificaciones complejas en los patrones de distribución de circuitos y conexiones entre regiones cerebrales, como exponentes de un síndrome de desconexión (Coleman, 2005; Geschwind, 1965), son alteraciones de la arquitectura y la función sináptica, las que se han descrito con mayor frecuencia y detalle en la fisiopatología del TEA.

2. Carácter mesenquimal y progenitor de cresta neural de las células de ligamento periodontal y de la pulpa dental

En estudios previos de nuestro laboratorio hemos demostrado que las células obtenidas con el protocolo de selección de células mesénquimas "in vitro" a partir de ligamento periodontal (LP), muestran los marcadores característicos de células progenitoras de cresta neural (Bueno et al., 2013). Además de determinar su capacidad de producir células con fenotipo morfológico neuronal "in viyro", hemos explorado su diferenciación dentro del tejido cerebral en experimental de xenotrasplantes en ratones inmunodeficientes.

Las células mesénquimales derivadas de la pulpa dental (PD) han sido también caracterizadas molecularmente como células progenitoras de la cresta neural (Thesleff, 2003; Janebodín et al, 2011).

En nuestro presente trabajo hemos reproducido parcialmente la caracterización de las células derivadas de LP y de PD, para demostrar que nuestras condiciones de trabajo son adecuadas para reproducir trabajos previos y afrontar con seguridad los estudios comparativos y los protocolos de diferenciación neural de células derivadas de LP y PD.

Nuestro trabajo pretende en su primer objetivo desarrollar un estudio comparativo de las características de células madre mesenquimales (MSCs) derivadas de LP y PD, obtenidas de dientes procedentes de personas diagnosticadas de TEA y controles. Pero al observar la homogeneidad en el fenotipo morfológico en cultivos en proliferación de LP y PD, y por razones de economía de tiempo, hemos estudiado los procesos celulares de forma exhaustiva solo en células derivadas de LP.

Como resultado del primer objetivo de nuestro trabajo, hemos demostrado el carácter de células madre mesenquimales de las células de LP, derivadas de dientes de personas con diagnóstico de TEA como de dientes control. Hemos evidenciado la presencia de Nestina, como marcador de células progenitoras indiferenciadas; así como las proteínas de superficie CD44 y CD90, como marcadores de células mesenquimales. La expresión de NG2 y Tuj1 se ha determinado como marcadores de progenitores neurales y de cresta neural. El estudio se ha completado, siguiendo la propuesta de Bueno et al. (2012) con el análisis transcriptómico y proteómico más detallado, determinando la expresión de *Slug*, *Twist*, *Oct3/4*, *Sox9* y *Sox10*. Por lo tanto, el resultado original obtenido en el presente trabajo demuestra que las células de LP derivado de dientes con TEA, expresan en fase proliferativa: 1) marcadores de células madre: *Oct3/4*, *Nestina* y *Sox2*; y 2) marcadores de células de la cresta neural: *Slug*, *Twist*, *Sox10* and *Sox9*, así como *Fgf8b* y sus receptores (*p75^{NTR}*, *FGFR1-4*). Por lo tanto, validan la propuesta de usar células derivadas de LP como modelo de células progenitoras de cresta neural, fácil de obtener de forma no invasiva, para estudiar el TEA.

En cuanto a las diferencias encontradas en la expresión de los genes estudiados y sus proteínas. Venos que en general no hay muchas diferencias entre LP y PD con TEA y controles, si bien predomina de forma generalizada una mayor presencia en células con TEA de estos genes, excepto la *NESTINA* y *MIKIA67*, que como marcador de células progenitoras indiferenciadas y actividad proliferativa esta más expresado donde hay mayor grado de inmadurez celular. Por lo tanto las células mesenquimales de LP y PD control en cultivo conservan mayor grado de inmadurez molecular que las células con TEA.

Como conclusión del primer y segundo objetivos hemos demostrado que las alteraciones genéticas y ambientales que subyacen al TEA, no afectan el desarrollo de las características moleculares y celulares de los progenitores de la cresta neural que van a generar el esbozo de los dientes (tanto sus derivados del ligamento como de la pulpa).

3. Diferenciación neural de las células de LP y PD

En un medio neurogénico las células de LP y PD desarrollan características morfológicas y moleculares de neuronas, con un patrón temporal heterogéneo. La potencialidad de generar neuronas esta dentro de los destinos de diferenciación normales de estas células, como células progenitoras de cresta neural. (Janebodin et al, 2011; Mitsiadis et al., 2017; Santagati y Rijli, 2003; Sperber 1989; Thesleff, 2003). Las neuronas que origina la creta neural son las neuronas del sistema nervioso periférico, que morfológicamente se caracterizan como: neuronas paseudo-monopolares de los ganglios sensoriales y neuronas de morfología poligonal de los plexos mientéricos. Para conocer cómo se produce el cambio morfológico desde célula progenitora a neurona, hemos partido de cultivos indiferenciados de células de LP por presentar de forma reproducible un patrón células homogéneo, y por nuestra experiencia en la diferenciación neural del LP control (Bueno et al., 2013; Jones et al., 2012). Hemos descrito por primera vez el cambio de morfología de las células durante el proceso de conversión en neuronas.

Las células reorganizan su citoesqueleto, yendo desde una morfología aplanada a la formación de una esfera, que ha de definir una polaridad y formar arboles de neuritas, las que después van a especializarse en dendritas y axón. Las diferentes fases de este proceso son similares a las descritas en la maduración de cultivos de progenitores neurales de ratón (Tahirovic and Bradke., 2009; Takano et al., 2015). Por lo tanto, vemos como las células progenitoras neurales del sistema nervioso periférico humanas siguen los mismos estadios morfológicos que las células progenitoras del sistema nervioso central de mamíferos. Esto sugiere que los procesos de reorganización del citoesqueleto encaminados a la polarización de las

neuronas esta conservado en todo el sistema nervioso (central y periférico) y en los mamíferos (al menos en ratones y humanos).

