

UCH-FC
DOC-BN.CN
M386
C-1

Exp. al grado 21/1/11



Estudio de la función de la vía de señalización Shh/Gli en los procesos de proliferación y diferenciación de células del ligamento periodontal humano

Tesis entregada a la Universidad de Chile
En cumplimiento parcial de los requisitos
Para optar al grado de

Doctora en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y
Neurociencias

Facultad De Ciencias

Por

Constanza Martínez Cardozo

Enero de 2011

Directores de Tesis Drs.
Verónica Palma Alvarado
Patricio Smith Ferrer

Co-Director de Tesis Dr.
Juan Pablo Rodríguez



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

CONSTANZA MARTINEZ CARDOZO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 5 de enero de 2011

Director de Tesis:
Dra. Verónica Palma A

Dr. Patricio Smith Ferrer

Co-Director de Tesis
Dr. Juan Pablo Rodríguez

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Alejandro Roth

Dr. Mario Galindo

Dr. Alejandro Oyarzún



DEDICATORIA

A mi esposo Luis Felipe y a mi padres Carmen Alicia y Gustavo Enrique quienes me han apoyado siempre con su amor y dedicación.



RESUMEN BIOGRÁFICO

Nací en Bogotá, en donde estudié Odontología en la Universidad Nacional de Colombia y desde entonces mi sueño fue involucrarme en investigación en mi profesión. Participé como joven investigadora del grupo de Neurociencias del Instituto Nacional de Salud de mi País en donde decidí tomar el camino de la ciencia, al tiempo que he continuado con la práctica clínica como odontóloga. Trabajé desde el año 2000 como profesora e investigadora en la Universidad Nacional de Colombia y posteriormente en el año 2005 en la misma Universidad, obtuve mi título de Magister en Bioquímica. En el 2006 como becaria del Conicyt vine a Chile a hacer mis estudios de doctorado, etapa que hoy culmino. Actualmente trabajo como profesora de la Carrera de Odontología de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile



AGRADECIMIENTOS

- Al **CONICYT** por las becas para estudios de doctorado y de apoyo a la realización de la tesis doctoral.
- A la **Dra. Verónica Palma**, quien me recibió en su laboratorio con entusiasmo y confió en mí, apoyándome y dándome la oportunidad de trabajar en el área que siempre soñé. Por sus enseñanzas, por su compromiso y su apoyo personal en los momentos difíciles por los que tuve que pasar estando lejos de mi País y de mi familia.
- Al **Dr. Patricio Smith** quien me apoyó incondicionalmente en este proyecto con su confianza y credibilidad en lo académico, pero sobre todo por su comprensión en los difíciles momentos familiares que viví lejos de mi Patria. Gracias también por ser un modelo a seguir, por sus enseñanzas y por ser excepcional como persona y permitirme acompañarlo como colega en este fascinante mundo de la ciencia.
- Al **Dr. Juan Pablo Rodríguez** por permitirme trabajar en su laboratorio, apoyo académico y personal durante este tiempo.
- A los **Drs. Alejandro Roth, Mario Galindo y Alejandro Oyarzún** de la comisión de Tesis por sus valiosos aportes y disposición durante este proceso.
- A la **Dra. María Rosa Bono** por su valiosa ayuda con la citometría de flujo
- A todos los profesores del programa de doctorado, de quienes aprendí enormemente, especialmente a los Drs. **Miguel Allende, Álvaro Glavic y Juan Bacigalupo**.
- A mis **compañeros de los laboratorios** en los cuales hice este trabajo: Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias de la U de Chile, Laboratorio de biología celular del INTA y Laboratorio de fisiología periodontal de la Universidad Católica. Así como a todo el **personal administrativo** en especial a **Lorena Saragoni** en la unidad de microscopía.
- A la **Universidad Nacional de Colombia** por las imágenes de SEM y por los anticuerpos donados por el laboratorio de Biomiméticos del IBUN.
- A mis mejores amigos que siempre han estado a mi lado compartiendo conmigo nuestros momentos de alegrías y tristezas y los que viven en Chile que se han convertido en nuestra familia lejos de casa: **Marcela Morales, Pablo Martín, Alfonso Díaz, Carolina Montenegro, Ruby Valdivia, Andrés Villa y a toda la familia Borquez Polloni**.
- Por último pero lo más importante a mi esposo **Luis Felipe** quien ha estado a cada momento desde que compartimos nuestras vidas apoyándome con dedicación y dándome toda la fuerza y el amor que necesité para lograr esta meta. A mis padres **Carmen Alicia y Gustavo Enrique**, sin quienes no podría haber culminado este sueño, me formaron para ser quien soy y me han acompañado a cada minuto de mi vida con inmenso amor y entrega.

RESUMEN



Las células troncales mesenquimales y progenitoras residentes en el ligamento periodontal humano constituyen una población de células troncales adultas con características similares a las células troncales mesenquimales de la medula ósea que son capaces de diferenciarse a varios linajes. Considerando su importante papel en la regeneración periodontal, es de suma importancia la identificación de los factores que controlan su proliferación y diferenciación. Sonic hedgehog (Shh) corresponde a una proteína que pertenece a la familia de proteínas Hedgehog (Hh) y juega un papel clave durante la embriogénesis, organogénesis y la homeostasis de algunos tejidos. Adicionalmente a las funciones antes mencionadas, la señalización mediada por Shh juega un papel primordial en la odontogénesis temprana. Estudios recientes han identificado la expresión de componentes de la vía de señalización de Shh en la vaina epitelial radicular de Hertwig y el mesénquima dental proliferativo durante la formación radicular. Sin embargo, el papel que juega la vía de Shh en el ligamento periodontal humano adulto es, hasta el momento, desconocido. Considerando la función de Shh sobre la proliferación de células troncales y progenitoras en diversos tejidos, el propósito de esta tesis fue el analizar la posible función de esta vía de señalización sobre la proliferación y diferenciación hacia el linaje óseo de las células troncales y progenitores del

ligamento periodontal humano adulto. En este trabajo, se logró demostrar, por primera vez, que Shh actúa como mitógeno sobre células troncales/progenitoras mesenquimáticas presentes en el ligamento periodontal humano e influye en su diferenciación hacia el linaje óseo.





ABSTRACT

Human Periodontal Ligament Stem Cells (HPLSC) constitute a mesenchymal stem cell population that persists in adults, exhibits features of bone marrow derived cells and is able to differentiate to many cell lineages. Considering their role in periodontal regeneration, it is critically important to identify factors that control their differentiation and proliferation. Sonic hedgehog (Shh) is a member of the mammalian Hedgehog (Hh) family that plays a key role during embryogenesis, organogenesis, early odontogenesis and adult tissue homeostasis. The role played by Shh/GLI signalling in human periodontal ligament (HPL) growth is so far unknown. However, recent studies have identified the expression of *SHH/GLI* components in the Hertwig's epithelial root sheath and the proliferative dental mesenchyme during root development. Considering that Shh influences stem cell behaviour in several tissues here, we have explored the putative role played by Shh in HPLSC proliferation and bone differentiation. Thus, for the first time we propose that Shh plays a critical role in the regulation of cell proliferation in STRO-1(+)/HPLSC and the differentiation to osteoblastic lineage.

INDICE DE MATERIAS



	Página
1. INTRODUCCION.....	1-22
1.1. Ligamento Periodontal Humano.....	1-2
1.1.1. Fibroblastos.....	2-3
1.1.2. Células Epiteliales.....	3-4
1.1.3. Células Troncales mesenquimales.....	5-7
1.2. Sonic Hedgehog.....	7-12
1.2.1. Shh y la odontogénesis.....	12-14
1.2.2. Shh y la Formación Radicular.....	14-15
1.2.3. Diferenciación al linaje óseo.....	15-18
1.2.4. Shh y la diferenciación ósea.....	19-21
1.3. Hipótesis.....	21
1.4. Objetivos.....	21
1.4.1. Objetivo general.....	21
1.4.2. Objetivos Específicos.....	21-22
2. MATERIALES Y METODOS.....	23-37
2.1. Cultivo de células mesenquimales a partir de LPH.....	23-24
2.2. Aislamiento de células troncales (STRO-1 +) a partir de cultivos celulares de LPH.....	24-25
2.3. Viabilidad celular.....	25



2.4. Criopreservación de las células obtenidas.....	25
2.5. Diferenciación al linaje óseo/cemento.....	25-26
2.6. Diferenciación al linaje adiposo.....	26-27
2.7. Diferenciación neuronal.....	27
2.8. Establecimiento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).....	27-28
2.9. Transfección celular.....	28
2.10. Actividad de las Deshidrogenasas Mitocondriales – Reducción de MTS...29	
2.11. Expresión de proteínas en cultivo.....	29
2.11.1 Inmunofluorescencia.....	29-30
2.11.2 Citometría de flujo.....	30-31
2.11.3 Western blot.....	31-32
2.12 RT-PCR semicuantitativo.....	32-33
2.13. Actividad fosfatasa alcalina (ALPA).....	33-34
2.14. Depósito de Calcio.....	34
2.15. Microscopia Electrónica de Barrido.....	34-35
2.16. Estimulo con Shh o Purmorfamina e inhibición farmacológica con Ciclopamina.....	35
2.17. Cuantificación y Análisis Estadístico de los Resultados Obtenidos.....	36
2.17.1. Inmunofluorescencia.....	36
2.17.2. Cuantificación de ALPA y adipocitos.....	36
2.17.3. Western blot.....	36-37
2.18. Análisis estadístico de los Datos Obtenidos.....	37
3. RESULTADOS.....	38-61



3.1. Caracterización de los Cultivos primarios obtenidos de Ligamento Periodontal Humano (LPH) y aislamiento de las células STRO-1(+)	38-39
3.2. Caracterización de las células STRO-1(+) aisladas Inmunomagnéticamente	40-45
3.3. Las células STRO-1 (+) expresan los componentes de la vía Shh/GLI y son capaces de responder a Shh	46-48
3.4. Las células STRO-1 (+) tienen cilios primarios, un centro de señalización necesario para la transducción de Shh	49-51
3.5. Shh estimula la proliferación de las células STRO-1(+)	52-54
3.6. Shh estimula la diferenciación ósea de las células STRO-1(+) y de las células comprometidas al linaje óseo en STRO-1(-)	55-61
4. DISCUSION	62-72
4.1. Perspectivas	71-72
5. CONCLUSIONES	73-74
6. BIBLIOGRAFIA	75-84



LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Distribución de los tejidos que componen los dientes.....	2
Figura 2. Señalización de Hh en vertebrados dentro del cilio primario.....	12
Figura 3. Diferenciación celular al linaje óseo.....	18
Figura 4. Viabilidad y tiempo de duplicación de los cultivos obtenidos a partir de LPH.....	39
Figura 5. Las células obtenidas a partir de LPH son mesenquimales y contienen células troncales/progenitoras que pueden ser aisladas inmunomagnéticamente.....	40
Figura 6. Las HPLSC/progenitoras aisladas, son clonogénicas y positivas para los marcadores STRO-1 y CD146/MUC18.....	42
Figura 7. Las células HPLSC/progenitoras no expresan marcadores óseos en condiciones basales.....	43
Figura 8. Las HPLSC/progenitoras son multipotentes y se diferencian a los linajes óseo/cemento, adiposo y neuronal.....	44
Figura 9. Las HPLSC/progenitoras tienen mayor capacidad de diferenciarse a tejido adiposo pero menor capacidad de diferenciarse al linaje óseo que las células STRO-1(-).....	45
Figura 10. Las HPLSC/progenitoras expresan los componentes de la vía de señalización Shh/Gli, responden activamente a ésta y secretan Shh autocrino.....	48

Figura 11. Las HPLSC/progenitoras tienen cilio primario, un centro de señalización necesario para la transducción de señales de Shh/Gli y responden a la vía al movilizarse Smo a la punta del cilio.....	50
Figura 12. Las HPLSC/progenitoras STRO -1(+) responden a la vía al movilizarse Smo a la punta del cilio.....	51
Figura 13. Las HPLSC/progenitoras STRO -1(+) aumentan su proliferación en respuesta a la vía Shh/Gli.....	53
Figura 14. Ni los cultivos heterogéneos de LPH ni las células STRO-1(-) cambian su proliferación en respuesta a la vía Shh/Gli.....	54
Figura 15. La vía de señalización Shh/Gli participa en la diferenciación al linaje óseo de las células del LPH.....	58
Figura 16. En los cultivos heterogéneos de LPH Shh actúa sobre los progenitores y osteoblastos inmaduros.....	59
Figura 17. Los niveles de proteína de Shh incrementan en presencia del estímulo osteogénico.....	60
Figura 18. Las células STRO-1(-) expresan los componentes de la vía Shh/Gli, presentan cilio primario y responden a la vía translocando a Smo.....	61
Tabla 1. Lista de partidores utilizados para amplificar los transcritos de los genes indicados, con las condiciones de TM correspondientes.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA

Alpa	Actividad de fosfatasa alcalina
Alp	Fosfatasa alcalina
BrdU	5-bromo-2-deoxiuridina
Bmp-2	Proteína morfogenética ósea 2
Cyc	Ciclopamina
Dhh	Desert Hedgehog
GSK-3	Glicógeno sintasa quinasa
Hh	Hedgehog
HPLSC	Células troncales del ligamento periodontal humano
Ihh	Indian Hedgehog
LPH	Ligamento periodontal humano
Osx	Osterix
Osteo	Osteogénico
PFA	Paraformaldehído
Ptc-1	Proteína patched -1
Pur	Pur morfamina
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Proteína smoothened
TM	Temperatura de denaturación
UFC	unidades formadoras de colonias fibroblastoides

Nomenclatura

Los genes humanos fueron escritos en letras mayúsculas con el formato de letra itálica. Los genes de otras especies fueron escritos en letras minúsculas con el formato de letra itálica.

1. INTRODUCCION

1.1. Ligamento Periodontal Humano

El periodonto es un término general que se usa para describir a los tejidos que se encargan de dar soporte a los dientes. En estos tejidos, se evidencian varios tipos de células y matrices extracelulares que están en interacción permanente y proveen soporte continuo, inserción, propiocepción y protección física para los dientes en condiciones fisiológicas, lo que permite minimizar el daño tisular como consecuencia de traumas o patologías infecciosas. Los tejidos que conforman el periodonto corresponden a cemento radicular, hueso alveolar, encía y ligamento periodontal (*Cho y Garant, 2000; Nanci y col., 2008; Fig. 1*).

El ligamento periodontal es un tejido conectivo que se desarrolla a partir de células ectomesenquimales del folículo dental y está situado entre el cemento que cubre las raíces de los dientes y el hueso alveolar. Tiene un espesor promedio de 0.21 mm, grosor que va disminuyendo progresivamente con la edad (*Nanci y col., 2008*). Es un tejido indispensable en el soporte de los dientes y contribuye a la homeostasis y reparación de los tejidos del periodonto una vez que estos han sido lesionados. Este tejido conectivo está particularmente adaptado a su función principal, la cual es soportar a los dientes en sus alvéolos y al mismo tiempo permitir que estos resistan las fuerzas de masticación. Tiene la capacidad de actuar como un receptor sensorial permitiendo un adecuado posicionamiento de los maxilares (*Beersten y col., 1997; McCulloch, 1997;*

Berkovitz y col., 1998; Nanci y Bosshardt, 2006).

Similar a otros tejidos conectivos, el ligamento periodontal está conformado por células y una matriz extracelular que incluye proteínas colágenas y no colágenas. Las células encontradas en este tejido son: fibroblastos, los restos epiteliales de Malassez, monocitos y macrófagos, cementoblastos, células endoteliales, osteoblastos, osteoclastos y células troncales mesenquimales. (*Berkovitz y col., 1998; Nanci y Bosshardt, 2006, Nanci y col., 2008*)

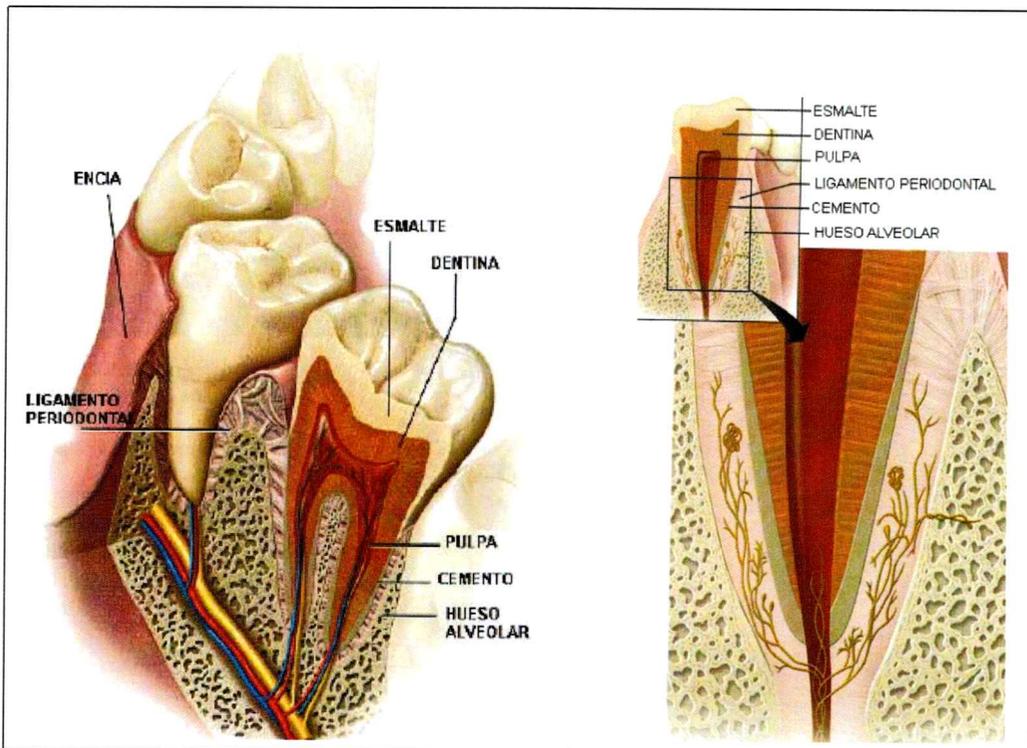


Figura 1. Distribución de los tejidos que componen los dientes. Diagramas ilustrativos de la composición de los dientes. Se indican los tejidos que componen la corona y los tejidos periodontales. Modificado de Nancy y col., 2008

1.1.1. Fibroblastos: Las células principales del ligamento periodontal son los fibroblastos y tienen la propiedad de recambiar la matriz extracelular con una alta tasa de ocurrencia, en particular el colágeno. Estas células son

las responsables de mantener el espacio del ligamento periodontal previniendo que el hueso alveolar y el cemento lo ocupen. Son células con grandes citoplasmas que contienen abundantes organelos asociados con la síntesis y secreción de proteínas, así como un citoesqueleto bien desarrollado. Se sabe que en el ligamento periodontal hay poblaciones heterogéneas de fibroblastos, una subpoblación de estas células tiene similitud con osteoblastos, expresa fosfatasa alcalina y tiene la capacidad de diferenciarse a osteoblastos y cementoblastos. (Nanci y Bosshardt, 2006; Nanci y col., 2008)

1.1.2. Células Epiteliales: Durante la odontogénesis ocurren una serie de interacciones entre el epitelio oral primitivo y las células de la cresta neural que migran y se localizan debajo del epitelio oral para luego diferenciarse en células que formarán los tejidos dentales. En este proceso inicialmente el epitelio secreta factores de crecimiento que emiten señales hacia el ectomesenquima subyacente y hace que se expresen genes de una manera altamente coordinada y específica que establecen la morfogénesis dental (Thesleff, 2003). La formación de la corona dental continúa a través de una serie de etapas denominadas *yema o botón, copa y campana* en la que finalmente ocurre la histodiferenciación que lleva a la formación del esmalte, la dentina y la pulpa. Cuando la formación de la corona finaliza, el epitelio dental externo y el epitelio dental interno que inicialmente dieron origen al esmalte dental forman una estructura que recibe el nombre de *vaina epitelial radicular de Hertwig* (Thesleff y Tummers, 2009). Se cree que las células de esta estructura envían señales inductivas a las células de la

pulpa recién formada para que a nivel radicular, se diferencien a odontoblastos y formen la dentina. Acto seguido, envían señales para que se forme el cemento en la superficie radicular. Los eventos moleculares involucrados en la formación del cemento aún se desconocen (*Rincón y col., 2006; Foster y col., 2007*). A medida que ocurre la morfogénesis radicular restos epiteliales de la vaina radicular de Hertwig quedan atrapados en el ligamento periodontal en formación. Estas células epiteliales que se encuentran dentro del ligamento periodontal corresponden a remanentes de células del desarrollo (*Binner-Bector y col., 2007*) y se conocen con el nombre de *Restos epiteliales de Malassez*. Se ubican dentro del ligamento periodontal cercanas al cemento como un grupo de células que forman una red epitelial. La función de estas células se desconoce ya que hasta hace poco se creía que estas células permanecían quiescentes dentro del ligamento periodontal y unas pocas evidencias experimentales sugerían que podrían estar involucradas en la reparación y/o regeneración periodontal (*Nanci y Bosshardt, 2006*). Se ha sugerido que juegan un papel en el mantenimiento del espacio del ligamento periodontal y quizás están asociadas con la formación y reparación del cemento (*Yamanaka y col., 2000; Simonishi y col., 2005; Mouri y col., 2003*) Recientemente se ha reportado que estas células pueden proliferar bajo estímulos y en condiciones determinadas como el movimiento dental que se genera con las fuerzas ortodónticas y en condiciones patológicas durante la formación de queratoquistes odontogénicos (*Talic y col., 2003; Rincón y col., 2006; Grachtchouk y col., 2007; Nishio y col., 2010*).

