



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias

**“Generación de modelos neuronales derivados de
células pluripotentes inducidas y troncales de pulpa
dental humanas para el estudio de marcadores de
neurodegeneración”**

T E S I S

Que presenta

GUSTAVO LÓPEZ TOLEDO

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Directores de la Tesis:

- Dra. María del Carmen Cárdenas Aguayo
- Dr. José Antonio Gilberto Arias Montaña

Ciudad de México

Septiembre, 2015

ÍNDICE

i.	Lista de tablas	4
ii.	Lista de figuras	4
iii.	Lista de abreviaturas	6
1.	Resumen	8
2.	Abstract	9
3.	Introducción	10
4.	Marco teórico	12
4.1	Célula troncal	12
4.1.1	Nicho de células troncales	14
4.1.2	Tipos de células troncales	16
4.1.3	Células troncales embrionarias (ESCs)	16
4.1.4	Células troncales adultas (ASCs)	18
4.1.5	Células troncales mesenquimales (MSCs)	20
4.1.6	Células troncales de pulpa dental (DPSCs)	23
4.1.7	Células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs)	26
4.1.8	Células troncales cancerígenas (CSCs)	32
4.1.9	Diferenciación de células troncales a linaje neural	35
4.1.10	Marcadores de diferenciación neuronal	36
4.1.11	Factores neurotróficos	40
4.2	Demencia	42
4.2.1.	Enfermedad de Alzheimer (EA)	44
4.2.2.	Etiopatogenia de la EA	45
4.2.3.	Clasificación de la EA	48
4.2.4.	Modelos de estudio de la EA	49
4.2.5.	Ventajas del uso de DPSCs e iPSCs en la EA	52
5.	Planteamiento del problema	54
6.	Hipótesis	55
7.	Objetivo general	55
8.	Objetivos particulares	55
9.	Materiales y métodos	56
9.1.	Células troncales de la pulpa dental	56
9.2.	Fibroblastos de pacientes con la Enfermedad de Alzheimer y controles ...	56
9.3.	Cultivo de células troncales de pulpa dental	57

9.4.	Cultivo de fibroblastos humanos.....	57
9.5.	Diferenciación neural de DPSCs	57
9.6.	Protocolo de generación de iPSCs a partir de fibroblastos humanos.....	58
9.7.	Extracción de RNA	59
9.8.	Retro-transcripción	60
9.9.	PCR.....	61
9.10.	Extracción de proteínas.....	61
9.11.	Western Blot	62
9.12.	Inmuncitofluorescencia.....	62
9.13.	Microscopía confocal	63
10.	Resultados	66
10.1.	Cultivo de DPSCs	66
10.2.	Caracterización mesenquimal de las DPSCs	66
10.3.	Diferenciación neuronal de las DPSCs.....	69
10.4.	Caracterización por inmunofluorescencia de la expresión de marcadores de diferenciación neuronal	71
10.5.	Cultivo de fibroblastos humanos	80
10.6.	Evaluación de vías de señalización de fibroblastos afectados con la Enfermedad de Alzheimer y no afectados	82
11.	Discusión	85
11.1.	Caracterización y diferenciación de las DPSCs.....	85
11.2.	Fibroblastos de individuos controles y de pacientes de la EA	90
12.	Conclusiones	93
13.	Perspectivas	94
14.	Referencias.....	95

i. Lista de tablas

N°	Título	Página
1	Nichos de obtención de células troncales mesenquimales (MSCs) y potencial de diferenciación	21
2	Fuentes de obtención de células mesenquimales, marcadores de superficie y medios de cultivo	22
3	Líneas celulares obtenidas del "Coriell Institute	56
4	Primers de estado mesenquimal y de diferenciación neuronal	64
5	Anticuerpos mesenquimales y fenotipo neuronal	65

ii. Lista de figuras

N°	Título	Página
1	Características de las células troncales	12
2	Composición del nicho de las células troncales	14
3	Células troncales embrionarias (ESCs)	17
4	Localización de células troncales adultas (ASCs)	19
5	Tejidos dentales y asociados de los que pueden aislarse diferentes poblaciones de MSCs dentales	24
6	Células troncales pluripotentes inducidas	27
7	Proceso de dos estados de reprogramación de células somáticas	30
8	Modelos de heterogeneidad en células cancerígenas	33
9	Vías de señalización involucradas en la diferenciación neural de células troncales	37
10	Marcadores de diferenciación neuronal en el hipocampo adulto	39
11	Vías de señalización de los receptores Trk	41
12	Cambios morfológicos en el cerebro de una persona con enfermedad de Alzheimer	44
13	Etiopatogenia de la Enfermedad de Alzheimer	45
14	Procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloidea (APP)	46
15	Hiperfosforilación de la proteína tau	47
16	Clasificación de la Enfermedad de Alzheimer	49
17	Procesos empleados en la diferenciación de DPSCs a tipos neurales	58
18	Procesos empleados en reprogramación de fibroblastos humanos y la generación de iPSCs	59
19	Cultivo de células troncales de pulpa dental	66

20	Marcadores mesenquimales expresados por las células troncales de pulpa dental	67
21	Marcadores neurales expresados por las DPSCs	68
22	Cariotipo de las DPSCs en el pasaje 7	69
23	DPSCs cultivadas en medio de transición (ITS 1 %, 5 ng/ml de EGF y 5 ng/ml de bFGF)	70
24	DPSCs subcultivadas en medio de diferenciación y factores neurotróficos (BDNF y GDNF)	70
25	DPSCs subcultivadas en medio de diferenciación con factores neurotróficos (BDNF + GDNF y Medio Base ITS 1 %)	71
26	Inmunodetección de Nestina y Ki67 en las DPSCs a 5 DIV en medios de diferenciación	72
27	Inmunodetección de β III Tubulina y GFAP en las DPSCs a 5 DIV en medios de diferenciación	73
28	Inmunodetección de Neurofilamento en las DPSCs a 5 días in vitro en medios de diferenciación	74
29	Expresión de CD105 por DPSCs (5 DIV)	75
30	Expresión de CD73 por DPSCs (5 DIV)	75
31	Expresión de Nestina en DPSCs con tratamientos de diferenciación y no diferenciadas (5 DIV).	76
32	Expresión de β III Tubulina en DPSCs con tratamientos de diferenciación y no diferenciadas (5 DIV)	77
33	Expresión de GFAP en DPSCs con tratamientos de diferenciación y no diferenciadas (5 DIV)	77
34	Expresión de MAP2c en DPSCs con tratamientos de diferenciación y no diferenciadas (5 DIV)	78
35	Diferenciación de las DPSCs (35 DIV)	79
36	Expresión de Neun, CD166 y CD146 por RT-PCR punto final en condiciones de diferenciación (35 DIV)	79
37	Fibroblastos de dos individuos control (sanos)	80
38	Fibroblastos de cuatro miembros de una familia italiana con una mutación en presenilina 1 (M146L)	81
39	Expresión de Vimentina en fibroblastos del individuo no afectado 2 y del afectado con EA2	82
40	Fosforilaciones en las isoformas de GSK3 α (Ser21) y GSK3 β (Ser9) en individuos no afectados, con riesgo y afectados por la enfermedad de Alzheimer	83
41	Fosforilación de tau serina 404 en individuos no afectados, con riesgo y afectados por la enfermedad de Alzheimer	84
42	Fosforilación de tau treonina 231 en individuos no afectados, con riesgo y afectados por la enfermedad de Alzheimer	84

iii. Lista de abreviaturas

- ABC: ATP Binding Cassette
- AKT: Proteína Cinasa B
- ANPEP: Alanil aminopeptidasa
- ApoE4: Apolipoproteína alelo 4
- APP: Proteína Precursora Amiloidea
- ASCs: Células Troncales Adultas
- A β : Amiloide Beta
- BDNF: Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
- bFGF: Factor básico de fibroblastos
- BM-MSCs: Células Troncales Mesenquimales de Médula Ósea
- BMP: Proteína Morfogénica Ósea
- CD: Cluster de Diferenciación
- c-Myc: Oncogén de myelocitomatosis
- CSCs: Células Troncales Cancerígenas
- DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco
- DNA: Ácido Desoxirribonucleico
- DPSCs: Células Troncales de Pulpa Dental
- EA: Enfermedad de Alzheimer
- ENG: Endoglina
- ESCs: Células Troncales Embrionarias
- FAD: Enfermedad de Alzheimer Familiar
- FGF: Factor de Crecimiento Epidermal
- GDNF: Factor Neurotrófico Derivado de la Glia
- GFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial
- GFSCs: Células Troncales Fibroblásticas Gingivales
- GSK3: Glucógeno Sintasa Cinasa 3
- GWAS: Estudio de Asociación Genómica
- HLA: Antígeno Leucocitario Humano
- HNK-1: Antígeno de Células Asesinas Naturales
- iPSCs: Células Troncales Pluripotentes inducidas
- Ki67: Proteína de Proliferación Ki67
- Klf4: Kruppel-like factor 4
- M146L: Metionina 146 por Leucina
- MAP2: Proteína 2 Asociada a Microtúbulos
- MAPK: Proteínas Cinasas Activadas por Cinasas
- MEM: Medio Basal de Eagle
- MET: Transición Epitelio-Mesénquima
- MNFs: Marañas Neurofibrilares
- MSCs: Células Troncales Mesenquimales

- NeuN: Gen homólogo determinante de sexo en *C. elegans*
- NGF: Factor de Crecimiento Nervioso
- NT: Neurotrofina
- NT5E: 5 ectonucleotidasa
- Oct4: Factor de transcripción de unión a octámero 4
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- PI3K: Fosfoinositol 3 cinasa
- PLDSCs: Células Troncales de Ligamento Periodontal
- PN: Placa Neurítica
- PSA-NCAM: Molécula de Adhesión Celular Neural Polisialilada
- PSEN: Presenilina
- RNA: Ácido Ribonucleico
- SAD: Enfermedad de Alzheimer Esporádica
- SCAPs: Células Troncales de Papila Apical
- Ser: Serina
- SFB: Suero Fetal Bovino
- SH3: Homólogo Src 3
- SHEDs: Células Troncales de Dientes Deciduos Exfoliados
- SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido
- Sox2: Región determinante del sexo Y
- SSEA: Antígeno Embrionario de Estado Específico
- Tbx3: Factor de transcripción T-box
- TGF: Factor de Crecimiento Transformante
- Thr: Treonina
- Trk: Cinasa relacionada a tropomiosina
- Tuj-1: β III Tubulina
- Tyr: Tirosina

1. Resumen

Las células troncales mesenquimales de la pulpa dental (DPSCs) y los fibroblastos humanos empleados en la reprogramación de células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs) representan modelos biológicos novedosos que permiten comprender las vías de señalización intracelular de enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer (EA) a través de su potencial de diferenciación en múltiples linajes incluyendo neuronas. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de diferenciación de células troncales de pulpa dental y la caracterización de la señalización intracelular de fibroblastos de pacientes con la Enfermedad de Alzheimer familiar con la mutación en presenilina 1 (M146L). Las DPSCs fueron aisladas de una paciente de 46 años de edad sin afección cognitiva, siendo estas positivas a los marcadores mesenquimales CD166, CD146, CD105, CD73 y CD13 en medio de crecimiento DMEM/12 y 10% de suero fetal bovino (SFB). La diferenciación se realizó mediante el uso de medio definido libre de suero suplementado con Insulina Transferrina Selenio (ITS) 1% en combinación del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) o del Factor Neurotrófico Derivado de la Glia (GDNF) mostrando cambios morfológicos de tipo neuronal y dando positivas a los marcadores de neuronas terminales MAP2 isoforma C y NeuN, proceso acompañado por la reducción del marcador de precursores neurales Nestina y la pérdida del marcador de proliferación Ki67, así mismo se demuestra que las DPSCs pueden expresar marcadores neurales basales sin ser diferenciadas. El cultivo de fibroblastos de pacientes con la EA en medio de crecimiento MEM con sales de Earl y 15% de SFB no inactivado fue caracterizado evaluando vías de señalización antes de su empleo en la reprogramación y generación de iPSCs, validando y evidenciando cambios preliminares a nivel molecular de marcadores de neurodegeneración. Las DPSCs y los fibroblastos humanos reprogramados mediante la diferenciación celular in vitro permitirán comprender los mecanismos involucrados en enfermedades como el Alzheimer.

2. Abstract

Mesenchymal stem cells from the dental pulp (DPSCs) and human fibroblasts used in the reprogramming of induced pluripotent stem cells (iPSCs) represent novel biological models that allow understanding the intracellular signaling pathways of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD) through its potential for differentiation into multiple lineages including neurons. The aim of this study was to examine the ability of differentiation of dental pulp stem cells and the characterization of intracellular signaling of fibroblasts from patients with Alzheimer's disease given by the mutation in presenilin 1 (M146L). DPSCs were isolated from a 47-year-old female without cognitive impairment, being positive for CD166, CD146, CD105, CD73 and CD13 mesenchymal markers in DMEM/12 and 10% fetal bovine serum (FBS) growth medium. The differentiation was performed using serum free media Insulin Transferrin Selenium (ITS) 1% in combination of Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) or Glia Derived Neurotrophic Factor (GDNF) showing neuronal type morphological changes and giving positive neuronal markers MAP2 isoform c and NeuN, a process accompanied by the reduction of the neural precursor marker nestin and the loss of Ki67 proliferation marker, it is also demonstrated that DPSCs can express basal neural markers without being differentiated. The culture of fibroblasts from patients with EA in MEM growth medium with Earl salts and 15% non-inactivated FBS was characterized by evaluating signaling pathways prior to their use in the reprogramming and generation of iPSCs, validating and evidencing preliminary changes at the level molecular markers of neurodegeneration. DPSCs and human fibroblasts reprogrammed by cell differentiation in vitro will allow understanding and overcoming the limitations of diseases such as Alzheimer's.

3. Introducción

Las células troncales de la pulpa dental (DPSCs), y las células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs) derivadas de la reprogramación de células somáticas (fibroblastos de piel) representan fuentes accesibles para la obtención de modelos neuronales a través de la diferenciación in vitro mediante el uso de medios neurales definidos libres de suero y el uso de factores tróficos.

La caracterización de células troncales dentales con marcadores específicos del fenotipo mesenquimal (CD166, CD146, CD105, CD73, CD13) e inmunodetección permite obtener poblaciones troncales mesenquimales con capacidad y compromiso a linajes neuronales. La caracterización de las células derivadas de la diferenciación de las DPSCs a fenotipos neuronales requiere la corroboración mediante marcadores de progresión de maduración neuronal como los empleados en la neurogénesis adulta (Nestina, GFAP, β III-Tubulina, Neurofilamento, MAP2 y NeuN) y del cariotipado cromosómico para descartar alteraciones genéticas, así como caracterizar las mutaciones que pudieran existir y estar relacionadas con las neuropatologías.

Los fibroblastos derivados de individuos con patologías como la Enfermedad de Alzheimer presentan el fondo genético propio de la enfermedad por lo que el estudio de dichas células permite comprender algunos de los mecanismos intracelulares involucrados, sin embargo, debido a que en las enfermedades neurodegenerativas hay mecanismos moleculares afectados específicamente en las células neuronales el uso de tecnologías de reprogramación de células somáticas (por ejemplo fibroblastos) con fondo patogénico hacia el fenotipo neuronal permitirá dilucidar las vías de señalización involucradas en enfermedades neurodegenerativas en particular en los fenotipos neuronales.

El descubrimiento de nichos de células troncales humanas adultas, y el advenimiento de la reprogramación de fibroblastos humanos en iPSCs han generado nuevos modelos celulares de enfermedades neurodegenerativas

donde para las que la obtención de una biopsia de cerebro es considerada inaccesible por consideraciones éticas.

El presente trabajo evidencia que las células troncales de la pulpa dental obtenidas de un primer molar de una paciente de 46 de años edad presentan características mesenquimales, dada la expresión de marcadores específicos de fenotipo CD166, CD146, CD105, CD73 y CD13 así como un componente cromosómico normal 46,XX,16qh+, y tendencia a la diferenciación neuronal cuando son cultivadas por 5 días en medio químicamente definido libre de suero, suplementado con Insulina Transferrina Selenio 1% (medio ITS) y neurotrofinas de forma individual BDNF, GDNF o su combinación BDNF + GDNF, observándose cambios en la expresión de marcadores neurales como la disminución de Nestina (marcador de precursor neural), aumento de la expresión de los marcadores de neuronas terminales MAP2 isoforma C, disminución en la expresión del marcador mesenquimal CD105 y la pérdida de proliferación por la ausencia de Ki67, mientras que a 35 días de diferenciación se visualiza la expresión de NeuN bajo las condiciones con BDNF o GDNF. Por otro lado, las células DPSCs expresan de forma basal (en medio de crecimiento con SFB) marcadores como GFAP, Nestina y β III Tubulina aun sin ser sometidas a un proceso de diferenciación neuronal, debido a su origen embrionario a partir de la cresta neural.

El estudio preliminar de las vías de señalización de fibroblastos de pacientes con fondo patogénico de la EA indica una disminución en la fosforilación de la Serina⁹ de la isoforma GSK3 β , relacionada con la inhibición de su actividad de cinasa, correlacionando con el aumento en la fosforilación de la Serina⁴⁰⁴ de la proteína tau de los fibroblastos de los individuos afectados.

Este estudio pretende aumentar la comprensión de los cambios intracelulares propios de la reprogramación de las iPSCs derivadas de dichos fibroblastos, y su diferenciación al linaje neuronal específico de la enfermedad de Alzheimer.

4. Marco teórico

4.1 Célula troncal

Las células troncales (del inglés “*Stem Cells*”) tienen capacidad de autorenovarse y de diferenciarse hacia múltiples tipos celulares. Además, no presentan las características fenotípicas de las células de cualquier tejido adulto (epitelial, conectivo, muscular, neural o inmunológico), pero poseen la capacidad de diferenciarse a cualquier estirpe celular de los tejidos mencionados (Figura 1).

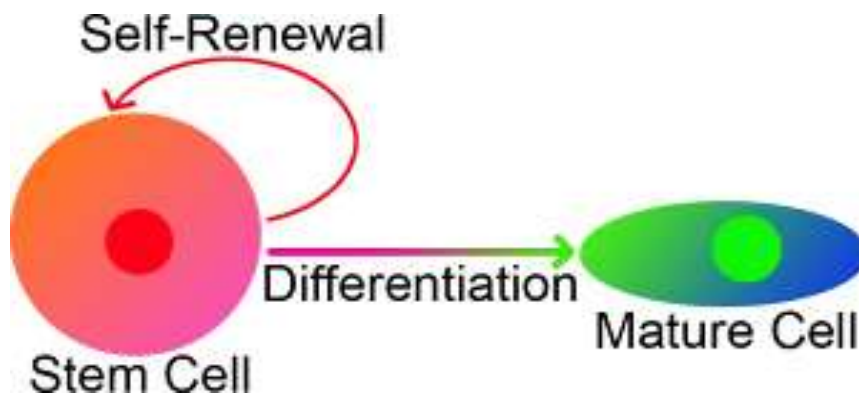


Figura 1. Características de las células troncales. Estas células poseen la capacidad de autorrenovarse generando células con la misma identidad y de diferenciarse en células especializadas y maduras (Rowland, 2009).

Existen cuatro tipos definidos de células troncales, dos de ellas de carácter fisiológico presentes en diferentes etapas de la vida, las células troncales embrionarias (ESCs, ES) y las células troncales adultas (ASCs), y por otra parte se encuentran las células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs) y las células patológicas presentes en el cáncer, las cuales presentan propiedades de troncalidad y se denominan células troncales de cáncer, CSCs (Alvarez et al., 2012).

Entre las propiedades comunes que caracterizan a los cuatro grupos descritos anteriormente se encuentran los siguientes aspectos funcionales:

1. Expresión de marcadores de pluripotencia.
2. Activación de vías de señalización que mantienen el estado de troncalidad.
3. Estado proliferativo.
4. Adherencia a superficies plásticas.
5. Desarrollo de teratomas *in vivo*.

Los avances en la investigación de células troncales han explorado vías terapéuticas y una serie de pruebas de estudio piloto que prometen beneficios como:

- Utilidad en estudios de genómica funcional para comprender la expresión génica humana, el conjunto de datos genómicos y la bioinformática.
- Empleo en el estudio de los procesos biológicos que ayuden a la comprensión de los trastornos del desarrollo humano como el cáncer, enfermedades genéticas y crónico-degenerativas.
- Generación de nuevos modelos de enfermedades humanas que permitan el descubrimiento y el desarrollo de fármacos, así como alternativas a la toxicología animal, y la disminución del tiempo de salida al mercado.
- Terapia basada en células troncales o diferenciadas.

Las células troncales derivadas de todas las fuentes representan inmensas promesas médicas, con los pacientes como principales beneficiarios de esta innovación (Nadig, 2009).

4.1.1 Nicho de células troncales

El nicho de las células troncales es el microambiente *in vivo* donde residen y reciben estímulos que determinan su destino. Por lo tanto, no debe considerarse simplemente un lugar físico para las células troncales, sino como el lugar donde las señales extrínsecas interactúan y se integran para influir en el comportamiento de la troncalidad. Estos estímulos incluyen interacciones célula-célula, célula-matriz y señales (moléculas) que activan y/o reprimen genes y programas de transcripción (Figura 2).

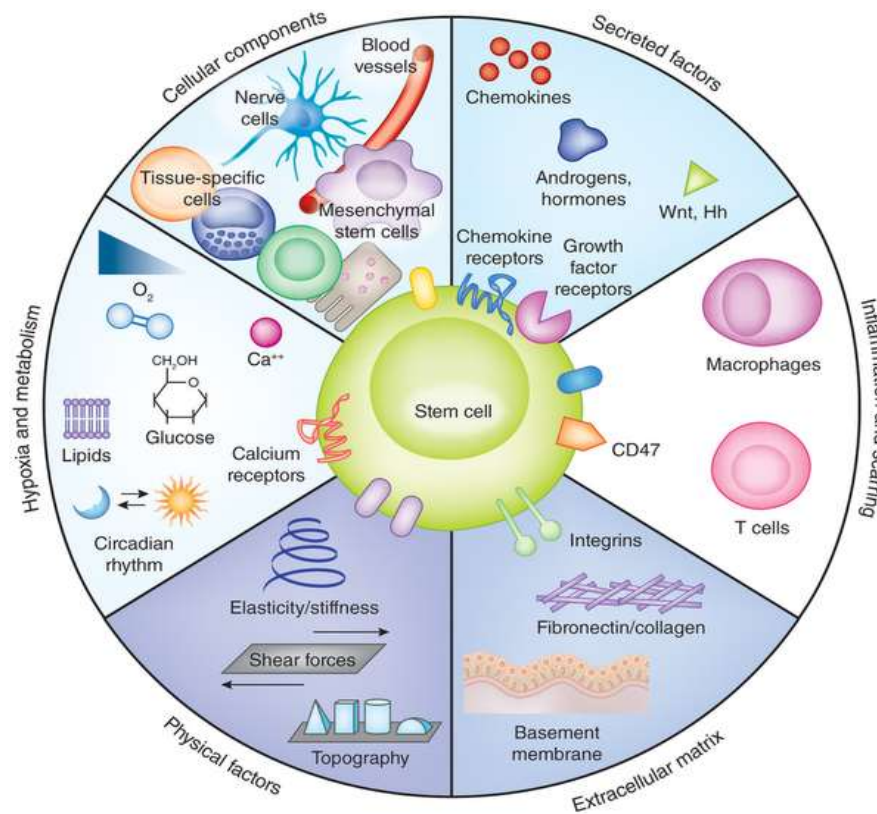


Figura 2. Composición del nicho de las células troncales. La composición se caracteriza por ser compleja, heterotípica, dinámica y con diferentes componentes celulares, factores, control inmunológico, parámetros físicos y control metabólico, generando interacciones entre las células troncales y su nicho direccionales y recíprocas (Lane et al., 2014).

Como consecuencia directa de estas interacciones, las células troncales se mantienen en un estado latente, inducidas a autorrenovarse o comprometerse a un estado diferenciado (Ferraro et al., 2010)

Los nichos tienen una ubicación anatómica definida y la salida de la célula troncal de su nicho resulta en diferenciación, en la que los componentes anatómicos fundamentales y las vías moleculares del ambiente están altamente conservados entre especies, aunque sus respectivas funciones en el nicho pueden mostrar variaciones. Se ha propuesto que es posible identificar componentes de nichos comunes asociados con funciones similares.

Los componentes conservados del nicho son:

- Células de soporte del estroma, incluyendo moléculas de adhesión célula-célula y factores solubles secretados, que se encuentran en proximidad de las células troncales.
- Proteínas de matriz extracelular que interactúan con las células troncales sirviendo de anclaje y constituyendo una unidad mecánica de andamiaje para transmitir la señalización.
- Vasos sanguíneos que llevan soporte nutricional y señales sistémicas al nicho desde otros órganos y que también participan en el reclutamiento de células troncales circulantes desde y hacia el nicho.
- Insumos (como por ejemplo los factores de crecimiento) neuronales que favorecen la movilización de células troncales de sus nichos e integran señales de diferentes sistemas de órganos. Las señales neuronales parecen ser particularmente importantes en el tráfico de células troncales hematopoyéticas.

El nicho de células troncales es el lugar donde las señales humorales, neuronales, locales (paracrina), posicional (física) y metabólica interactúan entre sí para regular el destino (o fenotipo) de las células troncales.

4.1.2 Tipos de células troncales

Las células troncales derivan de diversas regiones del organismo, y se forman en momentos diferentes de la vida del organismo. Las células troncales embrionarias sólo existen en las primeras etapas de desarrollo y varios tipos de células troncales específicas de tejidos adultos que aparecen durante el desarrollo fetal y permanecen en nuestro cuerpo durante toda la vida, o células que adquieren la capacidad de troncalidad a partir de la reprogramación de células somáticas, como las células troncales pluripotentes inducidas y las derivadas por condiciones patológicas como las troncales de nichos cancerígenos.

4.1.3 Células troncales embrionarias (ESCs o ES)

A partir de 1998, se descubrió que las células troncales embrionarias (ESCs) podían aislarse de embriones humanos tempranos, ser cultivadas durante períodos prolongados, manteniendo un cariotipo normal, y ser diferenciadas a una amplia gama de tejidos y órganos derivados de las tres capas germinales embrionarias (Henningson et al., 2003). Las ESCs derivan de la masa celular interna del blastocisto antes de su implantación (Figura 3).

Son las células troncales más estudiadas y los conocimientos obtenidos de ellas han permitido el estudio de otros tipos de células con carácter de troncalidad. *In vivo* las ESCs sólo existen durante un periodo corto de tiempo que corresponde al desarrollo pre-implantación, y en paralelo con la división mitótica las células del embrión se diferencian y pierden su pluripotencia.

Las ESCs poseen la capacidad no sólo de autorrenovación, sino de mantener establemente propiedades inherentes a las células troncales embrionarias, como la expresión de genes característicos de pluripotencia (Oct4, Sox2, Klf4, Rex, telomerasa y fosfatasa alcalina), la co-dependencia de expresión de otros factores de transcripción (o genes homeóticos) básicos para el mantenimiento de niveles correctos de expresión como la regulación indirecta del gen Oct4 por Sox2, la heterodimerización

como mecanismo regulador de los genes de pluripotencia (como el heterodímero Oct4 y Sox2, permitiendo su unión concurrente a los dominios del DNA), la conmutación alélica del gen Nanog caracterizada por la transcripción aleatoria de un solo alelo en células no pluripotentes, un cambio de expresión de mono- a bi-alélica exclusivo de células troncales embrionarias, así como un estado de equilibrio epigenético a través de la sub-metilación general del DNA y las variantes de micro RNA generadas por procesamiento (*splicing*) alternativo del RNAm (Alvarez et al., 2012).

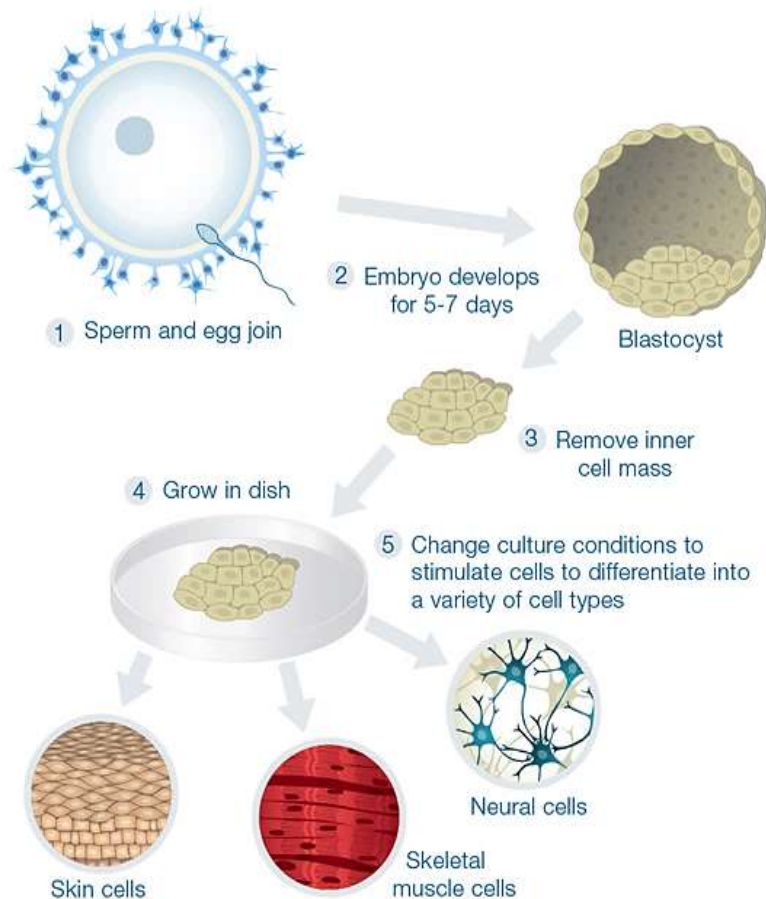


Figura 3. Células troncales embrionarias (ESCs). Se forman como una parte normal del desarrollo embrionario y pueden aislarse de un embrión temprano y crecer *in vitro* (Learn.Genetics, 2017).