Las células de la PD han mostrado una mayor tendencia para generar neuronas que las derivadas de LP. Hemos visto que algunas células con morfología neuronal ya aparecían con cierta frecuencia en cultivos en proliferación, lo cual nos hace pensar que la metodología de purificación de las células mesenquiales en la PD selecciona una población heterogénea de células con distintas propiedades de diferenciación en medios basales. Phan y colaboradores (Phan et al., 2018) han publicado un estudio en el que muestran la capacidad de diferenciación de la células de PD en neuronas tras cultivo en medios neurogénicos, y describen de un proceso de cambios morfológicos que distribuyen en cuatro estadios, que aprecen similares a los que hemos descrito en las células de LP. Esta nos indica que las población de células mesenquiales derivadas de la cresta neural es heterogénea inicialmente, con capacidad de responder a la inducción neural. Además de células mesenquiales perivasculares, pueden existir células progenitoras gliales para el revestimiento miélnico de las terminaciones nerviosas de la pulpa dental (Pashley et al., 2014).

Como conclusión del tercer objetivo hemos visto que las células de LP y PD con TEA y controles, muestran características parecidas en cultivos proliferativos. Demostrando ambas la capacidad de diferenciarse en neuronas cuando se cultivan en un medio neurogénico, consistente en la incorporación de factores tróficos (EGF y FGF) a un medio de cultivo idóneo para células neurales. Hemos definido los estadios del proceso de diferenciación neuronal de las células de LP, y observado que aunque la neuronas derivadas son de sistema nervioso periférico, siguen el mismo patrón que el descrito en neuronas de cultivos primarios de progenitores neurales del cerebro.

4. Neuronas con TEA

Una vez que hemos sentado las bases experimentales que validan el modelo celular propuesto, vamos a desarrollar de forma precisa la significación de los resultados que indican la sensibilidad del modelo para detectar fenotipos relevantes en los mecanismos patogénicos del TEA. El estudio de las diferencias entre el fenotipo “in vitro” de células mesenquiales derivadas

DATOS LIGAMENTO		qPCR	WB	ICC	L / P
LPA>LPC	LPC>LPA				
MeCP2	Prol.				ND
	Dif.			ND	ND
EN2	Prol.			ND	ND
	Dif.				ND
EN1	Prol.				ND
	Dif.			ND	ND
SHANK3	Prol.		ND	ND	
	Dif.		ND		
SIRT1	Prol.	ND	ND	ND	
	Dif.		ND	ND	
CASP3	Prol.			ND	ND
	Dif.		ND		
GAD1	Prol.				ND
	Dif.				

Tabla 6: Datos de los cultivos de LP. qPCR: transcripción del gen. WB: Western blot. ICC: inmunocitoquímica. L/P: LP/PD. ND: no diferencias. Diferencias entre LP y PD

del LP y la PD en personas con TEA con respecto a personas sin diagnóstico de TEA ni otra enfermedad mental, puede desarrollarse a dos niveles de complejidad: por una lado observar los fenotipos que los cultivos presentan en cuanto a población celular; por otra parte, los fenotipos observables en las células individualmente.

En el plano de población celular, son los cultivos en diferenciación son los que

han generado mayor número de diferencias celulares y moleculares entre células control y células con TEA (Tablas 6, 7 y 8).

DATOS PULPA		qPCR	WB	ICC	L / P
LPA>LPC	LPC>LPA				
MeCP2	Prol.				ND
	Dif.			ND	ND
EN2	Prol.			ND	ND
	Dif.				ND
EN1	Prol.				ND
	Dif.			ND	ND
SHANK3	Prol.	ND	ND	ND	
	Dif.		ND	ND	
SIRT1	Prol.	ND			
	Dif.			ND	
CASP3	Prol.			ND	ND
	Dif.				
GAD1	Prol.				ND
	Dif.				

Tabla 7: Datos de los cultivos de PD. qPCR: transcripción del gen. WB: Western blot. ICC: inmunocitoquímica. L/P: LP/PD. ND: no diferencias. Diferencias entre LP y PD

Ya hemos visto que en cultivos basales (proliferación), la PD muestra mayor heterogeneidad celular, pero sin embargo presenta menores diferencias en la expresión de genes que el LP (solo 6 /22 genes sin diferencias en PD y 4/22 genes sin diferencias en LP). Por lo tanto, los fenotipos en cultivos basales son mas sensibles en LP que en PD. Las células de LPA y PDA en condiciones basales expresan mas proteína MeCP2, EN2, EN1, CASP3, GAD1 and SIRT1, y también presentan una mayor expresión de los genes *SHANK2* y *3*, *NR3C1*, *CDC42*, *SYNGAP1*, *CCDD1*, *RORA* and *ROHA*. De forma particular las células de LPC en cultivo basal presentan mayor cantidad de expresión de *BDNF* que las de LPA. Este resultado es inesperado, puesto que hemos visto como hay mas expresión de MeCP2 en LPA que en el LPC, y sabemos que MeCP2 es una proteína multifuncional que regula diversos procesos relacionados con la morfogénesis celular y desarrollo sináptico (durante el desarrollo y plasticidad neuronal), mediante un mecanismo epigenético de activación de expresión de múltiples genes, entre ellos *BDNF* (Fig. 68) (Lamonica y Zhou, 2016; Katz, 2014). Por lo tanto en las células con TEA puede estar alterado el mecanismo de activación transcripciones de MeCP2 en relación con *BDNF*. Sin embargo en cultivos de diferenciación los resultados son acordes con la relación positiva de MeCP2 y *BDNF*, así como con el posible papel patogénico de sobreexpresión de *BDNF* en TEA (Li et al., 2017; Maussion et al., 2018; Wen et al., 2017).

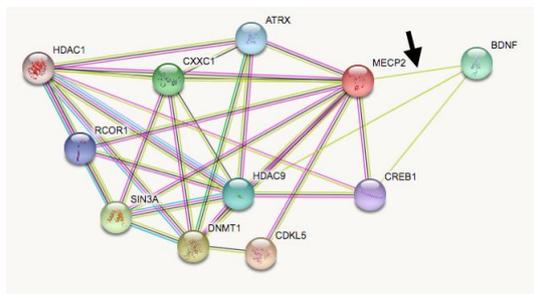


Figura 68: mapa de integración funcional entre proteínas. Se muestra que existe una relación funcional directa entre MeCP2 y BDNF (flecha). Fuente: STRING data base. <https://string-db.org/>

En cultivos de diferenciación se expresan de forma más abundante moléculas características de neuronas, por lo que consideramos que estamos en condiciones mas adecuadas para establecer correlaciones relevantes para explicar las alteraciones celulares del TEA. En el cultivo de diferenciación las diferencias en expresión de moléculas

entre células normales y con TEA son homogéneamente mayor que en cultivos en proliferación (solo 3/22 moléculas sin diferencias en células de LP y 2/22 en células de PD). Este dato nos indica que las células mesenquimales derivadas de LP y PD en cultivo de diferenciación a neuronas se homogeneizan en cuanto a fenotipo molecular. Esta homogeneización se ha visto también reflejada en el mantenimiento de los procesos estructurales que caracterizan los estadios de desarrollo descritos en el proceso de polarización celular en las células del LP (nuestro trabajo) y en la PD (menos detallado, pero ilustrado en Phan et al. (2018). Lo mas remarcable como población celular es el

incremento de casi generalizado de proteína neurales, sobretodo las relacionadas con la estructura sináptica, y la disminución de marcadores de células indiferenciadas (NESTINA) y de proliferación (MIKIA67).