1.1.3. Células Troncales mesenquimales

La posibilidad de que puedan existir células progenitoras en el ligamento periodontal adulto ha sido reconocida desde hace varios años. La presencia de múltiples tipos celulares en este tejido adulto sugiere que estas células comparten un ancestro común y que corresponde a una fuente renovable para la homeóstasis fisiológica y cicatrización del periodonto ante traumas o patologías (McCulloch, 1985; Nanci y col., 2008; Mrozik y col., 2010). Recientemente, células con características de troncales o progenitoras mesenquimales han sido aisladas del ligamento periodontal humano adulto (Seo y col., 2004; Nanci y Bosshardt, 2006; Bartold y col., 2006; Seo y col., 2004 y 2005; Jo y col. 2007; Nagamoto y col., 2006; Chen y col., 2006; Trubiani y col., 2005; Huang y col., 2009; Lindross y col., 2008). Estas células están ubicadas en nichos cercanos a los vasos sanguíneos y muestran características morfológicas similares a las de otras células troncales mesenquimales adultas como las de la médula ósea humana que tienen capacidad de auto renovarse y diferenciarse a varios linajes celulares (Lin y col., 2009; Mrozik y col., 2010; Volponi y col., 2010). Varios marcadores han sido utilizados para identificar células troncales mesenquimales. Entre estos está el antígeno STRO-1 que es una proteína de membrana expresada por las células troncales mesenquimales de la médula ósea humana con alta capacidad clonogénica y de auto renovación. Adicionalmente otros marcadores utilizados son la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión celular CD146. Ante la dificultad de identificar un marcador único para verificar la población de

células troncales, el uso de varias combinaciones de estos marcadores y su potencial de diferenciación ha permitido identificar eficientemente este tipo de poblaciones celulares (Seo y col., 2004; Lin y col., 2008; Schipani y Kronenberg, 2009; Xu y col., 2009). Estas células se caracterizan por generar clones adherentes al sustrato con morfología fibroblastoide, son capaces de diferenciarse a adipocitos, osteoblastos, condrocitos y cementoblastos *in vitro*. Además se ha demostrado su capacidad de producir cemento y ligamento periodontal en experimentos *in vivo* (Seo y col., 2004, Feng y col., 2010). Adicionalmente a su potencial de diferenciación, existen evidencias de que pueden participar en la cicatrización de defectos periodontales humanos (Feng y col., 2010).

La identificación de células troncales en el ligamento periodontal ha abierto posibilidades importantes para la aplicación de terapias celulares en la reconstrucción del periodonto. La regeneración periodontal se puede definir como la completa restauración de los tejidos que perdieron su arquitectura original y función por traumas o patologías como la enfermedad periodontal caracterizada por una pérdida irreversible del periodonto causando secuelas que comprometen funcional y estéticamente a la dentición. El uso de células troncales constituye una nueva alternativa terapéutica para la regeneración periodontal en la que esencialmente ocurre una recapitulación del desarrollo incluyendo morfogénesis, citodiferenciación, producción de matriz extracelular y mineralización (Mrozik y col., 2010). Por lo tanto, en un evento de injuria al periodonto, las células troncales mesenquimales pueden ser activadas hacia la diferenciación terminal y reparación tisular o regeneración. Claramente para el desarrollo de terapias clínicas exitosas

destinadas a la regeneración del periodonto es necesario conocer las características de estas células y saber que biomoléculas modulan tanto su proliferación como su diferenciación (*Bartold y col., 2006; Seo y col. 2004 y 2005; Jo y col., 2007; Liu y col., 2008; Xu y col., 2009; Lin y col, 2010; Feng y col., 2010*).

1.2. Sonic Hedgehog

Las proteínas hedgehog (Hh) son lipoproteínas secretadas que cumplen variadas funciones durante el desarrollo y la homeostasis celular tanto en invertebrados como en vertebrados. Hedgehog (Hh) fue descubierto hace casi 30 años por Christiane Nüsslein Volhard y Eric Wieschaus inicialmente como un gen que controla la polaridad de los segmentos en *Drosophila melanogaster* (*Nüsslein-Volhard y Wieschaus, 1980*). La familia de genes de Hedgehog (HH) codifica una clase de proteínas que actúan como moléculas de señalización intracelular responsables de controlar un amplio rango de actividades durante el desarrollo, influenciando el crecimiento, establecimiento de patrones, morfogénesis y homeostasis promoviendo la proliferación de diversas células troncales/progenitoras en tejidos como sistema nervioso, hematopoyético, piel, coclear, gastrointestinal, hepático, pancreático y mamario. Hh participa en el mantenimiento del número de progenitores que contribuyen a la homeostasis tisular así como en la regeneración y reparación posterior a injurias (*Karhadkar y col., 2004, Palma y col., 2004; Stamatakis y col., 2005; Fendrich y col., 2008; King y col., 2008; Jiang y Hui, 2008; Mimeault y Batra, 2010*). Por otro lado, la activación constitutiva de la vía de señalización Hh sobre las células

troncales y/o progenitoras de los tejidos adultos ha sido propuesta como una de las causas potenciales para su transformación maligna, contribuyendo a la iniciación y progresión de diferentes tipos de cáncer incluidos los carcinomas baso celulares de piel, cáncer de próstata, pulmón, cáncer de mama, gliomas y meduloblastoma (*Grachtchouk y col., 2003; Sánchez y col., 2004; Palma y col., 2005; Mukherjee y col., 2006; Clement y col., 2007; Stecca y Ruiz i Altaba, 2009; King y col., 2008; Mas y Ruiz i Altaba, 2010; Mimeault y Batra, 2010*). Un número variado de homólogos de Hh se han encontrado en los vertebrados. En el ratón y en el humano tres miembros han sido identificados: Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) y Desert Hedgehog (Dhh), que también proveen múltiples funciones durante el desarrollo.

El ligando Shh es sintetizado como un precursor de 462 aminoácidos (aa) de aproximadamente 45Kda. Esta proteína contiene un péptido señal de 23aa, un dominio de señalización de 174aa y un dominio de autoprosesamiento de 265aa que posee actividades autoproteolítica y colesterol transferasa. Durante la modificación post-traducciona de la preproteína en el retículo endoplásmico, el precursor de Shh sufre un clivaje autocatalítico catalizado por su dominio C-terminal, dando lugar a un producto N-terminal activo de 19KDa, que representa la forma biológicamente activa de Shh, y un producto C-terminal sin función conocida hasta el momento. Durante esta reacción una molécula de colesterol es añadida al residuo C-terminal de la proteína activa y en su extremo N-terminal sufre una palmitoilación. Estas modificaciones lipídicas promueven su inmovilización por caveolina en la membrana plasmática y los

microdominios lipídicos (en inglés, *rafts*) ricos en colesterol, incrementando su concentración local y la eficiencia de su transducción de señales. Finalmente Shh es secretada de las células al compartimento extracelular para mediar sus efectos biológicos en las células que son capaces de responder a esta proteína (*Sharpe y Cobourne, 2005; Robbins y Hebrok, 2007; Jiang y Hui, 2008; Mas y Ruiz y Altaba 2010, Mimeault y Batra, 2010*). El ligando secretado puede actuar de forma autocrina o paracrina bajo la forma de monómero u oligómero en las células que lo producen o en las células que responden en sitios cercanos o a distancia. La formación de grandes oligómeros puede permitir la liberación en el espacio extracelular y transporte vía lipoproteínas a largas distancias para su acción paracrina (*Mimeault y Batra, 2010*). Una vez sintetizada y modificada la proteína, la recepción de la señal de Shh en la membrana celular está mediada por la interacción física con el receptor Patched-1 (Ptc-1), que corresponde a un receptor transmembrana de 12 dominios. En ausencia de ligando Hh, Ptc-1 inhibe la vía, a través de su unión a un co-receptor acoplado a una proteína G llamada Smoothed (Smo) cuya acción es esencial para la transducción de la vía. La unión de Shh a Ptc-1 favorece la activación de Smo al liberarse de la acción inhibitoria de Ptc-1, la que es absolutamente necesaria para la transducción de la señal que es mediada por los factores de transcripción Gli (Gli1, Gli2 y Gli3) en vertebrados. Este complejo de interacción celular da como resultado final señales de proliferación celular, diferenciación o supervivencia, dependiendo del balance general de la acción activadora o represora de los factores Gli (*Sharpe, P. y Cobourne, 2005, Jiang y Hui, 2008, Mas y Ruiz i Altaba, 2010*). Las tres proteínas Gli son factores de

transcripción del tipo dedos de zinc de 1000 aminoácidos las que codifican tanto actividades represoras como activadoras. En ranas, peces, ratones y humanos, Gli1 es un potente activador transcripcional, Gli2 tiene funciones activadoras y represoras y Gli 3 es fundamentalmente un represor (*Pan y col., 2006*). En ausencia de Hh, Gli1 es transcripcionalmente silente, mientras que Gli2 y Gli3 pueden ser expresados como represores. En presencia de los ligandos de Hh ocurre la activación de Smo, lo que conlleva a la activación transcripcional de Gli1. Por otro lado, Gli2 se mantiene como activador y Gli 3 no es modificado, perdiendo su función represora. Los genes blanco de la vía Hh incluyen entre otros a *gli-1*, *ptc-1*, la *proteína morfogenética ósea 1*, *ciclinas D1 y D2* y el *factor de transcripción jun* (*Ruiz i. Altaba y col., 2007* *Grachtchouk y col., 2003*; *Sanchez, 2004*; *Palma y col., 2005*; *Mukherjee y col., 2006*; *Mimeault y Batra, 2010*).

Estudios recientes han evidenciado que la señalización de Hh en mamíferos ocurre dentro de un compartimiento celular denominado cilio primario, que corresponde a una estructura única y no motil con un axonema compuesto de 9 pares de microtúbulos periféricos sin microtubulos centrales (9 + 0). Esta se ensambla durante la interfase celular a partir del centriolo materno en G1 y se desensambla durante la mitosis (*Pan y Snell, 2007*). Este organelo ha sido catalogado como una verdadera antena celular, involucrada en la transducción y coordinación de vías de señalización intra e intercelulares (*Kieffer, 2010*). Se ha comprobado que la arquitectura del axonema ciliar, así como de las proteínas de transporte intraflagelar que están dentro del cilio, son requeridas para transducir los diferentes niveles de Shh controlando la actividad de los factores de transcripción Gli que

llevan a cabo los efectos de la vía (*Caspary y col., 2007*). Basado en los estudios genéticos que asocian a Shh con el cilio primario, se ha descrito que todos los componentes claves para que ocurra la señalización están enriquecidos en el cilio primario. Tanto Ptc-1 como Smo evidencian un tráfico dependiente del ligando dentro de este organelo. En ausencia de Shh, Ptc-1 está localizado en la base del cilio y Smo se encuentra en vesículas y en la membrana de la célula, sin encontrarse asociado al cilio. Cuando el ligando entra en contacto con Ptc-1, este sale del cilio y Smo se moviliza hacia la punta del cilio. Las mutaciones activadoras de Smo, así como los agonistas de Hh, llevan a la localización de Smo dentro del cilio (**Fig. 2**). Por lo tanto, la relocalización de Smo puede ser un factor determinante que gobierne el proceso dinámico de la activación de la vía de Shh y la expresión génica inducida por los factores Gli en las células capaces de responder a la vía (*Mimeault y Batra, 2010*).

Adicionalmente, los factores de transcripción Gli también se encuentran enriquecidos en el cilio y se ha evidenciado que la activación de la vía incrementa la cantidad de Gli2 y Gli3 en la punta del cilio en fibroblastos (*Wong y Reiter, 2008; Simpson y col., 2009; Goetz y Anderson, 2010*).

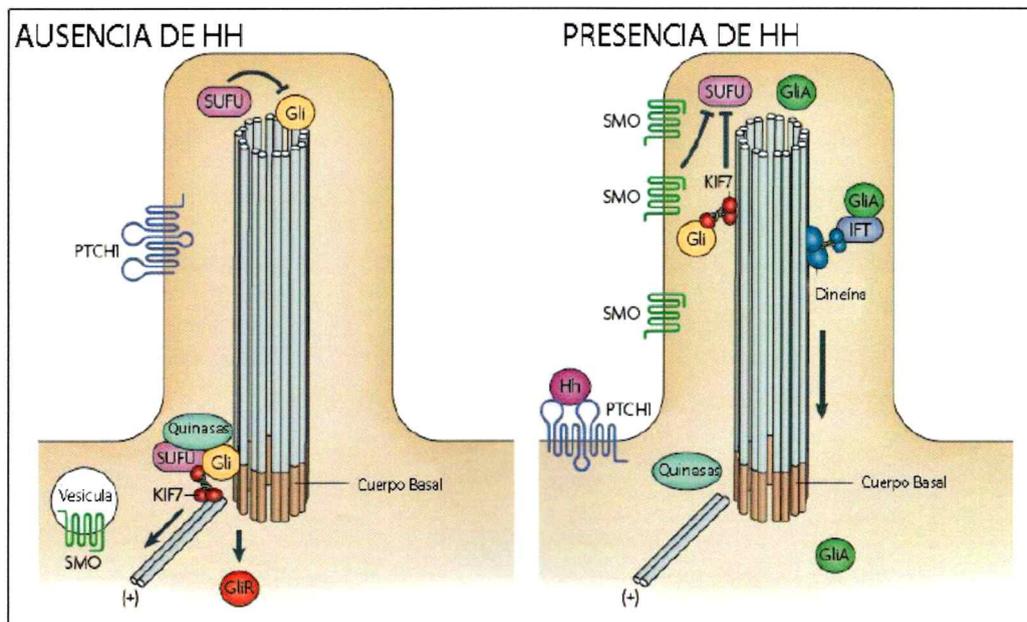


Figura 2. Señalización de Hh en vertebrados dentro del cilio primario. En ausencia de ligando, Ptc-1 se localiza en el cilio y bloquea la entrada de Smo. La quinesina Kif7 se encuentra en la base del cilio formando un complejo con los factores de transcripción Gli y otros componentes de la vía, previniendo el enriquecimiento de estos en el cilio y promoviendo el procesamiento de Gli3. En presencia de Hh, cuando el ligando se une a Ptc-1, Smo se mueve a través de la membrana del cilio hacia la punta y Kif7 se transloca al cilio, promoviendo la acumulación de Gli2 en la punta del cilio. Los componentes de la vía son translocados dentro del cilio a través de una dineína y proteínas de transporte intraflagelar. Modificado a partir de Goetz y Anderson, 2010.

1.2.1. Shh y la odontogénesis

La señalización mediada por Shh tiene un amplio rango de funciones durante el desarrollo normal de los vertebrados y está activa en la odontogénesis. Shh es expresado exclusivamente en el componente epitelial del germen dental de una manera restringida en ciertas regiones del mismo. Tanto el epitelio odontogénico como el ectomesénquima subyacente son capaces de responder a esta señal. Muchas evidencias experimentales han evaluado la función de esta vía durante la odontogénesis y es claro que es indispensable para el desarrollo de los dientes. Durante la iniciación de

la odontogénesis, la localización de la señal es importante para el establecimiento y desarrollo del germen dental. Sin embargo, posteriormente durante la morfogénesis Shh juega un papel importante coordinando la diferenciación y polarización del componente epitelial del germen dental. Estas interacciones complejas son mediadas por la señalización interepitelial y epitelio-mesenquima de Shh a través de varios estadios en el proceso de odontogénesis (*Sharpe y col., 2005, Thesleff y Tummers, 2009*). Es importante destacar que en el mutante para *Shh* (*Shh* *-/-*) no se forman los huesos maxilares (*Chiang y col., 1996*). Por esto, la primera evidencia genética del importante papel de Shh en la transducción durante la odontogénesis se observó a partir del análisis de los mutantes de *Gli2* y *Gli3*. Los embriones de *Gli3* *-/-* no tienen defectos dentales evidentes, pero los mutantes para *Gli2* *-/-* tienen defectos considerables en el desarrollo de incisivos superiores. Estos dientes se ven fusionados o pueden estar completamente ausentes. Sin embargo, la presencia de molares y además de estos incisivos rudimentarios indica que *Gli2* no es indispensable para la formación dental. Se ha sugerido que existe una redundancia funcional entre *Gli2* y *Gli3* en la odontogénesis, que ha sido confirmada con los dobles mutantes, en los que no existe desarrollo de molares y presentan gérmenes dentales rudimentarios de los incisivos (*Hardcastle y col., 1998*). Posteriormente se precisó la función de *Shh* obteniendo mutantes Cre-LoxP dirigidos al epitelio odontogénico del ratón y esta pérdida funcional de *Shh* en el epitelio dental resultó en un severo retardo del crecimiento del germen dental y morfogénesis alterada. Los incisivos y molares se forman pero son muy pequeños y con morfologías

totalmente aberrantes (*Dassule y col., 2000*). En los mutantes condicionales para *Smo* se evidenciaron ameloblastos aberrantes, por lo que *Shh* parece mediar la proliferación de los componentes epiteliales en el germen dental en desarrollo y esta actividad es importante para la citodiferenciación de los ameloblastos (*Gritli-Linde y col., 2002*). Adicionalmente, la respuesta del ectomesenquima proveniente de la cresta neural a la señalización mediada por *Shh* es importante para el crecimiento y desarrollo craneofacial, incluida la dentición. Más aun, es necesario establecer con mayor precisión su función en el mesenquima ya que los componentes que responden a la señal se expresan durante todo el proceso de formación dental en el mesenquima (*HardCastle y col., 1998; Sharpe, 2005*).

1.2.2. Shh y la Formación Radicular

Posterior a la formación de la corona, las raíces de los dientes se desarrollan para obtener una morfología dental completa. En la formación radicular, que en el ratón y en el humano es un proceso postnatal, la vaina epitelial radicular de Hertwig permite la iniciación de la proliferación mesenquimal y diferenciación a odontoblastos, cementoblastos, fibroblastos y osteoblastos durante el desarrollo radicular. Se ha sugerido que la vía de *Shh* podría estar involucrada en la odontogénesis tardía, lo que incluye el desarrollo radicular y de los tejidos periodontales. Sin embargo, los modelos *in vivo* que permitirían establecer la función de *Shh* en la vida postnatal no son viables ya que los mutantes para *Shh* (-/-), *Gli2* (-/-) y *Gli3* (-/-) mueren al nacer, los de *Smo* (-/-) y *Ptc* (-/-) mueren alrededor del día embrionario 9 y los condicionales de *Smo* y *Shh* bajo el promotor de queratina 14, mueren

en el día postnatal 1 (*Chiang y col., 1996; Gritli-Linde y col., 2000*).