Las propiedades de las células embrionarias, tales como el cariotipo normal y la alta actividad de la telomerasa, se conservan períodos prolongados en las ESCs humanas en cultivo. La mayoría de las células somáticas diploides no expresan altos niveles de telomerasa y entran en senescencia replicativa después de un tiempo de vida finito de 50 a 80 duplicaciones (Henningson et al., 2003).

4.1.4 Células troncales adultas (ASCs)

Una célula troncal adulta (ASCs) es una célula indiferenciada, localizada entre células diferenciadas en un tejido u órgano. Las ASCs pueden renovarse y diferenciarse para producir algunos o todos los tipos de células especializadas más importantes del tejido u órgano. Las funciones primarias que desempeñan en un organismo son mantener y reparar el tejido en el que se encuentran (Figura 4).

En la década de 1950-1960 se descubrió que la médula ósea contiene al menos dos tipos de células troncales. Una de estas poblaciones, de células troncales hematopoyéticas, origina los diversos tipos de células sanguíneas en el organismo. La segunda población, de células troncales del estroma de la médula ósea o de células troncales mesenquimales, fue descubierta unos años más tarde. Estas células troncales no hematopoyéticas constituyen una pequeña proporción de la población de células mesenquimales en la médula ósea y pueden generar células de hueso, cartílago y grasa que contribuyen a la formación de sangre y tejido fibroso conectivo. Así mismo, en la década de los 1960s, se identificaron en la rata dos regiones del cerebro que contenían células en división que finalmente derivaban en células nerviosas (Altman, 1963). No fue sino hasta la década de los 1990s, con los trabajos de Fred Gage y Álvarez-Buylla, que se estableció que el cerebro adulto contiene células troncales capaces de generar los tres principales tipos celulares del cerebro, astrocitos, oligodendrocitos y neuronas (Álvarez et al., 1990: National-Institutes-of-Health, 2017).

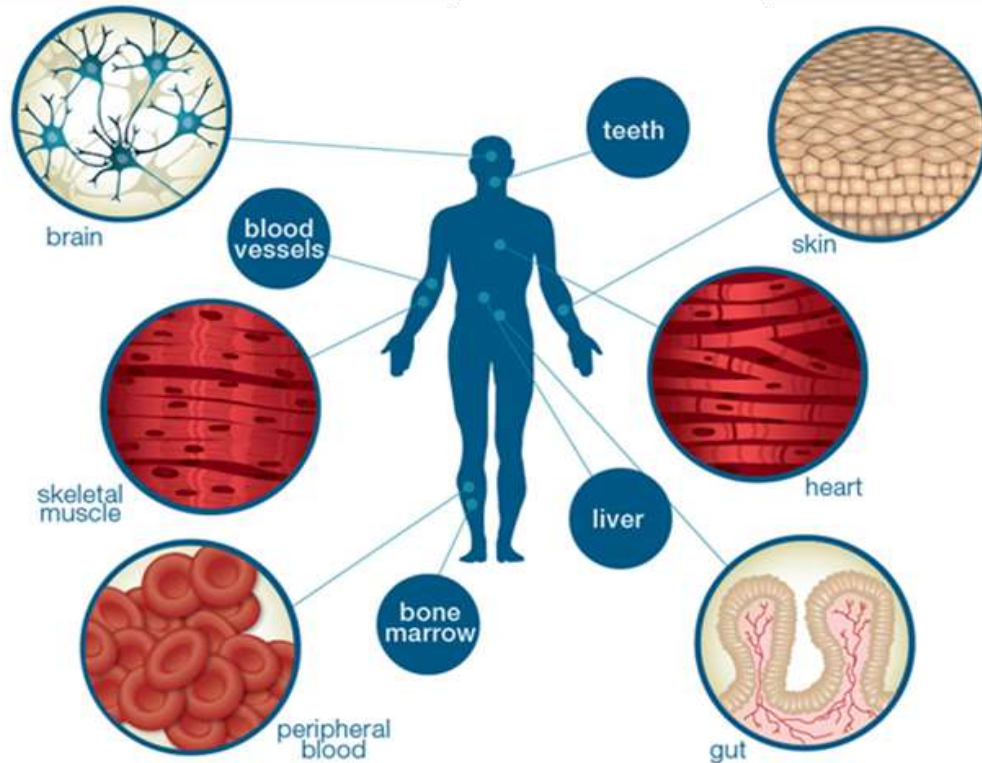


Figura 4. Localización de células troncales adultas (ASCs). Son células que existen naturalmente en el cuerpo importantes para el crecimiento, la restauración y la sustitución de células que se pierden por desgaste (Learn.Genetics, 2017).

Diversos estudios han sugerido que las células troncales adultas son muy versátiles y pueden encontrarse en diferentes nichos troncales, como células troncales hematopoyéticas, mamarias, intestinales, de la pulpa dental, endoteliales y olfatorias, entre otras.

Las ASCs son derivados postnatales de las ESCs localizadas en todo el cuerpo que mantienen la co-expresión de al menos tres de los cuatro factores de transcripción característicos de pluripotencia de las ESCs (Oct4, Klf4 y Sox2) y muestran alta expresión de transportadores ABC y de la fosfatasa alcalina. No está claro si expresan espontáneamente la telomerasa como las ESCs, pero a diferencia de las células somáticas diferenciadas las ASCs sobre-expresan a las proteínas de filamentos intermedios E-cadherina, Vimentina y β -catenina, además de marcadores específicos del órgano. Las

ASCs se han descrito en muchos órganos diferentes, pero aún no se sabe cuáles marcadores son comunes a todas las ASCs y cuales son específicos de órganos. Algunos marcadores de ASCs también se expresan en células somáticas diferenciadas, aunque con diferentes niveles, y no de manera coordinada con respecto a los factores de troncalidad (Alvarez et al., 2012).

4.1.5 Células troncales mesenquimales (MSCs)

Las células troncales se definen clásicamente por su multipotencia y autorrenovación. El término células troncales mesenquimales (MSCs) se utilizó por primera vez para referirse a un precursor hipotético postnatal, multipotente y autorrenovable derivado de una célula embrionaria, cuya función era mantener la renovación de tejidos esqueléticos y la reparación de tejidos durante la edad adulta generando tejidos funcionales y fenotípicamente maduros, incluyendo hueso, músculo liso, tendones, cartílago y tejido adiposo (Nombela-Arrieta et al., 2011).

Las células aisladas de la médula ósea del ratón en cultivo exhiben propiedades de adherencia a superficies de plástico y generación de colonias con morfología en huso y fueron referidas como fibroblastos formadores de colonias, debido a su capacidad para diferenciarse en células especializadas propias del mesodermo denominadas células troncales mesenquimales. Las MSCs existen en tejidos adultos de diferentes fuentes, desde los murinos hasta los seres humanos. Son autorrenovables, multipotentes, fácilmente accesibles y en cultivo celular son altamente expandibles con una excepcional estabilidad genómica y pocas implicaciones éticas, lo que apoya su importancia en la investigación básica y su posible uso terapéutico (Ullah et al., 2015). Actualmente se investigan fuentes estables, seguras y altamente accesibles de células troncales con un gran potencial para la medicina regenerativa.

Las MSCs están presentes no sólo en los tejidos fetales, sino también en muchos tejidos adultos (Tabla 1), como la médula ósea (Pittenger et al.,

1999), el tejido adiposo (Wagner et al., 2005), el tejido dental (Seifrtova et al., 2012), la sangre menstrual (Allickson et al., 2011), la sangre periférica (Ab Kadir et al., 2012), las glándulas salivales (Rotter et al., 2008), la piel y el prepucio (Bartsch et al., 2005).

Tabla 1. Nichos de obtención de células troncales mesenquimales (MSCs) y potencial de diferenciación.

Fuente	Potencial de diferenciación in vitro
Médula ósea	Osteocitos, condrocitos, adipocitos, cardiomiocitos, hepatocitos, células pancreáticas y células neuronales
Tejido adiposo	Osteocitos, condrocitos, adipocitos, cardiomiocitos, hepatocitos, células pancreáticas y células neuronales
Pulpa dental	Osteocitos, condrocitos, adipocitos, células pancreáticas, melanocitos y células neuronales
Cordón umbilical	Osteocitos, condrocitos, adipocitos, células pancreáticas, hepatocitos y células neuronales
Gelatina de Wharton	Osteocitos, condrocitos, adipocitos, células hepatocitos y células neuronales
Piel y prepucio	Osteocitos, condrocitos, adipocitos y miocitos

Los criterios estándar de la Sociedad Internacional de Terapia Celular establecen que la expresión de un conjunto específico de marcadores de superficie celular es una de las características esenciales de las MSCs, en particular la presencia de CD73, CD90, CD105, y la ausencia de CD14, CD34, CD45 y HLA-DR (Dominici et al., 2006). Los marcadores más caracterizados con las especificidades más altas para MSCs se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Fuentes de obtención de células mesenquimales, marcadores de superficie y medios de cultivo.

Fuente	Método de aislamiento	Medio de crecimiento	Suplemento	Marcadores de superficie		Referencias
				Positivo	Negativo	
Médula ósea	Gradiente de densidad (Ficoll)	DMEM DMEM/F12	SFB	CD73, CD90, CD105, STRO-1	CD14, CD34, CD45, HLA-DR	Gronthos et al., 2001; Gronthos, Graves, Ohta, y Simmons, 1994; Nadig, 2009; Pittenger et al., 1999
Tejido adiposo	Digestión enzimática y filtración por membrana	DMEM DMEM/LG	SFB SFC	CD73, CD090, CD29, CD44, CD71, CD105, CD13, CD166, STRO-1	CD14, CD31, CD34, CD45	Baglioni et al., 2009; Gronthos et al., 2001; Wagner et al., 2005
Membrana y fluido amniótico	Digestión enzimática y gradiente de densidad	α -MEM DMEM/F12	SFB	CD29, CD44, CD90, CD105, SH2, SH3,	CD10, CD14, CD34, HLA-DR	Cai et al., 2010
Tejido dental	Digestión enzimática	α -MEM MEM	SFB SFC	CD29, CD44, CD90, CD105, CD13, CD73	CD14, CD34, CD45	Kadar et al., 2009; Seifrtova et al., 2012
Sangre periférica	Gradiente de densidad en Ficoll	α -MEM	NBSC	CD44, CD90, CD105, HLA-ABC	CD45, CD133	Ab Kadir et al., 2012
Glándulas salivales	Digestión enzimática	DMEM	SFC	CD13, CD29, CD44, CD90, STRO-1	CD34, CD45	Rotter et al., 2008
Piel y prepucio	Digestión enzimática	DMEM/HG DMEM DMEM/F12	SFB	CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, SSEA-4, Vimentina	CD34, CD45, HLA-DR	Bartsch et al., 2005; Riekstina, Muceniece, Cakstina, Muiznieks, y Ancans, 2008

Cordón umbilical	Digestión enzimática	DMEM-HG DMEM	SFB	CD29, CD44, CD73, CD90, CD105	CD34, CD45	Kita, Gauglitz, Phan, Herndon, y Jeschke, 2010; Moretti et al., 2010
Líquido sinovial	Gradiente de densidad en Ficoll	α -MEM	SFB	CD44, CD90, CD105, CD147, STRO-1	CD31, CD34, CD45, CD106	Morito et al., 2008
Gelatina de Wharton	Digestión enzimática	DMEM	SFB	CD73, CD90, CD105	CD14, CD34, CD45, CD79, HLA-DR	Hou et al., 2009; Kuznetsov et al., 1997

SFB: Suero Fetal Bovino, SFC: Suero Fetal de Cabra, CD: Cluster de Diferenciación, DMEM: Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco, DMEM/F12: Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco con mezcla de nutrientes de Ham, MEM: Medio mínimo esencial, DMEM/LG: Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco bajo en glucosa, DMEM/HG: Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco alto en glucosa.

Las MSCs tienen la capacidad de diferenciarse en los tres linajes, ectodermo, mesodermo y endodermo, dependiendo de los medios de cultivo y los suplementos utilizados para inducir la diferenciación. Con base en la localización, el potencial multi-linaje, la secreción de moléculas anti-inflamatorias y los efectos inmunorreguladores (Figueroa et al., 2012), las MSCs se consideran fuente de células con posible utilidad en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, inflamatorias y degenerativas como terapia de remplazo y como modelos de estudio de enfermedades degenerativas.

4.1.6 Células troncales de pulpa dental (DPSCs)

La pulpa dental es un tejido conectivo blando contenido en la cámara pulpar; es una fuente de células troncales adultas debido a su alto contenido de células y a los procedimientos poco invasivos requeridos para el aislamiento celular (Pisciotta et al., 2015).

El tejido dental de la pulpa se extrae de los dientes obtenidos durante procedimientos dentales de rutina y es la fuente más conveniente y valiosa de células troncales de pulpa dental. Existen varios tipos de células troncales de tejido dental (Figura 5), incluyendo células troncales de pulpa dental (DPSCs), de dientes deciduos exfoliados (SHEDs), de ligamentos periodontales (PDLSCs), de papila apical (SCAPs), y células progenitoras del folículo dental (DFPCs) (Ashri et al., 2015). Se ha investigado intensamente el tipo de diente a utilizar siendo los terceros molares los utilizados en la gran mayoría de los estudios de células troncales dentales, pero los dientes deciduos exfoliados (“dientes de leche”) podrían ser una excelente fuente de células para expandir y preservar (Kawashima, 2012).

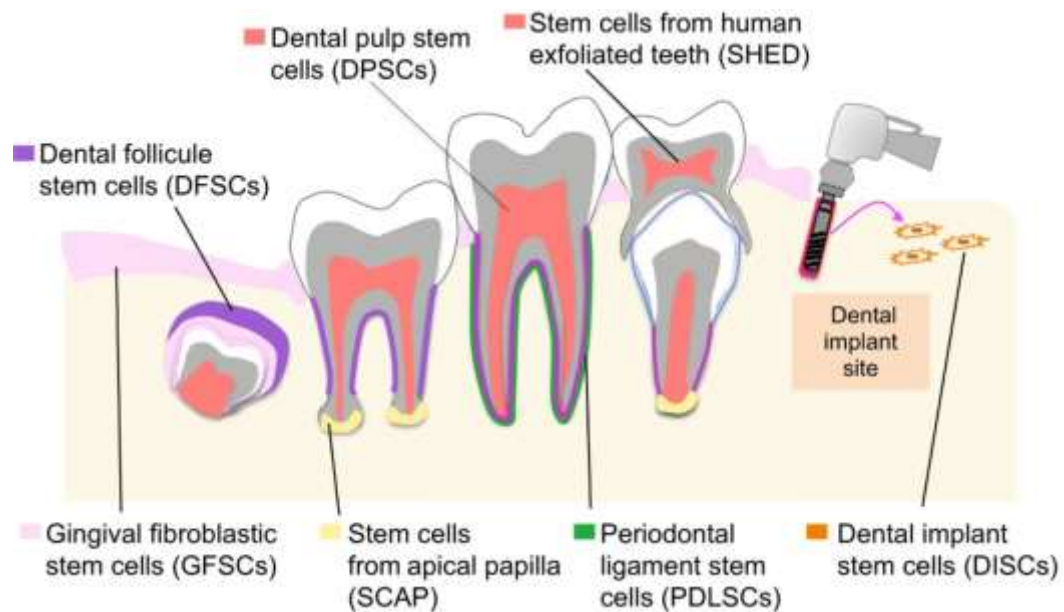


Figura 5. Tejidos dentales y asociados de los que pueden aislarse diferentes poblaciones de MSCs dentales. Las diferentes subpoblaciones de MSCs dentales se clasifican según su tejido de origen. A partir del diente, las células troncales de la pulpa dental (DPSCs) pueden derivarse de la pulpa dental interna de los molares adultos, así como de la pulpa de los dientes exfoliados deciduos (SHEDs), de la papila apical (SCAPs), y de los tejidos de soporte. Las MSCs dentales pueden derivarse del folículo dental (DFSCs), del ligamento periodontal (PDLSCs), la encía (GFSCs) y también a partir de tejido obtenido durante los implantes dentales (Sharpe, 2016).

La capacidad de crear nuevos odontoblastos durante toda la vida en respuesta a daño sugirió una fuente de células troncales dentro de la pulpa dental, las cuales se aislaron y caracterizaron, denominándose células troncales de pulpa dental o DPSCs (Gronthos et al., 2002). Estas células muestran similitudes, pero también importantes diferencias con las células mesenquimales de la médula ósea humana (BM-MSCs).

Las DPSCs pueden diferenciarse con factores de crecimiento, factores transcripcionales, proteínas de matriz extracelular y moléculas receptoras en diferentes tipos celulares entre los que se incluyen los odontoblastos, osteoblastos, condrocitos, cardiomiocitos, células neuronales, adipocitos, células epiteliales, células melanocíticas y células β -pancreáticas (Yu et al., 2010).

Las DPSCs generalmente permanecen quiescentes en la pulpa dental, pero responden rápidamente después de una lesión. Estas DPSC tienen una alta capacidad proliferativa y se diferencian inmediatamente en odontoblastos, osteoblastos y condrocitos para producir tejidos de dentina, hueso y cartílago, respectivamente, para el proceso de reparación. Las DPSCs derivan principalmente de las células de la cresta neural craneal durante el desarrollo embrionario, y mantienen la expresión de GFAP, HNK-1, Nestina, P75, S-100 y β III Tubulina marcadores de células troncales neurales (Potdar et al., 2015).

El fenotipo mesenquimal de las DPSCs se puede corroborar por el uso de 3 marcadores principales: CD105, CD73, CD13. CD105 (Endoglina, ENG) es una proteína asociada al Receptor del Factor de Crecimiento Transformante β (TGF β R). Se ha reportado una disminución significativa en la expresión del gen CD105 en osteoblastos diferenciados, condrocitos y adipocitos. Por lo tanto, es necesario comprobar la expresión del gen CD105 antes del uso de estas células troncales de pulpa dental (Koc et al., 2000). CD13 es otro marcador de membrana (alanil-aminopeptidasa, ANPEP), cuyo gen tiene suma importancia como causa de varios tipos de leucemias o linfomas

cuando se encuentra mutado (Huang et al., 2008). CD73 es una enzima (5'-nucleotidasa, 5'-NT) codificada por el gen NT5E (Mokry et al., 2010), utilizada como un marcador de diferenciación de linfocitos y de MSCs.

Las células troncales aisladas de la pulpa dental pueden ser una alternativa como modelos de diferenciación celular y posible terapéutica. Además de los marcadores antes mencionados, expresan marcadores de pluripotencia de células troncales embrionarias, como Oct4, Nanog, SSEA-4 y TRA-160. Además, expresan marcadores de multipotencia que indican formación de tejido condrogénico y osteogénico y diferenciación neuronal espontánea. La investigación de la generación de células de linaje neuronal a partir de células troncales dentales ha mostrado que las DPSCs expresan diversos marcadores neuronales después de la estimulación con medios de diferenciación neuronal. Se han realizado numerosos estudios para establecer estrategias de cultivo eficaces que promuevan la diferenciación de neuroesferas y la inducción neuronal (Tatullo et al., 2015).

Además de los estudios de diferenciación *in vitro*, se ha intentado regenerar al tejido nervioso mediante el trasplante de poblaciones de DPSCs, ya que dado su origen a partir de la cresta neural presentan predisposición a la diferenciación neuronal y la reparación, por lo que la pulpa dental humana constituye una interesante fuente de células troncales adultas que pueden contribuir a la regeneración de numerosos tipos de tejidos y como herramienta para modelar enfermedades neurodegenerativas dada su relación ectodérmica.

4.1.7 Células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs)

Las iPSCs son células troncales con características pluripotenciales derivadas por medio de la reprogramación de una célula somática. Son generadas a partir de una célula adulta diferenciada procedente de un tejido, a la que se induce la expresión de varios genes exógenos, como Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4, proceso denominado reprogramación (Figura 6).

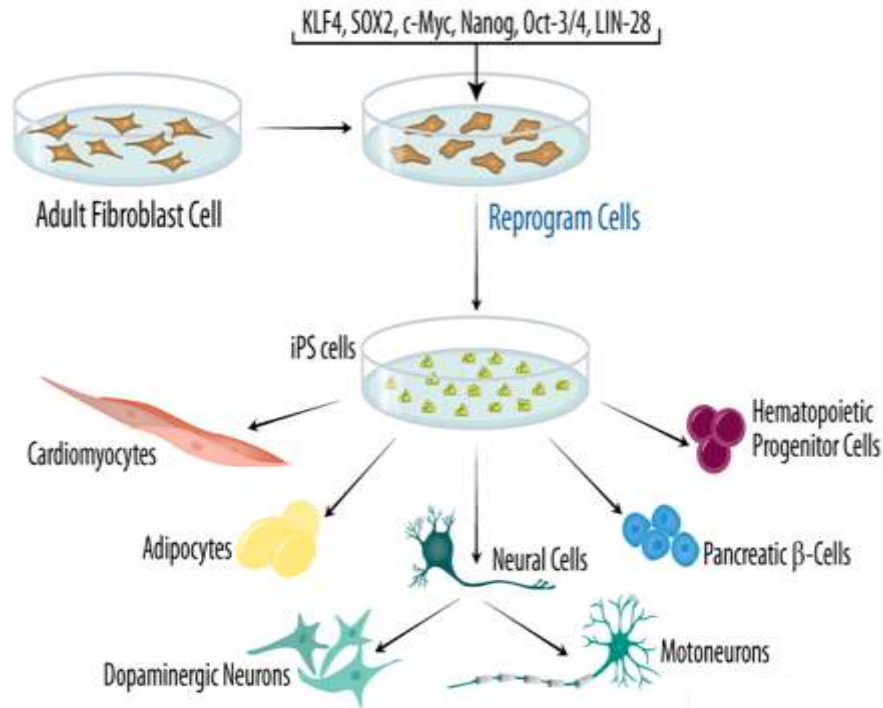


Figura 6. Células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs). Se generan mediante por reprogramación de células somáticas adultas. Después del aislamiento, las células somáticas se cultivan *in vitro* y se transfectan con vectores de expresión que codifican factores de transcripción asociados con la pluripotencia. Para la mayoría de los tipos celulares se utilizan cuatro factores (c-Myc, Oct-3/4, Sox2 y Klf4), aunque también se han utilizado con éxito otras combinaciones (Oct-3/4, Sox2, Nanog y LIN-28). La expresión de los factores exógenos desencadena un proceso gradual silenciando marcadores del fenotipo diferenciado e induciendo marcadores del estado pluripotente. Como células pluripotentes, las iPSCs tienen la capacidad de generar todos los tipos de células de las tres capas embrionarias. Las células iPSCs humanas se han diferenciado en diversas células somáticas, incluyendo adipocitos, cardiomiocitos, células hematopoyéticas primitivas, células β -pancreáticas y varios tipos de células neuronales (RandBSystems, 2016).

Las células pluripotentes inducidas son capaces de diferenciarse en células de tejidos pertenecientes a las tres capas germinales de un embrión: endodermo, mesodermo y ectodermo, de formar teratomas y ratones quiméricos. Se ha demostrado que las células iPSCs son idénticas en

muchos aspectos y diferentes en otros a las células troncales embrionarias. Por ejemplo, son iguales en morfología, expresión de ciertos genes y proteínas, patrones de metilación del DNA, tiempo de duplicación celular y capacidad de diferenciación a células de otros tejidos. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual se inducen y su relación con las ESCs sigue aún en investigación (Liu et al., 2011). Y debe tomarse en cuenta que el uso de las iPSCs tiene menos consideraciones éticas que las ES, además de que las iPSC tienen menor predisposición de formar teratomas

En 2006, se demostró que células troncales con propiedades similares a las ESCs podrían generarse a partir de fibroblastos de ratón mediante la introducción simultánea de cuatro genes, Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc (Takahashi et al., 2006). Estas células fueron denominadas células troncales pluripotentes inducidas. En el año 2007 se introdujeron en fibroblastos humanos los mismos factores de transcripción (factores de Yamanaka) para generar las primeras iPSCs humanas (Takahashi et al., 2007).

Las iPSCs se han derivado de un número de especies diferentes, incluyendo seres humanos, ratas y monos rhesus, mediante la expresión de los cuatro factores de Yamanaka, demostrando que las características fundamentales de la red transcripcional que rige la pluripotencia permanece conservada durante la evolución. De forma similar, las iPSCs se han generado de diferentes poblaciones de células somáticas, tales como queratinocitos, células neuronales, melanocitos, células β -pancreáticas y linfocitos diferenciados terminalmente mostrando la versatilidad y universalidad de la pluripotencia inducida (Stadtfield et al., 2010).

Los estudios en fibroblastos sugieren que los mecanismos de la reprogramación siguen una secuencia organizada de eventos, que comienza con la regulación negativa de marcadores somáticos (Stadtfield et al., 2008) y cambios morfológicos que conllevan una transición mesénquima-epitelio (MET), mediante la inactivación de genes como la E-cadherina y la señalización del receptor de la proteína morfogénica de

hueso (BMP) (Samavarchi-Tehrani et al., 2010). Estos eventos son seguidos por la activación de los primeros marcadores de pluripotencia como el Antígeno Embrionario de Estado Específico (SSEA-1), fosfatasa alcalina y la proteína 15 de la familia F-box (Fbox15) antes que expresen genes de pluripotencia auténticos como Nanog u Oct4 y las células se independicen de la expresión del factor exógeno (Brambrink et al., 2008). Cabe destacar que la adquisición de pluripotencia puede no ser completa tras la independencia de la expresión del factor exógeno y la activación de los genes de pluripotencia endógena, y puede continuar durante varias rondas de división celular (Marion et al., 2009; Polo et al., 2010). Otro paso importante es la activación de factores endógenos entre los que se encuentra la desrepresión epigenética del locus del gen Nanog endógeno por los factores de reprogramación (Figura 7).

El gen Nanog y otros genes relacionados con el carácter pluripotente se activan tardíamente durante la reprogramación y por lo tanto representan un paso limitante para la conversión eficiente de las células somáticas en iPSCs. La sobreexpresión simultánea de Nanog (Hanna et al., 2009), así como de otros factores transcripcionales asociados a la pluripotencia como Tbx3 (Hanna et al., 2010) y Sall4 (Tsubooka et al., 2009) a la par del uso de los factores exógenos de reprogramación Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc mejoran y aceleran la reprogramación.

Los promotores de genes de pluripotencia como Nanog y Oct4 son silenciados de forma estable por el proceso de metilación del DNA en células somáticas (Gidekel y Bergman, 2002), lo que probablemente interfiere con la unión del factor de transcripción y la activación de los genes durante la reprogramación. No es claro cómo se supera este obstáculo durante la generación de las iPSCs, pero se han postulado mecanismos basados en la desmetilación del DNA (Hochedlinger y Plath, 2009). Así mismo, las vías de muerte celular, como la vía de p53, tendrían que ser inactivadas para asegurar la supervivencia de las células (Jackson-Grusby et al., 2001). En

apoyo a esta hipótesis, los fibroblastos sometidos a la reprogramación han demostrado la capacidad de inactivar la vía de inhibición de ciclinas relacionada con el control del ciclo celular.

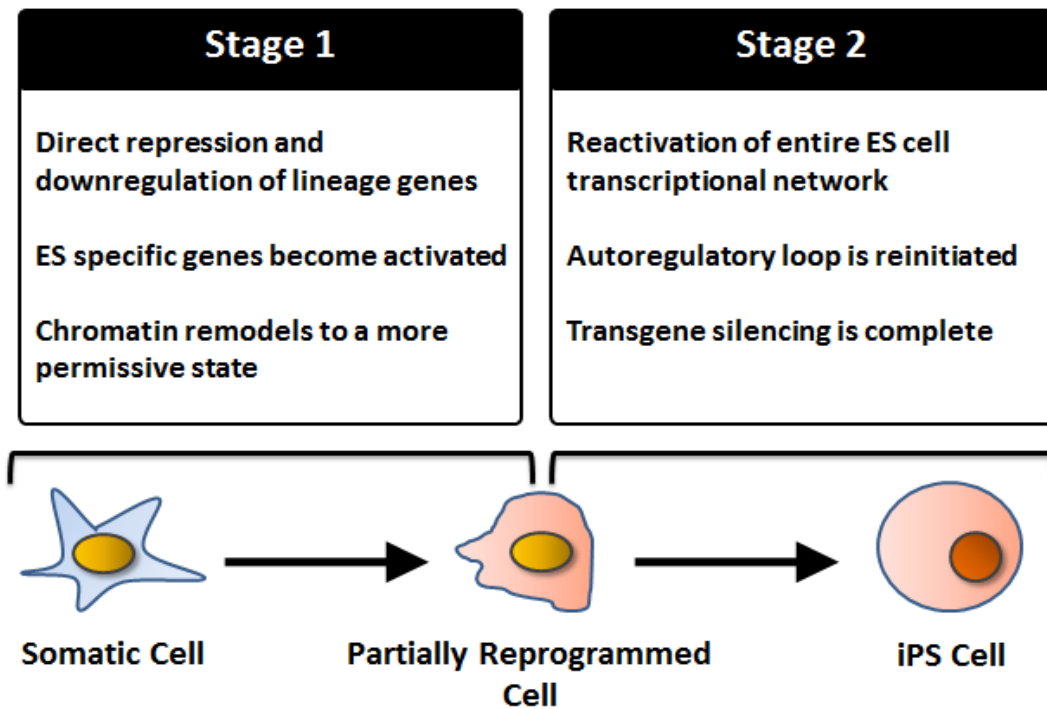


Figura 7. Proceso de dos estados de reprogramación de células somáticas. Se ha propuesto una división de La reprogramación en dos etapas. En una primera fase, Oct4 y Sox2 reprimen los genes asociados con el linaje de la célula somática y re-establecen el epigenoma de la célula hacia un modo de cromatina permisiva colocando a la célula en un estado tipo embrionario. La segunda etapa permite que los factores de reprogramación reactiven el proceso auto-regulatorio endógeno que desencadena la red transcripcional de pluripotencia (Perla Cota, 2013).