En el plano de población celular, hemos de tener en cuenta que hoy en día prevalece la hipótesis de que son alteraciones estructurales de las sinapsis la

qPCR-Gen	LPC/LPA		PDC/PDA	
	Prol.	Dif.	Prol.	Dif.
Nestina			ND	
B-III-Tub	ND	ND	ND	ND
NR3C1				
CDC42				
SHANK2				
SYNGAP1				
MIK167				
RELN				
miRNA 132			ND	
CCDD1A			ND	
MBD3	ND			
NTRK2	ND			
RORA			ND	
ROHA			ND	ND
BDNF		ND		
RAC1	ND	ND		

Tabla 8: Datos de los cultivos de LP y PD. qPCR: transcripción del gen. ND: no diferencias. ■ Control>Autismo ■ A>C.

base de la fisiopatología del TEA, aceptándose que el trastorno es mayoritariamente una sinaptopatía (Bayés and Grant, 2016; Betancur et al., 2009; Toro et al., 2010). Por lo tanto, nos vamos a centrar en discutir los hallazgos observados en genes que codifican proteínas que intervienen en el desarrollo de la estructura sináptica. Si bien el resto de genes, como hemos visto, pueden estar implicados en mecanismos del metabolismo celular y/o respuesta a agentes exógenos que de forma secundaria modifiquen las funcionalidad sináptica.

La unión sináptica es una estructura compleja, estimándose que cerca de 2000 proteínas forman parte de ella (O'Rourke et al., 2012). La distribución de las proteínas sinápticas: sinptofisina (SYP) y sinapsina (SYN), como proteínas localizadas en la terminal presináptica; Conexina 43 (Cx43) como proteína relacionada con el desarrollo de sinapsis eléctricas (uniones tipo gap), así como CDC42, RHOA y SHANK2,3 como proteínas relacionadas con la densidad postsináptica.

Nuestros datos son confirmatorios en relación con las alteraciones en la expresión de proteínas SHANK en la densidad postsináptica, demostrada tanto en mutaciones de personas con TEA como en modelos animales (Betancur et al., 2009; Penzes et al., 2011; Schmeisser y Verpelli, 2016). SHANK 2 y 3, que son moléculas muy importantes en el andamiaje de la densidad postsináptica y la remodelación funcional de las espinas sinápticas (Hayashi et al., 2009).

Mutaciones en los genes *SHANK* en humanos producen el síndrome de Phelan-McDermid (síndrome de delección del cromosoma 22: del22q13.3), que esta asociado también a comportamiento similar al TEA.

Las proteínas CDC42 y RHOA presentan menor grado de diferencias aunque importantes para la estabilidad y funcionalidad de citoesqueleto postsináptico, se les ha relacionado mas con esquizofrenia y discapacidad intelectual que con TEA (Ba et al., 2013; Penzes et al., 2011).

Nuestros estudios morfológicos e inmunocitoquímicos sobre la diferenciación neuronal han producido los resultados mas originales, evidenciando una sobreproducción de neuritas en las células con TEA, lo que esta con concordancia con los datos observados a partir de modelos celulares de TEA a partir de IPs (Vaccharino et al., 2011; Deshpande et al., 2017).

El estudio preciso de la estructura y morfología celular en los cultivos de diferenciación de LPC han sido importante para describir los cambios en la forma celular y la distribución de las proteínas del citoesqueleto (filamentos de actina y microtubulos). Hemos descrito una intensa reorganización del citoesqueleto en el proceso de diferenciación neuronal a partir de progenitores de cresta neural. El estudio de los cambios de la morfología nuclear durante este proceso ha originado una interesante línea de trabajo en relación con la neurogénesis no asociada a división celular (Bueno et la., en revisión). La producción y distribución de proteínas presinápticas analizadas mediante estudios inmunohistoquímicos ha generado datos muy interesantes que revelan la existencia de importantes alteraciones en la expresión y distribución de SYP, SIN y Cx43 en neuronas con TEA.

La SYP se sintetiza en el citoplasma y se ensambla a la membrana de las vesículas sinápticas en el aparato de Golgi, lo que nos explica el acumulo de proteína observado al lado del núcleo en células control y con TEA. Existen claras diferencias en el inicio de la expresión de SYP en células control (homogénea y con una clara tendencia a acumularse en las terminales) y las células con TEA (con una distribución irregular y sin apreciarse acumulada en terminales). Por lo tanto, además de las alteraciones descritas en las proteínas postsinápticas, en las células con TEA hay una alteración en la distribución de proteínas marcadores de vesículas presinápticas y su maquinaria de secreción. Alteraciones en la expresión de *SYP* no han sido detectadas en estudios con modelos celulares derivados de células embrionarias (Yazdani et al., 2012). La falta de datos sobre la expresión de proteínas en este trabajo no permite avanzar en el estudio comparativo de los resultados. Si bien, el

fenotipo encontrado hace referencia sobretodo a la distribución de la pretina y no a la expresión del gene o su síntesis.

Del mismo modo que hemos detectado una alteración en la distribución de SYP, se ha detectado alteraciones en la distribución de la expresión de SYN. Aunque el fenotipo de las células con TEA es menos aparente que el observado con la expresión de SYP, la SIN presenta una distribución mas dispersa y menos abundante en las células con TEA que en las control. Existe en la literatura datos que relacionan directamente mutaciones en SYN y aparición de características fenotípicas de TEA en modelos animales (Chen et al., 2014; Giovedi et al., 2014; Michetti, et al., 2017).