Por otro lado, se ha reportado la presencia de transcritos, visualizados por hibridación *in situ* de *Shh* en la vaina de Hertwig y algunos componentes de la vía: *Ptc*, *Smo* y *Gli1* en el epitelio y mesenquima en formación. Sin embargo, estos resultados no explican ni sugieren la función de la señalización *Shh/Gli* durante la formación radicular o en los tejidos periodontales (*Nakatomi y col., 2006*.) En contraposición a lo que ocurre en la corona, no se ha podido establecer que factores y funciones de los mismos están involucrados en la formación radicular, lo que tiene importantes implicaciones en la terapéutica clínica, ya que no se sabe si las señales necesarias en el desarrollo de estos tejidos podrían requerirse en la reparación o regeneración de tejidos periodontales (*Nakatomi y col. 2006; Khan y col., 2007*).

Recientemente se ha generado otra evidencia que refleja la importancia de *Shh* en la regulación de las células troncales y progenitoras adultas en los tejidos dentales. En esta se confirmó el rol de *Shh* en la generación de ameloblastos a partir de progenitores adultos en el incisivo de ratón, modelo en el cual existe una formación continua de esmalte durante la vida adulta del animal, contrario a la formación restringida al proceso de odontogénesis que incluye la formación de esmalte en el humano (*Seidel y col., 2010*).

1.2.3. Diferenciación al linaje óseo

La formación ósea es un proceso altamente regulado que está caracterizado por una secuencia de eventos que incluyen el compromiso de las células

troncales mesenquimales hacia células osteoprogenitoras que posteriormente se diferencian en pre-osteoblastos y luego en osteoblastos maduros; cuya función es sintetizar matriz ósea que progresivamente es mineralizada. El compromiso hacia el linaje osteoblástico, la diferenciación y su función son gobernados por varios factores de transcripción, que permiten la expresión de genes relacionados con cada etapa en el proceso de diferenciación ósea y la adquisición del fenotipo osteoblástico. Los principales factores de transcripción involucrados en este proceso son los factores Runx2, Osterix y ATF4 (Marie, 2008; Karsenty y col., 2009). El factor de transcripción Runx2 es un miembro de la familia de factores de transcripción Runt, debido a la presencia del dominio de unión al DNA conocido como runt. Se ha evidenciado que su expresión es necesaria y suficiente para la diferenciación celular hacia el linaje óseo y ha sido aceptado como el factor maestro para la diferenciación osteoblástica, ya que en el ratón knockout para *Runx2* no se observan osteoblastos ni hay formación ósea (Komori y col., 2007; Komori, 2010). Runx2 se une a una secuencia consenso en el DNA inicialmente llamada elemento específico de osteoblastos (OSE2), que puede ser localizado en la mayoría de los promotores de los genes que controlan el fenotipo osteoblástico incluyendo *colágeno tipo I(α)*, *osteopontina*, *sialoproteína ósea* y *osteocalcina*. La regulación de la expresión de Runx2 y su proteína ocurre a niveles transcripcional, traduccional y postraduccional a través de varias vías de señalización incluidas la proteína morfogenética ósea-2, el factor de crecimiento transformante β , el factor de crecimiento derivado de las plaquetas y Hh/Gli (Marie, 2008; Komori, 2010).

Osterix, el segundo factor de transcripción osteoblasto específico, es una proteína que contiene dedos de zinc. Es expresada en células osteoprogenitoras y es requerida para la diferenciación osteoblástica. Este factor actúa corriente abajo de Runx durante la diferenciación ósea, ya que *Osx* no es expresado en los mutantes para *Runx2*, mientras que *Runx2* si se expresa en los ratones mutantes para *Osx* (Karsenty y col., 2009).

ATF4, el tercer factor de transcripción que es altamente expresado en osteoblastos es un miembro de la familia de proteínas CREB. Este factor no es requerido para la diferenciación temprana de los osteoblastos, pero si necesario para el mantenimiento del fenotipo osteoblástico y el mantenimiento de los niveles de aminoácidos durante la maduración. ATF4 es requerido para mantener una fuente suficiente de aminoácidos en las células, ya que los osteoblastos secretan grandes cantidades de proteínas. Debido a esto ATF4 aumenta la cantidad de aminoácidos en los osteoblastos favoreciendo así la síntesis de colágeno tipo I, que corresponde a la proteína más abundante de la matriz extracelular ósea. (Karsenty y col., 2009)

Durante la diferenciación osteoblástica, *Runx2* y Osterix juegan un rol fundamental en el compromiso de las células pluripotenciales al linaje óseo. Después de comprometerse con el linaje óseo, las células expresan proteínas de la matriz extracelular ósea dependiendo de su nivel de maduración. Las células mesenquimales osteoprogenitoras y preosteoblastos expresan débilmente colágeno tipo Ia que es fuertemente expresado en osteoblastos inmaduros. Estas células inmaduras también expresan osteopontina, sialoproteína ósea y fosfatasa alcalina, necesarias

para la nucleación de los cristales que conformarán la matriz inorgánica del tejido óseo (Nanci y col., 2008). Finalmente los osteoblastos maduros evidencian una fuerte expresión de osteocalcina, depositan calcio, quedando atrapados en la matriz ósea, convirtiéndose en osteocitos que expresan la proteína de matriz dental 1 (Komori, 2010, **Fig. 3**).

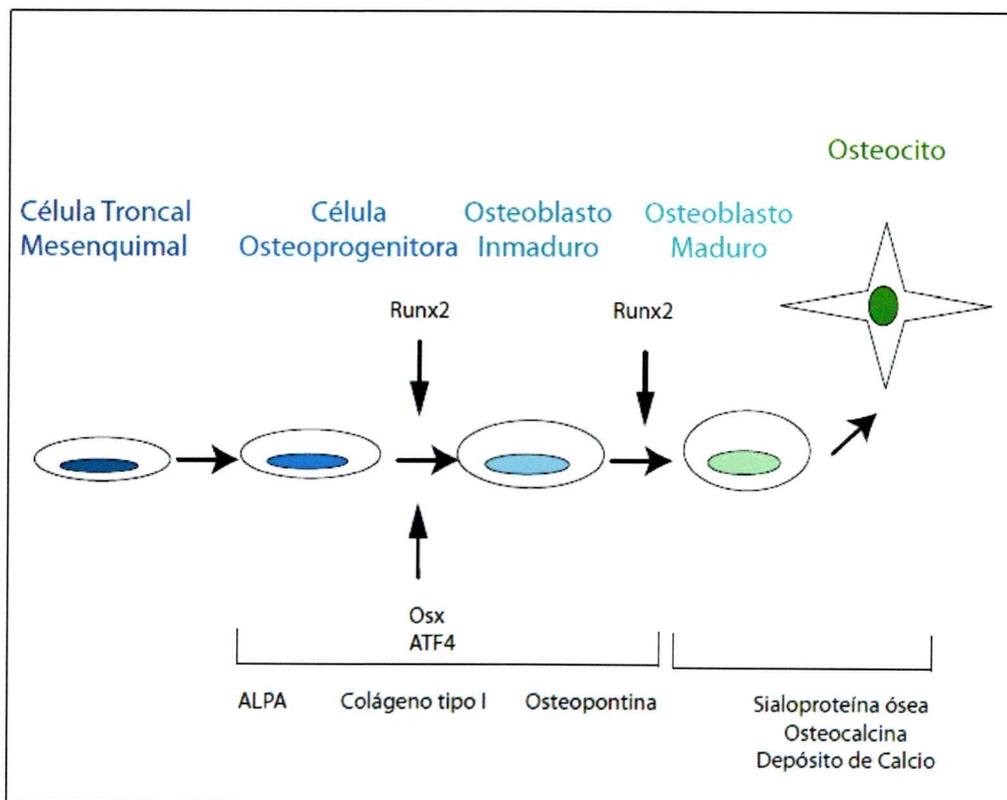


Figura 3. Diferenciación celular al linaje óseo. Las células troncales mesenquimales adquieren el compromiso para diferenciarse secuencialmente a células osteoprogenitoras y osteoblastos inmaduros que expresan los factores Runx2 y Osx, secretan fosfatasa alcalina, posteriormente Colágeno tipo I y Osteopontina para establecer la MEC del tejido óseo. Luego se diferencian a osteoblastos maduros y finalmente a osteocitos, estadios durante los cuales se deposita el calcio para mineralizar la matriz.

1.2.4. Shh y la diferenciación ósea

Existen evidencias de la influencia de la vía de señalización Shh/Gli en la diferenciación hacia el linaje óseo. Esta función de Shh ha sido observada en varias aproximaciones experimentales. En líneas celulares estimuladas con Shh aumenta la expresión de *fosfatasa alcalina* y *osteocalcina*, dos marcadores de osteogénesis (Yuasa y col. 2002). Igualmente en preosteoblastos (KS483), el tratamiento con Shh recombinante incrementa la expresión de fosfatasa alcalina y el depósito de calcio. Esta ganancia de función farmacológica, ejerce un efecto específico en células inmaduras y por lo tanto se encuentra delimitada a una ventana temporal específica dentro del proceso de diferenciación ósea (Van der Horst y col., 2003).

Posteriormente se determinó una función de Shh en la diferenciación ósea en células transfectadas con Gli 2. En estos experimentos se comprobó la interacción de Gli-2 con el promotor del gen de la Proteína Morfogenética Ósea -2 (*BMP-2*), factor que ya se sabe es un potente inductor hacia el linaje óseo de progenitores mesenquimales. Gli 2, una vez unido al promotor de *BMP-2*, promueve la actividad de fosfatasa alcalina y expresión de *RUNX2*. Es decir, Gli2 es un potente activador transcripcional de *BMP-2* y juega un papel crítico en la señalización de Shh-Gli2-Bmp2 en la diferenciación osteoblástica (Zhao y col., 2006).

Posteriormente, se reportó que Hh está implicado en el crecimiento y desarrollo de huesos endocondrales observado en un modelo reportero murino. Al bloquear la vía de Hh con un inhibidor que atrapa a Smo, disminuye la proliferación de condrocitos hipertróficos que se encuentran en los centros de crecimiento depletando el pool de progenitores y aumentando

su diferenciación. Esto lleva a generar huesos más cortos, articulaciones aberrantes y genera defectos permanentes en el crecimiento que no pueden ser modificados o revertidos por el proceso de remodelado ósea (Kimura y col., 2008). Así mismo se han observado importantes hallazgos de la función de la vía Hh/Gli en la homeóstasis en el tejido óseo adulto, utilizando el ratón mutante heterocigoto para *Ptc-1* (*Ptc-1+/-*). Las evidencias indicaron que la haploinsuficiencia de *Ptc-1* tiene varios efectos importantes en el tejido óseo adulto, los que incluyen un aumento considerable de la masa ósea y la diferenciación osteoblástica. A nivel molecular se observó una disminución en los niveles de expresión del factor de transcripción *Gli 3* represor. Además en este modelo *Gli 3* represor compete con *Runx2* por la unión al DNA, ya que existe un sitio de unión a *Gli* (*Gli Binding Site*), que es funcional para *Gli 3* represor, en el elemento *OSE2*. La inhibición de *Gli 3* represor sobre *Runx2* fue confirmada en células mutantes para *Ptc-1* y *Gli3* en las cuales la actividad de *Runx2* incrementa. Finalmente se rescató el fenotipo de masa ósea incrementada a través de la inhibición farmacológica de la vía inyectando sistémicamente ciclopamina (*Cyc*), un antagonista específico para *Smo* (Ohba y col., 2008). Así mismo, existen evidencias experimentales que apuntan a la función de Hh/Gli sobre el recambio dinámico en el tejido óseo, que corresponden a la regulación tanto de la formación como de la reabsorción ósea en el tejido óseo adulto (Kingston y col., 2008). En conclusión, estas observaciones implican una función fisiológica de Shh/Gli en el metabolismo óseo en la vida adulta.

Hasta la fecha no existen reportes en la literatura de la expresión de Shh en células mesenquimales del ligamento periodontal humano. Se desconoce el

potencial de esta vía de señalización durante el desarrollo radicular y de los tejidos periodontales y por lo tanto su función en estos tejidos durante la vida adulta. Debido a que las células troncales del ligamento periodontal pueden diferenciarse y residen en este tejido células osteoprogenitoras y osteoblastos, se sugiere que Shh puede jugar un papel importante en la regulación fisiológica y probablemente en la regeneración de tejidos lesionados o perdidos por enfermedad periodontal.

1.3. Hipótesis

“Sonic Hedgehog regula los procesos de proliferación y/o diferenciación al linaje óseo de las células mesenquimales del ligamento periodontal humano”.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Evaluar la función de Sonic hedgehog en la proliferación y diferenciación de células mesenquimales del ligamento periodontal humano.

1.4.2. Objetivos Específicos

1.4.2.1 Evaluar la expresión de los componentes de la vía Shh-Gli en cultivos de células mesenquimales de ligamento periodontal humano.

1.4.2.2. Determinar la función de la vía Shh-Gli en la proliferación de células mesenquimales del ligamento periodontal humano.

1.4.2.3. Analizar la función de la vía Shh-Gli en la diferenciación de células mesenquimales de ligamento periodontal humano hacia el linaje óseo.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Cultivo de Células Mesenquimales a partir de LPH

Se obtuvo el ligamento periodontal a partir de terceros molares incluidos, sanos, libres de enfermedad periodontal y/o caries. Los donantes fueron hombres o mujeres adultas en un rango de edad entre 14 y 25 años. En todos los casos se obtuvo el consentimiento de los donantes para la utilización de dichas muestras en este estudio. Una vez obtenidos los molares, se mantienen en medio de cultivo α - MEM (Hyclone) suplementado con suero fetal bovino (SFB, Hyclone) al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina (GIBCO) y 0,25 μ g/ml de anfotericina B (SIGMA). Posteriormente y bajo campana de flujo laminar los dientes fueron lavados por tres veces con PBS (GIBCO) suplementado con antibiótico y antimicótico (100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina, 0,25 μ g/ml de anfotericina B). Se obtuvo el ligamento periodontal del tercio medio radicular con una hoja de bisturí #15. Los fragmentos de tejido, denominados explantes, fueron cultivados sobre placas de cultivo o disociados en una solución de colagenasa tipo I a una concentración de 1mg/ml, preparada en medio de cultivo α - MEM suplementada con antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina) y tripsina al 0.25%, durante 15 minutos a 37 grados. Una vez disociado el tejido, las células obtenidas fueron centrifugadas y sembradas en placas de petri para cultivo celular y mantenidas en medio α - MEM suplementado con SFB al 10%, y antibiótico/antimicótico. El establecimiento de la monocapa en el

cultivo primario a partir de explantes requirió de aproximadamente 3 semanas y de 2 semanas a partir de disociación enzimática. Los subcultivos posteriores se hicieron usando tripsina (GIBCO) 0.25% durante 5 minutos para liberar las células desde la superficie de cultivo, la que se inactivó con medio suplementado con SFB. El medio fue cambiado por medio fresco cada tercer día (protocolo modificado a partir de *Seo y col., 2004; Seo y col., 2005*). Las células fueron utilizadas para experimentos dentro de los primeros cuatro subcultivos.

2.2. Aislamiento de células troncales (STRO-1 +) a partir de cultivos celulares de LPH

Para evaluar el efecto de la vía de señalización Shh/Gli sobre la población STRO-1+, las células fueron aisladas inmunomagnéticamente (*Seo y col., 2004*). Brevemente, monocapas obtenidas a partir de ligamento periodontal humano fueron liberadas de la superficie de cultivo con un tratamiento suave con tripsina y las células fueron colectadas por centrifugación (1000xg, durante 5 min). Posteriormente las células fueron incubadas con anticuerpo anti STRO-1 (mouse IgM MAB1038, R & D systems 10µg/ml) durante 30 minutos a 4° C. Las células fueron lavadas con PBS -albúmina al 0.2% y EDTA 2mM (pH 7.0) e incubadas con esferas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-IgM (Dynabeads, rat anti-mouse IgM, Invitrogen) durante 20 minutos a 4 °C. Finalmente, las células fueron puestas en contacto con un magneto (Dyna system, Invitrogen) durante 1 minuto, seleccionando de esta manera las células unidas a las dynabeads y denominadas la población celular STRO-1 (+). La población restante

corresponde a las células STRO-1 (-). Este procedimiento se repitió por 3 veces más. Ambas poblaciones fueron cultivadas separadamente con posterioridad al aislamiento para hacer los experimentos correspondientes (Seo y col., 2004; Xu y col., 2009).

2.3. Viabilidad Celular:

La viabilidad celular fue evaluada mediante la utilización de la coloración vital de exclusión con azul de tripán y cuantificada en un hemocitómetro (Freshney, 1987).

2.4. Criopreservación de las Células obtenidas:

Las monocapas celulares obtenidas del linaje mesenquimal de ligamento periodontal humano fueron criopreservadas utilizando SFB al 90% y dimetilsulfóxido (SIGMA) 10%. La temperatura fue disminuida gradualmente hasta su mantenimiento en nitrógeno líquido. Como respaldo se criopreservaron células de cada tejido cultivado, en cada uno de los subcultivos 2 al 4 (Freshney, 1987; Seo y col., 2005).

2.5. Diferenciación al Linaje óseo/cemento

Las células STRO-1(+) y los cultivos heterogéneos obtenidos fueron incubados, durante 14 a 21 días con medio de cultivo basal (α - MEM (Hyclone), 10% de SFB (Hyclone) penicilina 100 U / ml, estreptomycin y anfotericina B 100 μ g/ml (GIBCO)) o con medio osteogénico (α - MEM, SFB al 10%, dexametasona (SIGMA) 100nM, β -glicerofosfato (SIGMA) 10mM y ácido ascórbico (SIGMA) 50 μ g/ml. Este último permitió que las células se

diferenciaran al linaje óseo/cemento y se evidencie la formación de depósitos de calcio, también conocidos como nódulos de mineralización *in vitro* (Rodríguez, JP y col., 2004; Seo y col., 2004; Xu y col., 2009). Como control positivo de diferenciación al linaje óseo se usó la línea celular SaOs-2, que tienen la capacidad de diferenciarse terminalmente a osteoblastos y permitir el depósito de calcio en cultivo (Kobayashi, 1999; Hou, 2007). La diferenciación al linaje óseo fue evaluada teniendo presente la expresión de transcritos de genes involucrados en la diferenciación ósea (ver tabla 1), la actividad de fosfatasa alcalina y el depósito de calcio *in vitro*.

2.6. Diferenciación al linaje adiposo

Para evaluar la diferenciación adipogénica se sembraron células STRO-1(+) y STRO-1(-) a una densidad de 50.000 células en una superficie de 1,9cm². Las células fueron incubadas durante 21 días en presencia de los medios de cultivo basal o adipogénico (α - MEM, 10% de SFB, penicilina 100 U / ml, estreptomicina y anfotericina B 100µg/ml 0,25 mg / ml, dexametasona 1 µM (SIGMA), indometacina 100µM (GIBCO), isobutilmetilxantina 0,5 mM (SIGMA) e insulina 10µg/ml (SIGMA)) y finalmente fueron fijadas y teñidas con oil red (Seo y col., 2004; Xu y col., 2009.) Para la tinción, 0,70gr de oil red (SIGMA) fueron disueltos en 200ml de isopropanol absoluto y en agitación toda la noche. Luego, la solución fue filtrada y 180ml fueron mezclados en agitación con 120ml de agua toda la noche a temperatura ambiente. Finalmente la solución fue filtrada con papel filtro para ser usada (Struut y col., 1996). Para la tinción, las células fueron fijadas en formalina 10% durante 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente fueron

lavadas con PBS e isopropanol (Merck) al 60%. Luego, se incubaron con oil red durante 1 hora a temperatura ambiente y lavadas durante 5 segundos con isopropanol al 60%, seguido de 2 lavados con agua destilada. Finalmente las células fueron teñidas con hematoxilina de Mayer y montadas con aquamount (Thermo Scientific).