Una pregunta por abordar es si la reprogramación de las iPSCs interviene en el desarrollo normal de las células diferenciadas, y si el fenómeno de reprogramación conlleva a estados similares a los progenitores antes de adquirir la pluripotencia. La aparición de células parcialmente

reprogramadas, que exhiben fenotipos similares independientemente del tipo de células iniciales (Mikkelsen et al., 2008) argumenta contra la desdiferenciación en progenitores específicos de linaje celular. Sin embargo, una respuesta definitiva a esta pregunta requerirá el análisis de poblaciones de células somáticas bien definidas, tales como linfocitos, fibroblastos y el cultivo de células en medios que permitan la detección de poblaciones de células progenitoras potencialmente raras y transitorias.

Un proceso importante para entender los mecanismos de reprogramación es la generación de métodos eficaces sin la integración de DNA exógeno para la reprogramación de células somáticas. Se han desarrollado métodos de inducción alternativos que implican la expresión transitoria de factores de reprogramación, incluyendo adenovirus, plásmidos, transposones, virus Sendai, micro RNAs sintéticos, proteínas recombinantes y recientemente compuestos químicos. Actualmente, los vectores episómicos, los virus Sendai y los micro RNAs sintéticos se utilizan ampliamente para generar las iPSCs sin integración. Se emplean también combinaciones de medios químicamente definidos y proteínas de matriz recombinante, como vitronectina o laminina, para la generación y mantenimiento de las iPSCs humanas (Takahashi y Yamanaka, 2016). Aún existe un gran debate sobre el mejor método para la reprogramación de células somáticas en iPSCs, así como la forma de evaluar la "troncalidad" de una célula iPS en comparación con una línea de células embrionarias (Lister et al., 2011). Es importante considerar que los factores exógenos, los antecedentes genéticos y epigenéticos de origen tisular de las iPSCs, se desconocen (Hanna et al., 2010), por lo que se esperan ciertas diferencias en la epigenética de estas células y las ESCs (Lister et al., 2011). Sin embargo, el advenimiento de la reprogramación de células somáticas hacia iPSCs ha permitido generar cualquier tipo de célula de interés a partir de las propias células somáticas de un paciente y desarrollar tratamientos farmacológicos específicos para cada paciente. Por otra parte, estas técnicas ofrecen un suministro casi ilimitado

de células humanas que pueden ser depositadas en repositorios y ser compartidas entre diferentes laboratorios del mundo.

El uso de la tecnología de iPSCs recientemente desarrollada por Shinya Yamanaka y Kazutoshi Takahashi (Premios Nobel de Medicina o Fisiología, 2012), puede ser atractivo para superar retos de la investigación biomédica. Lo más relevante de las iPSCs humanas derivadas de cualquier tipo de célula somática de pacientes con alguna patología en particular, es el fondo patogénico específico del paciente, proporcionando información importante para el modelado molecular. Así, las iPSCs son un puente entre los modelos animales y los ensayos clínicos, dado que las vías y las redes de señalización proporcionan un marco ideal para la integración de los mecanismos degenerativos involucrados permitiendo establecer nuevos blancos terapéuticos.

4.1.8 Células troncales cancerígenas (CSCs)

El cáncer es una enfermedad heterogénea dada la variabilidad celular intratumoral, lo que contribuye al fracaso de la terapia y la progresión de la enfermedad (Hanahan et al., 2011). Un tumor no es un conjunto de células malignas homogéneas, sino un ecosistema complejo que contiene células tumorales, así como diversos tipos endoteliales infiltrantes, hematopoyéticos, estromales y otros, que pueden influir en la función del tumor en su conjunto (Figura 8). Estos tipos de células extrañas pueden influir directamente en las células tumorales y crear cambios metabólicos como un entorno hipóxico y fluctuaciones de nutrientes, contribuyendo a la función heterogénea de las células malignas (Junttila et al., 2013).

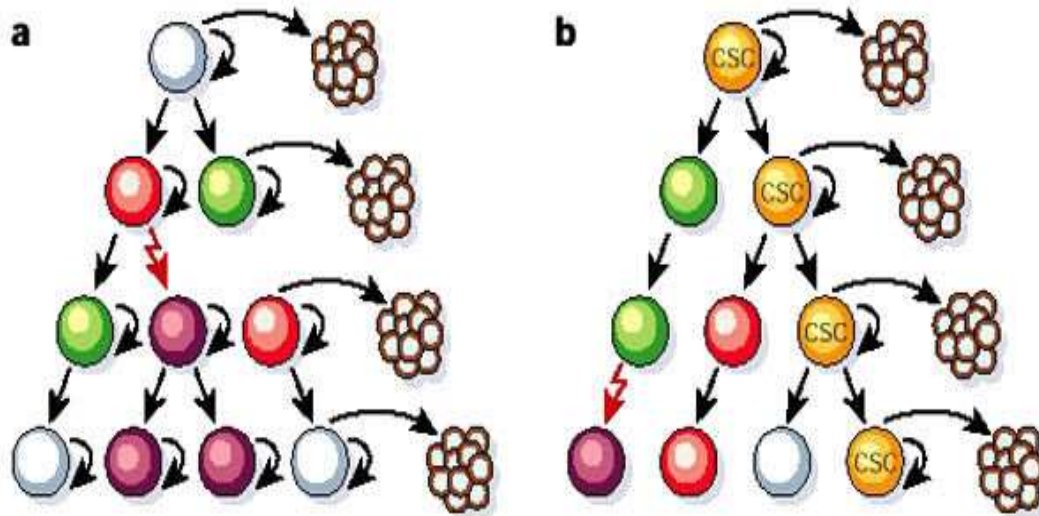


Figura 8. Modelos de heterogeneidad en células cancerígenas. Las células cancerosas de muchos fenotipos diferentes tienen el potencial de proliferar ampliamente, pero cualquier célula tendría una baja probabilidad de exhibir este potencial en un ensayo de clonogenicidad o tumorigenicidad. La mayoría de las células cancerosas sólo tienen un potencial proliferativo limitado, pero un subconjunto de células cancerosas prolifera constantemente en ensayos clonogénicos y pueden formar nuevos tumores al ser trasplantadas. El modelo de células troncales cancerígenas mostrado en la figura b predice que un subconjunto distinto de células se enriquece por la capacidad de formar nuevos tumores, mientras que la mayoría de las células pierden esta capacidad. Los enfoques terapéuticos existentes se basan en gran medida en el modelo mostrado en a para células cancerígenas sin propiedad de clonogenicidad (Reya et al., 2001).

Las múltiples investigaciones sobre el cáncer están proporcionando una mayor comprensión de los mecanismos subyacentes de la heterogeneidad tumoral y de los mecanismos relacionados con la resistencia a la terapia, la progresión del tumor y la recurrencia. La secuenciación genómica avanzada ha mostrado que el cáncer es una mezcla heterogénea de células genéticamente distintas generadas por la división y ramificación celular (Burrell et al., 2013; Greaves et al., 2012). Existen evidencias que relacionan las vías de desarrollo y las modificaciones epigenéticas (metilación del DNA, modificación de las histonas, apertura de la cromatina y micro RNAs (miRNA)) como las causas principales de la heterogeneidad funcional. Estos

procesos se atribuyen generalmente al mantenimiento de jerarquías de células troncales de tejidos normales (Figura 8) (Meacham et al., 2013; Nguyen et al., 2012). De forma similar, los determinantes no genéticos crean tejidos tumorales organizados jerárquicamente donde existe una subpoblación de células cancerígenas troncales autorrenovables mantenimiento el número de células cancerígenas en el tumor. No obstante, sigue existiendo una gran controversia sobre qué tipos de tumores están jerárquicamente organizados y cómo definir mejor las CSCs.

Las CSCs, como las células troncales de tejido normal, poseen capacidad de autorrenovación; sin embargo, la autorrenovación está típicamente desregulada en las CSCs. En numerosos tipos de cáncer, las CSCs representan una población distinta que se puede aislar del resto de las células tumorales, presentando repoblación celular a largo plazo (Nguyen et al., 2012). Sin embargo, en algunos tipos de cáncer no ha sido posible distinguir CSCs de las no CSCs porque la mayoría de las células cancerosas tienen característica de troncalidad. Tales tumores parecen ser homogéneos, en la actualidad existe evidencia con respecto a ciertas células cancerosas al poder transitar entre estado de troncalidad hacia uno cancerígeno. Por lo tanto, a pesar de que algunos tumores no pueden ser organizados en una jerarquía rígida, el estado de troncalidad contribuye a una variedad de funciones que permiten a las células sobrevivir a la terapia anti-cáncer, siendo las CSCs las contribuyentes principales al fracaso de la terapia, independientemente si son poblaciones únicas de CSCs o células troncales en transición cancerígena.

Con base en ensayos funcionales de células iniciadoras de tumores o células iniciadoras de leucemias con capacidad de proliferación, renovación y por sus similitudes, se establecen las siguientes características de una CSC (Clarke, 2006):

1. Generar un xenoinjerto que sea representativo del tumor original.
2. Autorrenovarse a partir de diluciones clonales en ensayos de xenoinjerto.
3. Generar células hijas que pueden poseer capacidad proliferativa, pero incapaces de establecer o mantener el clon tumoral tras varios pasajes.

4.1.9 Diferenciación de células troncales a linaje neural

El mantenimiento de la pluripotencia de las células troncales permite que se multipliquen continuamente en cultivo mientras se previene la diferenciación a otros linajes celulares. Cualquier interrupción del sistema de soporte de pluripotencia (por ejemplo, retirando factores claves del medio de cultivo o forzando a las células troncales a crecer en suspensión) promueve la diferenciación espontánea a varios linajes celulares. Debido a la naturaleza estocástica de la diferenciación espontánea de las células troncales se generan otros tipos de células; por lo tanto, la diferenciación espontánea no es un método eficiente para generar células neurales. Por lo tanto, se requieren ciertos factores que dirijan de manera específica la diferenciación de dichas células al linaje neuronal. La adición de factores instructivos y la eliminación de factores preventivos forman la base de la diferenciación dirigida dando como resultado un mejor rendimiento de células progenitoras neurales. Una vez que las células troncales se diferencian a células neurales mantienen la expresión de Sox2 y comienzan a expresar otros marcadores neuroepiteliales como Nestina, Sox1, Sox3, PSA-NCAM y MUSASHI (Dhara et al., 2008).

Se han utilizado diferentes factores o moléculas de señalización, suplementos/aditivos y medios condicionados para diferenciar células troncales a linajes neurales (Carpenter et al., 2001), si bien se desconoce el papel específico de muchos de los componentes (como suplementos de medios de cultivo) en la promoción de la diferenciación. La diferenciación neural a partir de células troncales proporciona conocimientos sobre los mecanismos implicados en la diferenciación de células troncales permitiendo una mejor comprensión de la señalización global que subyace a dicha diferenciación *in vitro*. Los inductores y vías de señalización exploradas incluyen el ácido retinoico, Wnt/ β -catenina, TGF/BMP, Notch, FGF, citocinas, Sonic Hedgehog, JNK/MAPK y la vía de las neurotrofinas, entre otros (Figura 9) (Chuang et al., 2015), lo que permite la exploración de la biología de las células troncales y su aplicación en medicina regenerativa (Zimmerman et al., 1996).

4.1.10 Marcadores de diferenciación neuronal

La neurogénesis en el hipocampo adulto es un proceso dado por la división de una célula precursora y un proceso de múltiples etapas (proliferación, diferenciación, migración, orientación e integración sináptica) que termina con la formación de una nueva neurona postmitótica funcionalmente integrada a un circuito neuronal. Durante los períodos específicos de la neurogénesis se expresan varios marcadores que se correlacionan con las etapas de diferenciación a lo largo del proceso, desde células progenitoras precoces hasta neuronas postmitóticas recién generadas. Los marcadores que se utilizan ampliamente para la investigación de la neurogénesis del hipocampo adulto son la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), Nestina, Pax6, NeuroD, molécula de adhesión celular neural polisialilada (PSA-NCAM), doblecortina (DCX), proteína de crecimiento axonal (TUC-4), β III Tubulina, calretinina, calbindina, MAP2 y NeuN. El descubrimiento y desarrollo de marcadores específicos que permiten el seguimiento en tiempo y determinar el destino de las neuronas durante la neurogénesis de manera detallada y

precisa no sólo es útil para obtener información sobre la génesis de las nuevas neuronas en el hipocampo, sino también de utilidad en el proceso de maduración neuronal *in vitro*, permitiendo el desarrollo de estrategias para la intervención terapéutica y el estudio de modelos biológicos.

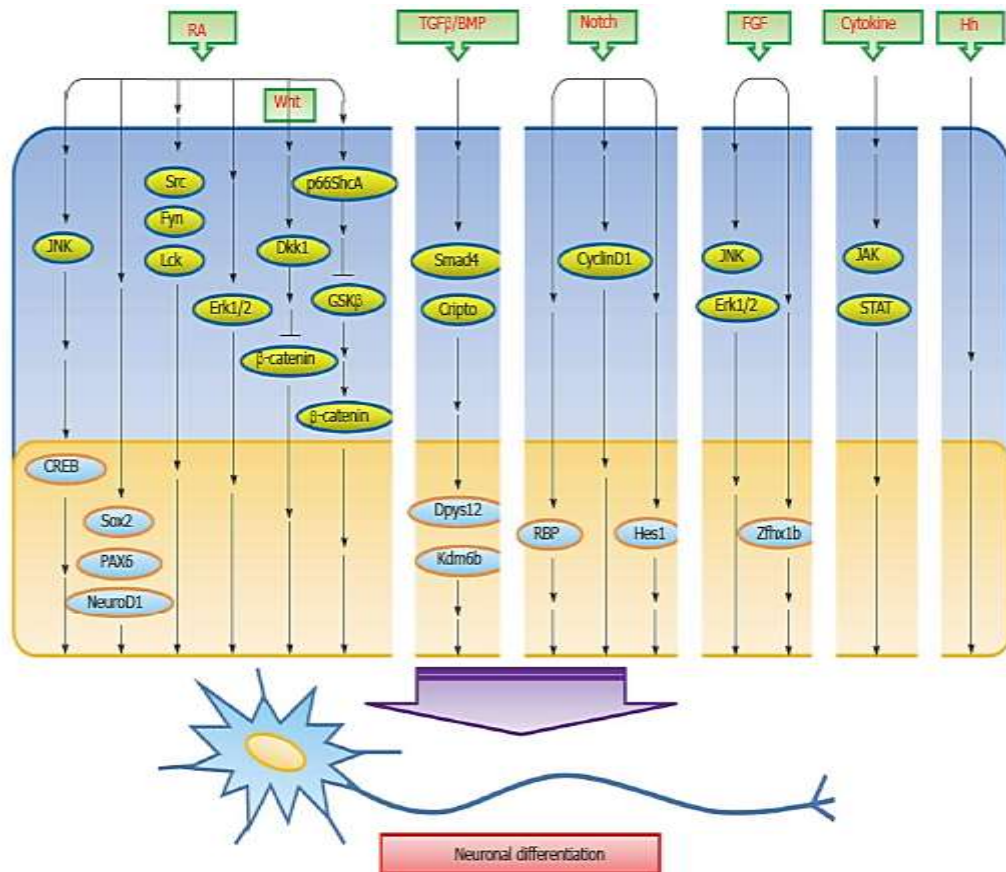


Figura 9. Vías de señalización involucradas en la diferenciación neural de células troncales. Los inductores conocidos que inducen a las células troncales a diferenciarse en fenotipos neurales son el ácido retinoico (RA), la vía Wnt/ β -catenina, el factor de crecimiento transformante (TGF), la proteína morfogénica de hueso (PMB), la vía de Notch, el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), citocinas, Sonic Hedgehog (Hh), la vía JNK/MAPK, y las neurotrofinas, entre otros. Estos inductores median la señalización de moléculas que provocan la diferenciación de las células troncales a células neurales que pueden derivar en fenotipos neuronales (Chuang et al., 2015).

El proceso neurogénico en el adulto puede dividirse en seis etapas de desarrollo (Figura 10) (Kempermann et al., 2004; Ming et al., 2005).

- Etapa 1. Las células tipo 1 son un grupo de células troncales neurales con morfología tipo glia-radial (Filippov et al., 2003), que expresan GFAP, un marcador astrocítico, y Nestina (Fukuda et al., 2003).
- Etapas 2-4. Las células tipo 1 se dividen asimétricamente (o así se pensaba que ocurría, sin embargo, de acuerdo a Álvarez-Buylla 2017, comunicación personal (Obernier et al., en preparación), no existe evidencia de división asimétrica en las células troncales neurales, NSCs, y éstas se van consumiendo conforme se generan células tipo C y una pocas se dividen de forma simétrica. Además una vez divididas entran en un segundo período de quiescencia y son esporádicamente reactivadas para generar las neuronas del bulbo olfatorio meses después de autorenovarse), generando células hijas denominadas células tipo 2, que formarán posteriormente tres tipos consecutivos de células progenitoras, las que pueden caracterizarse por la capacidad de proliferación, morfología específica y diferenciación neuronal gradualmente creciente (Gould et al., 1992; Parent et al., 1997). Las células tipo 2 son GFAP negativas y más proliferativas (Kronenberg et al., 2003). A partir de éstas se generan dos subtipos: las tipo 2a, Nestina positivas y GFAP positivas o negativas (marcadores de neuronas inmaduras); las tipo 2b, Nestina y doblecortina (DCX) positivas (Brown et al., 2003), y las células tipo 3, las cuales expresan la molécula de adhesión de células neurales polisialiladas (PSA-NCAM), son DCX positivas y Nestina negativas (Brandt et al., 2003). Así, los tres tipos de células (2a, 2b y 3) comparten algunas características durante las tres etapas que se clasifican dentro del linaje neuronal.
- Etapa 5. Después de las tres etapas anteriores, las células son inducidas a finalizar el estado proliferativo y entrar a una etapa postmitótica iniciando el desarrollo neuronal temprano y expresando marcadores de neuronas inmaduras como DCX y calretinina (Li et al., 2002).

- Etapa 6. Esta es la etapa de las células maduras, que en última instancia expresan MAP2, calbindina y NeuN. Las nuevas células son positivas a calretinina y se transforman en células calbindina positivas.

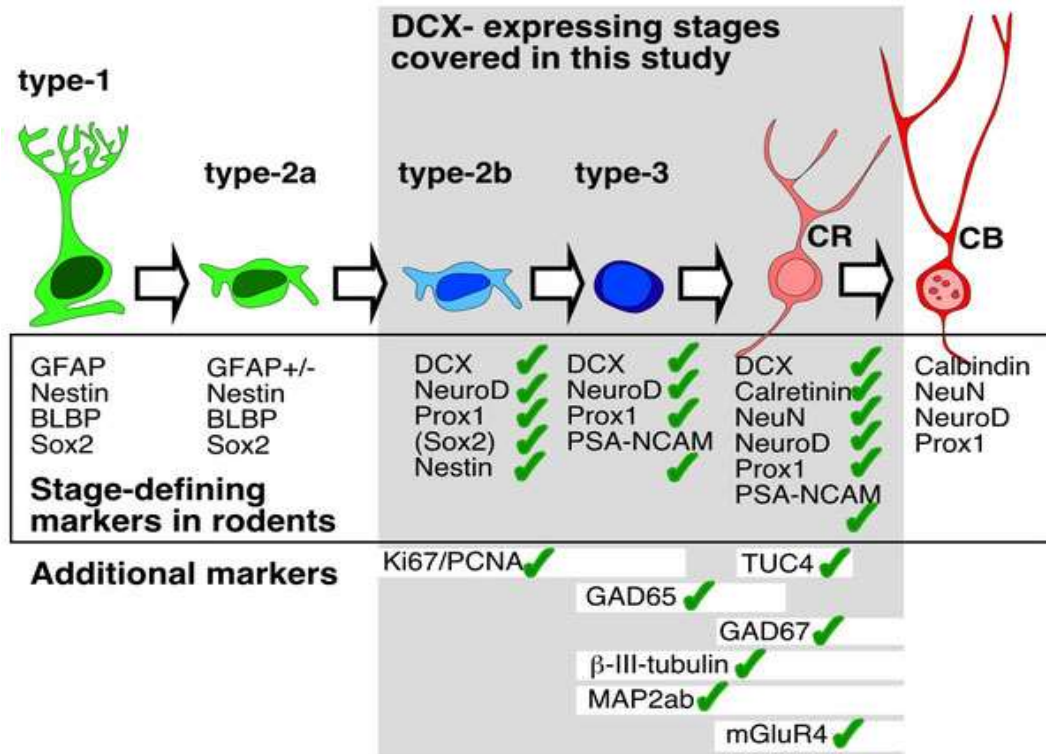


Figura 10. Marcadores de diferenciación neuronal en el hipocampo adulto. Los marcadores que se utilizan ampliamente en la investigación de la neurogénesis del hipocampo adulto son la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), Nestina, Pax6, NeuroD, PSA-NCAM, doblecortina (DCX), TUC-4, Tuj-1, calretinina, calbindina, MAP2 y NeuN. El descubrimiento y desarrollo de marcadores específicos que permiten el seguimiento del curso temporal y el destino de las células durante la neurogénesis de una manera detallada y precisa no sólo son útiles para obtener información sobre la génesis de las nuevas neuronas en el hipocampo, sino también para el desarrollo de estrategias para intervenciones terapéuticas mediante el estudio in vitro del proceso (von Bohlen Und Halbach, 2007).

4.1.11 Factores neurotróficos

Las neurotrofinas son importantes reguladores de la supervivencia neuronal, el desarrollo, la función y la plasticidad (Huang et al., 2001). El factor de crecimiento neural (NGF), el primer factor que se caracterizó, fue descubierto durante una búsqueda de tales factores de supervivencia (Levi-Montalcini, 1987). Hay cuatro neurotrofinas caracterizadas en mamíferos, el NGF, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3) y la neurotrofina-4 (NT-4), derivadas de un gen ancestral común y son similares en secuencia y estructura por lo que son denominadas colectivamente neurotrofinas (Hallbook, 1999). Los miembros de otras familias de proteínas, especialmente la familia del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y las citocinas, también regulan la supervivencia, el desarrollo y la función de las neuronas en el sistema nervioso.

Las neurotrofinas señalizan a través de los tres miembros de receptores de la familia de cinasas de tirosina (Trks, cinasas relacionadas con la tropomiosina; (Bothwell, 1995). Las neurotrofinas se unen directamente y dimerizan estos receptores dando como resultado su activación, por la autofosforilación de los residuos intracelulares del receptor. El NGF es específico para el receptor TrkA, BDNF y NT-4 son específicos para TrkB, NT-3 activa a TrkC y activa menos eficazmente a los otros receptores Trk. La señalización mediada por los receptores Trk promueve la supervivencia y/o la diferenciación en todas las poblaciones neurales (Barrett et al., 1994).

La unión de las neurotrofinas a los receptores Trk induce la fosforilación de residuos de tirosina en los dominios citoplásmicos de estos receptores. Los receptores Trk contienen diez tirosinas evolutivamente conservadas de las cuales tres (Tyr⁶⁷⁰, Tyr⁶⁷⁴ y Tyr⁶⁷⁵) controlan la actividad de cinasa (Inagaki et al., 1995). La fosforilación de estos residuos de tirosina activan al receptor, y la fosforilación de los otros residuos que promueve la señalización mediante la creación de sitios de reconocimiento por proteínas adaptadoras que contienen motivos de unión a fosfotirosina (PTB) o SH-2 (Pawson et al.,

2000). Estas proteínas adaptadoras acoplan a los receptores Trk a cascadas de señalización intracelular, que incluyen la vía de las cinasras Ras/ERK, la ruta de la 3-cinasa de fosfatidilinositol (PI3K/Akt) y la fosfolipasa C (PLC) (Figura 11) (Kaplan et al., 2000).

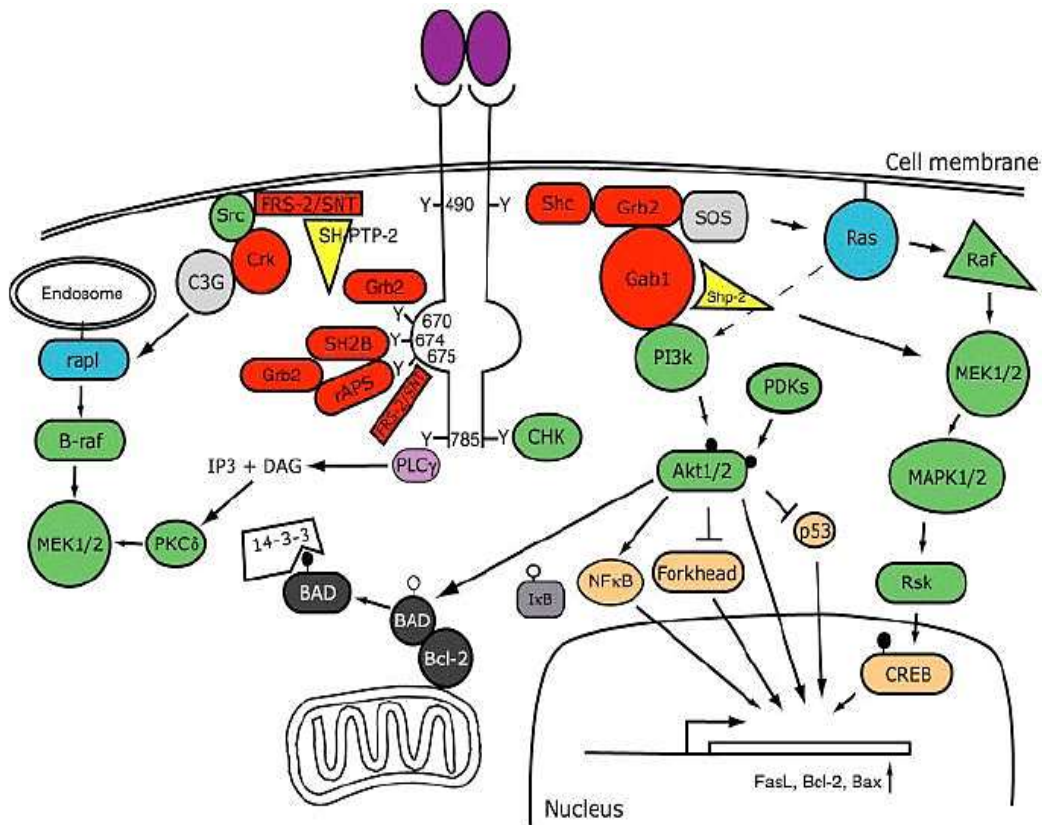


Figura 11. Vías de señalización de los receptores Trk. La unión de neurotrofinas a receptores Trk conduce al reclutamiento de proteínas que interactúan con residuos de fosfotirosina en los dominios citoplásmicos de los receptores Trk. Estas interacciones conducen a la activación de vías de señalización, como las vías Ras, 3-cinasa de fosfatidilinositol (PI3K) y fosfolipasa C (PLC), resultando en la activación de la expresión génica, la supervivencia neuronal y el crecimiento neurítico (Huang et al., 2001).

4.2 Demencia

La demencia es un síndrome de naturaleza crónica y progresiva caracterizado por el deterioro de la función cognitiva (es decir, la capacidad para procesar el pensamiento), más allá de lo que podría considerarse una consecuencia del envejecimiento normal. La demencia afecta la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y el juicio. El deterioro de la función cognitiva suele ir acompañado, y en ocasiones es precedido, por el deterioro del control emocional, el comportamiento social o la motivación.

En el mundo entero existen 47 millones de personas que padecen demencia, y cada año se registran 7.7 millones de nuevos casos (Alzheimer's Association, 2017; OMS, 2015). La OMS ha estimado que para el año 2025 la población de personas con 60 y más años de edad será aproximadamente 1.2 mil millones, un incremento del 223% de la población en 1970 y se espera que para el 2050 se triplique el número de casos de Demencia a nivel mundial (Snyder et al., 2016). La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia en países industrializados representando más del 60% de los casos (Abdulrahman et al., 2014).

La incidencia actual de demencia en México se estima en 860,000 casos, con base en la tasa de 25.55 por cada 1000 personas al año, detectando los casos de manera individual. Se espera que este número supere los 3.5 millones de personas para el 2050, sin ninguna forma de detener o disminuir la progresión (Gutierrez-Robledo et al., 2015; Prince et al., 2012; Wong et al., 2017). De acuerdo con la Sociedad Internacional de Alzheimer, se prevé que los países de América Latina presenten uno de los mayores aumentos en la prevalencia de demencia en los próximos 35 años, mayor al 400% en México, Brasil, Perú y Centroamérica entre los años 2010 y 2050 (Gutierrez-Robledo et al., 2015). Este aumento de la prevalencia de demencia en América Latina y el Caribe se ve agravado por las deficiencias en

infraestructura de salud existentes, la falta de acceso a servicios de salud y servicios sanitarios, según la Organización Panamericana de Salud.

La demencia afecta a cada persona de manera diferente, dependiendo del impacto de la enfermedad y de la personalidad del sujeto antes de empezar a padecerla. Los signos y síntomas relacionados con la demencia se pueden entender en tres etapas.