Finalmente la distribución de Cx43 en las neuronas control se localiza de una manera precisa y puntual en las regiones de contacto entre las neuritas. En las neuronas con TEA, al existir un mayor entramado neurítico se producen mas contactos, y por lo tanto la expresión aumentada de Cx43 en ellos. Pero además hemos observado expresión de Cx43 en regiones neuríticas donde no se aprecian contactos celulares. Esto nos indica un aumento muy significativo de uniones tipo Gap entre neuritas, así como una alteración en la distribución de la conexina en la membrana celular. La expresión de Cx43 no se ha visto relacionada con autismo de forma directa, aunque el aumento de uniones tipo gap entre las neuronas de los circuitos entre células piramidales dentro de las columnas corticales, junto con un déficit terminales GABAérgicas (desequilibrio excitador inhibitor)(Toro et al., 2010) podría explicar la hipótesis de desconexión en el TEA (incremento de actividad intracolumnar y déficit de conexión intercolumnar) (Casanova et al., 2013; Geschwind y Levitt, 2007; Golden et al., 2018; Hustler and Casanova, 2016; Zen et al., 2017).

Como conclusión de objetivo 4, podemos decir que la neuronas derivadas de células mesenquimales con TEA presentan “in vitro” una alteración en la expresión de los genes y proteínas sinápticas. Estas alteraciones ponen de relieve un distribución anómala de marcadores presinapticos, junto con una alteración en la expresión de proteínas de la densidad postsináptica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 4- Como conclusión del primer objetivo específico hemos podido aislar y amplificar células madre mesenquimales de LP y PD a partir de muestras con TEA y controles.
- 5- Hemos definido las características celulares (microscopia de fluorescencia [ICC] y electrónica de barrido) y moleculares (transcriptómica [qPCR] y proteómica [WB]).
- 6- Como conclusión del tercer objetivo hemos visto que las células de LP y PD con TEA y controles, tienen la capacidad de diferenciarse en neuronas y hemos definido los estadios del proceso de diferenciación.
- 7- Podemos decir que la neuronas derivadas de células mesenquimales con TEA presentan “in vitro” una alteración en la expresión de los genes y proteínas sinápticas. Estas alteraciones ponen de relieve una distribución anómala de marcadores presinapticos, junto con una alteración en la expresión de proteínas de la densidad postsináptica.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abrahams B. S. y Geschwind D.H. (2008). Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet.* 9(5):341-355.

Abyzov A., Mariani J., Palejev D., Zhang Y., Haney MS., Tomasini L. (2012). Somatic copy number mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells. *Nature.* 492(7429):438-42.

Acheson A., Conover J.C., Fandl J.P., DeChiara T.M. Russell M., Thadani A., Squinto S.P., Yancopoulos G.D., Lindsay R.M. (1995). A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature.* 374(6521):450-3

Alison M.R., Poulsom 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.

Alzheimers Dement. 2017 Apr;13(4):e1-e85. doi: 10.1016/j.jalz.2016.11.007. Epub 2017 Mar 22.

American Psychiatric Association. (2013). Autism Spectrum Disorder. American Psychiatric Pub. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5). Arlington, VA. pp. 50-59.

Anderson D.J., Gage F.H., Weissman I.L. (2001). Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat. Med.* 7:393-395.

Artigas Pallarés J. Narbona. (2011). Trastornos del neurodesarrollo ISBN 978-84-92931-03-3

Artigas Pallarés, J. (2002). Fenotipos conductuales. *Rev Neurol.* 34 (1), S38-S48.

- Avril T., Etcheverry A., Pineau R., Obacz J., Jegou G., Jouan F., Le Reste P.J., Hatami M., Colen R.R., Carlson B.L., Decker P.A., Sarkaria J.N., Vauléon E., Chiforeanu D.C., Clavreul A., Mosser J., Chevet E., Quillien V. (2017) Clin Cancer Res. 1;23(23):7360-7374.
- Ba W., van der Raadt J., Nadif Kasri N. (2013). Rho GTPase signaling at the synapse: implications for intellectual disability. Exp Cell Res. 319(15):2368-74.
- Baig T.T., Feng Y., Chelico L. (2017). Correction for Baig et al., Determinants of Efficient Degradation of APOBEC3 Restriction Factors by HIV-1 Vif. J Virol. 91(7).
- Benayed R., Choi J., Matteson P. G., Gharani N., Kamdar S., Brzustowicz L.M., Millonig J.H. (2009). Autism-associated haplotype affects the regulation of the homeobox gene, ENGRAILED 2. Biol Psychiatry. 66(10): 911-917.
- Benayed R., Gharani N., Rossman I., Mancuso V., Lazar G., Kamdar S., Bruse S.E., Tischfield S., Smith B.J., Zimmerman R.A., Diccico-Bloom E., Brzustowicz L.M., Millonig J.H. (2005). Support for the homeobox transcription factor gene ENGRAILED 2 as an autism spectrum disorder susceptibility locus. Am J Hum Genet. 77(5): 851-868.
- Betancur C., Sakurai T., Buxbaum J.D. (2009). The emerging role of synaptic cell-adhesion pathways in the pathogenesis of autism spectrum disorders. Trends Neurosci. 32(7):402-12.
- Blanquie O. y Bradke F. (2018). Cytoskeleton dynamics in axon regeneration. Curr Opin Neurobiol. 51: 60-69.
- Blau H.M., Brazelton T.R., Weimann J.M. (2001). The evolving concept of a stem cells: entity or function? Stem Cell. 105:829-841.
- Blomquist H.K., Bohman M., Edvinsson S.O., Gillberg C., Gustavson K.H., Holmgren G. y Wahlström J. (1985). Frequency of the fragile X syndrome in infantile autism. A Swedish multicenter study. Clinical Genetics. 27 (2),113-117.
- Bueno C., Ramirez C., Rodriguez-Lozano F.J., Tabares-Seisdedos R., Rodenas M., Moraleda J.M., Jones J.R., Martinez S. (2013). Human adult periodontal ligament-derived cells integrate and differentiate after implantation into the adult mammalian brain. Cell Transplant. 22(11): 2017-2028.
- 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. y McKay R.D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 435:406-417.

doi: 10.1186/2051-5960-1-67.