2.7. Diferenciación Neuronal

Para la diferenciación neuronal se sembraron células STRO-1(+) y STRO-1(-) a una densidad de 50.000 células en una superficie de 1,9cm². Los cubreobjetos utilizados para la diferenciación neuronal fueron cubiertos con poli-ornitina (10 µg/ml, SIGMA) y laminina (5 µg/ml SIGMA). Las células fueron incubadas durante 21 días en presencia de los medios de cultivo basal o neurogénico (medio neurobasal (GIBCO) 100 U / ml de penicilina, estreptomicina y anfotericina B 100µg/ml 0,25 mg / ml, B27 (GIBCO), factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento fibroblástico-2, 20 ng/ ml (Invitrogen). Transcurrido el tiempo de diferenciación las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y analizadas por inmunofluorescencia para la identificación del marcador neuronal β-tubulina III (*Arthur y col., 2008*).

2.8. Establecimiento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

El ensayo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), ha sido utilizado para evaluar la capacidad proliferativa y clonogénica de las células troncales mesenquimales en cultivo. Este ensayo consiste en sembrar células a densidades celulares muy bajas, comparable con los ensayos de dilución

clonal, en los cuales se siembran 1 ó 2 células /pozo. Para ello, se sembraron 80 células en una superficie de 100 cm² y se permitió la formación de estos grupos de clones celulares. Finalmente, 2 a 3 semanas después las células fueron fijadas y teñidas con hematoxilina de Mayer para evaluar el número de UFC obtenidas por cada 100 cm² (Seo y col., 2004; Kuznetsov y col., 2009).

2.9. Transfección Celular

Las células fueron transfectadas transitoriamente utilizando Lipofectamina 2000 plus (Invitrogen CA, EE.UU.). Las células fueron transfectadas en suspensión con plásmidos de expresión con smo silvestre o la secuencia mutante de smo constitutivamente activa, ambos con una marca de Flag, como se han reportado con anterioridad (Taipale y col., 2000). Posteriormente las células fueron plaqueadas y después de 24 horas, fueron estimuladas con agonistas de la vía de señalización Shh/Gli.

2.10. Actividad de las Deshidrogenasas Mitocondriales – Reducción de MTS

Como una medida indirecta de la proliferación celular, se utilizó la técnica de reducción de MTS, una modificación del ensayo de reducción de MTT (Mosman y col., 1983). Células STRO-1(-) fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 1000 células por pozo. Las células fueron tratadas con Shh (3,3 µg/ml) ó Cyc (10 µM) durante 48 horas e incubadas con MTS las dos últimas horas del tratamiento. Posteriormente la placa fue leída en un espectrofotómetro para placas a 492nm. La absorbancia obtenida

correspondió a la absorbancia del formazán o producto de reducción del MTS por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables en cultivo. Los valores de absorbancia fueron comparados entre las condiciones control y los tratamientos como una medida indirecta del número de células en cultivo.

2.11. Expresión de Proteínas en Cultivo

Con el objetivo de caracterizar los cultivos obtenidos, se evaluó por inmunofluorescencia, la expresión de Runx2, un marcador de pre-osteoblastos y de 4-prolilhidroxilasa como marcador de células mesenquimales. La expresión de STRO-1 para determinar el porcentaje de células troncales presentes en el cultivo se evaluó por citometría de flujo e inmunofluorescencia.

Por Western Blot se evaluó la expresión de Gli-1, Shh, Ptc-1, osteonectina, Runx2, receptor de hormona paratiroidea y colágeno tipo I α . Adicionalmente, para evaluar la capacidad proliferativa basal, se hicieron pulsos de 12 a 36 horas con BrdU 1 μ M y posterior inmunofluorescencia para detectar BrdU (*Kasaj y col., 2008; Seo, 2004; Seo, 2005; Sonoyama, 2007; Bartold y col., 2006; Jo y col., 2007*). Todos los experimentos fueron hechos en triplicado y con tres muestras diferentes (N=3) como mínimo.

Brevemente, las técnicas utilizadas se llevaron a cabo usando los siguientes protocolos:

2.11.1. Inmunofluorescencia

Las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA, SIGMA) al 4%. Para los antígenos localizados dentro del citoplasma celular, se permeabilizó la

membrana con tritón X-100 (Winkler) al 0.1%. Luego, se bloquearon sitios inespecíficos con suero de cabra (AbCam) al 5% y se incubó con los anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente y se tiñó con DAPI (SIGMA) para visualización nuclear. Para la inmunodetección de BrdU, fue necesario denaturar el DNA con HCl 2N (Merck) y posterior neutralización del pH con tetraborato de sodio (*Marichal y col., 2009*). Los anticuerpos primarios usados para esta técnica fueron: STRO-1 (R&D systems MAB1038 dilución 1:50) Runx2 (Santacruz Biotechnology sc-10758; 1:50) o (abcam ab23981 1:500), BrdU (Dako, M0744, 1:200), 4-prolilhidroxilasa (Fibroblast Dako M087, 1:100), tubulina acetilada (SIGMA T 6793, 1:8000) Adicionalmente se usaron anticuerpos secundarios anti-ratón o anti-conejo según el caso acoplados a un fluoróforo (anti-mouse Alexafluor 488, Invitrogen 1:1000; anti-rabbit Alexafluor 488, Invitrogen 1:1000; anti-mouse alexafluor 546, Invitrogen 1:1000). Finalmente las células fueron montadas en láminas cubreobjetos con un medio de montaje para fluorescencia (Fluorsave, Calbiochem).

2.11.2. Citometría de flujo

Las células fueron tratadas con tripsina 0,25%/EDTA (GIBCO) para despegarlas de la superficie de cultivo y obtener un precipitado celular, que fue lavado 2 veces con PBS, albúmina de bovino al 0.2% y EDTA 2mM. Las células fueron incubadas con el anticuerpo anti STRO-1 (R&D systems MAB1038 1:50) durante 30 minutos a 4 °C y posteriormente incubadas con un anticuerpo secundario anti-IgM acoplado a alexafluor 488 o alexaflúor

647 (1:3500, Invitrogen). Finalmente las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 1% y evaluadas en el citómetro de flujo.

2.11.3. Western blot

Monocapas celulares en superficies de 60 cm² fueron lisadas con buffer de lisis (Hepes 50mM, NaCl 150mM, EGTA 1mM, Glicerol 10%, Tritón X-100 1%, MgCl₂) y una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas. (Halt protease and phosphatase inhibitor cocktail EDTA free 100X, Thermo Scientific 78441). Se cuantificó el total de proteína obtenida en los lisados con un kit de cuantificación (Biorad dc protein assay kit II 5000112) y estos fueron mezclados con buffer de carga con β-Mercaptoetanol (SDS 40%, glicerol, Tris 1M pH 6.8, 0.04% de azul de bromofenol (Winkler) y 20% de β-Mercaptoetanol (SIGMA)). Los lisados fueron fraccionados en geles de poliacrilamida (Biorad, 10-12%) en condiciones denaturantes a 100mVolt durante aproximadamente 3 horas. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Millipore, 0,45μM) y posteriormente incubadas con los anticuerpos correspondientes y revelados en películas fotográficas usando reactivos de quimioluminiscencia (PIERCE). (*Stecca y Ruiz i Altaba, 2009*). Como control de carga se evaluó la expresión de α-tubulina o β-actina. Los anticuerpos usados para detectar la expresión de proteínas fueron los siguientes: colágeno tipo I (Santacruz Biotechnology sc-8784, 1:500), osteonectina (Santacruz Biotechnology sc-13326, 1:500), Runx2 (abcam ab23981 1:4000), receptor PTH (Santacruz Biotechnology sc-12778, 1:500), Gli-1 (Millipore Ab3444, 1:8000), β-actina (SIGMA A544, 1:5000), α-tubulina (SIGMA T-5168, 1:5000), Ptc-1 (Santacruz

Biotechnology H-267: sc-9016, 1:500).

2.12. RT-PCR semicuantitativo

Para establecer la presencia de transcritos de los componentes de la vía de Shh-Gli y para evidenciar los transcritos de genes involucrados en la diferenciación ósea, se utilizó la técnica de RT-PCR semicuantitativo de la siguiente manera: El RNA fue extraído con TRIZOL (Invitrogen) de células cultivadas hasta confluencia en placas con una superficie de 3,8 cm². Posteriormente, se generó cDNA de hebra simple para llevar a cabo las reacciones de RT-PCR. Como control de las técnicas propuestas para evaluar la presencia de transcritos se usaron las líneas celulares humanas Du145 y PC3, obtenidas a partir de cáncer de próstata, que se sabe expresan los componentes de la vía de señalización de Sonic Hedgehog. Estas células fueron mantenidas en DMEM:F-12 con SFB al 10% y antibióticos (*Sánchez y col., 2004*). Adicionalmente se usó la línea celular de osteosarcoma humano SaOS, mantenida en medio McCoy's 5A suplementado con SFB al 15% (*Warzecha y col., 2007*). Se evaluó la expresión de los siguientes genes para la vía de señalización Shh/Gli: *SHH*, *GLI1*, *GLI2*, *GLI3*, *PTC1*; se usó como control de carga la expresión del gen de la subunidad ribosomal *18S* (Tabla 1) (*Sanchez y col., 2004*).

Para evaluar transcritos relacionados con la diferenciación ósea se utilizaron los partidores y las condiciones que se enumeran en la **tabla1**

Gen	Partidor Sentido	Partidor Anti sentido	TM
<i>SHH</i>	TCCAAGGCACATATCCACTG	CCAGGAAAGTGAGGAAGTCG	60
<i>PTC 1</i>	CCACAGAAGCGCTCCTACA	CTGTAATTTGCCCCCTTCC	60
<i>GLI 1</i>	TGCAGCCAATACAGACAGTGG	CAGTATAGGCAGAGCTGATGC	60
<i>GLI2</i>	CACCGCTGCTCAAAGAGAA	TCTCCACGCCACTGTCATT	60
<i>GLI3</i>	CGAACAGATGTGAGCGAGAA	TTGATCAATGAGGCCCTCTC	60
<i>18S</i>	GAGCGAAAGCATTGCCAAG	GGCATCGTTTATGGTCGGAA	60
<i>RUNX2</i>	ACCCACGAATGCACTATCC	TTCCATCAGCGTCAACACC	54
<i>OSX</i>	AACCCCCAGCTGCCACCTACC	CGTTCGGATGAGCTGGAGCG	64
<i>FAL</i>	ATCCTGTATGGCAATGGGC	GGCGGCAGACTTTGGTTTC	57
<i>OC</i>	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC	CAGGGGATCCGGGTAGGGGAC	60
<i>COL I</i>	CAAAGGCAATGCTCA	TGCGGCACAAGGGAT	60
<i>GAPDH</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	60

Tabla 1. Lista de partidores utilizados para amplificar los transcritos de los genes indicados, con las condiciones de TM correspondientes.

2.13. Actividad fosfatasa alcalina (ALPA)

Para cuantificar la actividad de fosfatasa alcalina células STRO-1(+) o STRO-1(-) o la línea celular reportera de la vía de Shh/Gli CH310T1/2, fueron sembradas al 80% de confluencia en placas de 48 ó 24 ó 12 pocillos. Las células fueron fijadas con etanol 90% y 10% de formaldehído al 37% durante 1 minuto, luego las monocapas fueron lavadas con PBS. Para el protocolo por histoquímica, se usó como sustrato NBT y BCIP (Roche) a pH alcalino. Las células fueron incubadas durante 20 minutos en oscuridad con el sustrato. Las células con actividad de fosfatasa alcalina se tiñeron de color violeta. Posteriormente las células fueron contrateñidas con

hematoxilina de Mayer.

Para el protocolo con colorimetría las células fijadas fueron incubadas con el sustrato, p-nitrofenolfosfato (1mg/ml) durante 20 minutos a 37°C, el p-nitrofenol generado fue cuantificado a 405nm (*Regl y col., 2002; Rodríguez y col., 2004*).

2.14. Depósito de calcio

La presencia de nódulos de mineralización o cristales de calcio en presencia de medio osteogénico se determinó por medio de la tinción con rojo alizarín. Las células fijadas en PFA al 4%, Las células fijadas en paraformaldehído al 4% fueron incubadas con rojo alizarín (pH 4.2) durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego fueron lavadas con agua bidestilada e incubadas con PBS durante 15 minutos. Los depósitos de calcio presentes se observaron de rojo intenso. Adicionalmente se cuantificó el calcio depositado en las monocapas celulares utilizando la técnica colorimétrica, en la que el calcio forma un complejo cromogénico con orto-cresolftaleína que es cuantificado a 575nm. Se obtuvo la concentración en µg de calcio depositados en cada monocapa (BIOVISION Calcium colorimetric assay K380-250) (*Hiruma y col., 1998; Seo y col., 2004*).

2.15. Microscopia electrónica de barrido

Las células fueron fijadas en glutaraldehído (Merck) al 2,5% y deshidratadas gradualmente con etanol. Posteriormente fueron cubiertas con oro-paladio y visualizadas en el microscopio electrónico de barrido (FEI QUANTA-200) que cuenta con EDAX (Energy Dispersive X-ray analysis) una

herramienta que permite hacer un análisis de dispersión de energía por rayos X evaluar el contenido elemental de la zona de interés, y de esta manera se obtuvieron los datos sobre la composición de los nódulos de mineralización depositados en las monocapas celulares (Ko y col., 2007).

2.16. Estímulo con Shh o Purmorfamina e inhibición farmacológica con Ciclopamina

Para los experimentos de ganancia o pérdida de función farmacológica de la vía de señalización Shh/Gli, las células obtenidas de LPH y las poblaciones celulares STRO-1(+) y STRO-1(-) fueron tratadas con los agonistas Shh recombinante (3,3 µg/ml, N-terminal de R & D systems) o con purmorfamina (Pur, 10µM, Merck) en medio de cultivo α -MEM suplementado con antibióticos. Para la inhibición farmacológica las células fueron tratadas con Ciclopamina (Cyc, 10µM, Infinity Pharmacol.) en medio de cultivo basal. Cabe anotar que previo a los tratamientos farmacológicos, las células fueron incubadas con α - MEM sin SFB durante 24 horas.

Los experimentos en los que se evaluó la proliferación celular incluyeron un tratamiento de 48 horas con los agonistas o con el antagonista y un pulso final de 20 horas con BrdU (1µM).

2.17. Cuantificación y Análisis Estadístico de los Resultados Obtenidos

2.17.1 Inmunofluorescencia

Para la cuantificación de la expresión de proteínas visualizadas mediante esta técnica se se tomaron fotografías en el microscopio de epifluorescencia de 5 campos al azar a bajo aumento (20X) y se contaron las células positivas en cada canal en el programa Adobe Photoshop Cs3 Extended con la herramienta de conteo. Los resultados fueron expresados como un porcentaje del total de células teñidas con DAPI.

2.17.2 Cuantificación de Fosfatasa Alcalina y Adipocitos

Para determinar los porcentajes de células con actividad de fosfatasa alcalina por histoquímica, se tomaron fotos en el microscopio de luz a bajo aumento (Leica, 10X) y se cuantificaron las células positivas con respecto al total de núcleos teñidos con hematoxilina, los resultados fueron expresados en porcentaje.

Para determinar los porcentajes de adipocitos por campo, se tomaron fotos en el microscopio de luz a bajo aumento (Leica, 20X) y las células con vacuolas de triglicéridos teñidas con oil red fueron contadas como positivas. Los resultados fueron expresados como número de adipocitos en una superficie de 1,9cm².

2.17.3. Western Blot

Para la cuantificación de la expresión de proteínas visualizadas mediante esta técnica, las películas obtenidas fueron digitalizadas. Mediante el programa Kodak Molecular Imaging Software se evaluó la expresión relativa de las proteínas visualizadas con respecto al control de carga y se graficaron en unidades relativas de intensidad.

2.18. Análisis estadístico de los Datos Obtenidos

Para establecer diferencias entre los controles y tratamientos utilizados los resultados obtenidos de los experimentos con las distintas técnicas descritas, los datos fueron graficados y analizados estadísticamente con un intervalo de confianza del 95% (t-student) con el programa PRISM 5.0 de Graph Pad.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización de los Cultivos primarios obtenidos de Ligamento Periodontal Humano (LPH) y aislamiento de las células STRO-1(+)

Los cultivos primarios obtenidos de LPH fueron viables, proliferaron activamente y tuvieron un tiempo de duplicación de 24 horas, establecido por el número de células que incorporan BrdU en diversos tiempos en cultivo (12, 24 y 36 horas) (**Fig. 4 A, B**). Los cultivos heterogéneos de LPH expresaron los marcadores antes reportados en la literatura para células mesenquimales 4-prolil hidroxilasa y osteoprotegerina (*Lossdörfer y col., 2005*), así como una significativa expresión del factor de transcripción Runx2 (**Fig. 5 A, B, E**). En concordancia con lo evidenciado previamente en la literatura (*Seo y col., 2004, Ivanovsky y col., 2006, Xu y col., 2009*), en los cultivos obtenidos se observó la expresión del marcador de células troncales STRO-1 en alrededor de un 5% del total de las células evaluadas por citometría de flujo (**Fig. 5 C-F**). Posteriormente las células STRO-1(+) que a partir de ahora serán identificadas como células troncales y/o progenitoras del ligamento periodontal humano (HPLSC/progenitoras), fueron aisladas inmunomagnéticamente utilizando un anticuerpo monoclonal anti-STRO-1 y esferas magnéticas recubiertas con un anticuerpo secundario específico

(Ver materiales y métodos). Posterior al aislamiento se obtuvo un enriquecimiento cercano al 70% de células que expresan esta proteína **(Fig. 5 G)**.

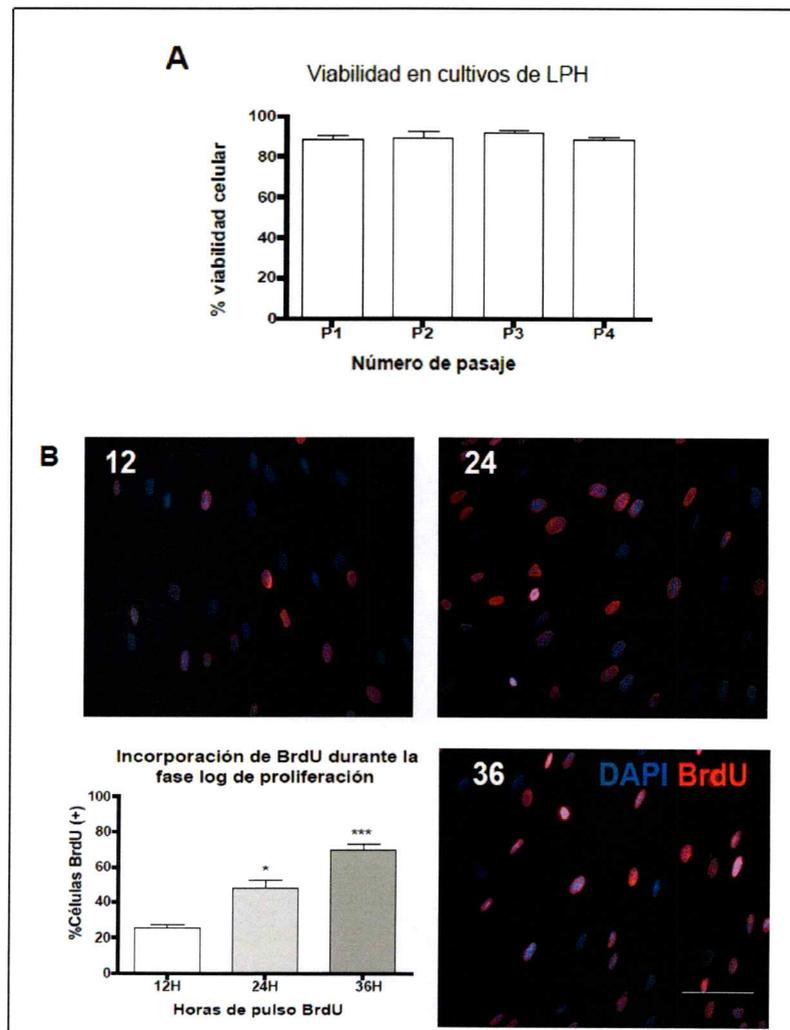


Figura 4. Viabilidad y tiempo de duplicación de los cultivos obtenidos a partir de LPH. (A). Células obtenidas a partir de ligamento periodontal humano (LPH) fueron cultivadas en presencia de SFB en una superficie de $1,9 \text{ cm}^2$ a una densidad de 5×10^3 células. Posteriormente las células fueron despegadas con tripsina y contadas en un hemocitómetro con azul tripán en los días de cultivo indicados. **(B)** Imágenes representativas de la incorporación de BrdU y su cuantificación durante la fase logarítmica de proliferación en con pulsos de 12, 24 y 36 horas de BrdU. Barra de aumento equivale a $50 \mu\text{m}$.