Etapas tempranas. A menudo pasa desapercibida, ya que el inicio es paulatino; los síntomas más comunes incluyen:

- Tendencia al olvido
- Pérdida de la noción del tiempo
- Desubicación espacial, incluso en lugares conocidos

Etapas intermedias. A medida que la demencia evoluciona a esta etapa, los signos y síntomas se vuelven más evidentes y más limitantes. En esta etapa las personas afectadas:

- Empiezan a olvidar acontecimientos recientes, así como los nombres de las personas
- Se encuentran desubicadas en su propio hogar
- Tienen cada vez más dificultades para comunicarse
- Empiezan a necesitar ayuda con el aseo y cuidado personal
- Sufren cambios de comportamiento, por ejemplo, dan vueltas por la casa o repiten las mismas preguntas

Etapas tardías. En la última etapa de la enfermedad, la dependencia y la inactividad son casi totales. Las alteraciones de la memoria son graves y los signos y síntomas físicos se hacen más evidentes. Los síntomas incluyen:

- Una creciente desubicación en el tiempo y en el espacio
- Dificultades para reconocer a familiares y amigos, e incluso dificultad para reconocer su propia imagen en el espejo.

- Una necesidad cada vez mayor de ayuda para el cuidado personal
- Dificultades para caminar
- Alteraciones del comportamiento que pueden exacerbarse y desembocar en agresiones

4.2.1. Enfermedad de Alzheimer (EA)

La EA está definida clínicamente por una pérdida progresiva de las funciones cognitivas, particularmente la memoria. Es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la pérdida de neuronas y sinapsis, lo que resulta en atrofia de las regiones afectadas, incluyendo degeneración en el lóbulo temporal, parietal, partes de la corteza frontal y la circunvolución cingulada (Figura 12).

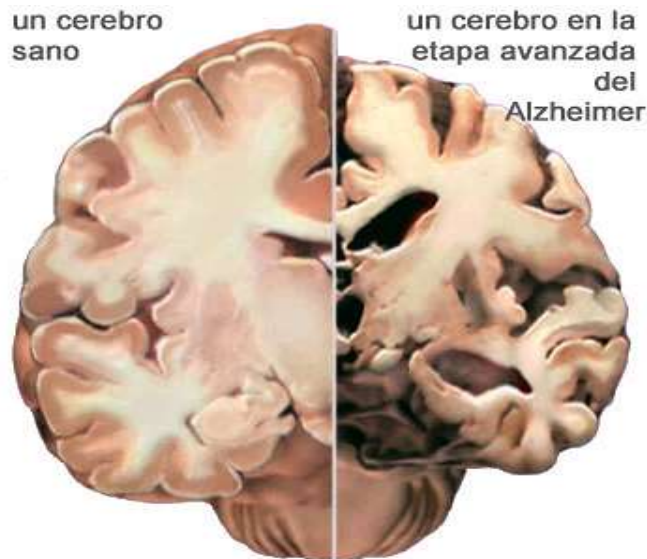


Figura 12. Cambios morfológicos en el cerebro de una persona con enfermedad de Alzheimer. La corteza cerebral se encoge, dañando las áreas del cerebro usadas para pensar, planear y recordar. El encogimiento es especialmente severo en el hipocampo, un área de la corteza con una función clave en la formación de nuevos recuerdos, y los ventrículos se vuelven más grandes (Alzheimer's-Association, 2017).

4.2.2. Etiopatogenia de la EA

Histopatológicamente se caracteriza por la presencia de dos tipos de lesiones en el cerebro: las placas neuríticas (PN) y las marañas neurofibrilares (MNFs) (Figura 13). Las primeras son depósitos compuestos por un núcleo fibrilar del péptido amiloide β ($A\beta$), producto del procesamiento de la proteína precursora amiloidea (APP), rodeado por neuritas distróficas, mientras que el segundo tipo de lesión son depósitos de la proteína tau hiperfosforilada y truncada en el extremo carboxilo, en forma de filamentos helicoidales apareados. La acumulación de estas dos lesiones lleva a la pérdida de la función neuronal y a la muerte celular (De Strooper et al., 2010; Garcia-Sierra et al., 2000).

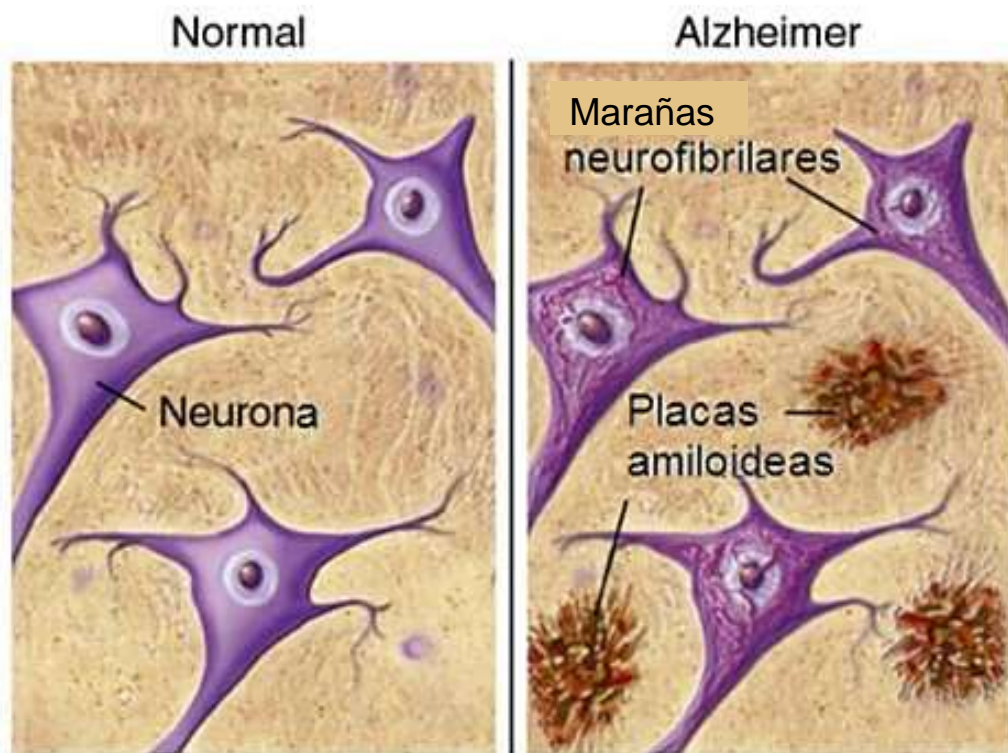


Figura 13. Etiopatogenia de la Enfermedad de Alzheimer. La histología cerebral muestra la presencia de marañas neurofibrilares intracelulares de proteína tau hiperfosforilada y agregados de la proteína amiloide β (placas amiloideas) (Pinterest, 2017).

La fisiopatología de la EA está relacionada con la lesión y muerte de las neuronas, iniciando en la corteza entorrinal y progresando al hipocampo. La hipótesis de la cascada amiloidea sugiere que la deposición de A β provoca disfunción y como consecuencia, muerte neuronal en el cerebro. El A β , es un péptido corto, subproducto proteolítico de la proteína precursora amiloidea (APP), una proteína transmembranal cuya función no está clara, pero que se cree participa en el desarrollo neuronal (Figura 14) y la plasticidad neuronal (Cardenas-Aguayo et al., 2014). Los monómeros de A β son solubles y contienen regiones cortas hojas β plegada las cuales se agregan para formar oligómeros y luego fibrillas amiloides. Estas fibrillas se depositan fuera de las neuronas en densas formaciones conocidas como placas seniles o placas neuríticas o en agregados menos densos placas difusas, y a veces en las paredes de los pequeños vasos sanguíneos en el cerebro, en un proceso llamado angiopatía amiloidea (Masters et al., 2012).

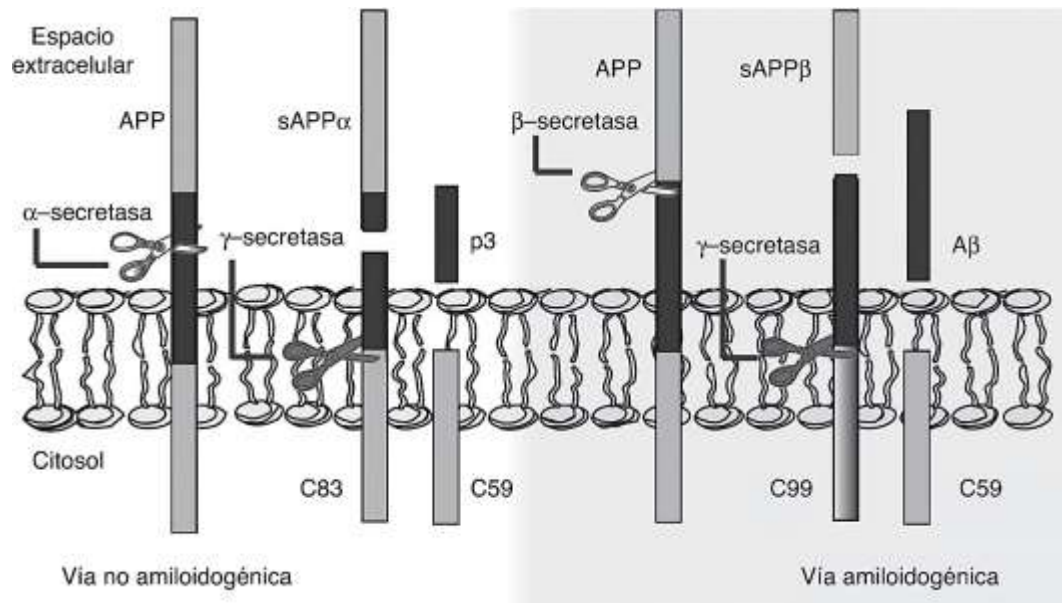


Figura 14. Procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloidea (APP). Vía no amiloidogénica con la escisión de APP por el complejo α y γ secretasa y vía amiloidogénica con la escisión de APP por el complejo β y γ secretasa. Esta última permite la generación del péptido amiloide β (A β) y la formación de placas amiloides (Rius-Perez et al., 2015).

En la EA también ocurre la agregación anormal de la proteína tau, una proteína asociada a microtúbulos que también se expresa en las neuronas, donde estabiliza los microtúbulos en el citoesqueleto celular. Como la mayoría de las proteínas asociadas a los microtúbulos, tau está normalmente regulada por fosforilación. En los pacientes con la EA, la proteína tau hiperfosforilada se acumula como filamentos helicoidales apareados formando agregados dentro de los cuerpos de las células nerviosas denominados marañas neurofibrilares (Figura 15) (Cardenas-Aguayo et al., 2014).

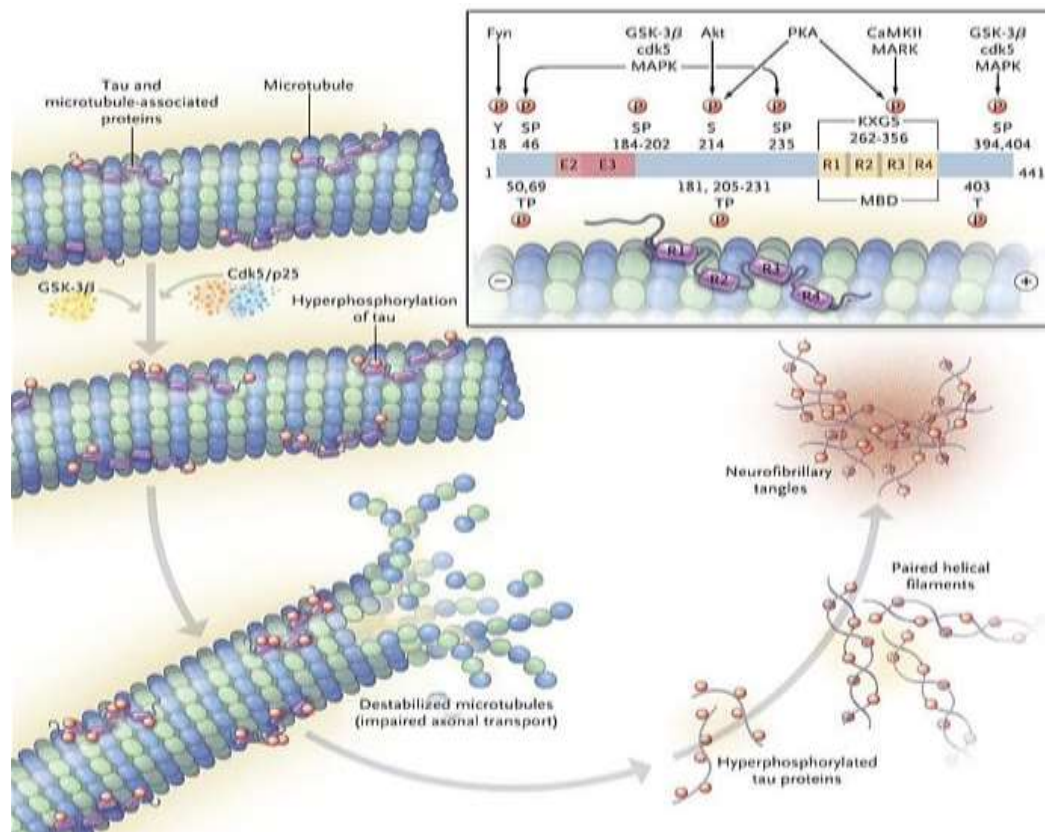


Figura 15. Hiperfosforilación de la proteína tau. La estabilización de los microtúbulos por la proteína tau está regulada por cinasas y fosfatasas. La hiperfosforilación anormal de las proteínas tau provoca una despolimerización de los microtúbulos y la formación de monómeros de tau citoplasmático insoluble, los cuales se agregan para formar oligómeros y posteriormente formar filamentos helicoidales apareados, que se ensamblan para producir las marañas neurofibrilares (Pinterest, 2017).

El mecanismo responsable de la formación de placas amiloides y de las marañas neurofibrilares aún se desconoce. Sin embargo, se sabe que inducen la lesión y la muerte de las neuronas, y como consecuencia la pérdida de memoria y cambios sintomáticos de comportamiento, así como procesos anormales como la liberación de neurotransmisores, como el glutamato que contribuye a la muerte neuronal e inflamación. La neuroinflamación también se encuentra involucrada en la compleja cascada que conduce a la patología de la EA. La respuesta inmunológica asociada a la patología por aumento de la concentración de citocinas proinflamatorias en fluidos como la sangre y el líquido cefalorraquídeo pueden ser causa o consecuencia de la EA, pero aún no se entiende completamente la inflamación dentro del cerebro, que incluye aumento de la reactividad de la microglia residente a los depósitos de amiloide, la cual se ha implicado en la patogénesis y progresión de la EA (Hampel et al., 2011).

4.2.3. Clasificación de la EA

La EA es causada por interacciones complejas entre componentes genéticos, epigenéticos y factores ambientales. Mutaciones en tres genes (APP, presenilinas (PSEN) 1 y 2, y proteína tau), son responsables de la aparición temprana de la enfermedad o Alzheimer familiar (FAD; < 60 años), las cuales explican el 1% de los casos de la EA. El envejecimiento es el factor de riesgo no genético conocido más importante para la aparición tardía de la EA (EA esporádica, SAD) (Figura 16) (Bertram et al., 2012). Los posibles factores de riesgo ambientales para la aparición tardía de la EA incluyen traumatismos craneoencefálicos, hiperlipidemia, hipertensión, homocistinuria, diabetes mellitus y obesidad. Sin embargo, varias de estas asociaciones siguen siendo controversiales. Las combinaciones del alelo ApoE4 en forma homocigota, con uno o más de estos factores de riesgo ambientales pueden aumentar la probabilidad de aparición tardía de la EA y el deterioro cognitivo relacionado con la edad (Farrer et al., 1997).



Figura 16. Clasificación de la Enfermedad de Alzheimer.

4.2.4. Modelos de estudio de la EA

La búsqueda e identificación de genes causales de la EA han resultado en la generación de más de 150 modelos de ratones transgénicos, por sobreexpresión de uno o más genes mutados de la APP humana, PSEN 1/2 o tau. Estos modelos transgénicos han permitido la comprensión de algunos mecanismos involucrados en la patogénesis de la EA y han promovido nuevos blancos terapéuticos y estrategias para el tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, ninguno refleja todas las características patogénicas y clínicas de la EA, en particular del tipo esporádico, que constituye el mayor número de los casos. Diferentes combinaciones y grados de mutaciones de genes conducen a una gran variedad de fenotipos de la EA (Bilkei-Gorzo, 2014).

A pesar de la presencia de placas de A β y la pérdida neuronal que se observa en casi todos los modelos animales (pero que no es predominante

en la neuropatología de Alzheimer), las marañas neurofibrilares sólo pueden ser generadas en las líneas de transgénicos que sobre-expresan la proteína tau humana mutada (mutación de la demencia frontotemporal). Por otra parte, la pérdida neuronal colinérgica se puede observar en varias líneas de animales transgénicos, pero la pérdida neuronal masiva en el cerebro se observa raramente en estos modelos. Así, los modelos actuales de animales transgénicos no reproducen completamente la progresión de la EA humana. Además, los animales transgénicos portadores de genes autosómicos dominantes de la EA familiar pueden tener limitaciones en el modelado de la EA esporádica debido a que no existen mutaciones asociadas a este tipo de la enfermedad (Kuhn et al., 2007).

Algunos fármacos promisorios han alcanzado la fase final de las pruebas clínicas (Fase III), pero no han prevenido el deterioro cognitivo (Doody et al., 2013; Doody et al., 2014). Las causas principales pueden ser dos: la falta de datos en individuos humanos para la estratificación con éxito (que separa la población de pacientes) de acuerdo con fenotipos de la enfermedad y/o perfiles de riesgo genético (Blennow, 2010; Wolozin, 2012), y las diferencias entre especies, ya que los factores de riesgo presentes en los seres humanos no se pueden modelar de manera adecuada en los roedores. Por ejemplo, mientras que las variantes en el gen ApoE son los factores de riesgo genético más fuertes para la EA esporádica identificados hasta la fecha (Bertram et al., 2008; Corder et al., 1993), el genoma de los roedores tiene sólo una versión de este gen.

Un importante número de modelos murinos han permitido el estudio *in vivo* de los fenotipos de la EA en el cerebro, y son la base de nuestra actual comprensión mecanicista de la enfermedad. Sin embargo, un inconveniente común a estos modelos es que típicamente sólo reproducen aspectos específicos de fenotipos de la EA, tales como placas de A β o las marañas neurofibrilares, pero no todo el espectro de la enfermedad, ya que la EA no es una enfermedad propia de murinos y sólo se presenta en seres humanos

(Webster et al., 2014). Por otra parte, la mayoría de los modelos en el ratón se centran sólo en las mutaciones causantes de la EA familiar, tales como los genes que codifican las PSEN 1 y 2, y la APP. Estos casos representan un porcentaje muy pequeño de la carga general de la EA humana.

Aunque los modelos derivados de la FAD son de gran valor la mayoría de los casos clínicos son de tipo esporádicos. Las bases genéticas de este tipo de EA pueden ser el resultado de un efecto combinatorio o aditivo de polimorfismos de nucleótido único (SNPs), identificados sólo en estudios de asociación de genoma completo (GWAS) (Lambert et al., 2013), mientras que la penetrancia de la enfermedad puede depender de una serie de factores de riesgo no genéticos, tales como la edad, traumatismos cefálicos, diabetes mellitus, el estrés cotidiano y los tóxicos ambientales, entre otros. Estudiar el impacto distinto de los SNPs asociados con la EA en modelos murinos es un reto, ya que estas variantes se encuentran a menudo en las regiones no codificantes del genoma humano.

El uso de las más recientes y rápidas técnicas de edición genómica (como CRISPR) para insertar varios SNPs en regiones homólogas del genoma del ratón sería una alternativa para estos estudios, pero enfrentarían dificultades dada la ausencia de secuencias génicas en los modelos transgénicos propias de los humanos. Se desconoce si un único SNP es la causa de la enfermedad, o si se trata de una combinación de varios SNPs. Por lo tanto, se necesitan modelos más representativos para facilitar la investigación de la EA y explorar estrategias terapéuticas más eficaces para su tratamiento (Mungenast et al., 2016).

El estudio de las enfermedades del cerebro humano se ve obstaculizado por las dificultades inherentes a la obtención de material (biopsias de cerebro) *in vivo*. La capacidad para generar cultivos neuronales a partir de cerebros humanos *post-mortem* depende en gran medida de la calidad del tejido cerebral (Verwer et al., 2002), y situaciones como la hipoxia, el coma o el daño cerebral isquémico podrían añadir variables de confusión a estos

estudios, sin mencionar la enorme dificultad de acceder a fuentes confiables de tejido cerebral humano (con tiempos *post-mortem* cortos, no mayores de 8 horas, que garanticen la integridad de la muestra).

4.2.5. Ventajas del uso de DPSCs e iPSCs en la investigación de la EA

La generación de células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs) de humanos a partir de células somáticas y la obtención de células mesenquimales humanas podrían superar las limitaciones de los modelos murinos. Se han desarrollado protocolos para diferenciar *in vitro* iPSCs a diferentes tipos de células que permiten examinar el inicio de la enfermedad y la progresión directa en un modelo de cultivo celular humano. Diversos estudios han mostrado que es posible la reprogramación de las iPSCs de fibroblastos derivados de pacientes de varias enfermedades neurológicas como la esclerosis lateral amiotrófica, la disautonomía familiar, la enfermedad de Parkinson, el síndrome de Rett, la esquizofrenia, la atrofia muscular espinal, la enfermedad de Gaucher tipo III, las distrofias musculares de Duchenne y de Becker, el síndrome de Down, la diabetes mellitus juvenil, el síndrome de Lesch-Nyhan y las enfermedades de Huntington y de Alzheimer (Liu et al., 2011; Park et al., 2008; Sandoe et al., 2013; Wren et al., 2015).

El uso de la tecnología de iPSCs recientemente desarrollada por Shinya Yamanaka y Kazutoshi Takahashi (Premios Nobel de Medicina o Fisiología, 2012), es un medio atractivo para superar estos retos de la investigación de la EA (Takahashi et al., 2006). Lo más relevante de las iPSCs humanas derivadas de cualquier tipo de célula somática de pacientes con EA, familiar o esporádico, es que contienen un fondo patogénico específico del paciente, y por lo tanto pueden proporcionar información prometedora para el modelado molecular de la neurodegeneración de la EA. Así, las iPSCs son un puente entre los modelos animales y los ensayos clínicos, dado que las vías y las redes de señalización proporcionan un marco ideal para la integración de los mecanismos neurodegenerativos. Esta estrategia es extremadamente útil para la comprensión de la patogénesis de la EA,

permitiendo la identificación clínica de blancos terapéuticos y el posible desarrollo de nuevos fármacos candidatos contra la EA (Yang et al., 2016).

Las DPSCs poseen varias ventajas sobre las células troncales mesenquimales de medula ósea (BM-MSC), como procedimientos menos invasivos para el aislamiento, mejor expansión *ex vivo* y un mayor potencial neurogénico (Govindasamy et al., 2010; Ibarretxe et al., 2012). En línea con lo anterior, las DPSCs aumentan la proliferación de células troncales/progenitoras neurales después de la inyección en el hipocampo de ratones. Además, dos estudios recientes mostraron que las DPSCs confieren más neuroprotección que las BM-MSC en modelos animales de lesiones de médula espinal e isquemia (Sakai et al., 2012). De manera interesante, medios de cultivo condicionados y secretomas derivados de las DPSCs podrían tener efectos neuroprotectores similares a los observados con los trasplantes directos de DPSCs (Inoue et al., 2013). Dado su origen en la cresta neural, la expresión del RNAm y la secreción de diversos factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF) y la neurofina 3 (NT-3) es mayor en DPSCs en comparación con las BM-MSCs.

Las DPSCs ya están siendo utilizadas como células troncales para terapias regenerativas de enfermedades óseas y en cirugías ortopédicas dada su capacidad de diferenciación en células óseas, como osteoblastos y condrocitos, procesos muy similares a los de las iPSCs para dichos tratamientos, por lo que el empleo de ambos tipos celulares (iPSCs y DPSCs) representa una estrategia prometedora para abordar y entender los mecanismos neurodegenerativos de enfermedades como la EA, en la que el acceso a muestras y los modelos murinos no han permitido visualizar la totalidad de la patología, a diferencia de los modelos derivados de células humanas.

5. Planteamiento del problema

El estudio de la EA se ha visto obstaculizado por la escases de muestras biológicas y de modelos animales que expliquen de manera adecuada y completa los efectos patológicos a nivel molecular de dicha enfermedad dada la ausencia del fondo genético en los pacientes con la enfermedad esporádica (que constituye la mayoría de los casos), por lo que aún no se tiene claro el mecanismo y las vías moleculares afectadas en la enfermedad. Los modelos experimentales derivados de roedores y muestras cerebrales humanas con tiempos *post-mortem* cortos, para garantizar la integridad de las células, plantean un reto en la comprensión molecular de la EA al añadir variables al proceso de estudio como los tiempos prolongados de obtención de la muestra cerebral, la sobre-expresión de genes, las mutaciones forzadas y el medio ambiental (o entorno) del paciente.

El advenimiento de modelos neuronales derivados de pacientes a través de la reprogramación de células somáticas para la generación de iPSCs y de nichos mesenquimales humanos como las DPSCs, permitirán comprender mejor los procesos moleculares no esclarecidos de la enfermedad, así como el posible diseño de estrategias terapéuticas para el tratamiento de la EA.

Basado en lo anterior, el presente proyecto plantea el uso de células troncales (iPSCs y DPSCs) derivadas de pacientes, para la generación de modelos neuronales que permitan evaluar proteínas de señalización intracelular y la expresión de marcadores de neurodegeneración en pacientes de la EA y controles sanos.

6. Hipótesis

La generación de modelos neuronales derivados de células pluripotentes inducidas y de células troncales mesenquimales permitirá evaluar diferencias en la expresión de marcadores de neurodegeneración y proteínas de señalización intracelular en pacientes con la Enfermedad de Alzheimer y controles sanos.

7. Objetivo general

Generar y caracterizar modelos neuronales derivados de células pluripotentes inducidas y de células troncales de pulpa dental, para evaluar proteínas de señalización intracelular y marcadores de neurodegeneración en células derivadas de pacientes con la EA y controles sanos.

8. Objetivos particulares

1. Establecer el cultivo de MSCs a partir de células de pulpa dental (DPSCs) de un paciente.
2. Caracterizar como células troncales y mesenquimales a las DPSCs mediante inmunodetección de marcadores específicos y PCR.
3. Generar mediante el uso de medios de cultivo definidos la reprogramación de las DPSCs a linaje neural.
4. Caracterizar la reprogramación a linaje neural de las DPSCs mediante inmunodetección de marcadores específicos y PCR.
5. Establecer y reprogramar cultivos de fibroblastos de pacientes con enfermedad de Alzheimer y controles de una familia italiana con una mutación en presenilina 1 (M146L) mediante transfección.
6. Establecer un cultivo de células troncales embrionarias de ratón y caracterizar su expresión de marcadores de troncalidad.

9. Materiales y métodos

9.1. Células troncales de la pulpa dental

Las DPSCs fueron de obtenidas del primer molar producto de una exodoncia rutinaria en una paciente mexicana de 46 años (sin deterioro cognitivo aparente), con consentimiento informado de la misma.

9.2. Fibroblastos de pacientes con la Enfermedad de Alzheimer y controles

Los fibroblastos de una familia italiana (1079) con la mutación M146L en la presenilina 1 y una línea de células troncales embrionarias (Tabla 3) fueron obtenidos del banco de células “Coriell Institute”.

Tabla 3. Líneas celulares obtenidas del “Coriell Institute”.

Cátalogo	Célula	Afectado o No Afectado	Especie	Género y edad	Factor de riesgo
AG07885	Fibroblasto	Afectado	Humano	Mujer-21	25 %
AG07928	Fibroblasto	Afectado	Humano	Mujer-47	50 %
AG07936	Fibroblasto	No Afectado	Humano	Mujer-69	0 %
AG08110	Fibroblasto	Afectado	Humano	Mujer-41	100 %
AG07872	Fibroblasto	Afectado	Humano	Hombre-53	100 %
AG08125	Fibroblasto	No Afectado	Humano	Hombre-64	0 %
AG23205	mESCs	No Afectado	Ratón	-	0 %

9.3. Cultivo de células troncales de pulpa dental

La pieza dental de la paciente se trasladó y mantuvo en suero fisiológico a 4° centígrados antes de la digestión para preservar el contenido celular. La pulpa dental se aisló y se sumergió en una solución de digestión (3 mg/ml de colagenasa tipo I/dispasa en DMEM-F12). Después de incubar por 45 minutos a 37 °C, con agitación cada 10 minutos, las enzimas se inactivaron con 10% de SFB y se resuspendió en medio fresco, la suspensión celular se colocó en botella de 25 cm² en medio de cultivo (DMEM-F12 con suero fetal bovino inactivado al 10%, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina) y la botella se colocó en una incubadora a 37 °C y 5 % de CO₂ en aire. Las DPSCs se expandieron hasta alcanzar 70 % de confluencia. Los pasajes celulares se realizaron con tripsina-EDTA al 0.05 %. La criopreservación se realizó en medio DMEM-F12 completo más 10 % de DMSO a -70 °C.

9.4. Cultivo de fibroblastos humanos

Los fibroblastos humanos se cultivaron en medio MEM Sales de Earl con aminoácidos no esenciales (1X), 25 mM de Hepes, 2.2 g/l de bicarbonato de sodio, 15 % de SFB no inactivado, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina. Los pasajes celulares se realizaron con 0.04% de tripsina/0.53 mM de EDTA. La criopreservación se realizó en MEM Sales de Earl completo más 5 % de DMSO A -70 °C.