Casanova M.F., El-Baz A.S., Kamat S.S., Dombroski B.A., Khalifa F., Elnakib A., Soliman A., Allison-McNutt A., Switala A.E. (2013). Focal cortical dysplasias in autism spectrum disorders. *Acta Neuropathol Commun.*1:67.

Chahrour M., Kleiman R.J., Manzini M.C. (2017) Translating genetic and preclinical findings into autism therapies. *Dialogues Clin Neurosci.* 19(4):335-343.

Chang S.C., Paul D.L., Lange C., Sasanfar R., Santangelo S.L., Am J., Med Genet B. (2011). Common genetic variation in the GAD1 gene and the entire family of DLX homeobox genes and autism spectrum disorders. *Chang he GAD1 gene an the entire family of DLX homeobox genes and autism spectrum disorders. Neuropsychiatr Genet.* 156(2):2339.

Chaste P., Roeder K., Devlin B. (2017). The Yin and Yang of Autism Genetics: How Rare De Novo and Common Variations Affect Liability. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 18:167-187.

Chen J., Yu S., Fu Y., Li X. (2014). Synaptic proteins and receptors defects in autism spectrum disorders. *Front Cell Neurosci.* 11;8:276.

Chen M., Licon K., Otsuka R., Pillus L., Ideker T. (2013) Decoupling epigenetic and genetic effects through systematic analysis of gene position. *Cell Rep.* 3(1):128-37.

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.

Coleman M. (2005). Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci.* 6(11):889-98.

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 Sox1 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.
- Cuylen S., Blaukopf C., Politi A.Z., Müller-Reichert T., Neumann B., Poser I., Ellenberg J., Hyman A.A., Gerlich D.W. (2016). Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature.* 14;535(7611):308-12.
- Deshpande A., Yadav S., Dao D.Q., Wu Z.Y., Hokanson K.C., Cahill M.K., Wiita A.P., Jan Y.N., Ullian E.M., Weiss L.A. (2017). Cellular Phenotypes in Human iPSC-Derived Neurons from a Genetic Model of Autism Spectrum Disorder. *Cell Rep.* 21(10):2678-2687.
- Deshpande I., Seeber A., Shimada K., Keusch J.J., Gut H., Gasser SM. (2017). Structural Basis of Mec1-Ddc2-RPA Assembly and Activation on Single-Stranded DNA at Sites of Damage. *Mol Cell.* 2017 Oct 19;68(2):431-445.
- Dierssen M, Martinez S. Neuropathology and synaptic alterations in neurodevelopmental disorders. (2013). In Caheney DS, Sklar P, Buxbaum JD, Nestler EJ, eds. *Neurobiology of mental illness.* 4 ed. Oxford: Oxford University Press. p. 980.
- Dietert R.R., Dietert J.M., Dewitt J.C. (2011). Environmental risk factors for autism. *Emerg Health Threats. J* 4: 7111.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Krause D.S., Deans R.J., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E.M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8:315-317.
- Dor Y. y Melton D.A. (2004). How important are adult stem cells for tissue maintenance?. *Cell Cycle.* 3(9):1104-6.
- Elsabbagh M., Divan G., Koh Y.J., Kim Y.S., Kauchali S., Marcini C., Montiel-Nava C., Patel V., Paula C.S., Wang C., Yasamy M.T., Fombonne E. (2012). Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res* 5(3): 160-179.
- Erlander M.G., Tillakaratne N.J., Feldblum S., Patel N., Tobin A.J. (1991). Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron.* 7: 91-100.
- Farhan H., Hsu VW. (2016). Cdc42 and Cellular Polarity: Emerging Roles at the Golgi. *Trends Cell Biol.* 26:241-248.

Flynn K.C. (2013). The cytoskeleton and neurite initiation. *BioArchitecture*. 3 (4): 86-109.

Foudah D., Monfrini M., Donzelli E., Niada S., Brini A.T., Orcian M., Tredici G., Miloso M. (2014). Expression of neural markers by undifferentiated mesenchymal-like stem cells from different sources. *J Immunol Res*. 2014: 987678.

Foxe J.J., Molholm S., Baudouin S.J., Wallace M.T. (2018). Explorations and perspectives on the neurobiological bases of autism spectrum disorder. *THE NEUROBIOLOGICAL BASES OF AUTISM SPECTRUM DISORDERS*. 47(6):488-496

Frederiksen K. y McKay R. (1988). Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells from the mammalian. *CNS. J. Neurosci*. 8:1144-1151.

Fuchs E. y Segre J.A. (2000). Stem cells: A new lease on life. *Cell*. 100:143-155.

Fuchs E. y Weber K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. *Annu. Rev. Biochem*. 63:345-382.

Galli R., Gritti A., Bonfanti L. & Vescovi A.L. (2003). Neural stem cells: an overview. *Circ. Res*. 92:598-608.

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.

Geschwind D.H. y Levitt P. (2007). Autism spectrum disorders: developmental disconnection syndromes. *Current Opinion in Neurobiology*, 17 (1), 103-111.

Geschwind N. (1965). Disconnexion syndromes in animals and man. I. *Brain*. 88(2):237-94.

Gibson D.A. y Ma L. (2011) Developmental regulation of axon branching in the vertebrate nervous system. *Development*. 138 (2):183-195.

Giovedì S., Corradi A., Fassio A., Benfenati F. (2014). Involvement of synaptic genes in the pathogenesis of autism spectrum disorders: the case of synapsins. *Front Pediatr*. 4;2:94.

Goellner B., Aberle H. (2011). The synaptic cytoskeleton in development and disease. *Developmental Neurobiology*. 72(1):111-25