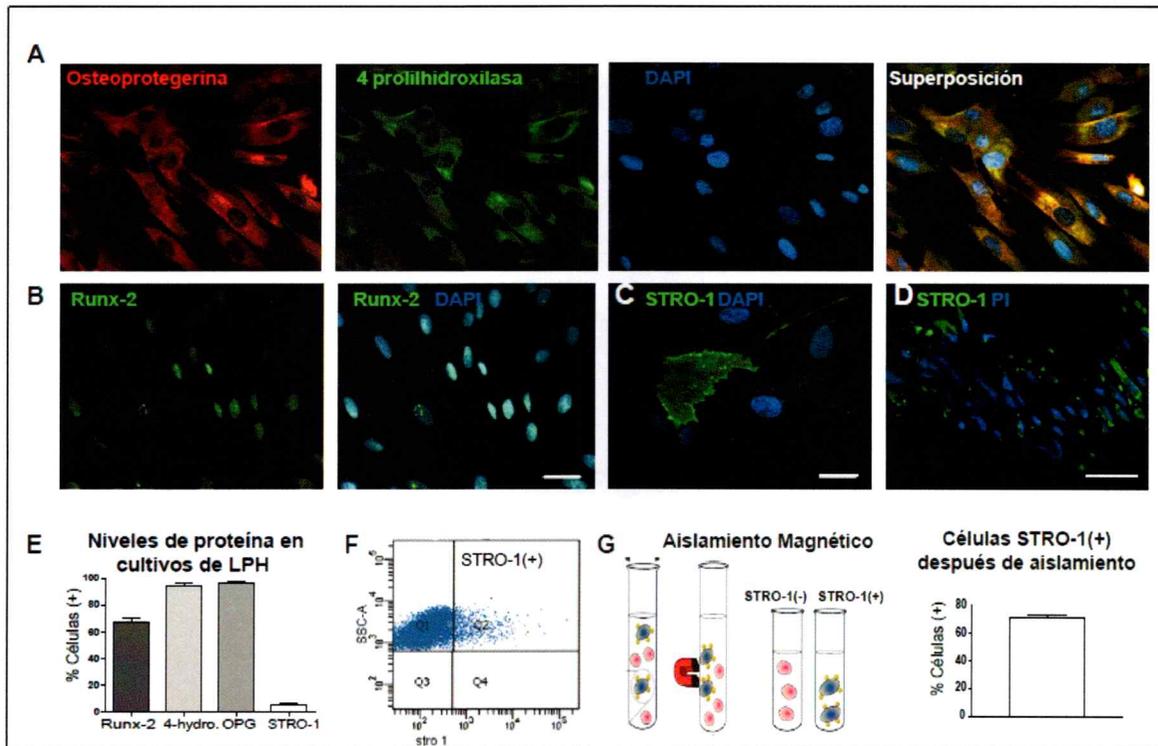


Figura 5. Las células obtenidas a partir de LPH son mesenquimales y contienen células troncales/progenitoras que pueden ser aisladas inmunomagnéticamente. Las células obtenidas de LPH fueron cultivadas en presencia de SFB en una superficie de 1,9 cm² a una densidad de 5X10³ células, fueron fijadas en PFA 4% y se sometieron a inmunofluorescencia. Imágenes representativas de **(A)** 4-prolilhidroxilasa y osteoprotegerina, **(B)** Runx2 **(C)** STRO-1 **(D)** Imagen de un explante de LPH en el que se observan células STRO-1(+). **(E)** Cuantificación de la expresión de Runx2, 4-prolilhidroxilasa, osteoprotegerina (OPG) y STRO-1 por inmunofluorescencia con respecto a las células DAPI (+) **(F)**. Citometría de flujo para el marcador STRO-1 **(G)** Aislamiento inmunomagnético y cuantificación del porcentaje de células STRO-1(+) obtenidas 1 semana post-aislamiento, las células fueron contadas con respecto al número de células DAPI (+). Barra de aumento equivale a (A, B, D) 50 µm. (C) 20 µm.

3.2. Caracterización de las células STRO-1(+) aisladas inmunomagnéticamente

Las células troncales y/o progenitoras aisladas inmunomagnéticamente, además de la expresión de STRO-1, evidenciaron la capacidad de generar clones en el ensayo de establecimiento de UFC y también expresaron CD146/MUC18, que corresponde a un segundo marcador de células troncales mesenquimales (**Fig. 6 A-B'**). Así mismo en condiciones basales, estas células HPLSC/progenitoras no expresaron los marcadores de diferenciación ósea (colágeno tipo-I, Rc-PTH, osteonectina y Runx2). Sin embargo, estos marcadores fueron evidentes en la población de células STRO-1(-) (**Fig. 7 A-D**). Por otra parte, el potencial de diferenciación a varios linajes de las células aisladas inmunomagnéticamente fue confirmado ya que las HPLSC/progenitoras fueron capaces de diferenciarse a los linajes óseo/cemento, adiposo y neuronal después de haber sido incubadas durante 21 días con los respectivos medios de diferenciación. La diferenciación al linaje óseo fue evaluada por el depósito de calcio o nódulos de mineralización depositados en cultivo y su composición mediante análisis de EDAX (**Fig. 8 A-C'**); el depósito de triglicéridos evaluados por tinción oil red que confirma la presencia de adipocitos en cultivo para la diferenciación adiposa (**Fig. 8 D-F'**) y la expresión del marcador neuronal β III tubulina en el caso de la diferenciación neuronal (**Fig. 8 G- I**).

Igualmente se compararon los potenciales de diferenciación a los linajes óseo y adiposo de las HPLSC/progenitoras con las de la población STRO-

1(-), lo que reveló una mayor diferenciación de adipocitos en las HPLSC/progenitoras con respecto a la población STRO-1(-), en las que la diferenciación fue prácticamente inexistente (**Fig. 9 A, B**). Por el contrario la población STRO-1(-) presentó un mayor depósito de calcio y actividad de fosfatasa alcalina que las HPLSC/progenitoras (**Fig. 9 C-H**).

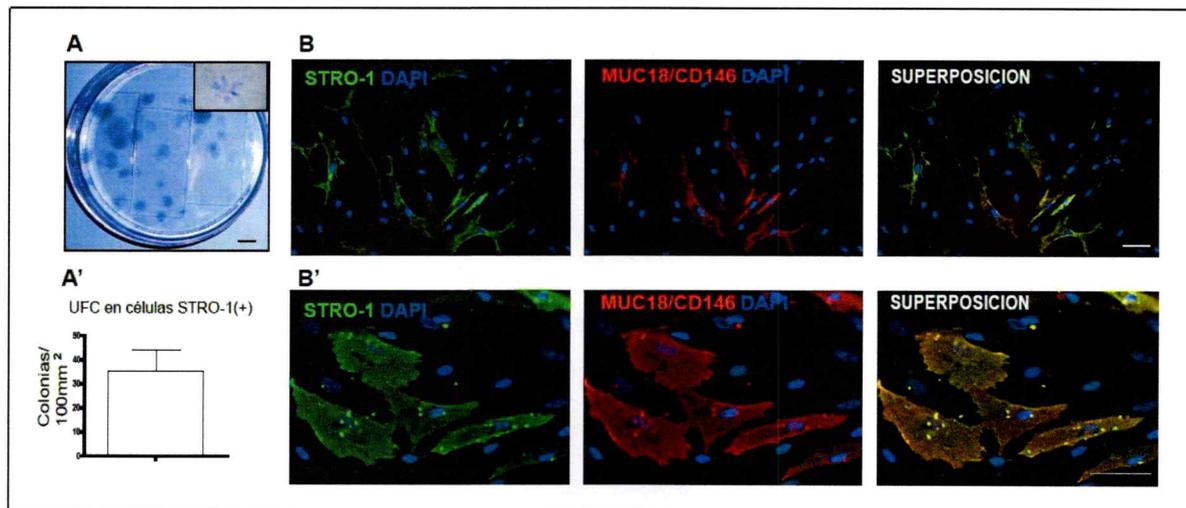


Figura 6. Las HPLSC/progenitoras aisladas, son clonogénicas y positivas para los marcadores STRO-1 y CD146/MUC18. Para el ensayo de establecimiento de Unidades Formadoras de Colonias Fibroblastoides (UFC-F) 80 HPLSC/progenitoras fueron sembradas en una placa de 100mm², después de 3 semanas en cultivo las células fueron fijadas con PFA y teñidas con hematoxilina de Mayer (**A**). Imagen representativa de las colonias formadas (**A'**) y su cuantificación (**B-B'**) Imágenes representativas de inmunofluorescencias dobles para STRO-1 y MUC18/CD146. Barra de aumento equivale a (A) 1cm (B-B') 50 μ m.

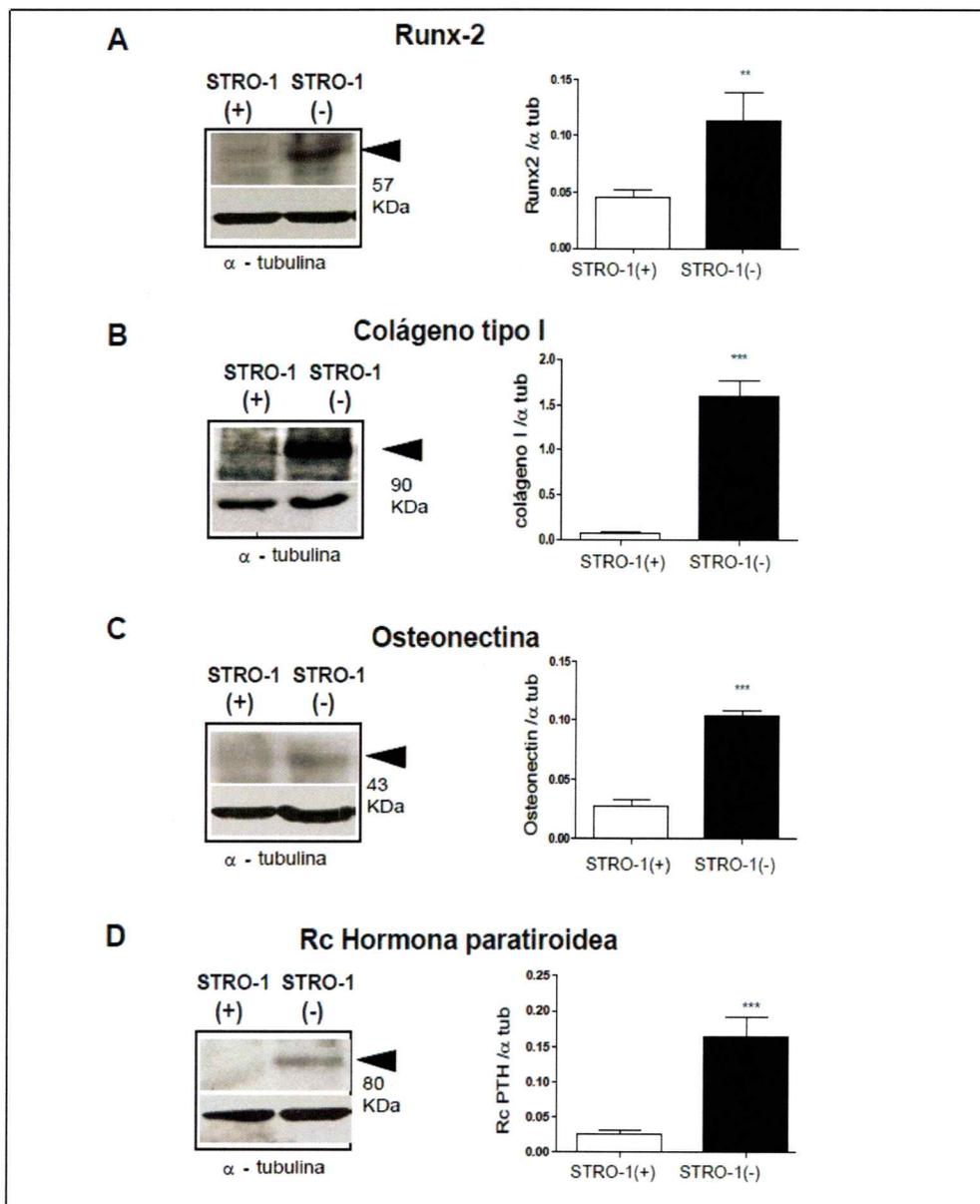


Figura 7. Las células HPLSC/progenitoras no expresan marcadores óseos en condiciones basales. Una vez aisladas las poblaciones STRO-1(+) y STRO-1(-) fue evaluada la expresión de marcadores de linaje óseo. Los niveles de proteínas fueron evaluados por Western Blot y las respectivas cuantificaciones densitométricas de **(A)** Runx2, **(B)** colágeno tipo I, **(C)** Osteonectina y **(D)** Receptor de Hormona Paratiroidea. Los resultados fueron cuantificados en el programa Kodak Digital Imaging. Los resultados se expresan como la razón entre las intensidades netas de la proteína analizada y de la α -tubulina. * $p < 0.03$ ** $p < 0.003$ *** $p < 0.0001$

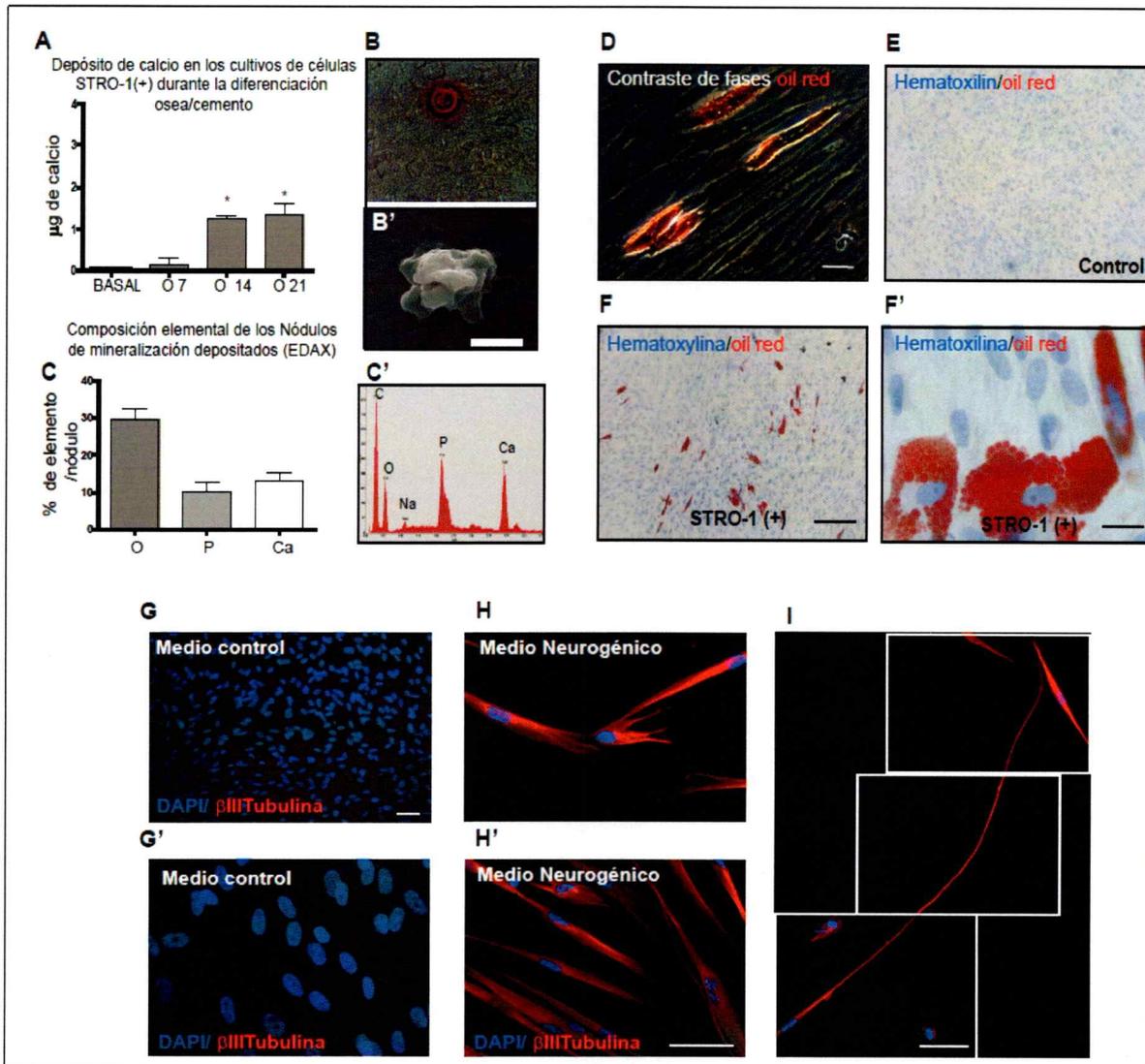


Figura 8. Las HPLSC/progenitoras son multipotentes y se diferencian a los linajes óseo/cemento, adiposo y neuronal. Las HPLSC/progenitoras fueron incubadas durante 21 días en presencia de medio basal o medio osteogénico y fueron fijadas. **(A)** Cuantificación del depósito de calcio ($\mu\text{g}/\text{pozo}$) por colorimetría en los tiempos indicados. **(B)** Imágenes representativas de los nódulos de mineralización depositados en cultivo teñidos con rojo alizarín y **(B')** evaluados por microscopía electrónica de barrido. **(C)** Análisis elemental por nódulo y **(C')** su respectivo perfil de emisión con EDAX. **(D-F')** Las HPLSC/progenitoras fueron incubadas durante 21 días en presencia de medio basal o medio adipogénico, fueron fijadas y teñidas con oil red y hematoxilina de Mayer. Imágenes representativas de la diferenciación adipogénica en las condiciones indicadas. **(G-I)** Las HPLSC/progenitoras fueron incubadas durante 21 días en presencia de medio basal o medio neurogénico, fueron fijadas y se identificó por inmunofluorescencia el marcador neuronal βIII -tubulina. Imágenes representativas de la diferenciación neuronal en las condiciones indicadas, observe en **(I)** la composición de 3 campos en los que se identifican neuritas en cultivo. Barra de aumento equivale a **(B')** 5 μm . **(F-I)** 50 μm .