9.5. Diferenciación neural de DPSCs

Las DPSCs se cultivan en DMEN-F12 completo más 10 % de SFB hasta alcanzar una densidad de 10⁶ células por botella de 25 cm² (70-80 % de confluencia). Posteriormente se realiza un subcultivo a una densidad de 200,000 células por botella de 25 cm² en medio de cultivo DMEM-F12 completo con 10 % de SFB durante 24 h, después de lo cual se cambia el medio por medio ITS 1 % (basado en el medio de cultivo reportado por Weiss

et al., 1986) (DMEM-F12, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina, 0.1 M de putresina, 10 μ M de progesterona y 1 % de una mezcla de Insulina-Transferrina-Selenio (ITS) suplementado con 5 ng/ml de bFGF y 5 ng/mL de EGF durante 3 d. A este proceso se le denomina transición y transcurridos los 3 d se realiza un subcultivo y cambio al medio de diferenciación ITS 1% más la combinación de factores neurotróficos como se indica:

- Medio ITS 1 % + 20 ng/mL de BDNF
- Medio ITS 1 % + 20 ng/mL de GDNF
- Medio ITS 1 % + 20 ng/mL de BDNF + 20 ng/mL de GDNF
- Medio ITS 1 %

Las células se mantuvieron en este medio por 5 o 35 d, con cambio de medio cada tercer día (Figura 17).

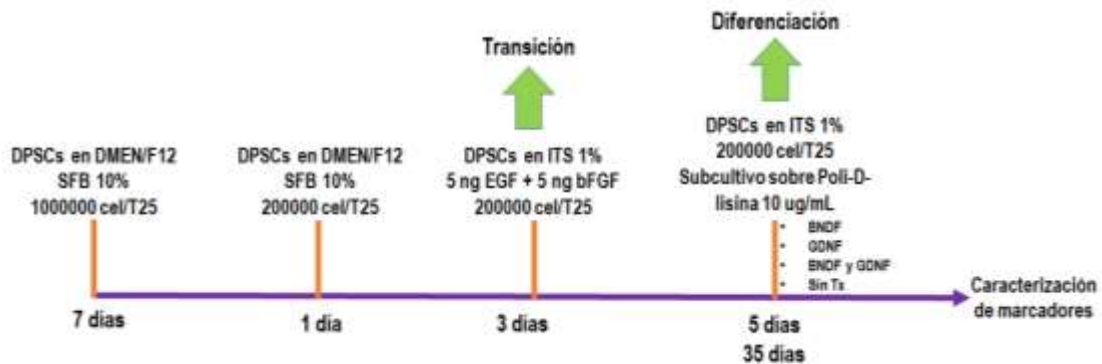


Figura 17. Protocolos empleados en la diferenciación de DPSCs a tipos neurales.

9.6. Protocolo de generación de iPSCs a partir de fibroblastos humanos

Las células obtenidas del Coriell Institute se crecieron y expandieron hasta obtener un número suficiente de pasajes en resguardo y comenzar la

experimentación con fibroblastos en pasajes 7 y 8 (Figura 18) de todas las siguientes condiciones:

- No afectado 1 (AG07936)
- No Afectado 2 (AG08125)
- Riesgo de padecer la enfermedad en un 25 % (AG07885)
- Riesgo de padecer la enfermedad en un 50 % (AG07928)
- Afectado 1 por la EA (AG08110)
- Afectado 2 por la EA (AG07872)



Figura 18. Protocolos empleados en reprogramación de fibroblastos humanos y la generación de iPSCs.

La expresión de marcadores intracelulares de vías de señalización relacionadas con la patología de la EA fue analizada por Western Blot. Las células provenientes de los individuos afectado II y no afectado 2 fueron caracterizadas por inmunocitofluorescencia para el marcador de Vimentina.

9.7. Extracción de RNA

La extracción de RNA de las DPSCs diferenciadas se realizó con el KIT Quick-RNA™ MicroPrep (Plus) de Zymo Research (número de catálogo R1057). A las células adherentes se les retiró el medio y se agregaron 100 µl de solución de lisis. Los lisados se colectaron y se centrifugaron a 12,000 rpm por 1 min. El sobrenadante se transfiere a un tubo libre de RNasas, se añade 1 volumen de etanol al 100%, se mezcla y se transfiere a una columna

Zymo-Spin con tubo colector y se centrifuga por 30 s a 12,000 rpm. Se descarta el líquido del colector, la columna se pre-lava con 400 µL de solución de lavado RNA y se centrifuga por 30 s a 12,000 rpm. Se descarta el líquido del colector y se añaden 40 µL de DNasa I (DNasa I² 5 µl + solución de digestión de DNA 35 µL) a la columna, se incuba a 25 °C por 15 min, se centrifuga por 30 s a 12,000 rpm, se desecha el líquido del tubo colector, se añaden 400 µL de solución Prep RNA a la columna, centrifugar por 30 segundos a 12,000 rpm y desecar el contenido del tubo colector. A la columna se añaden 700 µl de solución de lavado RNA, se centrifuga por 30 s a 12,000 rpm y se descarta el tubo colector. Se añaden 400 µL de solución de lavado RNA y se centrifuga por 2 min a 12,000 rpm hasta remover por completo la solución de lavado. La columna se transfiere a un tubo libre de RNasa y se colocan 15 µL de agua libre de RNasa de manera directa a la columna y se centrifuga por 30 s. El RNA eluído se almacena a -70 °C.

9.8. Retro-transcripción

Se empleó el sistema de Tetro reverse transcriptase de BIOLINE (número de catálogo BIO-65050). Las muestras se mezclaron de acuerdo con el siguiente esquema:

RNA total 5 µg	µL
Random hexámeros (40 µM)	1
10 mM mezcla de dNTPs	1
5x Buffer RT	4
RiboSafe Rnase Inhibitor	1
Tetro Reverse Transcriptase (200 u/µL)	1
Agua tratada DEPC	c.b.p. 20 µL

Incubar a 10 minutos a 25 °C seguido por otra incubación a 45 °C por 30 minutos, la reacción se detiene incubando a 85 °C por 5 minutos y se almacena a -20 °C o se emplea en la PCR.

9.9. PCR

La amplificación de los genes de caracterización de DPSCs y de diferenciación neuronal se realizó mediante el KIT de PCR de BIOLINE MyTaq™ DNA Polymerase (número de catálogo BIO-21105), bajo la siguiente reacción:

5x Taq Reaction Buffer BIOLINE	4 µL
cDNA	El requerido
Primer forward (0.1 µg/µL) (Tabla 4)	1 µL
Primer reverse (0.1 µg/µL) (Tabla 4)	1 uL
DNA polimerasa BIOLINE	0.3 µL
H ₂ O estéril grado biología molecular	c.b.p. para 20 µL
Total para 1 reacción	20 µL

Siguiendo el siguiente de ciclo de amplificación:

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	1
Desnaturalización	95 °C	45 s	2-35
Alineación	Usar la determinada	45 s	
Extensión	72 °C	45 s	

Las reacciones se visualizaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

9.10. Extracción de proteínas

Se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron con GBS (solución salina con glucosa) a 4 °C O CON PBS (solución salina amortiguada con fosfatos, pH 7.4). Se añadió RIPA frío directamente a la placa (100-150 µl por pozo para una placa de 6 pozos, o 200 µl para una caja T-25). Se incubó por 5 min sobre hielo, agitando manualmente para desprender completamente la

monocapa. El lisado se transfirió a un tubo de 1.5 ml y se congeló -20 °C por 16 h. Al siguiente día la muestra se descongeló y se resuspendió antes de centrifugar a 14,000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se tomó una alícuota para determinar el contenido de proteínas (BCA).

9.11. Western Blot

Las células se lisaron en tampón RIPA (PBS al 4X, SDS al 0.4%, NP-40 al 4%, deoxicolato de sodio al 2%, AEBSF a 1000x, aprotinina a 10 mg/ml, leupeptina a 10 mg/ml, pepstatina a 2 mg/ml, benzamidina a 500 mM, β -glicerofosfato a 50x, NaF a 1M, O-vanadato a 250 mM, EDTA a 0.5 M pH 8, EGTA a 0.5 M pH 8). Cada muestra de 10 μ g de proteína se sometió a SDS-PAGE (geles de SDS-poliacrilamida con concentración de 8 a 10%), las proteínas separadas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios (Tabla 5), seguidos de anticuerpos secundarios de acuerdo a la especie del primario, y se visualizaron usando quimiolumiscencia (ECL). Las imágenes fueron adquiridas en MicroChemi (DNR). La intensidad de la banda de proteína o mancha se analizó utilizando el software Fiji ImageJ.

9.12. Inmunocitofluorescencia

Las células se fijaron en paraformaldehído al 4 % (m/v) en buffer de fosfatos (PBS) durante 15 min y se lavó 2 veces con GBS durante 10 minutos. Las células fijas se permeabilizaron mediante incubación en Tritón X-100 al 0.25% (m/v) en PBS durante 10 minutos, la unión no específica se bloqueó incubando con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% (m/v) en PBS durante 30 minutos. Posterior las células se incubaron con anticuerpo primario toda la noche en PBS tritón y 1% BSA, posterior se lavó e incubaron los anticuerpos secundarios fluoresceínado Alexa 488 o Alexa 546 en PBS más 1% de BSA por 1 hora y los núcleos se tiñeron con DAPI a 10 μ g/ml durante o 10

minutos. Los cubreobjetos fueron montados con Fluorogel (Electron Microscopy Sciences) y se dejaron secar durante la noche.

9.13. Microscopía confocal

En cada grupo experimental, se analizaron un mínimo de 5 campos de tres experimentos de una réplica las células seleccionadas aleatoriamente, extraídas de tres diferenciaciones separadas. Las imágenes fueron capturadas bajo microscopia confocal microscopio Leica TCS SP8 los secciones en z se procesaron y analizaron utilizando FIJI ImageJ. Todas las imágenes presentadas aquí son proyecciones de intensidad máxima de estas secciones z a menos que se indique lo contrario.

Tabla 4. Oligonucleótidos de estado mesenquimal y de diferenciación neuronal

Fenotipo mesenquimal		
Primer	Secuencia 5´-3´	Amplificado
CD105_F	TGCACTTGGCCTACAATTCCA	
CD105_R	AGCTGCCCACTCAAGGATCT	
CD73_F	GCCTGGGAGCTTACGATTTTG	
CD73_R	TAGTGCCCTGGTACTGGTCG	
CD13_F	GACGCTGAGACCGTACCTC	
CD13_R	TCAGTCTTGTCAATGTCGGGG	
CD146_F	GGACCTTGAGTTTGAGTGG	
CD146_R	CAGTGGTTTGGCTGGAGT	
CD166_F	AACATGGCGGCTTCAACG	
CD166_R	GACGACACCAGCAACGAG	
CD31_F	GGTCTTGTCCGAGTATCAG	
CD31_R	ATGGCAATTATCCGCTCT	
Fenotipo Neural		
Primer	Secuencia 5´-3´	Amplificado
NESTIN_F	CGCTCGGGAGAGTCGCTT	
NESTIN_R	CCAGTTGCTGCCACCTTC	
TUB3_F	ACGCATCTCGGAGCAGTT	
TYB3_R	CGGACACCAGGTCATTCA	
GFAP_F	CCTCTCCCTGGCTCGAATG	
GFAP_R	GGAAGCGAACCTTCTCGATGTA	
NEUN_F	CCAAGCGGCTACACGTCTC	
NEUN_R	CGTCCCATTGAGCTTCTCCC	
GAPDH_F	CAACGGCACAGTCAAGG	
GAPDH_R	AAGGTGGAAGAGTGGGAG	

Tabla 5. Anticuerpos mesenquimales y fenotipo neuronal

Fenotipo mesenquimal			
Anticuerpo	Empresa	Catálogo	Dilución (WB, IF)
CD105	Genetex	GTX100508	(1:1000) (1:500)
CD73	Genetex	GTX101140	(1:1000) (1:500)
CD13	Genetex	GTX102788	(1:1000) (1:500)

Fenotipo neural			
Anticuerpo	Empresa	Catálogo	Dilución
Nestina	Genetex	GTX30671	(1:1000) (1:500)
GFAP	Sigma Aldrich	G3893	(1:1000) (1:500)
β III Tubulina	Genetex	GTX5078	(1:1000) (1:500)
NeuN	Genetex	GTX30773	(1:1000) (1:500)
MAP2	Genetex	GTX27756	(1:1000) (1:500)

10. Resultados

10.1. Cultivo de DPSCs

Se aislaron células troncales de pulpa dental de un primer molar de una donadora sana 46 años de edad, mediante digestión enzimática (colagenasa y dispasa, las cuales se cultivaron en superficie de material plástico de poliestireno en medio DMEN-F12 y 10 % de SFB. Las células presentaron morfología ahusada, consistente con su naturaleza fibroblástica, con citoplasmas grandes, poco confluentes y con disposición de orientación parcialmente homogénea a densidades altas, y proliferación a través de los pasajes celulares (Figura 19).

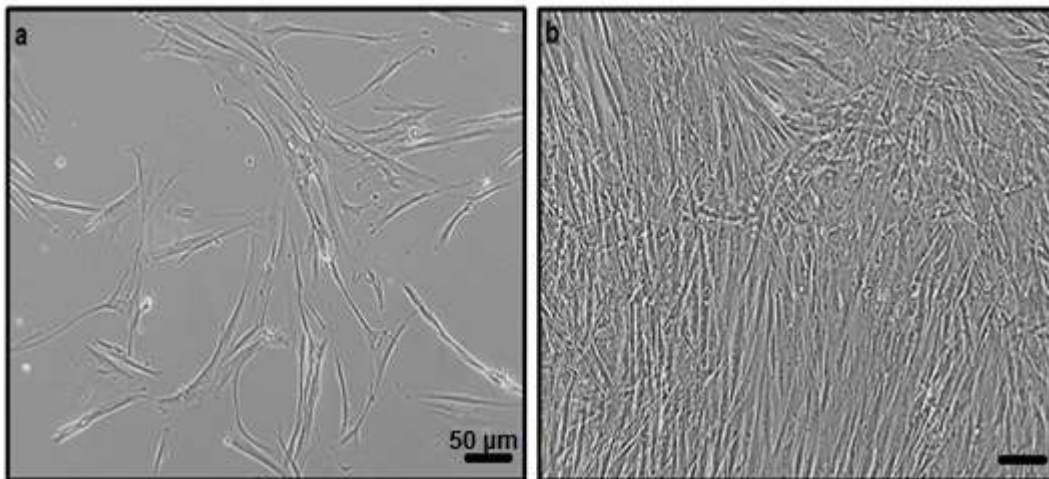


Figura 19. Cultivo de células troncales de pulpa dental. A. Después de tres días in vitro (DIV), la morfología de las DPSCs es fibroblástica, ahusada y alargada, con proyecciones citoplásmicas. B. La disposición de las DPSCs en confluencia muestra organización y crecimiento orientado a 7 DIV. Pasaje 3, 20x.

10.2. Caracterización mesenquimal de las DPSCs

Las DPSCs expresan el marcador de proliferación Ki67 y los tres marcadores de células mesenquimales para células de pulpa dental, CD105 (Endoglina),

CD73 (5'-nucleotidasa), y CD13 (alanil-aminopeptidasa) (Figura 20), así como marcadores neurales (Nestina, GFAP y β III Tubulina) evidenciando características neurales sin ser sometidas a un proceso de diferenciación neuronal (Figura 21).

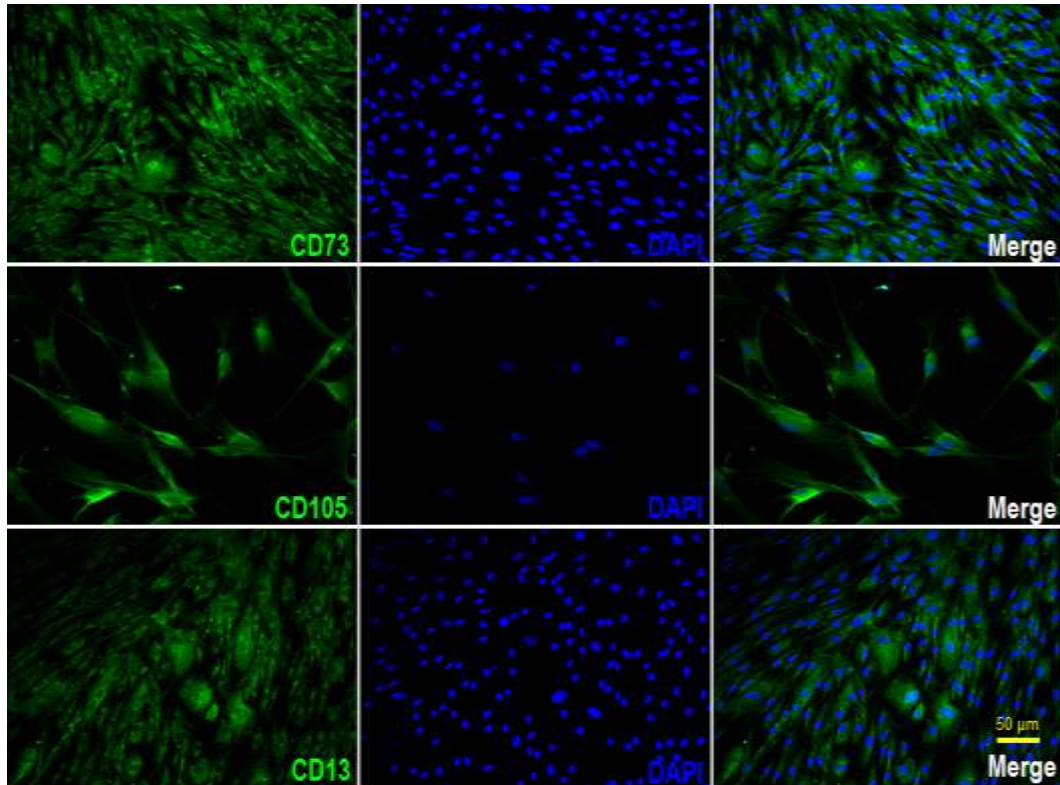


Figura 20. Marcadores mesenquimales expresados por las células troncales de pulpa dental. Las DPSCs son positivas a los marcadores CD73 (5'-nucleotidasa), CD105 (Endogлина) y CD13 (alanil-aminopeptidasa), cuya inmunorreactividad se observa en color verde. evidenciando linaje mesenquimal. Los núcleos teñidos con DAPI se observan en color azul. DPSCs p5, 5 días in vitro, 20x.

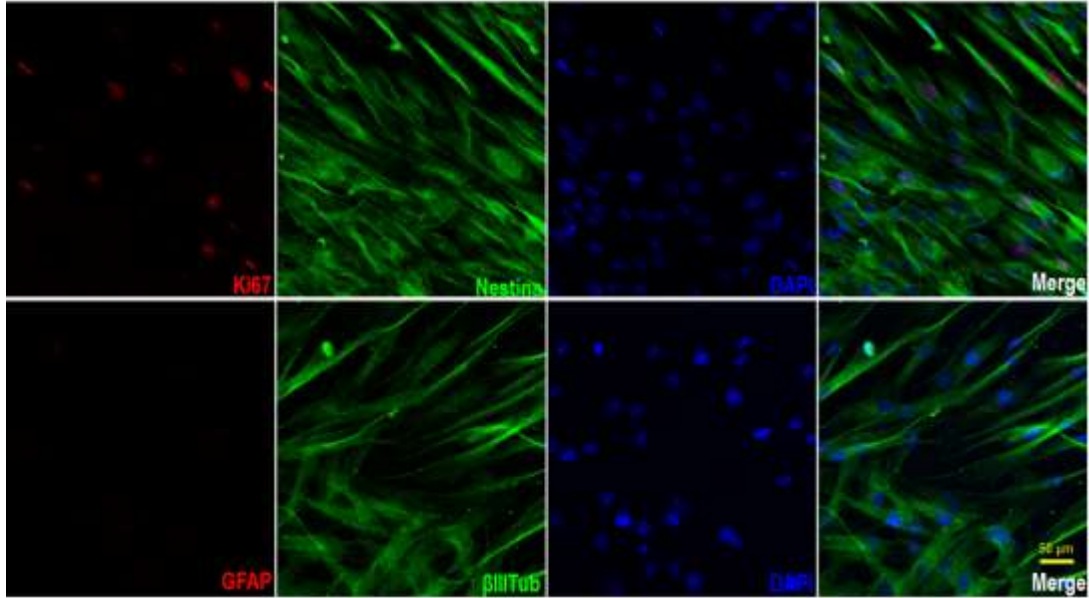


Figura 21. Marcadores neurales expresados por las DPSCs. Las células de pulpa dental presentan proliferación indicada por la expresión del marcador nuclear Ki67 (rojo), así como la expresión de marcadores tempranos de tipo neural (Nestina y β III Tubulina, verde). No se observa inmunorreactividad a GFAP. Los núcleos teñidos con DAPI se observan en color azul. DPSCs p5, 5 días in vitro, 50 μ m, 20x.

La Figura 22 muestra que la estabilidad cromosómica de la línea celular fue normal en el pasaje 7.

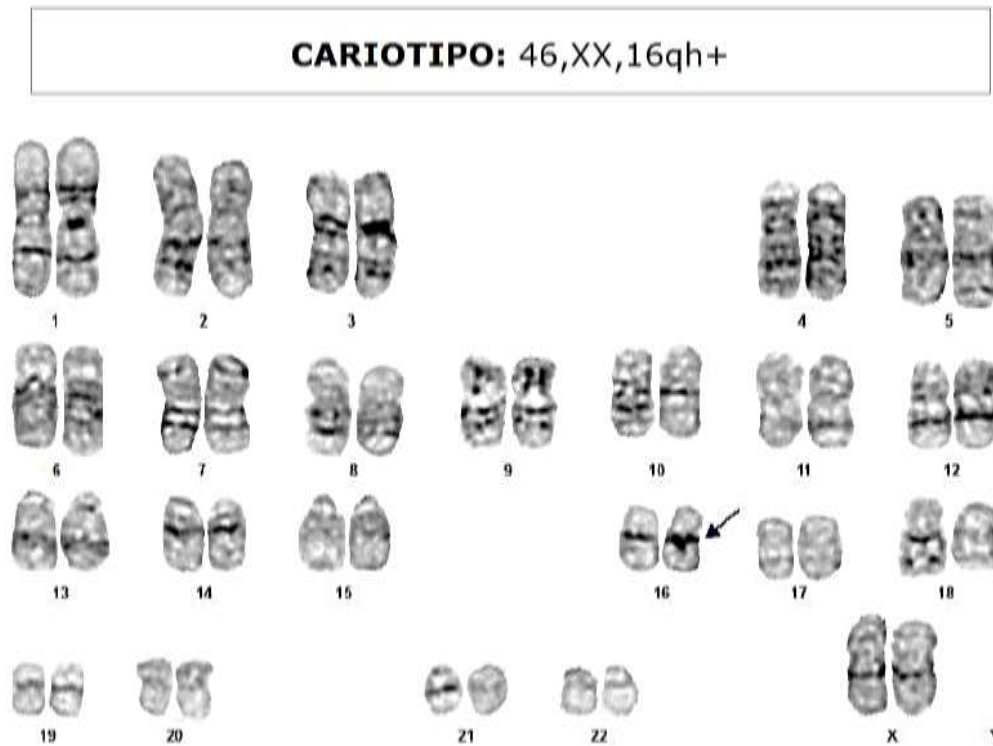


Figura 22. Cariotipo de las DPSCs en el pasaje 7. Se observa el cariotipo normal de un individuo de 46 años de sexo femenino, con número cromosómico normal (46) y aumento de heterocromatina centromérica normal en el cromosoma 16 (16qh+). Cariotipo de bandas G.

10.3. Diferenciación neuronal de las DPSCs

La incubación de las DPSCs en Insulina Transferrina Selenio 1% más 5 ng/ml de bFGF y 5 ng/ml de EGF, induce cambios en la morfología de las DPSCs (Figura 23) y el posterior subcultivo e incubación con factores neurotróficos (BDNF o GDNF) muestra morfologías de tipo precursor neural a los 5 días in vitro (Figuras 24 y 25).

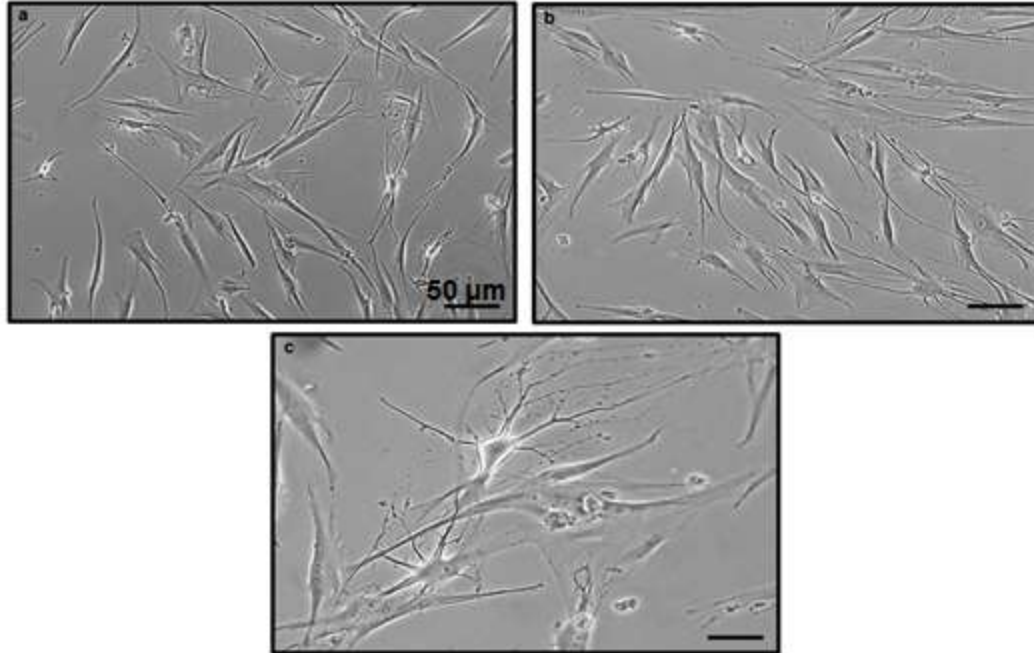


Figura 23. DPSCs cultivadas en medio de transición (ITS 1 %, 5 ng/ml de EGF y 5 ng/ml de bFGF). Las células presentan cambios morfológicos con prolongaciones de tipo neurítico, disminución del área citoplásmica y formas estrelladas. A, B. DPSCs en transición, 3 DIV, 20x. C. DPSCs en transición, 3 DIV, 20 µm, 40x.

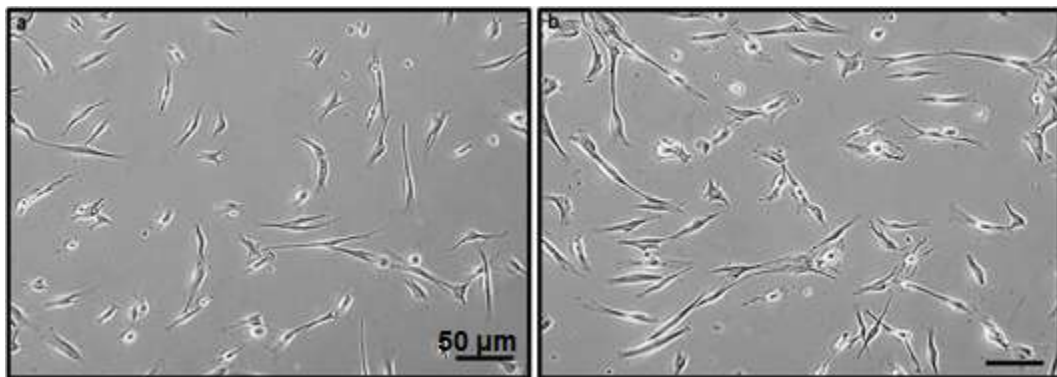


Figura 24. DPSCs subcultivadas en medio de diferenciación y factores neurotróficos (BDNF y GDNF). A. El BDNF induce morfología bipolar y prolongaciones de apariencia semejante a neuritas. 5 DIV, 100 µm, 10x. B. El GDNF induce en menor proporción crecimientos finos y neuríticos y el desarrollo de células bipolares con la presencia de formas fibroblásticas. 5 DIV, 10x.

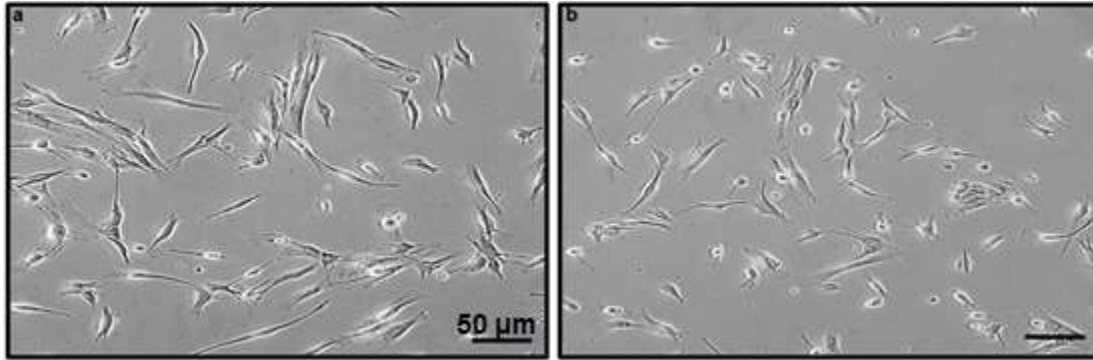


Figura 25. DPSCs subcultivadas en medio de diferenciación con factores neurotróficos (BDNF + GDNF y Medio Base ITS 1 %). A. En la combinación de los factores tróficos (BDNF + GDNF) se pueden observar morfologías neuroblásticas y fibroblastoides. DPSCs 5 días in vitro, 100 µm, 10x. (b) El ITS 1 % induce en menor proporción las formas neurales y coexisten con la presencia de formas fibroblásticas, DPSCs 5 días in vitro, 100 µm, 10x.