- Golden C.E., Buxbaum J.D., De Rubeis S. (2018). Disrupted circuits in mouse models of autism spectrum disorder and intellectual disability. *Curr Opin Neurobiol.* 48:106-112
- 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
- Greenberg D.A., Hodge S.E., Sowinski J y Nicoll D. (2001). Excess of twins among affected sibling pairs with autism: implications for the etiology of autism. *The American Journal of Human Genetics*, 69 (5), 1062-1067.
- 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 selfrenew in response to basic fibroblast growth factor. *J. Neurosci.* 16:10911100.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J. (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 13625–13630.
- Guérette D., Khan P.A., Savard P.E., Vincent M. (2007). Molecular evolution of intermediate filament proteins type VI. *BMC Evol. Biol.* 7:164.
- Hayashi M.K., Tang C., Verpelli C., Narayanan R., Stearns M.H., Xu R.M., Li H., Sala C., Hayashi Y. (2009). The postsynaptic density proteins Homer and Shank form a polymeric network structure. *Cell.* 3;137(1):159-71.
- Hirasaki M., Ueda A., Asaka M.N., Uranishi K., Suzuki A., Kohda M., Mizuno Y., Okazaki Y., Nishimoto M., Sharif J., Koseki H., Okuda A. (2018). Identification of the Coiled-Coil Domain as an Essential Methyl-CpG-Binding Domain Protein 3 Element for Preserving Lineage Commitment Potential of Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*.
- Horvath P.P. y Monteggia L.M. (2018). MeCP2 as an Activator of Gene Expression. *Trends Neurosci.* 41(2): 72-74.
- Horwitz B., Rumsey J.M., Grady C.L., Rapoport S.I. (1988). The cerebral metabolic landscape in autism. Intercorrelations of regional glucose utilization. *Arch Neurol.* 45(7):749-55.
- 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.

Huguet G., Benabou M., Bourgeron T., (2016) The Genetics of Autism Spectrum Disorders. A Time for Metabolism and Hormones. 101-129

Hustler A., Eardley I., Hinley J., Pearson J., Wezel F., Radvanyi F., Baker S.C., Southgate J. (2018). Differential transcription factor expression by human epithelial cells of buccal and urothelial derivation. *Exp Cell Res.* 369(2):284-294.

Hutsler J.J, Casanova M.F. (2016). Review: Cortical construction in autism spectrum disorder: columns, connectivity and the subplate. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 42(2):115-34.

Isacke C. y Horton M. (2000). The adhesión molecule factsbook. (2^a ed). Londres: Editorial Paperback.

Ismail F.Y., Fatemi A., Johnston M.V. Cerebral plasticity: Windows of opportunity in the developing brain. *Eur J Paediatr Neurol.* 21(1):23-48.

Janebodin K., Horst O.V., Ieronimakis N., Balasundaram G., Reesukumal K., Pratumvinit B., Reyes M. (2011). Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice. *PLoS One.* 6(11):e27526.

Jean Xavier, Claude Bursztejn, Maitri Stiskin, Roberto Canitano, David Cohen (2015). Autism spectrum disorders: An historical synthesis and a multidimensional assessment toward a tailored therapeutic program. *Research in Autism Spectrum Disorders* 18: 21-3

Johnstone A.D., Hallett R. M., Léon A., Carturan B., Gibon J., Barker P.A. (2018). A novel method for quantifying axon degeneration. *Plos One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199570>

Jones J., Estirado A., Redondo C., Bueno C., Martínez S. (2012). Human adipose stem cell-conditioned médium increases survival of Friedreich's ataxia cells submitted to oxidative stress. *Stem Cells* 21:2817-26.

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.

Kanner L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*, 2, 217-250.

Kathuria A., Nowosiad P., Jagasia R., Aigner S., Taylor R.D., Andrae L.C., Gattford N.J.F., Lucchesi W., Srivastava D.P., Price J. (2018). Stem cell-derived neurons from autistic individuals with SHANK3 mutation show morphogenetic abnormalities during early development. *Molecular Psychiatry*. 23, 735-746.

Katz D.M. (2014). Brain-derived neurotrophic factor and Rett syndrome. *Handb Exp Pharmacol*. 2014;220:481-95.

Kelleher R.J y Bear M.F. (2008). The autistic neuron: troubled translation? *Cell*. 135(3):401-6.

Kim J.H., Liao D., Lau L.F., Huganir R.L. (1998). SynGAP: a RasGAP synaptic that is associated with the protein family PSD-95 / SAP90. *Neuron*. 20(4):683-91.

Kiss C., Li J., Szeles A., Gizatullin R.Z., Kashuba V.I., Lushnikova T., Protopopov A.I., Kelve M., Kiss H., Kholodnyuk I.D., Imreh S., Klein G., Zabarovsky E.R. (1997). Assignment of the ARHA and GPX1 genes to the bands of the human chromosome 3p21.3 by hybridization in situ and with somatic cell hybrids. *Cytogenet. Cell Genet*. 79(3-4):228-230.

Kon E., Cossard A., Jossin Y. (2017). Neuronal polarity in the embryonic mammalian cerebral cortex. *Front Cell Neurosci*. 16;11:63.

Koseki H, Okuda A (2018). Identification of the Coiled-Coil Domain as an Essential Methyl-CpG-Binding Domain Protein 3 Element for Preserving Lineage Commitment Potential of Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*

LaSalle J.M. (2011). A genomic point-of-view on environmental factors influencing the human brain methylome. *Epigenetic*. 6 (7), 862-869.

LaSalle J.M. y Yasui D.H. (2009). Evolving role of MeCP2 in Rett syndrome and autism. *Epigenomics*, 1(1), 119-130.

Levine J.M. y 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.

Li X.T., Liang Z., Wang T.T., Yang J.W., Ma W., Deng S.K., Wang X.B., Dai Y.F., Guo J.H. (2017). Brain-derived Neurotrophic Factor Promotes Growth of Neurons and Neural Stem Cells Possibly by Triggering the Phosphoinositide 3-Kinase/AKT/Glycogen Synthase Kinase-3 β /beta-catenin Pathway. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 16(7): p. 828-836.

Lim S., Naisbitt S., Yoon J., Hwang J.I., Suh P.G., Sheng M., Kim E. (1999). Characterization of the Shank family of synaptic proteins. Multiple genes, alternative splicing and differential expression in brain and development. *J Biol Chem*. 274 (41):29510-8.

Lu N.Z., Cidlowski J.A. (2005). Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell*. 29;18(3):331-42.

Lyall K., R.J. Schmidt Hertz-Picciotto I. (2014). Maternal lifestyle and environmental risk factors for autism spectrum disorders. *Int J Epidemiol*. 43(2): 443-464.

Malenka R.C., Nestler E.J., Hyman S.E. (2009). Chapter 8: Atypical neurotransmitters. En Sydor A., Brown R.Y. (2nded). *Molecular neuropharmacology: a basis for clinical neuroscience*. Nueva York: McGraw-Hill Medical.

Malkova N.V., Hsiao E.Y. (2016). Neuronal and Synaptic Dysfunction in Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability. 65-82.