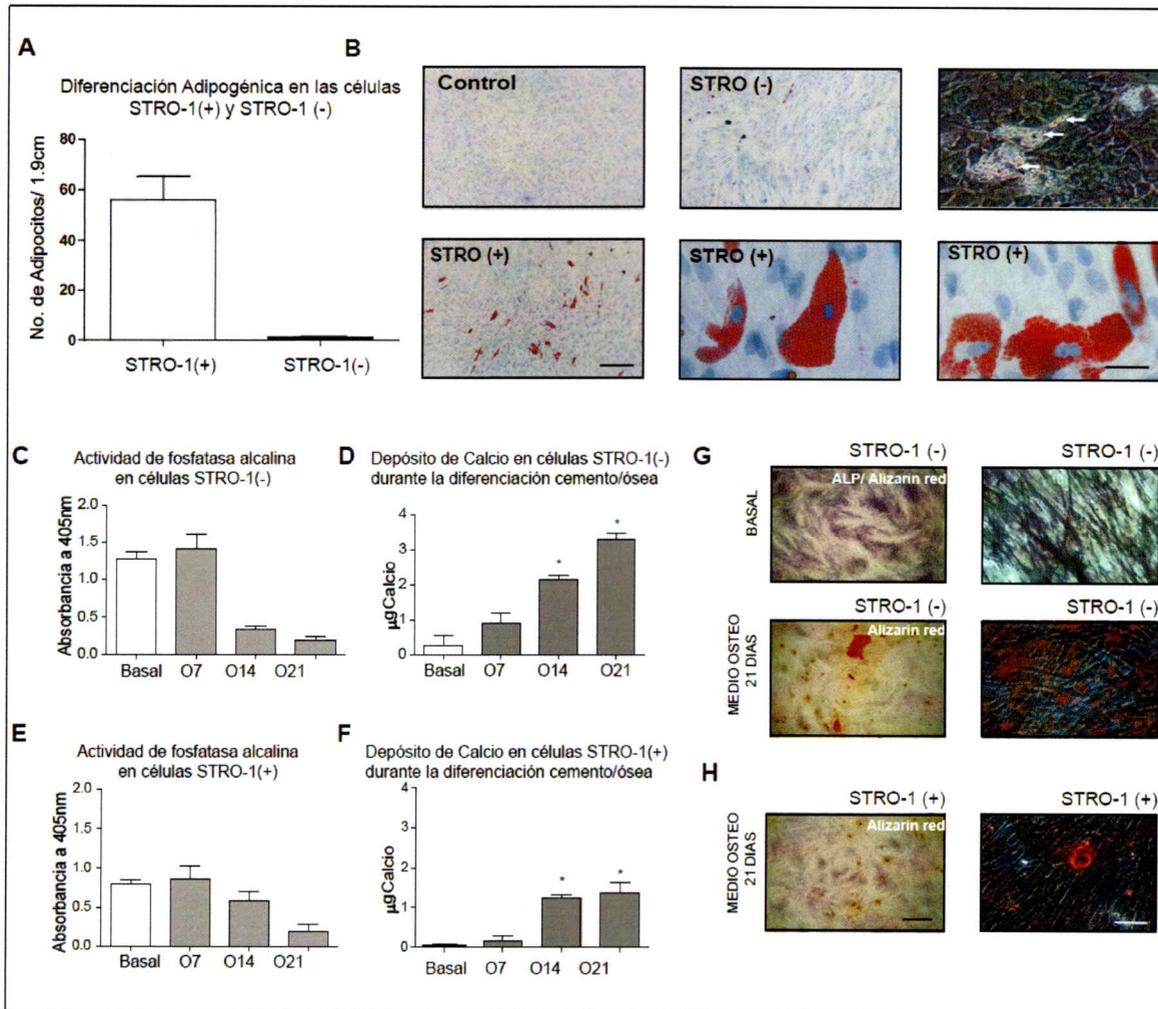


Figura 9. Las HPLSC/progenitoras tienen mayor capacidad de diferenciarse a tejido adiposo pero menor capacidad de diferenciarse al linaje óseo que las células STRO-1 (-). Las células STRO-1(+) o STRO-1(-) fueron incubadas en presencia de medio adipogénico durante 21 días. **(A, B)** Imágenes representativas y cuantificación del número de adipocitos presentes teñidos con oil red después de la diferenciación. Para la diferenciación ósea las células fueron incubadas con medio osteogénico durante los tiempos indicados. **(C-F)**. Cuantificación de la actividad de fosfatasa alcalina y del depósito de calcio en los tiempos y células indicadas **(G, H)**. Imágenes representativas de las tinciones para fosfatasa alcalina y rojo alizarín en las que se muestra mayor cantidad de nódulos de mineralización teñidos de rojo en la población STRO-1(-). Barra de aumento equivale a 200µm.

3.3. Las células STRO-1 (+) expresan los componentes de la vía Shh/GLI y son capaces de responder a Shh

Las HPLSC/progenitoras fueron estimuladas con 3,3 µg/ml de Shh en medio libre de suero o con 10µM Cyc, en presencia de SFB (10%). La expresión de los transcritos de los genes blanco de la vía de Shh *GLI1* y *PTC-1*, mostraron un incremento en la presencia de Shh y la correspondiente disminución en la presencia de Cyc, además de la expresión de los factores de transcripción *GLI2* y *GLI3* (**Fig. 10A**). Del mismo modo, los niveles de proteína de Ptc-1 fueron modulados por el tratamiento con Cyc, mostrando una disminución de los niveles de proteína en presencia del inhibidor farmacológico (**Fig. 10 B**).

Por otro lado se midieron los niveles de proteína de Shh en las HPLSC/progenitoras y en la población de células STRO-1(-), proteína que fue observada en las dos poblaciones celulares, pero siendo mayor en las HPLSC/progenitoras (**Fig. 10C**). Con el objetivo de evaluar la actividad de la proteína Shh secretada por ambas poblaciones celulares, se utilizó la línea celular reportera para Shh (C3H10T1 / 2), células en las que se induce la actividad de fosfatasa alcalina (ALPA) en presencia de Shh activo (*Ingram y col., 2002*). La línea celular se incubó con medios condicionados derivados de HPLSC o de células STRO-1 (-) y como controles positivos se usaron los agonistas de la vía Shh y purmorfamina. Solamente el medio condicionado proveniente de las células STRO-1 (+) fue capaz de inducir ALPA (**Fig. 10 D, E**), lo que indica una fuente autocrina de Shh. Además, el tratamiento con Cyc del medio condicionado proveniente de las células STRO-1 (+) redujo

significativamente la respuesta positiva de las células-reportero (**Fig. 10 D, E**). Por tanto, células STRO-1 (+) producen y a la vez responden a la señalización de Shh.

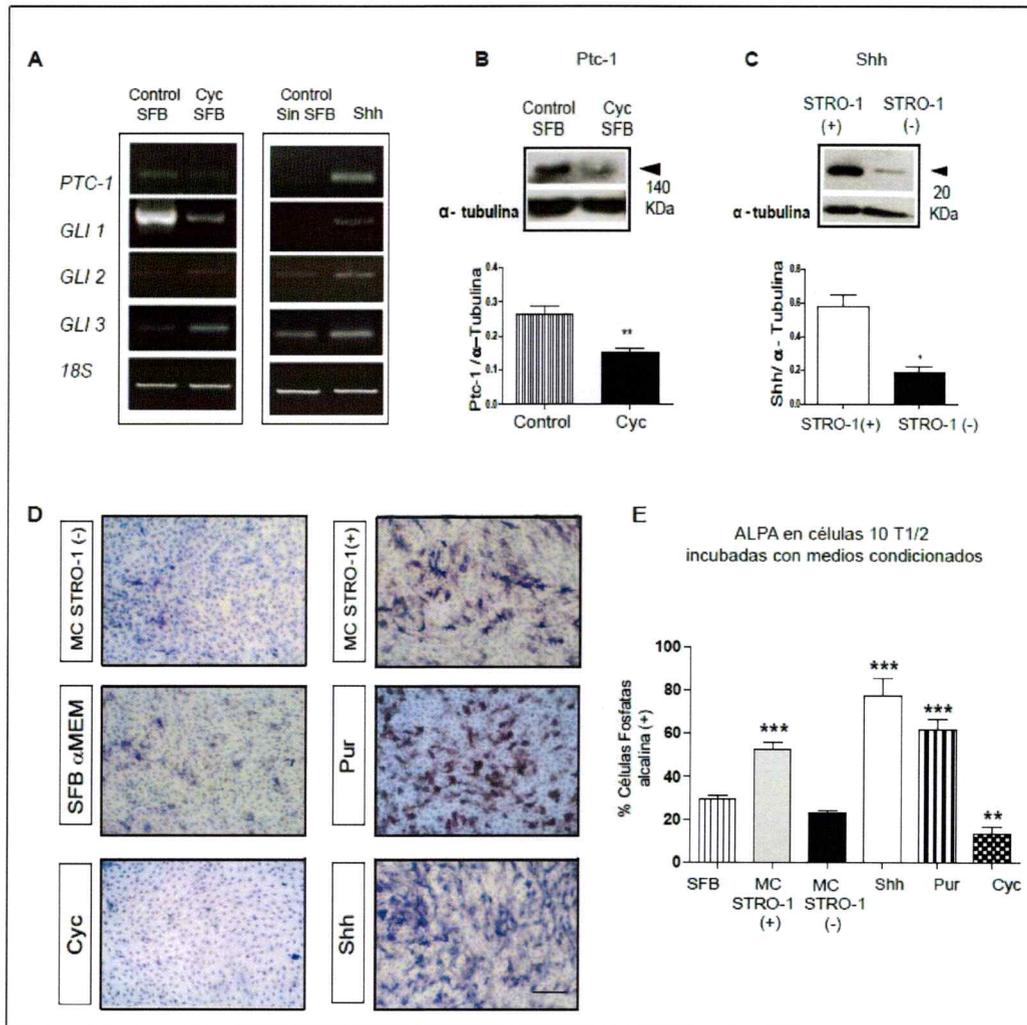


Figura 10. Las HPLSC/progenitoras expresan los componentes de la vía de señalización Shh/Gli, responden activamente a ésta y secretan Shh autocrino. (A) Las células STRO-1 (+) fueron tratadas durante 48 horas con Shh (3,3 μ g / ml sin SFB o Cyc (10 μ M con SFB al 10%) y luego se evaluó la expresión de los transcritos de la vía de señalización mediante RT-PCR semicuantitativo. Se observaron cambios en la expresión de *GLI1* y *PTC-1* **(B)** Western blot y análisis densitométrico de *Ptc-1*, cuyos niveles son disminuidos después del tratamiento con Cyc. **(C)** Niveles de expresión de la proteína Shh en las poblaciones STRO-1 (+) y STRO-1 (-) revela mayores niveles de Shh en HPLSC. **(D)** imágenes representativas de ALPA de las células C3H-10T1/2 2 tratadas con medio condicionado (MC) de las células STRO-1 (+) ó STRO-1 (-). Porcentaje de células ALPA (+) en respuesta a los tratamientos indicados **(E)**. Como controles fueron utilizados los agonistas Shh o purmorfamina y el agonista Cyc. * p <0,01 ** p <.0.001 *** p <0,0001. Barra de aumento equivale a 200 μ m.

3.4. Las células STRO-1 (+) tienen cilios primarios, un centro de señalización necesario para la transducción de Shh

Considerando el importante rol del cilio primario en la activación de la vía de Shh en los vertebrados (*Wong y Reiter, 2008*) se evaluó su presencia en las HPLSC/progenitoras. En ausencia del ligando Shh, Smo se localiza en el citoplasma celular. Por el contrario, Smo se enriquece en el cilio primario en presencia de Shh (*Rohatgi y col., 2007; Wang y col., 2009*). Los cilios primarios fueron detectados en las HPLSC por la expresión de tubulina acetilada, que es un marcador de cilio primario y mediante microscopía electrónica de barrido (**Fig. 11 A-A', B**). Posteriormente, con el objetivo de evaluar el enriquecimiento de Smo en los cilios después del estímulo con Shh, las células fueron transfectadas con un constructo de expresión silvestre smo-flag (smo-wt). En condiciones control la marca que se distribuyó por todo el citoplasma (**Fig. 11 C**). En tanto, una vez que las células fueron estimuladas con Shh, se observó la concentración de Smo en el cilio primario (**Fig. 11 D**). Para confirmar que efectivamente son las células STRO-1(+) en las que se observa el reclutamiento de Smo en el cilio, se hicieron triples marcajes para STRO-1, Smo y tubulina acetilada, confirmando la localización subcelular de Smo en presencia de los agonistas farmacológicos Shh o purmorfamina (**Fig. 12 A, B y C**). Como control, se utilizó una forma mutante activa de Smo (SmoA1) que se localiza exclusivamente en el cilio primario (**Fig. 12 D**). Basándose en estas observaciones se concluye que HPLSC/progenitores, responden activamente a vía de señalización Shh/Gli.

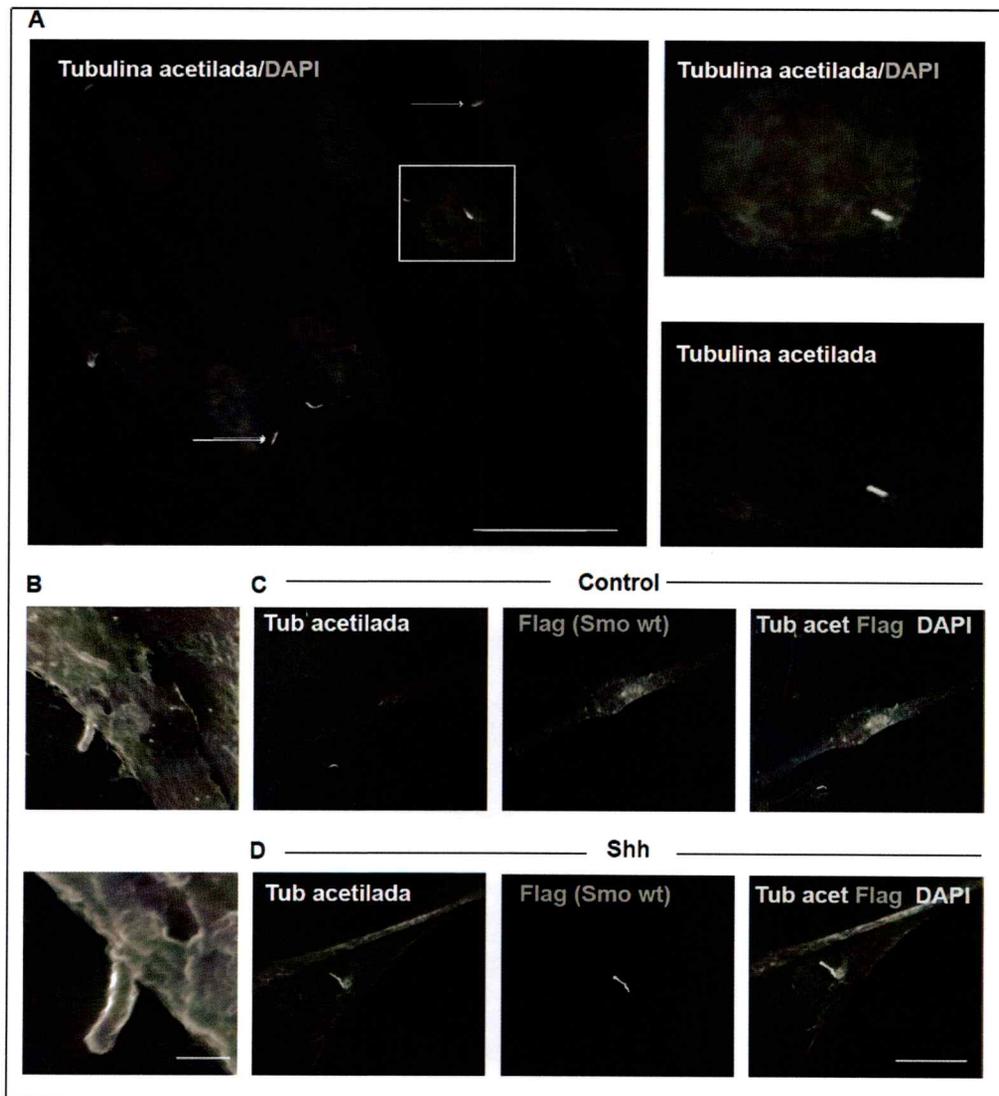


Figura 11. Las HPLSC/progenitoras tienen cilio primario, un centro de señalización necesario para la transducción de señales de Shh/Gli y responden a la vía al moverse Smo a la punta del cilio. (A) Imágenes de la inmunotinción para tubulina acetilada que marca los cilios primarios en las HPLSC. **(A')** Mayor amplificación de una sola célula con su cilio primario. **(B)** Imágenes tomadas en el microscopio electrónico de barrido que muestran un cilio primario. **(C)** HPLSC fueron transfectadas con smo-wt-tag y luego se hizo la doble inmunotinción para tubulina acetilada y flag. Imágenes en medio control o **(D)** tratadas con Shh (3,3 $\mu\text{g} / \text{ml}$). Barra de aumento equivale a (B) 5 μm . (D) 20 μm .

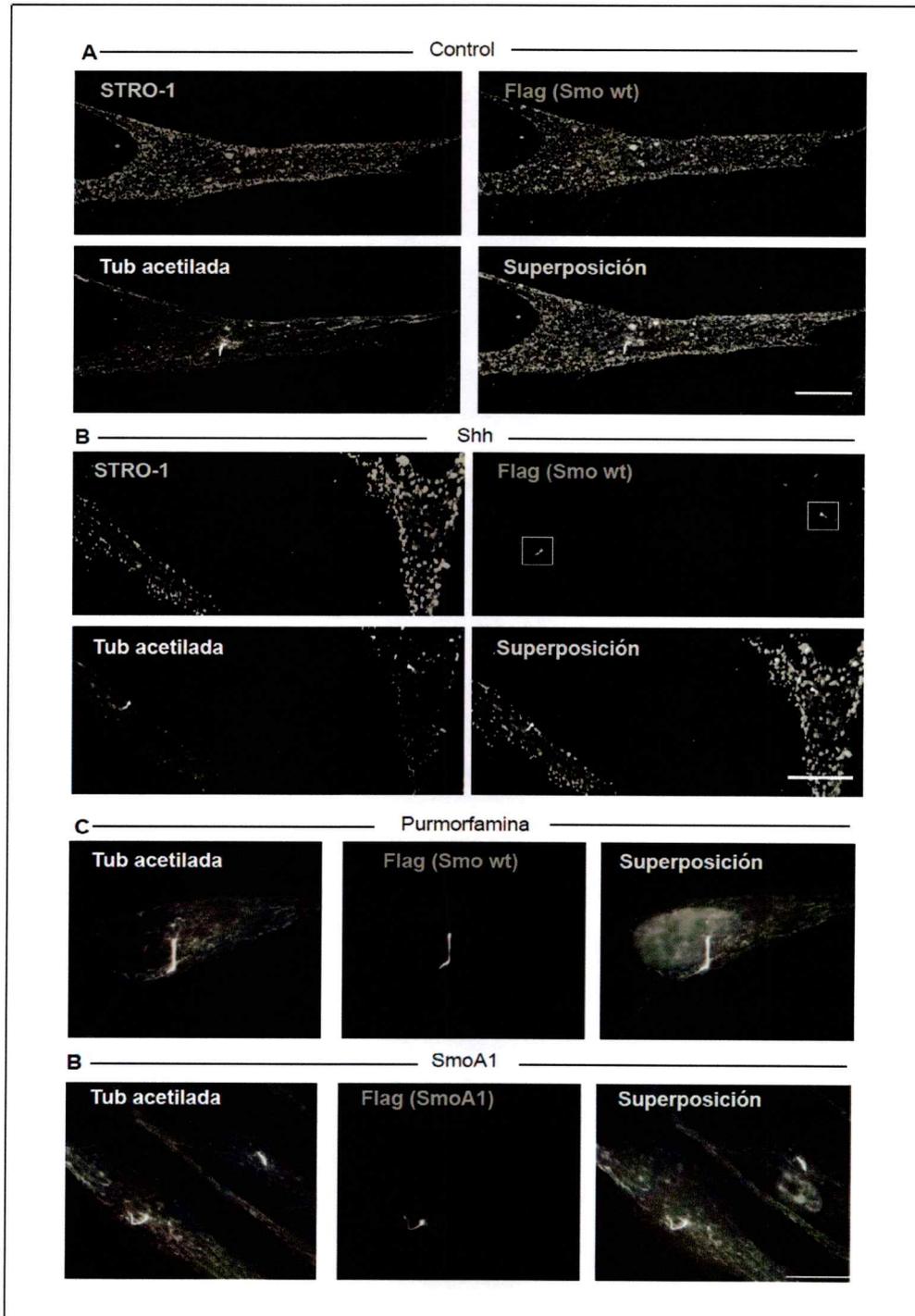


Figura 12. Las HPLSC/progenitoras STRO -1(+) responden a la vía al movilizarse Smo a la punta del cilio. HPLSC fueron transfectadas con smo-wt-flag y se hicieron triples marcajes para STRO-1, tubulina acetilada y flag. Imágenes representativas en las células en **(A)** medio control ó **(B)** tratadas con Shh o **(G)** purmorphamina. Las células STRO-1 (+) también fueron transfectadas con una forma activada del Smo (SmoA1). Barra de aumento equivale a 20 μ m.