10.4. Caracterización por inmunofluorescencia de la expresión de marcadores de diferenciación neuronal

Las DPSCs sometidas a diferenciación durante 5 DIV con factores neurotróficos y medio basal de diferenciación (ITS 1%), mantienen la expresión de Nestina (Figura 26), β III Tubulina (Figura 27) y muestran una modesta expresión de Neurofilamento (Figura 28). Por otra parte, pierden la expresión del marcador de proliferación Ki67, y no se observa presencia del marcador glial GFAP. En las cuatro condiciones de diferenciación (BDNF, GDNF, BDNF + GDNF, ITS 1%) se observan células con prolongaciones similares a las neuritas y formaciones neuroesféricas (características de precursores neurales).

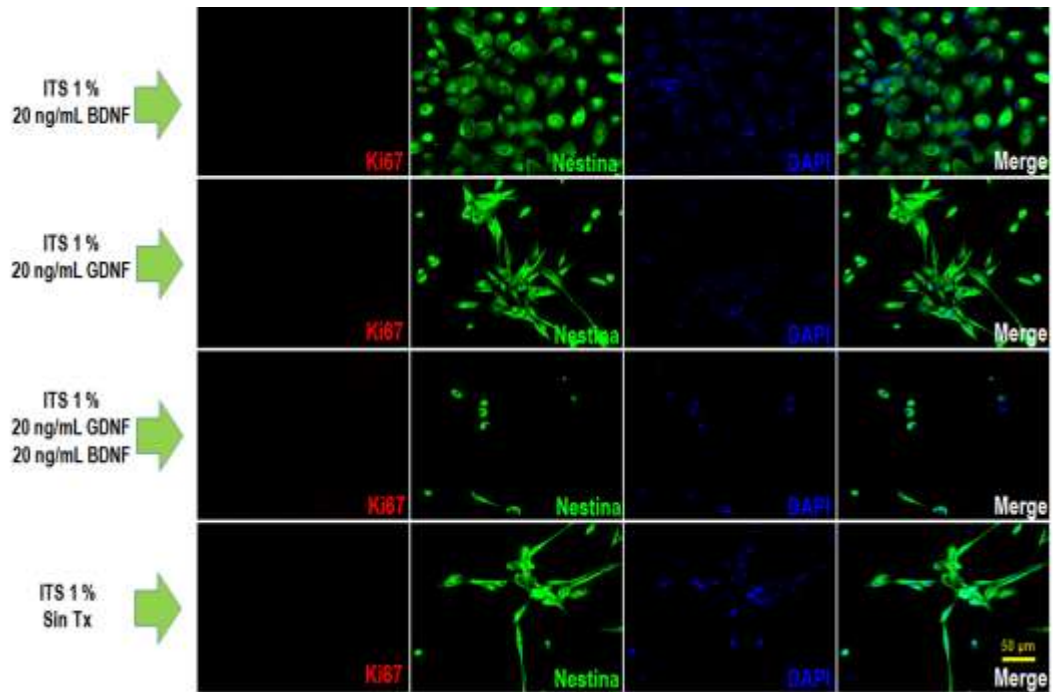


Figura 26. Inmunodetección de Nestina y Ki67 en las DPSCs a 5 DIV en medios de diferenciación. En presencia de las 4 condiciones de diferenciación (Medio ITS 1 % o medio suplementado con factores neurotróficos) la expresión de Nestina (verde) se mantiene mostrando un cambio morfológico de tipo neuroblasto, mientras que el marcador de proliferación Ki67 nuclear (rojo) desaparece, señalando un compromiso hacia la diferenciación; 20x.

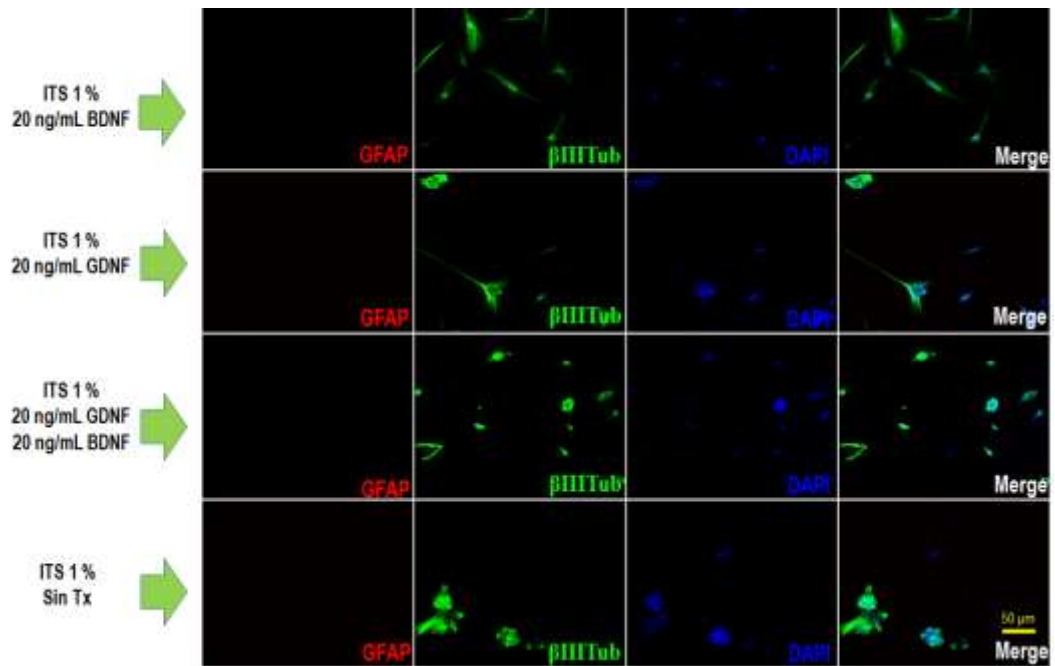


Figura 27. Inmunodetección de β III Tubulina y GFAP en las DPSCs a 5 DIV en medios de diferenciación. Las DPSCs mantienen la expresión de β III Tubulina (verde) en las 4 condiciones de diferenciación mostrando crecimientos finos, alargados y la formación de esferas. No se observa expresión de GFAP (rojo); 20x.

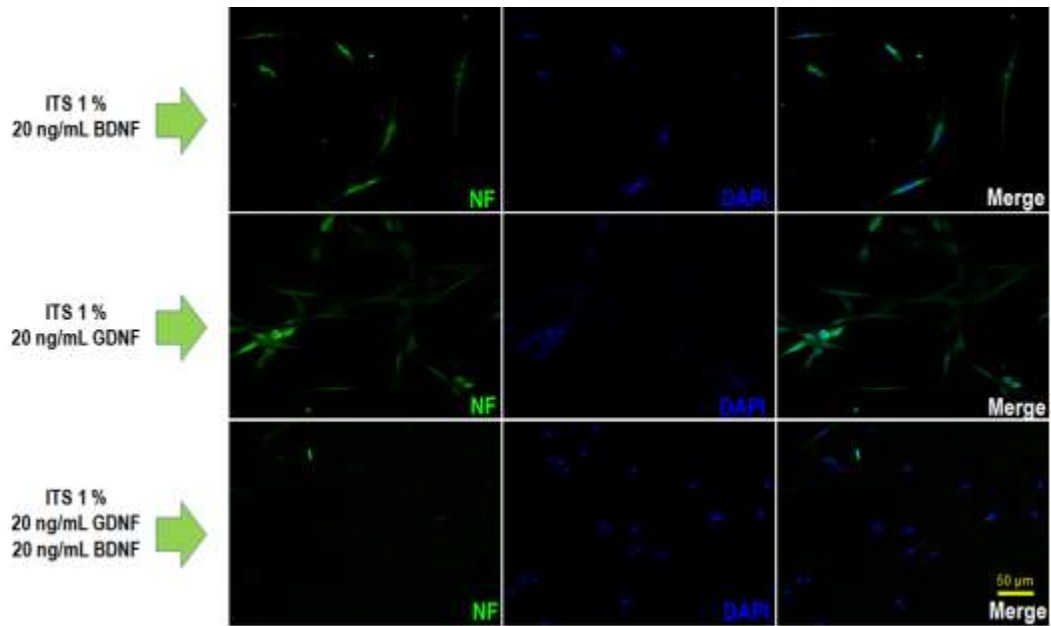


Figura 28. Inmunodetección de Neurofilamento en las DPSCs a 5 días in vitro en medios de diferenciación. Las DPSCs mantienen la expresión variada del marcador Neurofilamento en verde en 3 de las 4 condiciones de diferenciación mostrando mayores formas de tipo neural en la condición con el factor neurotrófico BDNF, 50 µm, 20x.

En experimentos preliminares se utilizó Western blot para identificar la expresión de marcadores. Las Figuras 29 y 30 muestran la detección de los marcadores de células mesenquimales CD105 y CD73 en extractos de células sometidas a diferenciación con medio definido y factores neurotróficos o medio basal (ITS 1%).

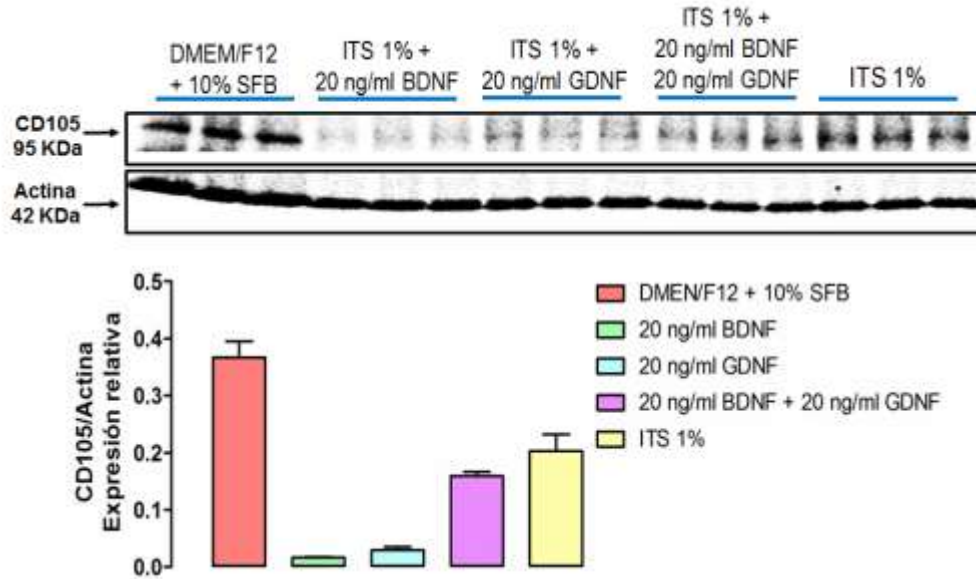


Figura 29. Expresión de CD105 por DPSCs (5 DIV). A. Inmunoblot con determinaciones por triplicado. B. Promedio \pm SEM de las determinaciones por triplicado. La densitometría se realizó con el programa ImageJ.

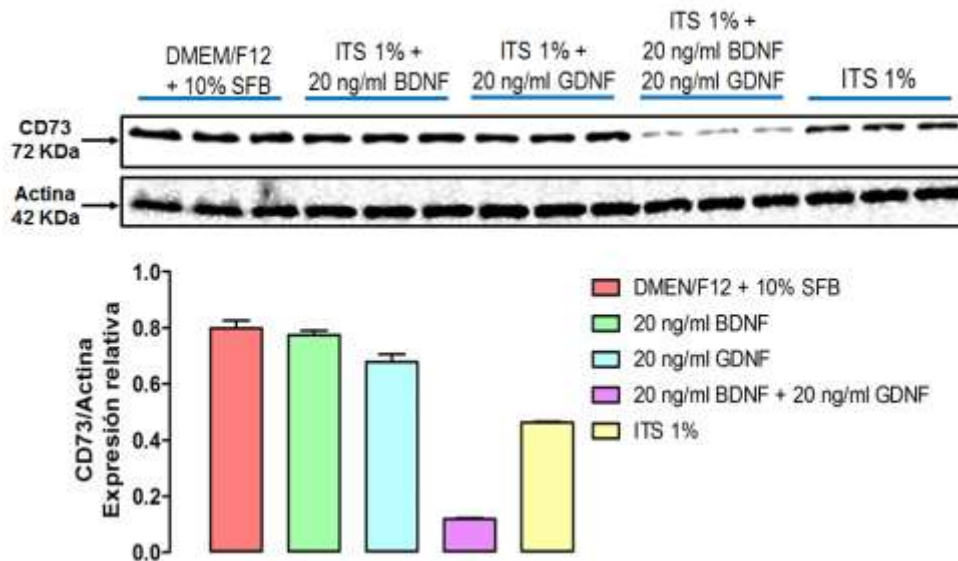


Figura 30. Expresión de CD73 por DPSCs (5 DIV). A. Inmunoblot con determinaciones por triplicado. B. Promedio \pm SEM de las determinaciones por triplicado. La densitometría se realizó con el programa ImageJ.

La Figura 31 muestran la detección de Nestina en extractos de células sometidas a diferenciación con medio definido y factores neurotróficos o medio basal (ITS 1%).

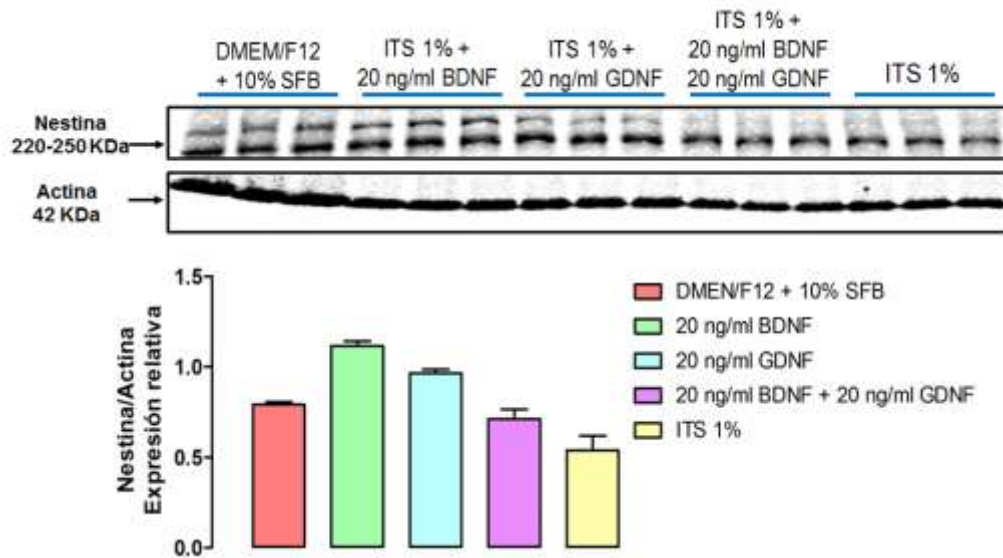


Figura 31. Expresión de Nestina en DPSCs con tratamientos de diferenciación y no diferenciadas (5 DIV). A. Inmunoblot con determinaciones por triplicado. B. Promedio \pm SEM de las determinaciones por triplicado. La densitometría se realizó con el programa ImageJ.

La Figura 32 muestra la expresión del marcador β III Tubulina en las células incubadas en medios de diferenciación y el medio basal, mientras que la Figura 33 muestra la expresión de GFAP bajo las mismas condiciones.

El marcador para la isoforma c de MAP2 muestra un incremento en las cuatro condiciones de diferenciación respecto al grupo no diferenciado en menor expresión para el factor neurotrófico BDNF y en aumento para las demás condiciones (Figura 34).

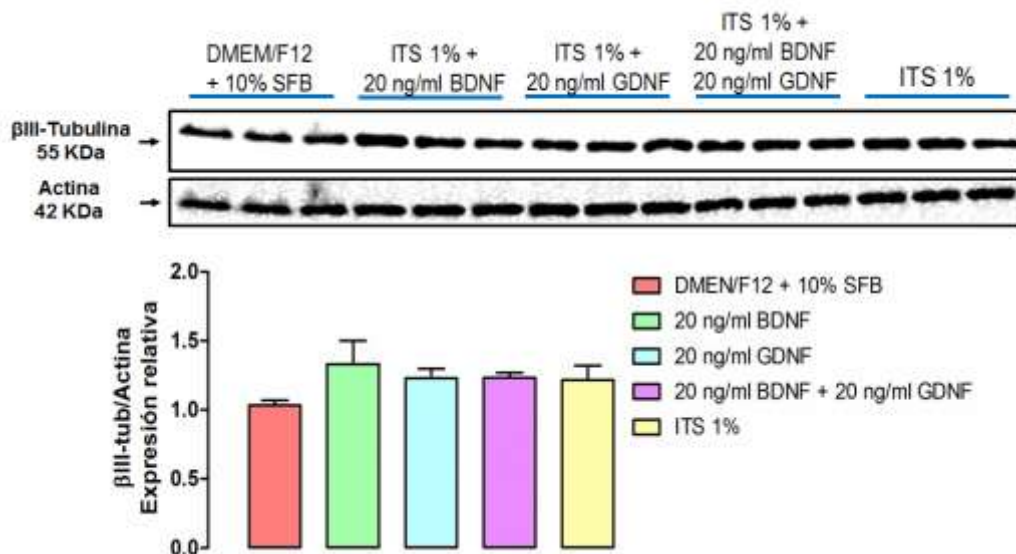


Figura 32. Expresión de β III Tubulina en DPSCs con tratamientos de diferenciación y no diferenciadas (5 DIV). A. Inmunoblot con determinaciones por triplicado. B. Promedio \pm SEM de las determinaciones por triplicado. La densitometría se realizó con el programa ImageJ.

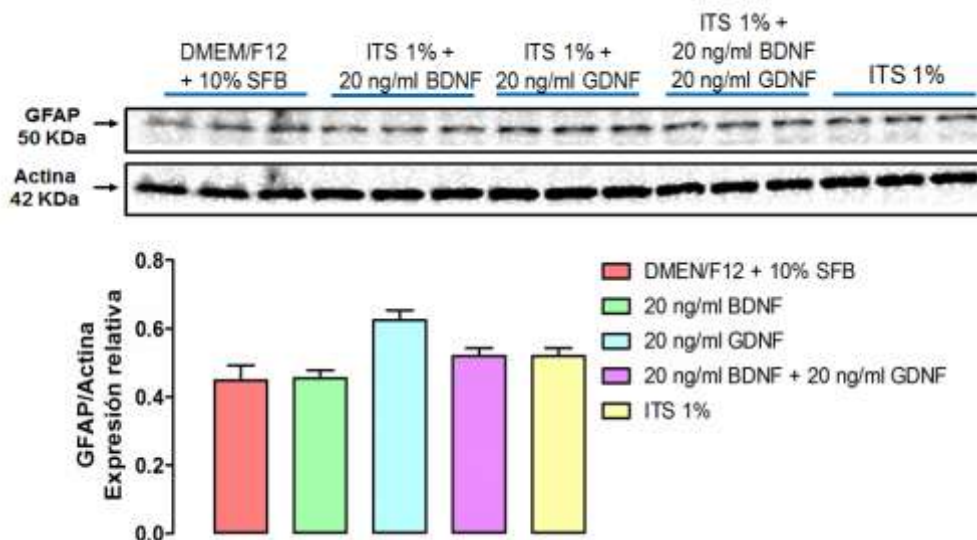


Figura 33. Expresión de GFAP en DPSCs con tratamientos de diferenciación y no diferenciadas (5 DIV). A. Inmunoblot con determinaciones por triplicado. B. Promedio \pm SEM de las determinaciones por triplicado. La densitometría se realizó con el programa ImageJ.

La Figura 34 muestra la expresión de la isoforma C de la MAP2 en las células incubadas en medios de diferenciación y el medio basal.

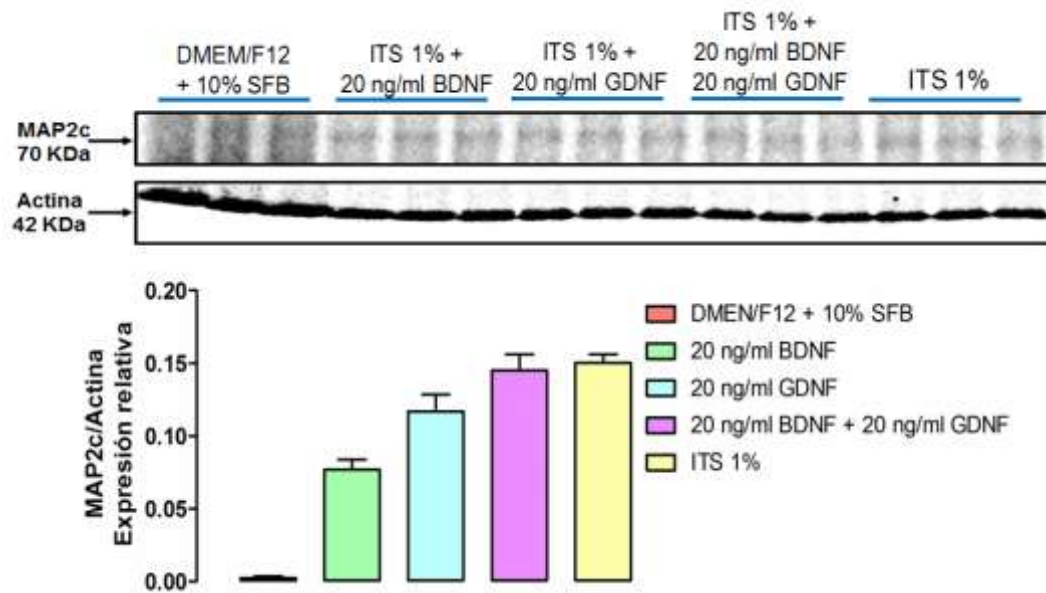


Figura 34. Expresión de MAP2c en DPSCs con tratamientos de diferenciación y no diferenciadas (5 DIV). A. Inmunoblot con determinaciones por triplicado. B. Promedio \pm SEM de las determinaciones por triplicado. La densitometría se realizó con el programa ImageJ.

Resultados preliminares a 35 días de diferenciación in vitro de las DPSCs muestran la presencia y preservación de células con morfología neuronal predominantes en las condiciones de medio definido y factor neurotrófico individual BDNF o GDNF (Figura 35), y la evaluación de expresión de NeuN por PCR punto final se evidencia en las condiciones anteriores, así como la disminución de marcadores mesenquimales CD166 y CD146 (Figura 36).

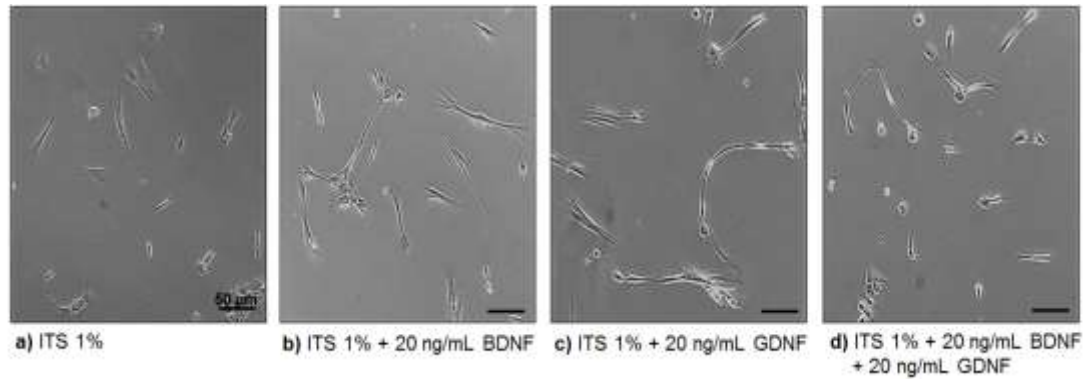


Figura 35. Diferenciación de las DPSCs (35 DIV). El medio basal Insulina Transferrina Selenio 1% suplementado con factores neurotróficos BDNF y GDNF inducen cambios en la morfología de tipo neuronal con respecto al medio basal y a la combinación de los 2 factores de crecimiento (BDNF y GDNF). Pasaje 4. 20x.

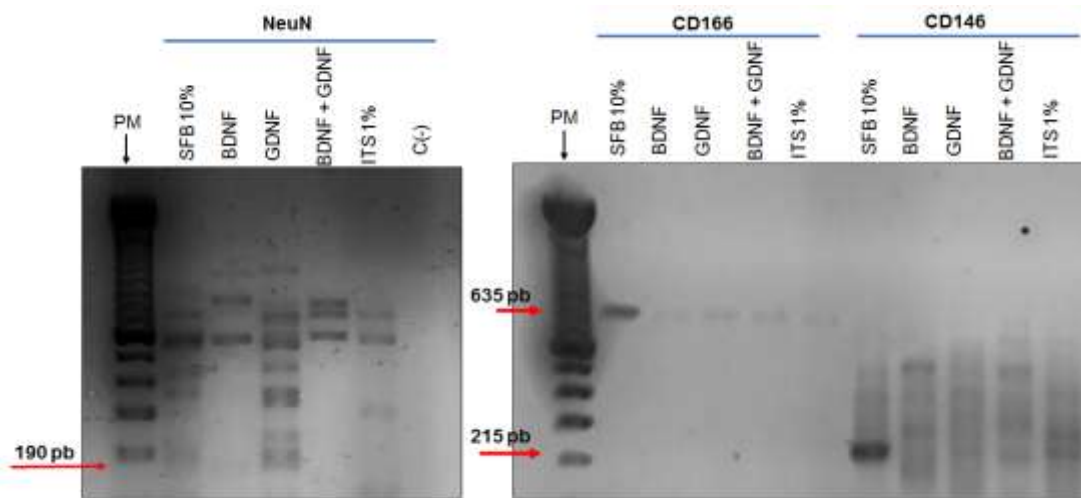


Figura 36. Expresión de NeuN, CD166 y CD146 por RT-PCR punto final en condiciones de diferenciación (35 DIV). La expresión de NeuN se visualiza en las condiciones de diferenciación con los factores neurotróficos individuales BDNF o GDNF producto de amplificación de 190 pb, mientras que los marcadores mesenquimales CD166 y C146 disminuyen bajo las condiciones de diferenciación. Pasaje 5.

10.5. Cultivo de fibroblastos humanos

Los fibroblastos procedentes de individuos controles y de pacientes con la enfermedad de Alzheimer de una familia italiana con una mutación puntual (M146L) en la presenilina 1 fueron cultivados sobre superficies de material plástico de poliestireno (tratado para cultivo) en medio MEM con sales de Earl y 15 % de SFB no inactivado. A los 3 DIV las células mostraron citoplasmas lamelares y de gran tamaño, así como morfologías alargadas y ahusadas. Las células de individuos controles y de los individuos afectados mostraron crecimiento normal y proliferación (Figuras 37 y 38), salvo las células de uno de los pacientes de Alzheimer (EA1), que mostraron una tasa de proliferación más lenta, además 2 líneas de fibroblastos la del individuo NA2 y EA2 expresan Vimentina marcador para fibroblastos (Figura 39).

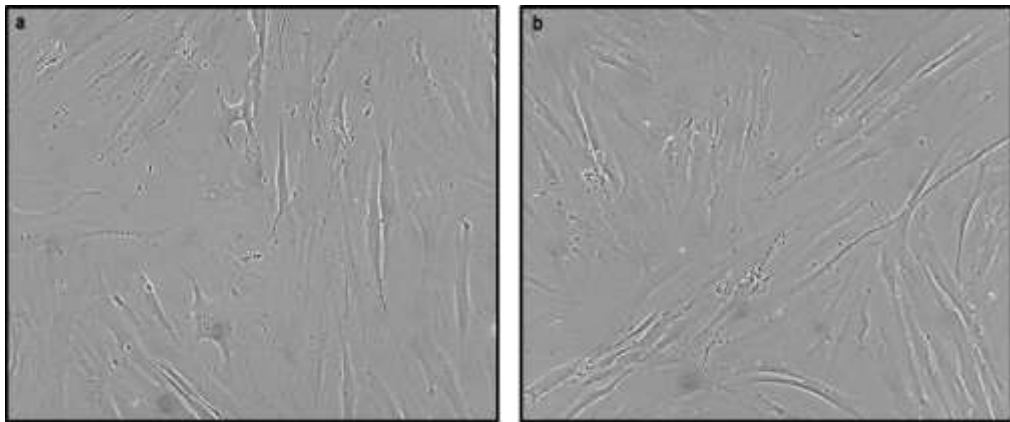


Figura 37. Fibroblastos de dos individuos control (sanos). A. Fibroblastos del individuo no afectado AG07936 (NA1). B. Fibroblastos del individuo AG08125 (NA2). Pasaje 7, 3 DIV, 20x.

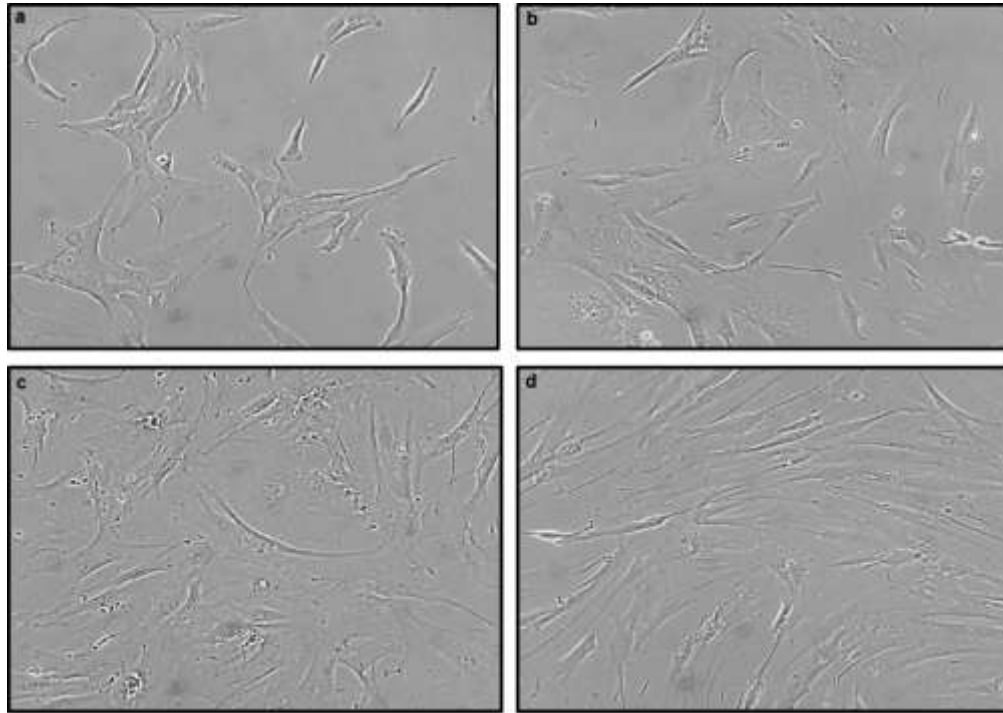


Figura 38. Fibroblastos de cuatro miembros de una familia italiana con una mutación en presenilina 1 (M146L). A. Fibroblastos del individuo AG07885 con 25% de riesgo de desarrollar EA. B. Fibroblastos del individuo AG07928 con 50 % de riesgo de desarrollar EA. C. Fibroblastos del individuo AG08110 afectado por la EA (EA1). D. Fibroblastos del individuo AG07872 afectado por la EA (EA2). Pasaje 7, 3 DIV, 20x.