Manzini M.C., Xiong L., Shaheen R., Tambunan D.E., Di Costanzo S., Mitisalis V., Tischfield D.J., Cinquino A., Ghaziuddin M., Christian M., Jiang Q., Laurent S., Nanjiani Z.A., Rasheed S., Hill R.S., Lizarraga S.B., Gleason D., Sabbagh D., Salih M.A., Alkuraya F.S., Walsh C.A. (2014). CC2D1A regulates human intellectual and social function, as well as signaling homeostasis NF- κ B. *Cell Rep*. 8(3):647-55.

Marchetto M.C., Belinson H., Tian Y., Freitas B.C., Fu C., Vadodaria K.C., Beltrao-Braga P.C., Trujillo C.A., Mendes A.P.D., Padmanabhan K., Nunez Y., Ou J., Ghosh H., Wright R., Brennand K.J., Pierce K., Eichenfield L., Pramparo T., Eyler L.T., Barnes C.C., Courchesne E., Geschwind D.H., Gage F.H., Wynshaw-Boris A., Muotri A.R. (2017). Altered proliferation and networks in neural cells derived from idiopathic autistic individuals. *Molecular Psychiatry*. 22: 820-835.

Martinez-Morga M. y Martinez S. (2016). Brain development and plasticity. *Rev Neurol* 62 Suppl 1: S3-8.

Martinez-Morga M. y Martinez S. (2017). Neuroplasticity: synaptogenesis during normal development and its implication in intellectual disability. *Rev Neurol* 64(s01): S45-S50.

Martinez-Morga M., Quesada-Rico M.P., Bueno C., Martinez S. (2018). Neurobiological bases of autistic spectrum disorder and attention deficit hyperactivity disorder: neural differentiation and synaptogenesis. *Rev Neurol* 66(S01): S97-S102.

Maussion G., Moalic J.M., Simonneau M., Gorwood P., Ramoz N. (2018). Increased expression of BDNF mRNA in the frontal cortex of autistic patients. *Behav Brain Res.* S0166-4328(18)30230-4

Mayani H. y 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.

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.

Merriam E.B., Millete M., Lumbard D.C. (2013). Synaptic regulation of microtubule dynamics in dendritic spines by calcium, F-actin, and debrin, *Journal of Neuroscience.* 33 (42): 164711-164782

Michalczyk K., Ziman M. (2005). Nestin structure and expected function in the organization of the cellular cytoskeleton. *Histology and Histopathology.* 20 (2):665-71.

Michetti C., Caruso A., Pagani M., Sabbioni M., Medrihan L., David G., Galbusera A., Morini M., Gozzi A., Benfenati F., Scattoni M.L. The Knockout of Synapsin II in Mice Impairs Social Behavior and Functional Connectivity Generating an ASD-like Phenotype. *Cereb Cortex.* 27(10):5014-5023.

Mitsiadis T.A., Catón J., Pagella P., Orsini G., Jimenez-Rojo L. (2017). Monitoring Notch Signaling-Associated Activation of Stem Cell Niches within Injured Dental Pulp. *Front Physiol.* 8: 372. PMID: 28611689

Miura M., Gronthos S., Zhao M., Lu B., Fisher L.W., Robey P.G., et al. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 100 (10):5807-5812.

Moretto E., Murru L., Martano G., Sassone J., Passafaro M. (2017). Glutamatergic synapses in neurodevelopmental disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 84(Pt B):328-342

Mundy P. (2018). A review of joint attention and social-cognitive brain systems in typical development and autism spectrum disorder. *Eur J Neurosci*. 47(6):497-514.

Mundy P., Sigman M., Ungerer J., Sherman T. (1986). Defining the Social Deficits of Autism: The Contribution of Non-Verbal Communication Measures. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 27(5):657-669.

Muotri A.R., Beltrão-Braga P.C. (2017). Modeling autism spectrum disorders with human neurons. *Brain Res*. 1656:49-54.

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.

Nishiyama A., Lin Z.H., Stallcup W.B. (1995). Generation of truncated forms of proteoglycan NG2 by protection of the cell surface. *Mol Biol Cell*. 6 (12): 1819-32.

Ohja K., Gozal E., Fahnestock M., Cai L., Cai J., Freedman J.H., Switala A., El-Baz A., Barnes G.N. (2018). Neuroimmunologic and Neurotrophic Interactions in Autism Spectrum Disorders: Relationship to Neuroinflammation. *Neuromolecular Med*. 20(2):161-173

Okano H. (2002). Stem cell biology of the central nervous system. *J Neurosci Res*. 15;69(6):698-707.

Ozerdem U., Grako K.A., Dahlin-Huppe K., Monosov E., Stallcup W.B. Proteoglycan NG2 refers exclusively to mural cells during vascular morphogenesis. (2001) *Dev. Dyn*. 222 (2): 218-227.

Palmen S.J., van Engeland H., Hof P.R., Schmitz C. (2004). Neuropathological findings in autism. *Brain*. 127(12):2572-83.

Pashley D.H., Sabatini C. Mechanisms regulating the degradation of dentin matrices by endogenous dentin proteases and their role in dental adhesion. (2014). *Am J Dent*. 27(4):203-14.

Penzes P., Remmers C. (2012). Kalirin signaling: implications for synaptic pathology. *Mol Neurobiol*. (1):109-18.

- Penzes P., Cahill M.E., Jones K.A., VanLeeuwen J.E., Woolfrey K.M. (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci.* 14(3):285-93.
- Persico, A. M. and T. Bourgeron (2006). "Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues." *Trends Neurosci* 29(7): 349-358.
- Pevny L. y Rao M. (2003). The stem-cell menagerie. *Trends Neurosci.* 26:351359.
- Pham T.T.M., Kato H., Yamaza H., Masuda K., Hirofuji Y., Sato H., Nguyen H.T.N., Han X., Zhang Y., Taguchi T., Nonaka K. (2018). Altered development of dopaminergic neurons differentiated from stem cells from human exfoliated deciduous teeth of a patient with Down syndrome. *BMC Neurol.* 18(1):132.
- Pomerat C.M. y Contino R.M. (1965). The cultivation of dental tissues. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 19:628-32.
- Ricceri L., Michetti C., Scattoni. (2016). Mouse Behavior and models for autism spectrum disorders. Neuronal and synaptic dysfunction in autism spectrum disorder and intellectual disability. Chapter 17.
- Saillour Y., Broix L., Bruel-Jungerman E., Lebrun N., Muraca G., Rucci J., Poirier K., Belvindrah R., Francis F., Chelly J. (2013). Beta tubulin isoforms are not interchangeable for rescuing impaired radial migration due to Tubb3 knockdown. *Hum Mol Genet.* 23(6):1516-26.
- 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.
- Sala C. y Verpelli C. (2016). *Neuronal and Synaptic Dysfunction in Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability.* 1st Edition. ISBN: 9780128001097
- Santagati F. y Rijli F.M. (2003). Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nat Rev Neurosci.* 4(10):806-18.
- Schmidt R. J., K. Lyall Hertz-Picciotto I. (2014). Environment and Autism: Current State of the Science. *Cut Edge Psychiatry Pract* 1(4): 21-38.
- Scott F. Gilber. (2014). *Developmental Biology.* 10 Edition. ISBN-10: 160535192X
- 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