3.5. Shh estimula la proliferación de las células STRO-1(+)

Se evaluó la respuesta proliferativa de las células STRO-1 (+) después de 48 horas de estimulación con Shh recombinante en medio α -MEM o inhibición con Cyc, en presencia de SFB 10% y un pulso de 20 horas con BrdU, ya que previamente se evidenció un tiempo estimado de duplicación de 24 horas. Una vez cuantificado el porcentaje de células que incorporan BrdU y las que expresan el antígeno Ki67, se evidenció un incremento estadísticamente significativo tanto de las células BrdU(+), como de las células Ki67(+) y las doble positivas en presencia de Shh y lo opuesto se obtuvo con el antagonista Cyc (**Fig. 13 A-G**). Este efecto se observó sólo en HPLSC/progenitoras, ya que no se detectaron cambios proliferativos ni en los cultivos heterogéneos ni en las células STRO-1 (-) (**Fig. 14 A-G**). Con base en estos resultados se concluye que Shh tiene un claro efecto mitogénico sobre las HPLSC/progenitoras.

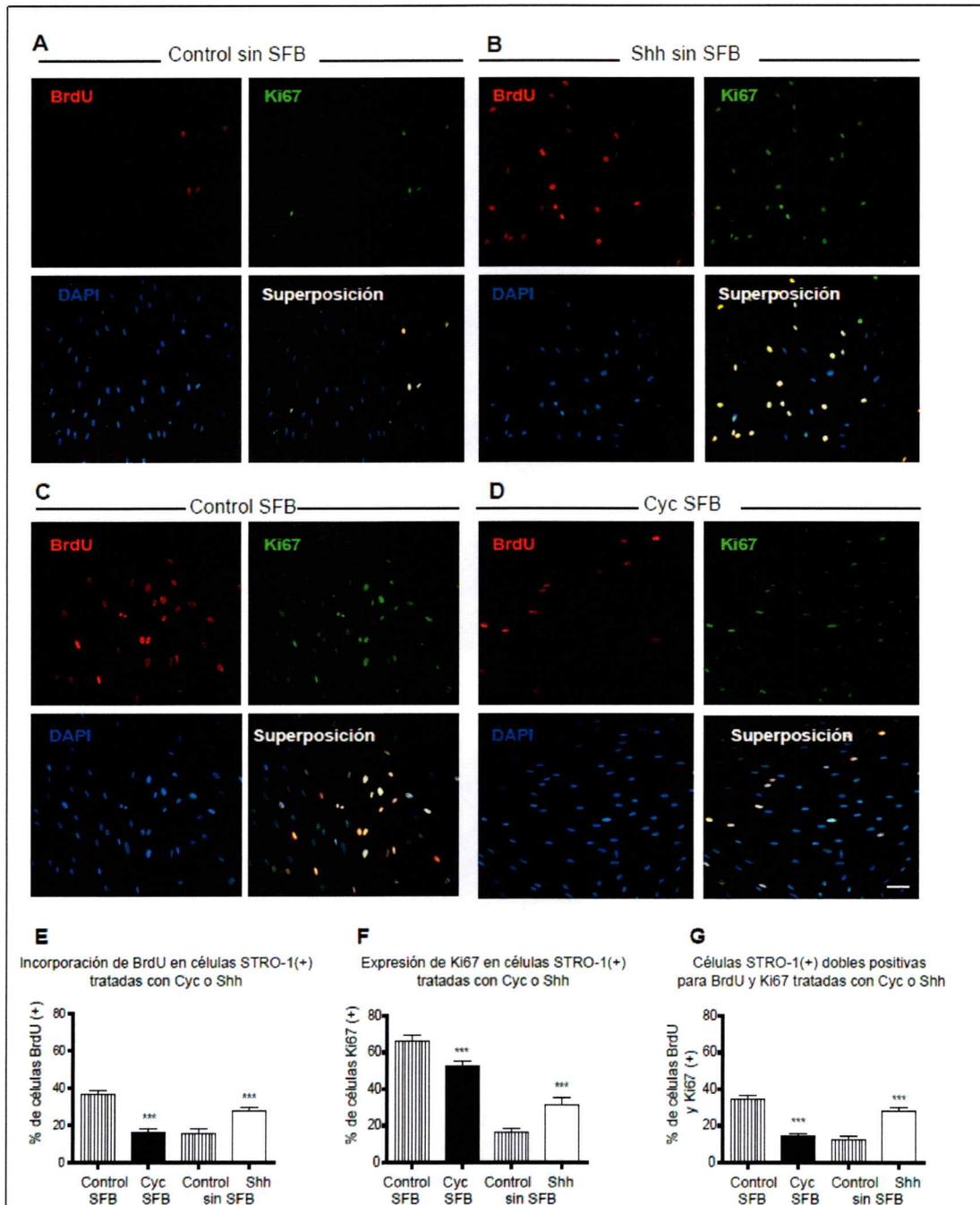


Figura 13. Las HPLSC/progenitoras STRO -1(+) aumentan su proliferación en respuesta a la vía Shh/Gli. Las células fueron tratadas durante 48 horas en cultivo con Shh (3,3 µg/ml) o Cyc (10µM), incluyendo un pulso de BrdU durante las últimas 20 horas. Se hizo inmunofluorescencia para BrdU y el antígeno de proliferación Ki67. **(A)** Imágenes representativas de células (+) en el medio sin SFB **(B)** Tratamiento de Shh en el medio de cultivo sinSFB. **(C)** las células en los medios de cultivo con SFB **(D)** o el tratamiento Cyc en presencia de SFB. Cuantificación de las células **(E)** BrdU (+) **(F)** Ki67 (+) **(G)** doble (+) para BrdU y Ki67. La cuantificación de las células (+) se expresa como un porcentaje del total de células DAPI (+) *** p <0,001. Barra de aumento equivale a 50µm.

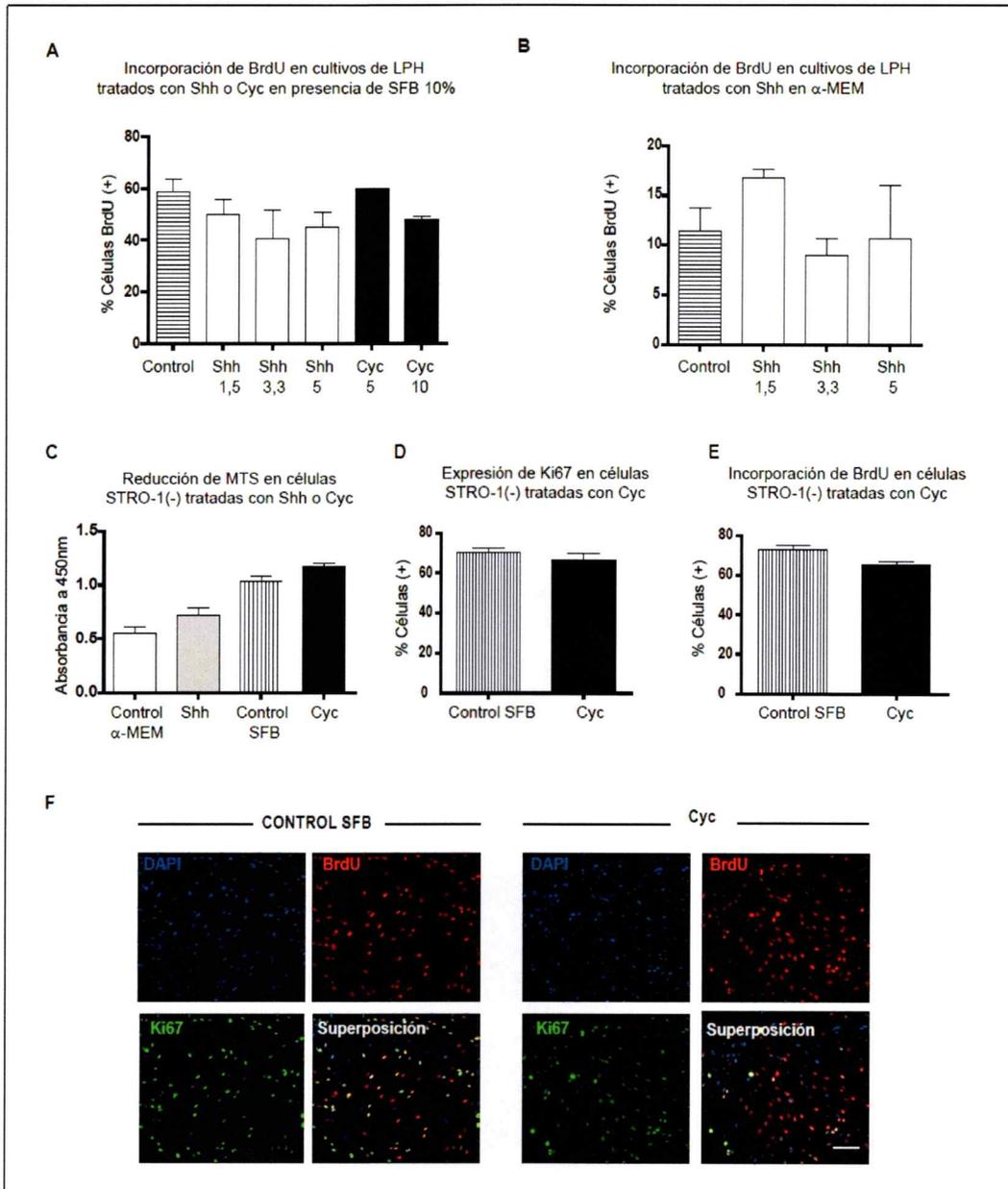


Figura 14. Ni los cultivos heterogéneos de LPH ni las células STRO-1(-) cambian su proliferación en respuesta a la vía Shh/Gli. Células obtenidas a partir de LPH o células STRO-1(-) fueron tratadas durante 48 horas en cultivo con Shh o Cyc en las concentraciones indicadas, incluyendo un pulso de BrdU durante las últimas 20 horas. Se hizo inmunofluorescencia para BrdU, el antígeno de proliferación Ki67 y se midió la reducción de MTS. **(A)** Cuantificación de las células de LPH BrdU (+) tratadas con Shh (μ g/ml) o Cyc (μ M) en presencia de SFB ó **(B)** tratadas con Shh sin SFB **(C)** Cuantificación de la actividad de deshidrogenasas mitocondriales, producto de la reducción de MTS en células STRO-1(-) 48 horas después de los tratamientos indicados. **(D, E)** Cuantificación de las células STRO-1(-) Ki67 (+) y BrdU (+) tratadas con Cyc La cuantificación de las células (+) se expresa como un porcentaje del total de células DAPI (+) **(F, G)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia para BrdU y Ki67. Barra de aumento equivale a 50 μ m.

3.6. Shh estimula la diferenciación ósea/cementoblástica de las células STRO-1(+) y STRO-1(-)

El proceso de diferenciación al linaje óseo es altamente regulado y se lleva a cabo por el compromiso de las células troncales hacia los diferentes estadios de maduración osteoblástica/cementoblástica involucrando la participación de diversos factores de transcripción que controlan este proceso (**Fig. 3**). Dado que las células osteoprogenitoras y los osteoblastos inmaduros secretan fosfatasa alcalina antes de la mineralización (*Nanci y col., 2008*), se cuantificó la ALPA como marcador temprano de la diferenciación hacia el linaje óseo/cemento e igualmente se utilizó la medición del depósito de calcio como un indicador de su diferenciación terminal. Para determinar estos parámetros se usó la línea celular de osteosarcoma humano SaOs-2 como control positivo. En estas células se evidenciaron niveles de ALPA basales estables durante el tiempo de diferenciación, aún en presencia de medio osteogénico y el depósito de calcio como se ha reportado previamente (*McQuillan y col., 1995*) (**Fig. 15 A, B**).

Con el objetivo de evaluar la función de la vía Shh en la diferenciación al linaje óseo/cemento los cultivos heterogéneos de LPH y las células STRO-1(+) y (-) fueron incubadas durante 7, 14 y 21 días en presencia del inhibidor Cyc. Tanto las células STRO-1(-) como STRO-1(+) incubadas con medio basal evidenciaron una ALPA estable durante el tiempo cuantificado y que en presencia de solo medio osteogénico disminuye paulatinamente (**Fig. 15 C, D**). En las células STRO-1(-), que corresponden en su mayoría a células osteoprogenitoras o células

comprometidas en el camino de diferenciación al linaje óseo/cemento, el tratamiento con Cyc en presencia de medio osteogénico disminuyó significativamente la ALPA en el día 7 de diferenciación (**Fig. 15 C**). Por el contrario en las células STRO-1(+) que corresponden a células HPLSC/progenitoras, incubadas con medio osteogénico y Cyc, se vio una disminución de la ALPA en los días 1 y 4, permaneciendo estable e incluso aumentando en los días 7 y 14 (**Fig. 15 D**).

Posteriormente, se cuantificó el depósito de calcio durante los días 7, 14 y 21 de diferenciación en ambas poblaciones celulares. Se observó en presencia de medio osteogénico y Cyc, una disminución estadísticamente significativa en el depósito de calcio a los 14 días, en ambas poblaciones celulares STRO-1(-) Y STRO-1(+) (**Fig. 15 E, F**).

A continuación se evaluó la expresión de varios genes relacionados con el proceso de diferenciación al linaje óseo/cemento, en los cultivos heterogéneos obtenidos a partir de LPH. Las células incubadas en presencia del inhibidor Cyc y medio osteogénico, presentaron un aumento de la expresión de los transcritos de *RUNX2* y *OSX* en los días 7 y 14 y una disminución del transcrito de *ALP* con respecto al control con solo medio osteogénico (**Fig 16 A- D**).

Finalmente se determinó la expresión del transcrito de *SHH* durante la diferenciación, mostrando un aumento notable en presencia de Cyc tanto a los 7 como a los 14 días (**Fig. 16 A, E**).

Por otra parte los niveles de proteína Shh fueron evaluados durante la diferenciación temprana hacia el linaje óseo/cemento en las células STRO-1(+). Estos niveles aumentaron significativamente en presencia de

solo medio osteogénico después de 4 días de incubación (**Fig. 17**) lo que sugiere una modulación de los niveles de la proteína en presencia del medio osteoinductivo.

Finalmente y debido a la evidente respuesta a la vía de señalización Shh/Gli durante la diferenciación ósea/cementoblástica de las células STRO-1(-), se evaluó la expresión de los transcritos de *GLI1* y *GLI2* en estas células, observando una disminución del transcrito de *GLI1* posterior al tratamiento con Cyc (**Fig. 18 A**), lo que sugiere una respuesta a la vía de señalización. Además las células STRO-1(-) presentan cilios primarios y responden con la re-localización subcelular de Smo, cuando son transfectadas con smo exógeno y tratadas con el agonista purmorfamina (**Fig. 18 B, C**).

Estos resultados sugieren una posible influencia de Shh en la diferenciación de las células del ligamento periodontal humano hacia osteoblastos/cementoblastos maduros.

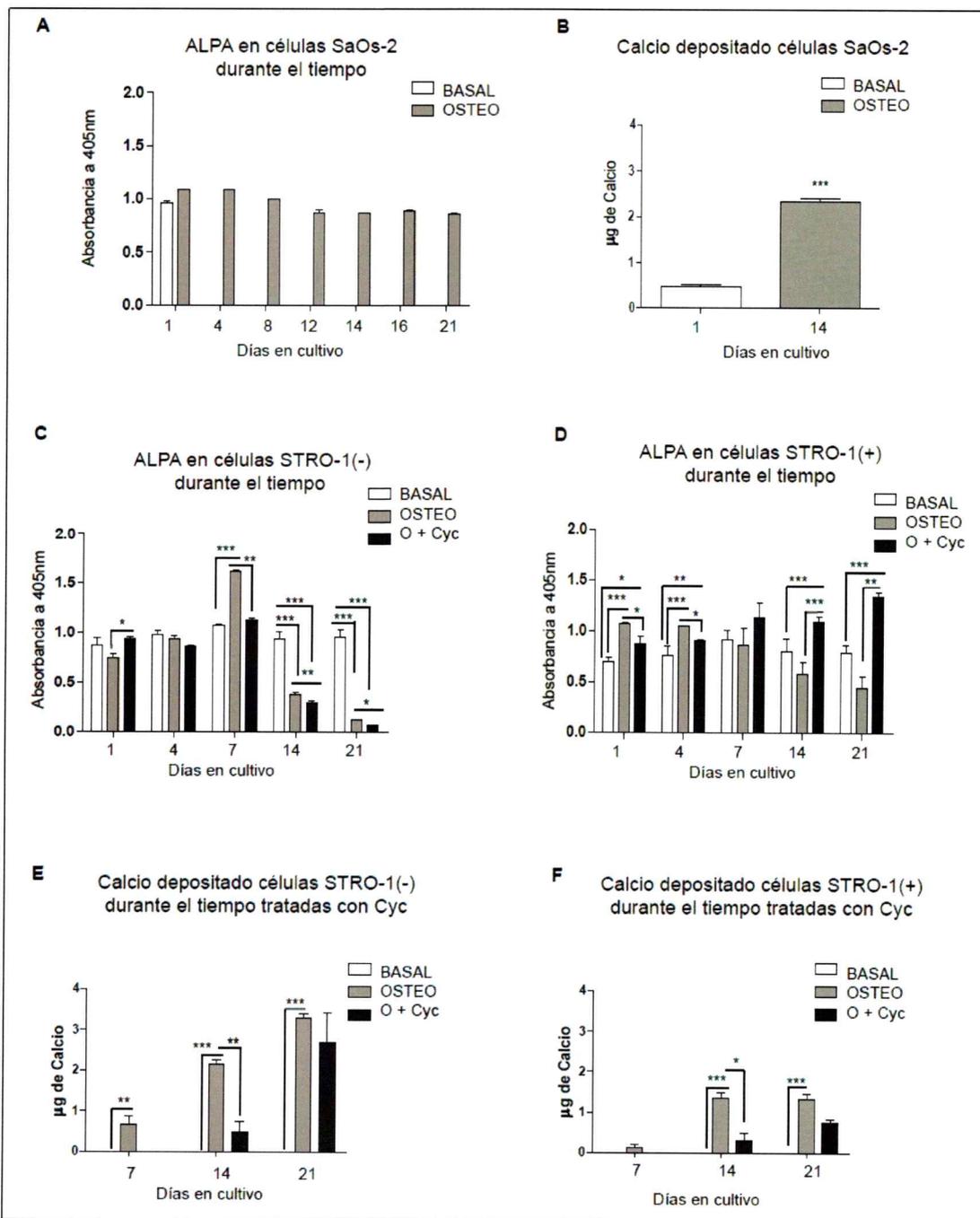


Figura 15. La vía de señalización Shh/Gli participa en la diferenciación al linaje óseo de las células del LPH. (A) Niveles de actividad de fosfatasa alcalina (ALPA) y **(B)** calcio depositado en células SaOs-2. En las células obtenidas de LPH, ALPA fue cuantificada durante los tiempos y medios indicados, para las células: **(C)** STRO-1(-) y **(D)** STRO-1(+). El depósito de calcio fue cuantificado durante los tiempos y medios indicados, se evidencia una disminución significativa en el depósito de calcio a los 14 días, con el tratamiento con Cyc para las células **(E)** STRO-1(-) y **(F)** STRO-1(+). * p 0,01 **, p 0,001 ***, p <0,0001. O= medio osteogénico Cyc= Ciclopamina 10 μ M.