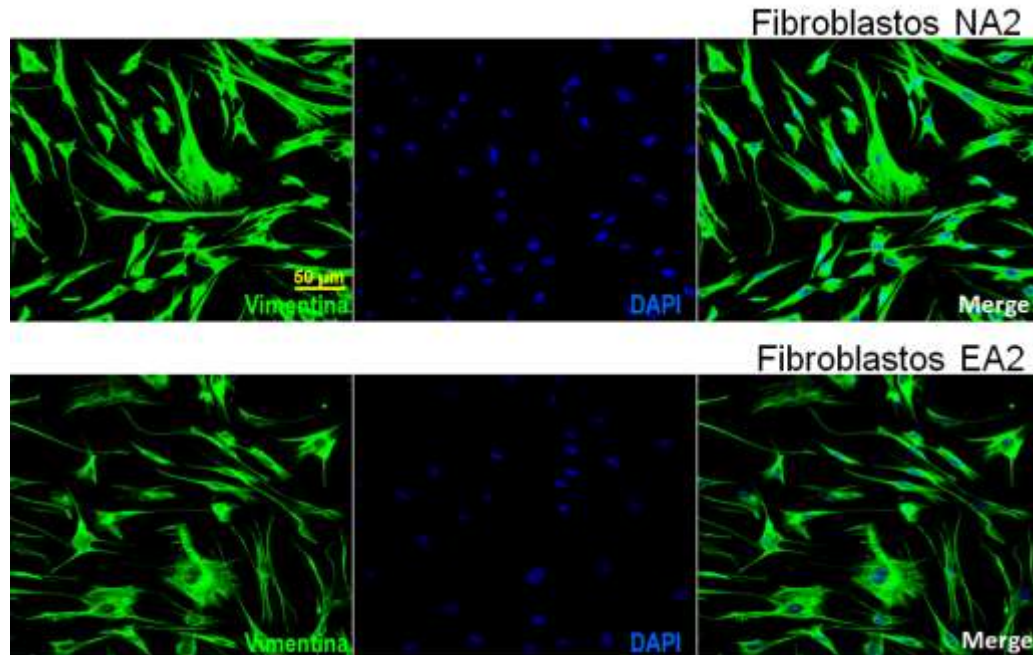


Figura 39. Expresión de Vimentina en fibroblastos del individuo no afectado 2 y del afectado con EA2. La expresión de Vimentina en verde muestra morfologías fusiformes Pasaje 7, 3 días in vitro, 20x.

10.6. Evaluación de vías de señalización de fibroblastos afectados con la Enfermedad de Alzheimer y no afectados

El análisis de la expresión del marcador GSK3 en sus dos isoformas entre los individuos controles y los afectados por la enfermedad de Alzheimer evidenció que la fosforilación de la serina 21 de la isoforma GSK3 α (fosforilación inhibitoria) disminuye en el individuo EA2 en comparación con los 2 controles no afectados, pero presenta variabilidad entre los demás individuos, mientras que para la isoforma GSK3 β entre los 2 individuos no afectados con respecto al individuo con un riesgo del 50% y los 2 individuos afectados con EA presentan una disminución en la fosforilación de la serina 9 en estos 3 grupos, efecto no observado en el individuo con un 25 % de riesgo (Figura 39). La evaluación de las fosforilaciones de la proteína tau serina 404 y treonina 231 muestran para el primer caso un aumento entre el

individuo no afectado 1 con respecto a los 4 individuos con riesgo y afectados por la EA, mientras que para el no afectado 2 solo se observa una diferencia entre el individuo EA2 (Figura 40). La fosforilación de la proteína tau en t231 no muestra cambios entre los diferentes individuos (Figura 41).

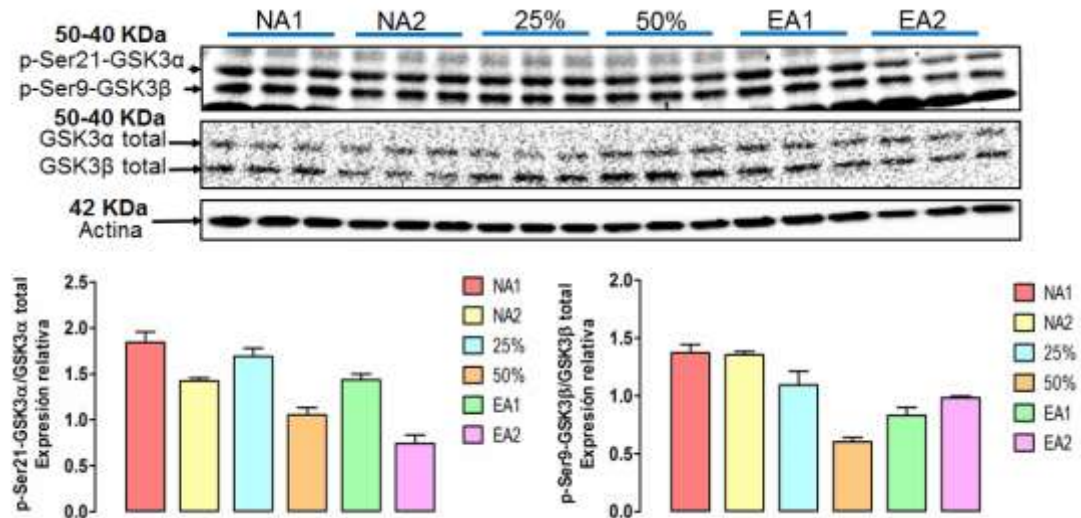


Figura 40. Fosforilaciones en las isoformas de GSK3α (Ser21) y GSK3β (Ser9) en individuos no afectados, con riesgo y afectados por la enfermedad de Alzheimer. A. Inmunoblot con determinaciones por triplicado. B. Promedio ± SEM de las determinaciones por triplicado. La densitometría se realizó con el programa ImageJ.

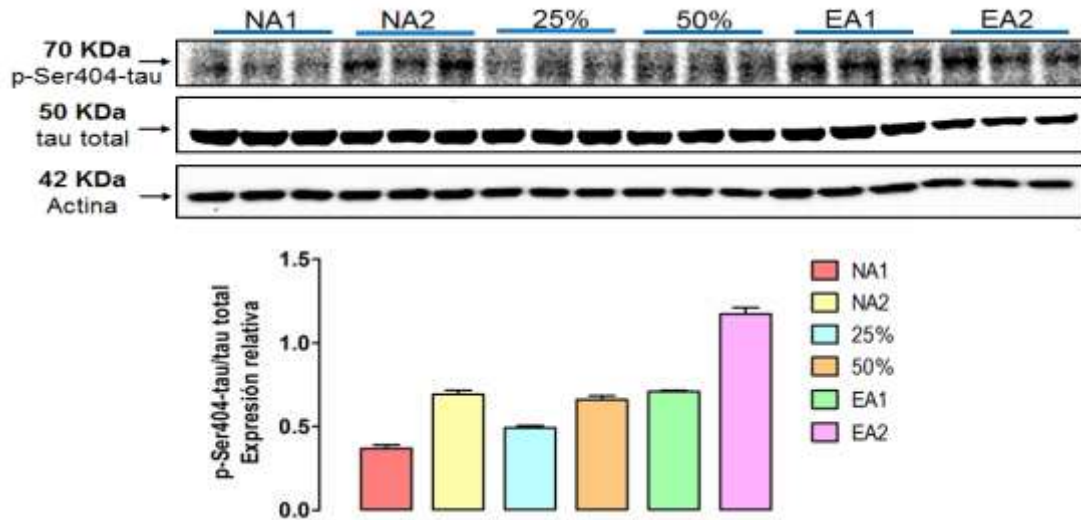


Figura 41. Fosforilación de tau serina 404 en individuos no afectados, con riesgo y afectados por la enfermedad de Alzheimer. A. Inmunoblot con determinaciones pro triplicado. B. Promedio \pm SEM de las determinaciones por triplicado. La densitometría se realizó con el programa ImageJ.

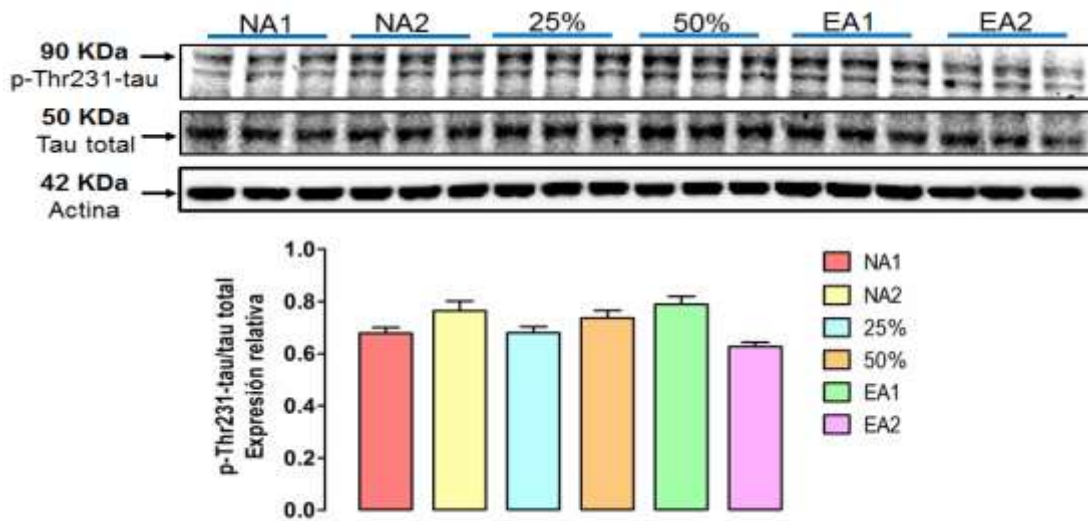


Figura 42. Fosforilación de tau treonina 231 en individuos no afectados, con riesgo y afectados por la enfermedad de Alzheimer. A. Inmunoblot con determinaciones pro triplicado. B. Promedio \pm SEM de las determinaciones por triplicado. La densitometría se realizó con el programa ImageJ.

11. Discusión

El término célula troncal puede aplicarse a un grupo diverso de células que comparten dos propiedades: 1) capacidad de auto-renovación prolongada o ilimitada bajo condiciones controladas; y 2) potencial para diferenciarse en una variedad de células especializadas.

La diferenciación neural eficaz a partir de DPSCs e iPSCs podría ser clínicamente relevante debido a la posibilidad de producir células específicas de pacientes para el tratamiento de déficits neurológicos. Las células troncales de la pulpa dental y las derivadas a partir de la reprogramación de células somáticas tienen una naturaleza multipotente, por lo que la diferenciación neural debería ser, en principio, alcanzable, con la producción sólida de células neuronales con propiedades electrofisiológicas y propiedades funcionales adicionales.

11.1. Caracterización y diferenciación de las DPSCs

En este trabajo, las células troncales mesenquimales se aislaron de la pulpa dental de un primer molar de una paciente sin deterioro cognitivo mediante tratamiento enzimático (Gronthos et al., 2000). Posterior a la siembra las DPSCs aisladas mostraron adherencia al poliestireno. Sin embargo, las propiedades de adhesión no son suficientes para clasificar esta población celular como MSCs (Bertassoli, 2016). De hecho, existen estudios en los que los fibroblastos, los macrófagos y algunas líneas celulares hematopoyéticas pueden adherirse al plástico y presentar también características morfológicas similares a las MSCs (Schrepfer et al., 2007). Además, la densidad celular también puede ser un factor influyente en la capacidad de las MSCs para adherirse al plástico, ya que la baja densidad permite que las células mesenquimales se adhieren más rápido al plástico (Deans et al., 2000).

En el pasaje 3 las DPSCs mostraron morfología de tipo fibroblastoide y adquirieron orientación homogénea a alta confluencia. La morfología similar

a fibroblastos se ha reportado en células troncales mesenquimales derivadas de medula ósea y en diversos tejidos dentales dando un perfil característico a las DPSCs (Gronthos et al., 2002; Gronthos et al., 2000; Jesus, 2011) .

Se han reportado diferentes métodos de aislamiento y expansión de las MSCs. El "Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee" de la Sociedad Internacional de Terapia Celular, propuso los criterios mínimos para definir a las MSCs humanas: 1) capacidad de adherirse al plástico; 2) el patrón de expresión de los marcadores de superficie conocidos como "Cluster of Differentiation", siendo positivas para CD105, CD73 y CD90, y negativas para CD45, CD34, CD14 O CD11b, CD79 o CD19 y moléculas de superficie como HLA-DR; y 3) el potencial para diferenciarse *in vitro* a osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Dominici et al., 2006).

La caracterización fenotípica de las DPSCs ha sido ampliamente documentada (Gronthos et al., 2002; Hadaegh, 2014; Luisi, 2017). En el presente estudio, se detectó la expresión de CD105, CD73 y CD13, empleando inmunofluorescencia y Western blot.

Uno de estos marcadores, CD105 o endoglina es una glicoproteína de membrana tipo I localizada en la superficie de las células formando parte del receptor a TGF- β . Esta proteína consiste en un homodímero de 180 KDa con puentes disulfuro, y se ha encontrado en células endoteliales, macrófagos activados, fibroblastos y células de músculo liso. El comité de células troncales mesenquimales establece que un 95% de las MSCs deben expresar dicho marcador y al mismo tiempo expresar CD73 o 5'-ectonucleotidasa, enzima que consiste de un dímero de 2 subunidades idénticas de 70 KDa, unidas por un enlace glucosil-fosfatidil-inositol a la cara externa de la membrana plasmática, que convierte AMP a adenosina y ha sido empleada para caracterizar la diferenciación linfocítica. CD13 o aminopeptidasa N, es un antígeno CD propio del sistema inmune de los mamíferos con un peso molecular de 150-170 KDa. La enzima es una metaloproteasa dependiente de zinc, se expresa altamente en células

mielomonocíticas y se ha descrito como marcador de desarrollo temprano de las DPSCs (Kerkis et al., 2006). La expresión de estos marcadores en las DPSCs concuerda con hallazgos previos que indican que estos tres marcadores (CD105, CD73 y CD133) se expresan en las MSCs (Alsulaimani et al., 2016; Gronthos et al., 2002; Vishwanath et al., 2013).

Cuando se investiga el potencial de diferenciación neural de las MSCs, el éxito de la diferenciación se basa a menudo en la expresión de ciertos marcadores neurales como Nestina, β III Tubulina, Neurofilamento y GFAP (Alexanian et al., 2008; Karaoz et al., 2010; Safford et al., 2002; Tropel et al., 2006). Mediante inmunofluorescencia e inmunodetección por Western blot en las DPSCs humanas se identificó que algunos marcadores neuronales como Nestina y β III Tubulina están altamente expresados en estructuras neurales dentro del tejido pulpar. La expresión de estos marcadores también se ha observado en cultivos.

Se ha informado que las MSCs de la médula ósea son capaces de expresar genes neurales bajo la incubación en medios de cultivo con un alto porcentaje de suero y factor de crecimiento epidérmico llevando a la expresión de Nestina y Neurofilamento (Blondheim et al., 2006). En el presente estudio, las DPSC indiferenciadas expresaron uniformemente Nestina, β III Tubulina y GFAP. Además de la expresión de marcadores neurales por las DPSCs, varios estudios indican la producción y secreción de factores neurotróficos como el BDNF, GDNF y el factor de crecimiento nervioso o NGF (Nosrat et al., 2004; Nosrat et al., 2001).

Debe tenerse en consideración que la pulpa dental deriva del tejido de la cresta neural, lo que implica predisposición de diferenciación hacia los linajes neurales. Sin embargo, el potencial de diferenciación depende en parte de la composición del medio de cultivo. El uso de altas concentraciones de suero y/o suplementos, como factores de crecimiento en los medios de cultivo basales podría conducir a una expresión temprana de los marcadores neurales en las MSCs. Además, durante el cultivo celular se usaron medios

de crecimiento que contenían altas concentraciones de suero (10% de SFB), lo que podrían conducir a la expresión de marcadores neurales en las DPSCs *in vitro*. Esto lleva a concluir que la consideración y la selección cuidadosa de la composición del medio o de las condiciones de cultivo celular como la densidad celular, es necesaria y esencial para estudios de diferenciación, ya que ciertas condiciones de cultivo celular pueden interferir con el potencial de diferenciación de las DPSCs. Dado que este estudio muestra claramente que las DPSCs indiferenciadas expresaron marcadores neurales como β III Tubulina, Nestina y GFAP al ser cultivadas con 10 % de SFB, estos marcadores no pueden usarse para confirmar la diferenciación neural o glial de las DPSCs. Por lo tanto, debe evaluarse la expresión del marcador antes y después de los estudios de diferenciación y evaluar un amplio número de marcadores de fenotipos de diferenciación.

El cultivo libre de suero (medios químicamente definidos) para las células troncales se ha empleado como una estrategia para diferenciar las DPSCs a linaje neurogénico, con la finalidad de evitar la influencia de los distintos componentes presentes en el SFB y la diferenciación estocástica (Bonnamain et al., 2013; Jung et al., 2016; Osathanon et al., 2014). Se han diferenciado DPSCs a linaje neurogénico mediante el empleo de factores mitogénicos neuronales tales como EGF y bFGF y se ha propuesto el uso de factores neurotróficos exógenos como un requisito crucial para la supervivencia *in vitro* de los tejidos nerviosos periféricos y centrales (Rochlin et al., 2000). Se ha reportado que el medio libre de suero suplementado con Insulina-Transferrina-Selenio (medio ITS) induce cambios fenotípicos neurales en células troncales embrionarias representando un medio óptimo para la diferenciación hacia a estirpes neuronales (Pachernik et al., 2002; Weiss et al., 1986). Así mismo, la proporción de factores neurotróficos en el medio de cultivo permite una regulación positiva continua para la supervivencia, la diferenciación a largo plazo y la función de las células neurogénicas. Diversos estudios han mostrado que los factores

neutróficos como el BDNF y el GDNF son importantes para la supervivencia y la diferenciación neuronal de las células de MSCs.

Se ha confirmado la diferenciación neuronal de las MSCs con base en la expresión de Nestina, Neurofilamento, NeuN, Enolasa y otros marcadores neuronales (Hermann et al., 2006). Nuestro estudio muestra que las DPSCs en cultivo expresan espontáneamente marcadores neuronales inmaduros. Bajo condiciones permisivas especiales estas células deben adquirir rasgos neuronales y exhibir la expresión de β III Tubulina, GFAP y Nestina, por lo que es importante inducir la diferenciación neural a su etapa final de maduración. Nuestros resultados indican que en las DPSCs cultivadas en presencia de BDNF o GDNF indujo la diferenciación evidenciada por la presencia de marcadores neuronales como NeuN al día 35 de tratamiento con dichos factores de crecimiento. La presencia de marcadores tempranos, intermedios y maduros pueden confirmar el potencial de los factores neurotróficos para la diferenciación neuronal. La capacidad de diferenciación neuronal de las DPSCs se confirmó no sólo por las características morfológicas de las células e inmunocitofluorescencia para la evaluación de la expresión de marcadores de fenotipo, sino también por Western blot, que permitieron confirmar de forma semicuantitativa la expresión de marcadores de fenotípicos. La eficacia del BDNF y el GDNF como factores neurogénicos, depende de las concentraciones empleadas ocasionando supervivencia, diferenciación o actividad antiapoptótica. Se ha reportado mediante evaluación morfológica que las concentraciones de BDNF y NGF entre 12.5 ng/ml y 100 ng/ml promueven la supervivencia celular, el mantenimiento y la inducción neuronal en las MSCs (Jahan et al., 2017).

En este trabajo se muestra que las DPSCs diferenciadas con BDNF o GDNF generan células diferenciadas a los 35 días *in vitro* dada la expresión de NeuN, que potencialmente podrían ser funcionales, lo cual requerirá ser confirmado con ensayos electrofisiológicos. Dicho proceso ha reportado que las vías de señalización involucradas son AKT y MAP cinasas (MAPK) vías

intracelulares utilizadas por los factores neurotróficos (BDNF y GDNF) implicadas en la supervivencia y diferenciación neuronal (Frebel y Wiese, 2006).

Las DPSCs originadas a partir de la cresta neural podrían ser candidato ideal de fuente de células troncales para el tratamiento de enfermedades neurológicas y neurodegenerativas. Las células troncales de la pulpa dental tienen varias ventajas como aislamientos menos invasivos, proliferación *ex vivo* y propensión inherente a diferenciarse en neuronas y glía. Hoy día se justifican los estudios para explorar el potencial terapéutico de las DPSCs en el tratamiento de diversas enfermedades neurodegenerativas, como la EA, buscando las causas y alteraciones involucradas en la señalización intracelular.

11.2. Fibroblastos de individuos controles y de pacientes de la EA

Hasta la fecha, los fibroblastos han sido difíciles de identificarse fenotípicamente como tales. En algunos casos, se identifican con base a su forma de huso combinada con tinción positiva para el marcador mesenquimal Vimentina y la ausencia de tinción para tipos epiteliales u otros tipos de células mesenquimatosas, como células musculares, astrocitos o células hematopoyéticas (Chang et al., 2002). Aunque este enfoque no es definitivo ya que los fibroblastos pueden adoptar una amplia gama de formas en diferentes tejidos, y que las células positivas a Vimentina no son únicamente fibroblastos, lo que hace difícil identificar los fibroblastos solo a través de la expresión de Vimentina, por lo que deben utilizarse otros marcadores de este linaje celular, como son SA100A4, 1B10, 5B5 y TE-7.

Los fibroblastos son células fáciles de mantener y propagar *in vitro*. En los años 2006 y 2007 Yamanaka et al. mostraron que las iPSCs se podrían generar a partir de MEFs y de fibroblastos humanos adultos mediante la transducción mediada por retrovirus de cuatro factores de transcripción, OCT-3/4, SOX2, C-MYC y KLF4, adquiriendo importancia

como modelos de estudio de diferentes enfermedades y como puentes hacia su reprogramación y la generación de células troncales pluripotentes inducidas. Su bajo estado de metilación de las regiones promotoras de OCT4 y NANOG, así como la resultante baja expresión endógena de estos factores pueden estar involucrados en la buena capacidad de reprogramación asociada con estados transcripcionales y epigenéticos favorables a la reprogramación (Souza et al., 1986).

La caracterización molecular y de señalización en los fibroblastos de pacientes con diversas patologías, previo al proceso de reprogramación a iPSCs y su subsiguiente diferenciación hacia el fenotipo de interés en las patologías estudiadas, ha resultado ser un abordaje de estudio válido que aporta información valiosa a cerca de los mecanismos fisiopatológicos relevantes para la identificación de nuevas dianas terapéuticas. Y da pauta para los estudios posteriores, que involucran la reprogramación de dichos fibroblastos hacia los fenotipos de interés como es el caso de las neuronas para las enfermedades neurodegenerativas. En concordancia con lo anterior, está el caso de la EA, en donde se ha reportado cambios en la producción de Amiloide Beta en fibroblastos de pacientes con EA (similar a lo que ocurre en las neuronas) y dichos cambios se ven incrementados en las líneas neuronales diferenciadas a partir de iPSCs derivados de células somáticas de pacientes afectados (Sproul et al., 2014).

En el presente trabajo se reportan resultados preliminares de la expresión de marcadores propios de neurodegeneración en la EA en los fibroblastos de individuos control y afectados por la EA, siendo los principales cambios observados las fosforilaciones de GSK3 y la proteína tau fosforilada.

GSK3 tiene un papel central en la EA y su desregulación es responsable de muchos de los signos patológicos de la enfermedad tanto en los casos esporádicos como familiares, lo cual ha llevado a formular la hipótesis de que GSK3 juega un papel importante en la EA y a la vez involucrada con la hiperfosforilación de tau dada su actividad de cinasa, asociada al deterioro

de la memoria, el aumento de la producción de A β y en las respuestas inflamatorias. GSK3 también reduce la síntesis de acetilcolina, lo que está de acuerdo con el déficit colinérgico presente en la EA, y es un mediador clave de la apoptosis y por lo tanto puede contribuir directamente a la pérdida neuronal (Hooper ET AL., 2008). La disminución de la fosforilación de la Ser⁹ correlaciona con una menor inhibición de la actividad de cinasa de GSK3 β y un aumento en la fosforilación de moléculas blanco, como la proteína tau (Kim et al., 2009). Y se sabe que un incremento en la fosforilación de la proteína tau, favorece su auto-agregación y la desestabilización de los microtúbulos, afectando así las vías de transporte axonal y contribuye a la pérdida de la función y muerte neuronal. La caracterización de proteínas involucradas en vías de neurodegeneración (sobrevivencia, autofagia, proteosoma, apoptótica e inflamación) permiten identificar marcadores con valor diagnóstico y terapéutico con enfoque de éxito hacia la comprensión y tratamiento de la EA.

12. Conclusiones

Los resultados obtenidos en nuestro estudio son consistentes con reportes previos en los que las DPSCs son clasificadas como positivas para los marcadores CD166, CD 146, CD105, CD73 y CD13 y de proliferación como Ki67, así como la expresión basal de marcadores neurales como Nestina, β III Tubulina y GFAP, dado su origen de cresta neural. También se mostró que las DPSCs son capaces de diferenciarse hacia linaje neuronal y expresar NeuN mediante el tratamiento con neurotrofinas a tiempos largos de cultivo (35 días *in vitro*). La diferenciación de las DPSCs hacia fenotipo neuronal, representa una herramienta con aplicabilidad para la Medicina regenerativa y la Ciencia Básica. Sin embargo, se requiere caracterizar completamente poblaciones de DPSCs con un perfil de marcadores específicos de utilidad terapéutica en las enfermedades neurodegenerativas, a la par de ensayos de diferenciación y de determinación del perfil funcional. Por otra parte, los estudios realizados en el presente trabajo con fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Alzheimer muestran la expresión de marcadores propios de dicha enfermedad.

13. Perspectivas

1. Aumentar el número de réplicas en diversos experimentos, con el fin de evaluar la significancia estadística de los resultados obtenidos.
2. Establecimiento de DPSCs de un paciente con la EA, su caracterización y diferenciación hacia fenotipos neuronales
3. Evaluar la expresión entre los modelos neuronales derivados de la pulpa dental entre individuos controles y afectados por EA.
4. Reprogramación y diferenciación neuronal de fibroblastos humanos de pacientes con EA y controles.
5. Evaluar las vías de señalización de los grupos afectados y no afectados con EA en las neuronas derivadas de iPSCs, reprogramadas a partir de los fibroblastos de pacientes y controles sanos.
6. Planteamiento y valoración de estrategias terapéuticas en las células neuronales derivadas de iPSCs, reprogramadas a partir de los fibroblastos de Pacientes y controles sanos, o en las neuronas derivadas de las DPSCs de pacientes y controles.

14. Referencias

1. Ab Kadir, R., Zainal Ariffin, S. H., Megat Abdul Wahab, R., Kermani, S., y Senafi, S. (2012). Characterization of mononucleated human peripheral blood cells. *ScientificWorldJournal*, 2012, 843843. doi:10.1100/2012/843843
2. Abdulrahman, G. O., y Jnr. (2014). Alzheimer's disease: Current Trends in Wales. *Oman Med J*, 29(4), 280-284. doi:10.5001/omj.2014.73
3. Abstracts of the 110th Meeting of the British Neuropathological Society. January 7-9, 2009. London, United Kingdom. (2009). *Neuropathol Appl Neurobiol*, 35 Suppl 1, 1-38. doi:10.1111/j.1365-2990.2008.01003.x
4. Alexanian, A. R., Maiman, D. J., Kurpad, S. N., y Gennarelli, T. A. (2008). In vitro and in vivo characterization of neurally modified mesenchymal stem cells induced by epigenetic modifiers and neural stem cell environment. *Stem Cells Dev*, 17(6), 1123-1130. doi:10.1089/scd.2007.0212
5. Altman J. Investigación autorradiográfica de la proliferación celular en los cerebros de ratas y gatos. *Anat Rec*. 1963; 145 : 573.
6. Alsulaimani, R. S., Ajlan, S. A., Aldahmash, A. M., Alnabaheen, M. S., y Ashri, N. Y. (2016). Isolation of dental pulp stem cells from a single donor and characterization of their ability to differentiate after 2 years of cryopreservation. *Saudi Med J*, 37(5), 551-560. doi:10.15537/smj.2016.5.13615
7. Alvarez, C. V., Garcia-Lavandeira, M., Garcia-Rendueles, M. E., Diaz-Rodriguez, E., Garcia-Rendueles, A. R., Perez-Romero, S., Bravo, S. B. (2012). Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. *J Mol Endocrinol*, 49(2), R89-111. doi:10.1530/JME-12-0072
8. Alvarez-Buylla A, Theelen M, Nottebohm F. Proliferation "hot spots" in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron*. 1990 Jul;5(1):101-9.
9. Alzheimer's-Association. (2017). Facts y Figures Report.
10. Allickson, J. G., Sanchez, A., Yefimenko, N., Borlongan, C. V., y Sanberg, P. R. (2011). Recent Studies Assessing the Proliferative Capability of a Novel Adult Stem Cell Identified in Menstrual Blood. *Open Stem Cell J*, 3(2011), 4-10. doi:10.2174/1876893801103010004
11. Ashri, N. Y., Ajlan, S. A., y Aldahmash, A. M. (2015). Dental pulp stem cells. Biology and use for periodontal tissue engineering. *Saudi Med J*, 36(12), 1391-1399. doi:10.15537/smj.2015.12.12750
12. Baglioni, S., Francalanci, M., Squecco, R., Lombardi, A., Cantini, G., Angeli, R., Luconi, M. (2009). Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *FASEB J*, 23(10), 3494-3505. doi:10.1096/fj.08-126946
13. Barrett, G. L., y Bartlett, P. F. (1994). The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(14), 6501-6505.