Sheng and Kim. (2000). The Shank family of scaffold proteins. Sheng M1, Kim EJ Cell Sci. 113(11):1851-6.

Sidman R.L., el carril P.W., Dickie M.M. (1962). Staggerer, a new mutation in the mouse that affects the cerebellum. Science. 137(3530):610-2.

Skafidas,E., Testa R., Zantomio D., Chana G., Everall I.P., Pantelis, C. (2014). Predicting the diagnosis of autism spectrum disorder using gene pathway analysis. Molecular Psychiatry, 19(4), 504-510.

Sperber D. (1990) The evolution of the language faculty: A paradox and its solution. Behavioral and Brain Science.s 13(4):756-758.

Spring F.A., Dalchau R., Daniels G.L., Mallinson G., Judson P.A., Parsons S.F., Fabre J.W., Anstee D.J. (1988). The antigens of the blood group Ina and Inb are found in a glycoprotein of 80,000 MW (the glycoprotein CDw44) whose expression is influenced by the gene In (Lu). Immunology 64 (1): 37-43.

Stevens HE, Mariani J, Coppola G, Vaccarino F.M. (2012). Neurobiology meets genomic science: the promise of human-induced pluripotent stem cells. Dev Psychopathol. 24(4):1443-51.

Strasser L., Downes M., Kung J., Cross J.H., De Haan M. (2017). Prevalence and risk factors for autism spectrum disorder in epilepsy: a systematic review and meta-analysis. Dev Med Child Neurol. 60(1):19-29.

Tahirovic S. y Bradke F. (2009). Neuronal polarity. Cold Spring Harb Perspect Biol 1(3): a001644.

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

Takano T., Xu C., Funahashi Y., Namba T., Kaibuchi K. (2015). Neuronal polarization. Development 142(12): 2088-2093.

Tamamaki N., Fujimori K., Nojyo Y., Kaneko T.,Takauji R. (2003). Evidence that Sema3A and Sema3F regulate the migration of GABAergic neurons in the developing neocortex. J Comp Neurol. 455(2): 238-248.

Tatullo M., Marrelli M., Shakesheff K.M., White L.J. (2015). Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. J Tissue Eng Regen Med. 9(11): 1205-1216.

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.

Teresa Torres Torrelo (2015). Trastorno del Espectro Autista: Bases Biológicas, Valoración, Intervención y Diseño de Materiales en la Educación Primaria. TFM. Facultad de Ciencias de la Educación, Grado de Educación Primaria.

Thesleff I. (2003). Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci.* 116(9):1647-8.

Toro R., Konyukh M., Delorme R., Leblond C., Chaste P., Fauchereau F., Coleman M., Leboyer M., Gillberg C., Bourgeron T. (2006). Key role for gene dosage and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders. *Stem cells-a clinical update. Aust Fam Physician.* 35(9):719-21.

Trends Genet. (2010 (8):363-72. doi: 10.1016/j.tig.2010.05.007. Epub 2010 Jul 6.

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.

Ueda S., Kitazawa S., Ishida K., Nishikawa Y., Matsui M., Matsumoto H., Aoki T., Nozaki S., Takeda T., Tamori Y., Aiba A., Kahn C.R., Kataoka T., Satoh T. (2010).

Vaccarino F. M., Urban A. E., Stevens H. E., Szekely A., Abyzov A., Grigorenko E. L., Gerstein M., Weissman S. (2011). Annual Research Review: The promise of stem cell research for neuropsychiatric disorders. *J Child Psychol Psychiatry.* 52(4):504-16.

Verpelli C., Carlessi L., Bechi G., Poli E.F., Orellana D., Heise C., Franceschetti S., Mantegazza R., Mantegazza M., Delia D., Sala C. (2013). Comparative neuronal differentiation of self-renewing neural progenitor cell lines obtained from human induced pluripotent stem cells. *Front Cell Neuroscience.* 7: 175.

Vo N., Klein M.E., Varlamova O., Keller D.M., Yamamoto T., Goodman R.H., Impey S. (2005). A microRNA induced by cAMP response element binding protein regulates neuronal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102(45):16426.

Weiner D.J., Wigdor E.M., Ripke S, Walters R.K., Kosmicki J.A., Grove J., Samocha K.E., Goldstein J.I., Okbay A., Bybjerg-Grauholm J., Werge T., Hougaard D.M., Taylor

J., et al. (2017). Polygenic transmission disequilibrium confirms that common and rare variation act additively to create risk for autism spectrum disorders. *Nat Genet.* 49(7):978-985.

Weissman I.L. (2000). Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 100:157-168.

Wen Z., Cheng T.L., Li G.Z., Sun S.B., Yu S.Y., Zhang Y., Du Y.S., Qiu Z.(2017). Identification of autism-related MECP2 mutations by whole-exome sequencing and functional validation. *Mol Autism.* 8: p. 43.

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

Wolpert L. (1994). Positional information and pattern formation in development. *Dev. Genet.* 15:485-490.

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.

Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 318(5858):1917-20.

Zeng K., Kang J., Ouyang G., Li J., Han J., Wang Y., Sokhadze E.M., Casanova M.F., Li X. (2017). Disrupted Brain Network in Children with Autism Spectrum Disorder. *Sci Rep.* 2017 Nov 24;7(1):16253.

Zocchi, L. and P. Sassone-Corsi (2012). "SIRT1-mediated deacetylation of MeCP2 contributes to BDNF expression." *Epigenetics* 7(7): 695-700.