14. Bartsch, G., Yoo, J. J., De Coppi, P., Siddiqui, M. M., Schuch, G., Pohl, H. G., Atala, A. (2005). Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. *Stem Cells Dev*, 14(3), 337-348. doi:10.1089/scd.2005.14.337
15. Bertassoli, B. M. (2016). Rat dental pulp stem cells: isolation and phenotypic characterization method aiming bone tissue bioengineering. *Brazilian Archives of Biology and Technology, Braz. arch. biol. technol. vol.59 Curitiba 2016 Epub June 27, 2016*(ISSN 1678-4324).
16. Bertram, L., y Tanzi, R. E. (2008). Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci*, 9(10), 768-778. doi:10.1038/nrn2494
17. Bertram, L., y Tanzi, R. E. (2012). The genetics of Alzheimer's disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 107, 79-100. doi:10.1016/B978-0-12-385883-2.00008-4
18. Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., y Robey, P. G. (2001). Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 19(3), 180-192. doi:10.1634/stemcells.19-3-180
19. Bilkei-Gorzo, A. (2014). Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther*, 142(2), 244-257. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.12.009
20. Blennow, K. (2010). Biomarkers in Alzheimer's disease drug development. *Nat Med*, 16(11), 1218-1222. doi:10.1038/nm.2221
21. Blondheim, N. R., Levy, Y. S., Ben-Zur, T., Burshtein, A., Cherlow, T., Kan, I., Offen, D. (2006). Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition. *Stem Cells Dev*, 15(2), 141-164. doi:10.1089/scd.2006.15.141
22. Bobis, S., Jarocha, D., y Majka, M. (2006). Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol*, 44(4), 215-230.
23. Bonnamain, V., Thinard, R., Sergent-Tanguy, S., Huet, P., Bienvenu, G., Naveilhan, P., Alliot-Licht, B. (2013). Human dental pulp stem cells cultured in serum-free supplemented medium. *Front Physiol*, 4, 357. doi:10.3389/fphys.2013.00357
24. Bothwell, M. (1995). Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci*, 18, 223-253. doi:10.1146/annurev.ne.18.030195.001255
25. Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G. G., Lengner, C. J., Wernig, M., Suh, H., y Jaenisch, R. (2008). Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell*, 2(2), 151-159. doi:10.1016/j.stem.2008.01.004
26. Brandt, M. D., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., Reuter, K., Bick-Sander, A., Kempermann, G. (2003). Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci*, 24(3), 603-613.
27. Brown, J. P., Couillard-Despres, S., Cooper-Kuhn, C. M., Winkler, J., Aigner, L., y Kuhn, H. G. (2003). Transient expression of doublecortin

- during adult neurogenesis. *J Comp Neurol*, 467(1), 1-10. doi:10.1002/cne.10874
28. Burrell, R. A., McGranahan, N., Bartek, J., y Swanton, C. (2013). The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*, 501(7467), 338-345. doi:10.1038/nature12625
 29. Cai, J., Li, W., Su, H., Qin, D., Yang, J., Zhu, F., Pei, D. (2010). Generation of human induced pluripotent stem cells from umbilical cord matrix and amniotic membrane mesenchymal cells. *J Biol Chem*, 285(15), 11227-11234. doi:10.1074/jbc.M109.086389
 30. Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9(5), 641-650. doi:10.1002/jor.1100090504
 31. Cardenas-Aguayo, M., et al. (2014). Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity.
 32. Cárdenas-Aguayo, M. d. C., et al. (2014). "The Role of Tau Oligomers in the Onset of Alzheimer's Disease Neuropathology." *ACS Chemical Neuroscience* 5(12): 1178-1191.
 33. Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Denham, J., Mujtaba, T., Chiu, C. P., y Rao, M. S. (2001). Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp Neurol*, 172(2), 383-397. doi:10.1006/exnr.2001.7832
 34. Clarke MF, D. J., Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*.
 35. Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261(5123), 921-923.
 36. Chang, H. Y., Chi, J. T., Dudoit, S., Bondre, C., van de Rijn, M., Botstein, D., y Brown, P. O. (2002). Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(20), 12877-12882. doi:10.1073/pnas.162488599
 37. Chuang, J. H., Tung, L. C., y Lin, Y. (2015). Neural differentiation from embryonic stem cells in vitro: An overview of the signaling pathways. *World J Stem Cells*, 7(2), 437-447. doi:10.4252/wjsc.v7.i2.437
 38. De Strooper, B., Vassar, R., y Golde, T. (2010). The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, 6(2), 99-107. doi:10.1038/nrneurol.2009.218
 39. Deans, R. J., y Moseley, A. B. (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*, 28(8), 875-884.
 40. Dhara, S. K., y Stice, S. L. (2008). Neural differentiation of human embryonic stem cells. *J Cell Biochem*, 105(3), 633-640. doi:10.1002/jcb.21891
 41. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy

- position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. doi:10.1080/14653240600855905
42. Doody, R. S., Raman, R., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Semagacestat Study, G. (2013). A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 369(4), 341-350. doi:10.1056/NEJMoa1210951
 43. Doody, R. S., Thomas, R. G., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Solanezumab Study, G. (2014). Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 370(4), 311-321. doi:10.1056/NEJMoa1312889
 44. Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., van Duijn, C. M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*, 278(16), 1349-1356.
 45. Ferraro, F., Celso, C. L., y Scadden, D. (2010). Adult stem cels and their niches. *Adv Exp Med Biol*, 695, 155-168. doi:10.1007/978-1-4419-7037-4_11
 46. Figueroa, F. E., Carrion, F., Villanueva, S., y Khoury, M. (2012). Mesenchymal stem cell treatment for autoimmune diseases: a critical review. *Biol Res*, 45(3), 269-277. doi:10.4067/S0716-97602012000300008
 47. Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L. P., Kempermann, G. (2003). Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci*, 23(3), 373-382.
 48. Frebel, K., y Wiese, S. (2006). Signalling molecules essential for neuronal survival and differentiation. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 6), 1287-1290. doi:10.1042/BST0341287
 49. Fukuda, S., Kato, F., Tozuka, Y., Yamaguchi, M., Miyamoto, Y., y Hisatsune, T. (2003). Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci*, 23(28), 9357-9366.
 50. Garcia-Sierra, F., Hauw, J. J., Duyckaerts, C., Wischik, C. M., Luna-Munoz, J., Mena, R. (2000). The extent of neurofibrillary pathology in perforant pathway neurons is the key determinant of dementia in the very old. *Acta Neuropathol*, 100(1), 29-35.
 51. Gidekel, S., y Bergman, Y. (2002). A unique developmental pattern of Oct-3/4 DNA methylation is controlled by a cis-demodification element. *J Biol Chem*, 277(37), 34521-34530. doi:10.1074/jbc.M203338200
 52. Gould, E., Cameron, H. A., Daniels, D. C., Woolley, C. S., y McEwen, B. S. (1992). Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci*, 12(9), 3642-3650.
 53. Govindasamy, V., Abdullah, A. N., Ronald, V. S., Musa, S., Ab Aziz, Z. A., Zain, R. B., Abu Kasim, N. H. (2010). Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *J Endod*, 36(9), 1504-1515. doi:10.1016/j.joen.2010.05.006

54. Greaves, M., y Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), 306-313. doi:10.1038/nature10762
55. Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., Shi, S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, 81(8), 531-535. doi:10.1177/154405910208100806
56. Gronthos, S., Franklin, D. M., Leddy, H. A., Robey, P. G., Storms, R. W., y Gimble, J. M. (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*, 189(1), 54-63. doi:10.1002/jcp.1138
57. Gronthos, S., Graves, S. E., Ohta, S., y Simmons, P. J. (1994). The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*, 84(12), 4164-4173.
58. Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P. G., y Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(25), 13625-13630. doi:10.1073/pnas.240309797
59. Gutierrez-Robledo, L. M., y Arrieta-Cruz, I. (2015). [Dementia in Mexico: The need for a National Alzheimer s Plan]. *Gac Med Mex*, 151(5), 667-673.
60. Hadaegh, Y. (2014). Characterization of stem cells from the pulp of unerupted third molar tooth. *Indian Journal of Dental Research*, 25(14-25).
61. Hallbook, F. (1999). Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr Opin Neurobiol*, 9(5), 616-621. doi:10.1016/S0959-4388(99)00011-2
62. Hampel, H., Prvulovic, D., Teipel, S., Jessen, F., Luckhaus, C., Frolich, L., German Task Force on Alzheimer's, D. (2011). The future of Alzheimer's disease: the next 10 years. *Prog Neurobiol*, 95(4), 718-728. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.11.008
63. Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
64. Hanna, J., Cheng, A. W., Saha, K., Kim, J., Lengner, C. J., Soldner, F., Jaenisch, R. (2010). Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(20), 9222-9227. doi:10.1073/pnas.1004584107
65. Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C. J., Creighton, M. P., Jaenisch, R. (2009). Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature*, 462(7273), 595-601. doi:10.1038/nature08592
66. Hanna, J. H., Saha, K., y Jaenisch, R. (2010). Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*, 143(4), 508-525. doi:10.1016/j.cell.2010.10.008
67. Henningson, C. T., Jr., Stanislaus, M. A., y Gewirtz, A. M. (2003). 28. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol*, 111(2 Suppl), S745-753.
68. Hermann, A., Maisel, M., y Storch, A. (2006). Epigenetic conversion of human adult bone mesodermal stromal cells into neuroectodermal cell types for replacement therapy of neurodegenerative disorders. *Expert Opin Biol Ther*, 6(7), 653-670. doi:10.1517/14712598.6.7.653

69. Hochedlinger, K., y Plath, K. (2009). Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development*, 136(4), 509-523. doi:10.1242/dev.020867
70. Hooper, C., Killick, R., y Lovestone, S. (2008). The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 104(6), 1433-1439. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05194.x
71. Hou, T., Xu, J., Wu, X., Xie, Z., Luo, F., Zhang, Z., y Zeng, L. (2009). Umbilical cord Wharton's Jelly: a new potential cell source of mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A*, 15(9), 2325-2334. doi:10.1089/ten.tea.2008.0402
72. Huang, A. H., Snyder, B. R., Cheng, P. H., y Chan, A. W. (2008). Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. *Stem Cells*, 26(10), 2654-2663. doi:10.1634/stemcells.2008-0285
73. Huang, E. J., y Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, 24, 677-736. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.677
74. Ibarretxe, G., Crende, O., Aurrekoetxea, M., Garcia-Murga, V., Etxaniz, J., y Unda, F. (2012). Neural crest stem cells from dental tissues: a new hope for dental and neural regeneration. *Stem Cells Int*, 2012, 103503. doi:10.1155/2012/103503
75. Inagaki, N., Thoenen, H., y Lindholm, D. (1995). TrkA tyrosine residues involved in NGF-induced neurite outgrowth of PC12 cells. *Eur J Neurosci*, 7(6), 1125-1133.
76. Inoue, T., Sugiyama, M., Hattori, H., Wakita, H., Wakabayashi, T., y Ueda, M. (2013). Stem cells from human exfoliated deciduous tooth-derived conditioned medium enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats. *Tissue Eng Part A*, 19(1-2), 24-29. doi:10.1089/ten.TEA.2011.0385
77. Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemato, R., Tudor, M., Fambrough, D., Csankovszki, G., Jaenisch, R. (2001). Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat Genet*, 27(1), 31-39. doi:10.1038/83730
78. Jahan, S., Kumar, D., Kumar, A., Rajpurohit, C. S., Singh, S., Srivastava, A., Pant, A. B. (2017). Neurotrophic factor mediated neuronal differentiation of human cord blood mesenchymal stem cells and their applicability to assess the developmental neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, 482(4), 961-967. doi:10.1016/j.bbrc.2016.11.140
79. Jesus AA, S. M., Soares AP, Nogueira RC, Guimarães ET, Araújo TM. (2011). Collection and culture of stem cells derived from dental pulp of deciduous teeth: technique and clinical case report. *Dental Press J Orthod*.
80. Jung, J., Kim, J. W., Moon, H. J., Hong, J. Y., y Hyun, J. K. (2016). Characterization of Neurogenic Potential of Dental Pulp Stem Cells Cultured in Xeno/Serum-Free Condition: In Vitro and In Vivo Assessment. *Stem Cells Int*, 2016, 6921097. doi:10.1155/2016/6921097

81. Junttila, M. R., y de Sauvage, F. J. (2013). Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, 501(7467), 346-354. doi:10.1038/nature12626
82. Kadar, K., Kiraly, M., Porcsalmy, B., Molnar, B., Racz, G. Z., Blazsek, J., Varga, G. (2009). Differentiation potential of stem cells from human dental origin - promise for tissue engineering. *J Physiol Pharmacol*, 60 Suppl 7, 167-175.
83. Kaplan, D. R., y Miller, F. D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 10(3), 381-391.
84. Karaoz, E., Dogan, B. N., Aksoy, A., Gacar, G., Akyuz, S., Ayhan, S., Sariboyaci, A. E. (2010). Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol*, 133(1), 95-112. doi:10.1007/s00418-009-0646-5
85. Kawashima, N. (2012). Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol*, 57(11), 1439-1458. doi:10.1016/j.archoralbio.2012.08.010
86. Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., y Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*, 27(8), 447-452. doi:10.1016/j.tins.2004.05.013
87. Kerkis, I., Kerkis, A., Dozortsev, D., Stukart-Parsons, G. C., Gomes Massironi, S. M., Pereira, L. V., Cerruti, H. F. (2006). Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*, 184(3-4), 105-116. doi:10.1159/000099617
88. Kim, Y., Lee, Y. I., Seo, M., Kim, S. Y., Lee, J. E., Youn, H. D., Juhn, Y. S. (2009). Calcineurin dephosphorylates glycogen synthase kinase-3 beta at serine-9 in neuroblast-derived cells. *J Neurochem*, 111(2), 344-354. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06318.x
89. Kita, K., Gauglitz, G. G., Phan, T. T., Herndon, D. N., y Jeschke, M. G. (2010). Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane. *Stem Cells Dev*, 19(4), 491-502. doi:10.1089/scd.2009.0192
90. Koc, O. N., Gerson, S. L., Cooper, B. W., Dyhouse, S. M., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I., y Lazarus, H. M. (2000). Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol*, 18(2), 307-316. doi:10.1200/JCO.2000.18.2.307
91. Kronenberg, G., Reuter, K., Steiner, B., Brandt, M. D., Jessberger, S., Yamaguchi, M., y Kempermann, G. (2003). Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol*, 467(4), 455-463. doi:10.1002/cne.10945
92. Kuhn, H. G., Cooper-Kuhn, C. M., Boekhoorn, K., y Lucassen, P. J. (2007). Changes in neurogenesis in dementia and Alzheimer mouse models: are they functionally relevant? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 257(5), 281-289. doi:10.1007/s00406-007-0732-4

93. Kuznetsov, S. A., Krebsbach, P. H., Satomura, K., Kerr, J., Riminucci, M., Benayahu, D., y Robey, P. G. (1997). Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res*, 12(9), 1335-1347. doi:10.1359/jbmr.1997.12.9.1335
94. Lambert, J. C., Ibrahim-Verbaas, C. A., Harold, D., Naj, A. C., Sims, R., Bellenguez, C., Amouyel, P. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet*, 45(12), 1452-1458. doi:10.1038/ng.2802
95. Lane, S. W., Williams, D. A., y Watt, F. M. (2014). Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nat Biotechnol*, 32(8), 795-803. doi:10.1038/nbt.2978
96. Learn.Genetics. (2017). Stem Cell Quick Reference.
97. Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science*, 237(4819), 1154-1162.
98. Li, Z., Kato, T., Kawagishi, K., Fukushima, N., Yokouchi, K., y Moriizumi, T. (2002). Cell dynamics of calretinin-immunoreactive neurons in the rostral migratory stream after ibotenate-induced lesions in the forebrain. *Neurosci Res*, 42(2), 123-132.
99. Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y. S., Hawkins, R. D., Nery, J. R., Hon, G., Ecker, J. R. (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 471(7336), 68-73. doi:10.1038/nature09798
100. Liu, H., y Zhang, S. C. (2011). Specification of neuronal and glial subtypes from human pluripotent stem cells. *Cell Mol Life Sci*, 68(24), 3995-4008. doi:10.1007/s00018-011-0770-y
101. Liu, J., Verma, P. J., Evans-Galea, M. V., Delatycki, M. B., Michalska, A., Leung, J., Pebay, A. (2011). Generation of induced pluripotent stem cell lines from Friedreich ataxia patients. *Stem Cell Rev*, 7(3), 703-713. doi:10.1007/s12015-010-9210-x
102. Luisi, S. B. (2017). Isolation, immunophenotypic characterization and pluripotency of dental pulp stem cells. *Dent Oral Craniofac Res*, 3(5): 1-3.
103. Marion, R. M., Strati, K., Li, H., Tejera, A., Schoeftner, S., Ortega, S., Blasco, M. A. (2009). Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 4(2), 141-154. doi:10.1016/j.stem.2008.12.010
104. Masters, C. L., y Selkoe, D. J. (2012). Biochemistry of amyloid beta-protein and amyloid deposits in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(6), a006262. doi:10.1101/cshperspect.a006262
105. Meacham, C. E., y Morrison, S. J. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*, 501(7467), 328-337. doi:10.1038/nature12624
106. Mikkelsen, T. S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, 454(7200), 49-55. doi:10.1038/nature07056

107. Ming, G. L., y Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 28, 223-250. doi:10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459
108. Mokry, J., Soukup, T., Micuda, S., Karbanova, J., Visek, B., Brcakova, E., Ivancakova, R. (2010). Telomere attrition occurs during ex vivo expansion of human dental pulp stem cells. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 673513. doi:10.1155/2010/673513
109. Moretti, P., Hatlapatka, T., Marten, D., Lavrentieva, A., Majore, I., Hass, R., y Kasper, C. (2010). Mesenchymal stromal cells derived from human umbilical cord tissues: primitive cells with potential for clinical and tissue engineering applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 123, 29-54. doi:10.1007/10_2009_15
110. Morito, T., Muneta, T., Hara, K., Ju, Y. J., Mochizuki, T., Makino, H., . . . Sekiya, I. (2008). Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology (Oxford)*, 47(8), 1137-1143. doi:10.1093/rheumatology/ken114
111. Mungenast, A. E., Siegert, S., y Tsai, L. H. (2016). Modeling Alzheimer's disease with human induced pluripotent stem (iPS) cells. *Mol Cell Neurosci*, 73, 13-31. doi:10.1016/j.mcn.2015.11.010
112. Nadig, R. R. (2009). Stem cell therapy - Hype or hope? A review. *J Conserv Dent*, 12(4), 131-138. doi:10.4103/0972-0707.58329
113. National-Institutes-of-Health. (2017). In Stem Cell Information [World Wide Web site]. Retrieved from stemcells.nih.gov/info/basics/4.htm
114. Nguyen, L. V., Vanner, R., Dirks, P., y Eaves, C. J. (2012). Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer*, 12(2), 133-143. doi:10.1038/nrc3184
115. Nombela-Arrieta, C., Ritz, J., y Silberstein, L. E. (2011). The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(2), 126-131. doi:10.1038/nrm3049
116. Nosrat, I. V., Smith, C. A., Mullally, P., Olson, L., y Nosrat, C. A. (2004). Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur J Neurosci*, 19(9), 2388-2398. doi:10.1111/j.0953-816X.2004.03314.x
117. Nosrat, I. V., Widenfalk, J., Olson, L., y Nosrat, C. A. (2001). Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Dev Biol*, 238(1), 120-132. doi:10.1006/dbio.2001.0400
118. OMS. (2015). Demencia.
119. Osathanon, T., Sawangmake, C., Nowwarote, N., y Pavasant, P. (2014). Neurogenic differentiation of human dental pulp stem cells using different induction protocols. *Oral Dis*, 20(4), 352-358. doi:10.1111/odi.12119
120. Pachernik, J., Esner, M., Bryja, V., Dvorak, P., y Hampl, A. (2002). Neural differentiation of mouse embryonic stem cells grown in monolayer. *Reprod Nutr Dev*, 42(4), 317-326.

121. Parent, J. M., Yu, T. W., Leibowitz, R. T., Geschwind, D. H., Sloviter, R. S., y Lowenstein, D. H. (1997). Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 17(10), 3727-3738.
122. Park, I. H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Daley, G. Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 134(5), 877-886. doi:10.1016/j.cell.2008.07.041
123. Pawson, T., y Nash, P. (2000). Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev*, 14(9), 1027-1047.
124. Perla Cota, M. S. a. D. E. R. (2013). Stem Cells and Epigenetic Reprogramming.
125. Pinterest. (2017). Tau protein.
126. Pisciotta, A., Carnevale, G., Meloni, S., Riccio, M., De Biasi, S., Gibellini, L., De Pol, A. (2015). Human dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two sub-populations. *BMC Dev Biol*, 15, 14. doi:10.1186/s12861-015-0065-x
127. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-147.
128. Polo, J. M., Liu, S., Figueroa, M. E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K. Y., Hochedlinger, K. (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 28(8), 848-855. doi:10.1038/nbt.1667
129. Potdar, P. D., y Jethmalani, Y. D. (2015). Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World J Stem Cells*, 7(5), 839-851. doi:10.4252/wjsc.v7.i5.839
130. Prince, M., Acosta, D., Ferri, C. P., Guerra, M., Huang, Y., Llibre Rodriguez, J. J., Liu, Z. (2012). Dementia incidence and mortality in middle-income countries, and associations with indicators of cognitive reserve: a 10/66 Dementia Research Group population-based cohort study. *Lancet*, 380(9836), 50-58. doi:10.1016/S0140-6736(12)60399-7
131. RandBSystems. (2016). Differentiation Potential of Induced Pluripotent Stem Cells.
132. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., y Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105-111. doi:10.1038/35102167
133. Riekstina, U., Muceniece, R., Cakstina, I., Muiznieks, I., y Ancans, J. (2008). Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions. *Cytotechnology*, 58(3), 153-162. doi:10.1007/s10616-009-9183-2
134. Rius-Perez, S., Tormos, A. M., Perez, S., y Talens-Visconti, R. (2015). Vascular pathology: Cause or effect in Alzheimer disease? *Neurologia*. doi:10.1016/j.nrl.2015.07.010
135. Rochlin, M. W., O'Connor, R., Giger, R. J., Verhaagen, J., y Farbman, A. I. (2000). Comparison of neurotrophin and repellent sensitivities of early embryonic geniculate and trigeminal axons. *J Comp Neurol*, 422(4), 579-593.

136. Rotter, N., Oder, J., Schlenke, P., Lindner, U., Bohrnsen, F., Kramer, J., Lang, S. (2008). Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. *Stem Cells Dev*, 17(3), 509-518. doi:10.1089/scd.2007.0180
137. Rowland, T. (2009).
138. Safford, K. M., Hicok, K. C., Safford, S. D., Halvorsen, Y. D., Wilkison, W. O., Gimble, J. M., y Rice, H. E. (2002). Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 294(2), 371-379. doi:10.1016/S0006-291X(02)00469-2
139. Sakai, K., Yamamoto, A., Matsubara, K., Nakamura, S., Naruse, M., Yamagata, M., Ueda, M. (2012). Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest*, 122(1), 80-90. doi:10.1172/JCI59251
140. Samavarchi-Tehrani, P., Golipour, A., David, L., Sung, H. K., Beyer, T. A., Datti, A., Wrana, J. L. (2010). Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*, 7(1), 64-77. doi:10.1016/j.stem.2010.04.015
141. Sandoe, J., y Eggan, K. (2013). Opportunities and challenges of pluripotent stem cell neurodegenerative disease models. *Nat Neurosci*, 16(7), 780-789. doi:10.1038/nn.3425
142. Schrepfer, S., Deuse, T., Lange, C., Katzenberg, R., Reichenspurner, H., Robbins, R. C., y Pelletier, M. P. (2007). Simplified protocol to isolate, purify, and culture expand mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 16(1), 105-107. doi:10.1089/scd.2006.0041
143. Seifrtova, M., Havelek, R., Cmielova, J., Jiroutova, A., Soukup, T., Bruckova, L., Rezacova, M. (2012). The response of human ectomesenchymal dental pulp stem cells to cisplatin treatment. *Int Endod J*, 45(5), 401-412. doi:10.1111/j.1365-2591.2011.01990.x
144. Sharpe, P. T. (2016). Dental mesenchymal stem cells. *Development*, 143(13), 2273-2280. doi:10.1242/dev.134189
145. Snyder, H. M., Cardenas-Aguayo Mdel, C., Alonso, A., Bain, L., Iqbal, K., y Carrillo, M. C. (2016). Alzheimer's disease research in Ibero America. *Alzheimers Dement*, 12(6), 749-754. doi:10.1016/j.jalz.2016.04.007
146. Souza, L. M., Boone, T. C., Gabilove, J., Lai, P. H., Zsebo, K. M., Murdock, D. C., et al. (1986). Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science*, 232(4746), 61-65.
147. Sproul, A. A., Jacob, S., Pre, D., Kim, S. H., Nestor, M. W., Navarro-Sobrinho, M., Noggle, S. A. (2014). Characterization and molecular profiling of PSEN1 familial Alzheimer's disease iPSC-derived neural progenitors. *PLoS One*, 9(1), e84547. doi:10.1371/journal.pone.0084547
148. Stadtfeld, M., y Hochedlinger, K. (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev*, 24(20), 2239-2263. doi:10.1101/gad.1963910

149. Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D. T., y Hochedlinger, K. (2008). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell*, 2(3), 230-240. doi:10.1016/j.stem.2008.02.001
150. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., y Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861-872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
151. Takahashi, K., y Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
152. Takahashi, K., y Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17(3), 183-193. doi:10.1038/nrm.2016.8
153. Tatullo, M., Marrelli, M., Shakesheff, K. M., y White, L. J. (2015). Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*, 9(11), 1205-1216. doi:10.1002/term.1899
154. Tropel, P., Platet, N., Platel, J. C., Noel, D., Albrieux, M., Benabid, A. L., y Berger, F. (2006). Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24(12), 2868-2876. doi:10.1634/stemcells.2005-0636
155. Tsubooka, N., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Nakagawa, M., y Yamanaka, S. (2009). Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts. *Genes Cells*, 14(6), 683-694. doi:10.1111/j.1365-2443.2009.01301.x
156. Ullah, I., Subbarao, R. B., y Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep*, 35(2). doi:10.1042/BSR20150025
157. Verwer, R. W., Dubelaar, E. J., Hermens, W. T., y Swaab, D. F. (2002). Tissue cultures from adult human postmortem subcortical brain areas. *J Cell Mol Med*, 6(3), 429-432.
158. Vishwanath, V. R., Nadig, R. R., Nadig, R., Prasanna, J. S., Karthik, J., y Pai, V. S. (2013). Differentiation of isolated and characterized human dental pulp stem cells and stem cells from human exfoliated deciduous teeth: An in vitro study. *J Conserv Dent*, 16(5), 423-428. doi:10.4103/0972-0707.117509
159. von Bohlen Und Halbach, O. (2007). Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res*, 329(3), 409-420. doi:10.1007/s00441-007-0432-4
160. Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Ho, A. D. (2005). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*, 33(11), 1402-1416. doi:10.1016/j.exphem.2005.07.003
161. Webster, S. J., Bachstetter, A. D., Nelson, P. T., Schmitt, F. A., y Van Eldik, L. J. (2014). Using mice to model Alzheimer's dementia: an

- overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet*, 5, 88. doi:10.3389/fgene.2014.00088
162. Wolozin, B. (2012). Statins and therapy of Alzheimer's disease: questions of efficacy versus trial design. *Alzheimers Res Ther*, 4(1), 3. doi:10.1186/alzrt101
163. Wong, R., Michaels-Obregon, A., y Palloni, A. (2017). Cohort Profile: The Mexican Health and Aging Study (MHAS). *Int J Epidemiol*, 46(2), e2. doi:10.1093/ije/dyu263
164. Wren, M. C., Zhao, J., Liu, C. C., Murray, M. E., Atagi, Y., Davis, M. D., Bu, G. (2015). Frontotemporal dementia-associated N279K tau mutant disrupts subcellular vesicle trafficking and induces cellular stress in iPSC-derived neural stem cells. *Mol Neurodegener*, 10, 46. doi:10.1186/s13024-015-0042-7
165. Yang, J., Li, S., He, X. B., Cheng, C., y Le, W. (2016). Induced pluripotent stem cells in Alzheimer's disease: applications for disease modeling and cell-replacement therapy. *Mol Neurodegener*, 11(1), 39. doi:10.1186/s13024-016-0106-3
166. Yu, J., He, H., Tang, C., Zhang, G., Li, Y., Wang, R., Jin, Y. (2010). Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC Cell Biol*, 11, 32. doi:10.1186/1471-2121-11-32
167. Zimmerman, L. B., De Jesus-Escobar, J. M., y Harland, R. M. (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell*, 86(4), 599-606.