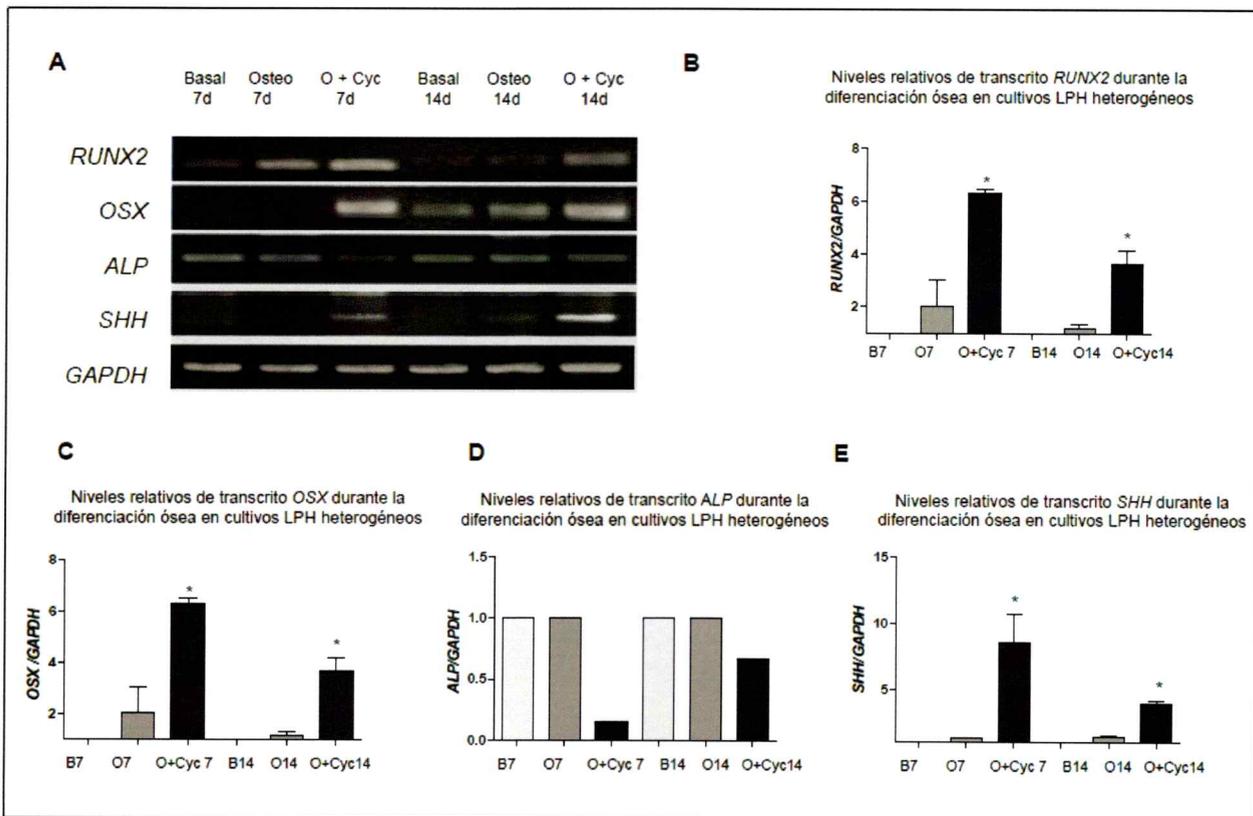


Figura 16. En los cultivos heterogéneos de LPH Shh actúa sobre los progenitores y osteoblastos inmaduros. Cultivos heterogéneos obtenidos del LPH fueron incubados con medio osteogénico durante 14 días y tratados con el antagonista Cyc. **(A)** RT-PCR semicuantitativo para los transcritos *RUNX2*, *OSX*, *ALPA*, *SHH* Y *GAPDH*. **(B)** Cuantificación de la expresión relativa del transcrito de *RUNX2* que aumenta significativamente con el tratamiento con Cyc. **(C)** Cuantificación de la expresión relativa del transcrito de *OSX* que aumenta significativamente con el tratamiento con Cyc. **(D)** Cuantificación de la expresión relativa del transcrito de *ALPA* que disminuye con el tratamiento con Cyc. **(E)** Cuantificación de la expresión relativa del transcrito de *SHH* que aumenta significativamente con el tratamiento con Cyc. La cuantificación relativa corresponde al análisis densitométrico con respecto a la expresión de *GAPDH*, a los controles se les asignó el valor de 1 a las unidades relativas de intensidad. * $p < 0,01$. *ALP*= fosfatasa alcalina, *OSX*=ósterix, B= medio basal, O= medio osteogénico.

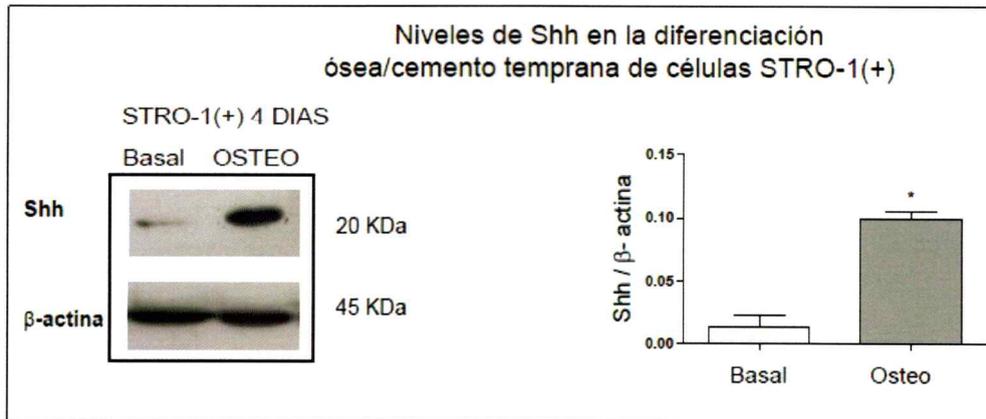


Figura 17. Los niveles de proteína de Shh incrementan en presencia del estímulo osteogénico. Células STRO-1(+) fueron incubadas durante 4 días en medio basal o medio osteogénico, luego los niveles de proteína de Shh fueron evaluados por Western Blot con su respectivo análisis densitométrico. * p 0,01.

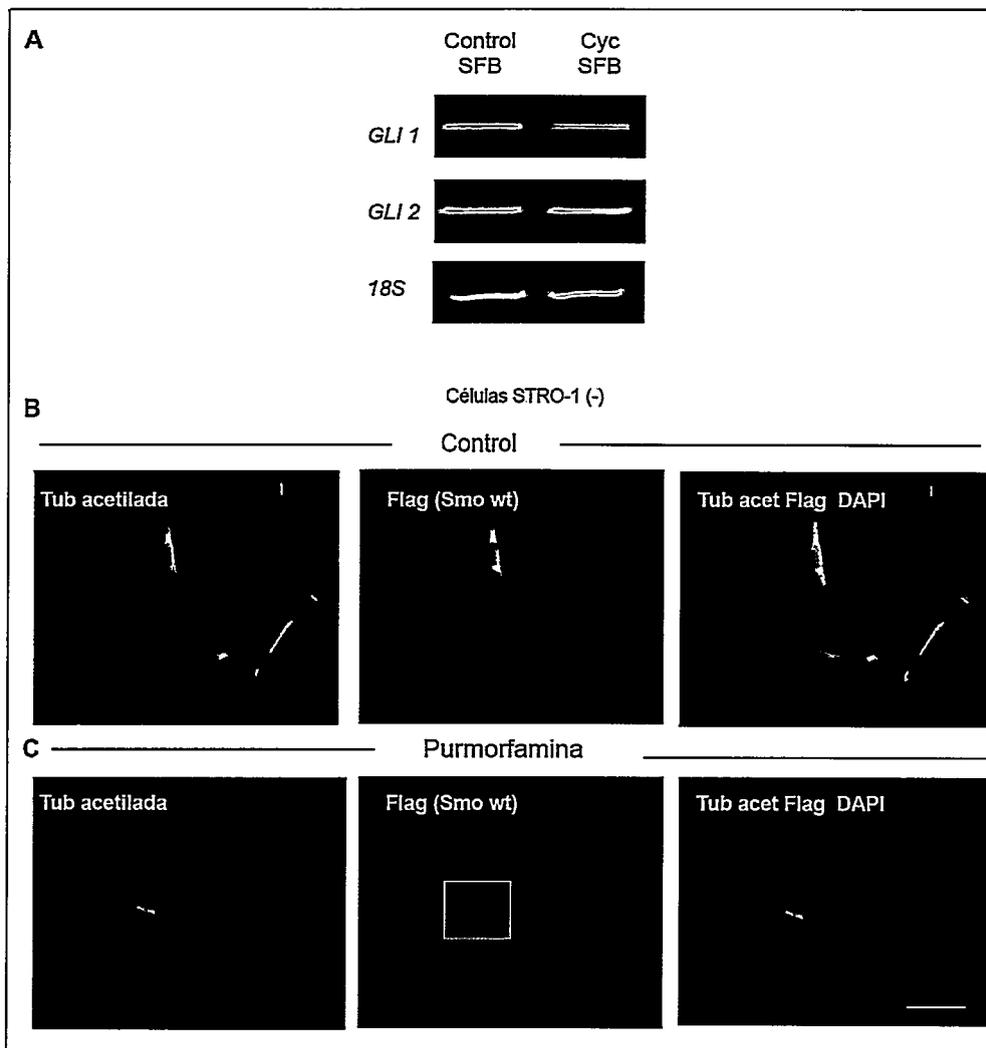


Figura 18. Las células STRO-1(-) expresan los componentes de la vía Shh/Gli, presentan cilio primario y responden a la vía translocando a Smo. (A) Las células STRO-1(-) fueron tratadas con Cyc durante 48 horas y luego se evaluó la expresión de los transcritos de la vía de señalización mediante RT-PCR semicuantitativo, se observaron cambios en *GLI 1*, lo que indica que las células responden a la vía. **(B)** Las células fueron transfectadas con *smo-wt* y con un flag-tag y se hicieron dobles marcajes para tubulina acetilada y flag. Imágenes representativas en las células en medio control ó **(C)** tratadas con purmorphamina. Barra de aumento equivale a 10 μ m.

4. DISCUSION

Una pregunta importante y aún sin dilucidar en la regeneración periodontal es la identificación de los mecanismos moleculares que controlan la proliferación celular y/o diferenciación de HPLSC/progenitoras, ya que su presencia en el LPH ha permitido generar terapias celulares para la regeneración de los tejidos que componen al periodonto e incluso ser fuente de células mesenquimales para la regeneración de otros tejidos (*Huang y col., 2009; Feng y col., 2010, Lin y col., 2008 y 2009*). Este trabajo muestra por primera vez que las HPLSC/progenitoras, son capaces de responder a los estímulos mitogénicos de Shh. Se obtuvieron y se caracterizaron células a partir del LPH, así como se logró la separación *in vitro* de 2 poblaciones celulares STRO-1 (+) y STRO-1 (-).

Las células que se identificaron como HPLSC/progenitoras son adherentes a la superficie de cultivo, expresan los marcadores de células troncales mesenquimales STRO-1 y MUC18/CD146 y no expresan marcadores de diferenciación ósea en condiciones basales (colágeno tipo I, Rc-PTH, osteonectina y Runx2). Por el contrario, los marcadores de diferenciación ósea, inicialmente abundantes en los cultivos heterogéneos antes de aislamiento magnético, se conservaron principalmente en la población STRO-1(-), dando cuenta de un mayor grado de compromiso y capacidad

de diferenciación al linaje óseo/cemento, ya que la gran mayoría expresan el factor de transcripción Runx2 (Marie, 2008).

De la misma manera que en el modelo usado en este trabajo, se ha reportado antes que las células aisladas inmunomagnéticamente tienen el potencial de diferenciarse a varios linajes, entre estos óseo/cemento, adiposo y neuronal (Seo y col., 2004; Xu y col., 2009; Psaltis y col., 2010). Además se compararon los potenciales de diferenciación entre las poblaciones celulares STRO-1(+) y STRO-1 (-), observando un potencial importante hacia el linaje óseo de las células STRO-1(-), que es consistente con la expresión de los niveles de marcadores óseos en condiciones basales y que al ser incubados con medio osteogénico, se observa un mayor depósito de calcio que las células STRO-1(+). Con respecto a la diferenciación al linaje adiposo, las células STRO-1(+) mostraron una capacidad evidente para formar adipocitos, mientras que en las células STRO-1(-) esta diferenciación fue casi inexistente.

En conclusión, las células aisladas inmunomagnéticamente con el anticuerpo STRO-1, poseen características de células troncales por la expresión de los marcadores STRO-1 y MUC18/CD146, la formación de colonias fibroblastoides en condiciones de muy baja densidad celular y tienen el potencial de diferenciarse a varios linajes *in vitro*.

Con respecto a los componentes de la vía de señalización Shh/Gli, las HPLSC/progenitoras expresaron los componentes de la vía, incluyendo todos los factores de transcripción *GLI*. Además fueron capaces de responder activamente a Shh ya que estas células mostraron una mayor expresión de *PTC-1* y *GLI1* (genes blancos de la vía) con el tratamiento

con Shh o una disminución de los mismos genes después de la incubación con el inhibidor Cyc. Del mismo modo, se observó una menor expresión de los niveles de proteína Ptc-1 en el tratamiento con Cyc. Además se mostró la presencia de cilio primario en las células STRO-1 (+). El cilio primario es considerado como una verdadera antena de señalización utilizada por las células de los vertebrados, incluyendo a los humanos. Las vías de señalización hasta el momento reportadas, cuyos componentes se concentran en el cilio primario son el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), Wnt y Shh (*Christensen y Ott, 2007*). En este organelo celular se evidencia un mecanismo sofisticado, mediante el cual las células pueden sensar y concentrar los componentes de las vías de señalización para llevar a cabo sus funciones en la expresión génica. Esto incluye el tráfico de proteínas y el transporte intraflagelar dentro del cilio primario, necesarios e indispensables para transportar a las proteínas que requieren concentrarse y generar la respuesta celular a las señales que recibe. (*Goetz y Anderson, 2010; Wong y Reiter, 2008*). El cilio primario, es necesario para la señalización de HH, ya que no se han podido detectar proteínas Gli activadoras en los mutantes que carecen de cilios. Igualmente, los hallazgos reportados en ciliopatías en humanos como la polidactilia en pacientes con los síndromes de Bardet-Bield y Meckel, que han sido atribuidos a defectos en la señalización de HH; el síndrome de Joubert, en el que uno de los síntomas es la ataxia, debido a la hipoplasia cerebelar atribuida a la dependencia de HH y por último la fibrosis quística en el riñón (*Goetz y Anderson, 2010*). Cabe anotar que aún faltan por determinar

molecularmente los mecanismos mediante los cuales, defectos en los componentes del cilio primario o proteínas del transporte intraflagelar llevan a generar estos fenotipos similares a los defectos que produce una alteración en la señalización de Hh/Gli (*Caspary y col., 2007; Wong y Reiter, 2008; Wong y col., 2009; Goetz y Anderson, 2010*).

De acuerdo con estudios previos en otros modelos de mamíferos, después de la transfección transitoria de las células HPLSC/progenitoras con el constructo de expresión smo-wt y la estimulación con Shh o una forma activadora de Smo, el smo exógeno se localizó en la punta del cilio, concentración que es necesaria para la activación de la vía a través de los factores Gli activadores (*Rohatgi y col., 2007; Wang y col., 2009*).

La expresión de los componentes de la vía Shh/Gli, los cambios en los genes blancos después de los tratamientos farmacológicos con los agonistas y el antagonista de Shh, la presencia de cilio primario y la concentración subcelular de smo bajo el estímulo de Shh, prueban que las células STRO-1 (+), constituyen una nueva población de células troncales/progenitoras mesenquimales capaces de responder a la vía de Shh/Gli.

Por primera vez se reporta que Shh actúa como un mitógeno para la población de células STRO-1 (+), puesto que se vio un aumento de la incorporación de BrdU y del antígeno Ki67 después del tratamiento con Shh. Sorprendentemente, incluso en presencia de altas concentraciones de SFB (10%) el antagonista Cyc fue capaz de disminuir la incorporación de BrdU y la expresión de Ki67. Estos resultados indican una función de Shh en la modulación de la auto-

renovación de la población de células progenitoras en el LPH. En cuanto a la fuente de la proteína Shh, tanto las células STRO-1 (+) como STRO-1 (-) expresan la proteína Shh activa (N-terminal). Sin embargo, Shh se detectó principalmente en la población STRO-1 (+). La actividad funcional de la proteína Shh secretada por las células de LPH se evaluó utilizando la línea celular reportera para Shh (C3H-10T1/2). Este enfoque experimental mostró un aumento significativo en la ALPA de las células C3H-10T1/2, después del tratamiento con los medios condicionados que provenían de las células STRO-1(+). Por lo tanto, las HPLSC/progenitoras, a través de la secreción de Shh, pueden modular su auto renovación por lo que Shh podría actuar como un factor de nicho fisiológico.

Posteriormente, se evaluó la función de la vía Shh/Gli en la diferenciación al linaje óseo/cemento de las células mesenquimales presentes en el LPH, teniendo en cuenta que existen reportes previos que vinculan esta vía de señalización en la diferenciación osteoblástica tanto en los procesos de formación ósea endocondral como intramembranosa durante el desarrollo embrionario e incluso en la homeóstasis de este tejido durante la vida adulta (*Van der Horst G y col., 2003; Ohba y col., 2008; Kingston y col., 2008; Mak y col., 2008*).

En las poblaciones celulares STRO-1(+) y STRO-1(-) existe una expresión basal de ALPA como se ha reportado en la literatura previamente (*Seo y col., 2004; Nanci y col., 2008*). Esta actividad es requerida para que las células en presencia de fosfatos inorgánicos, dexametasona y vitamina C, sean capaces de producir matriz extracelular que finalmente será

calcificada. La ALP libera iones fosfato inorgánico, necesarios para la nucleación de cristales de hidroxiapatita que son el componente principal de la matriz inorgánica de todos los tejidos mineralizados en el humano (Bonucci, 2002; Nanci y col., 2008; Dorozhkin, 2009).

Con el tratamiento con el antagonista Cyc en presencia de medio osteogénico, se observó una disminución significativa de la ALPA a los 7 días, en las células STRO-1(-) que en su mayoría se componen de células osteoprogenitoras o en camino a la diferenciación al linaje óseo/cemento; lo que probablemente sugiere una inhibición en la diferenciación de las células STRO-1 (-) por la ausencia de Shh. Además, en las células STRO-1(-) tratadas con el inhibidor Cyc se observó una disminución significativa en el depósito de calcio en el día 14, mostrando un efecto inhibitorio en la función de estas células terminalmente diferenciadas, que es el depósito de calcio. Por el contrario en el día 21 el depósito de calcio no mostró diferencias significativas entre las células tratadas solo con medio osteogénico y las incubadas con Cyc, lo que sugeriría un mecanismo compensatorio de la inhibición de Shh durante la diferenciación tardía al linaje óseo/cemento. Cabe mencionar que además de observar esta respuesta inhibitoria de la diferenciación ósea/cementoblástica en ausencia de la vía Shh en las células STRO-1(-), se comprobó su capacidad de respuesta a la vía por la disminución de transcrito de *GLI1*, posterior al tratamiento con Cyc, así como la presencia de cilios primarios y la localización subcelular de Smo exógeno después del estímulo con Pur.

Por otra parte, se observó una inhibición en el depósito de calcio después

del tratamiento con el Cyc en las células STRO-1(+) en el día 14. Esta inhibición en el depósito de calcio en ambas poblaciones en ausencia de Shh, es consistente con previos reportes en los que en otros modelos Shh incrementa el depósito de calcio, la ALPA y la osteocalcina. (*Van der Horst G y col., 2003; Ohba y col., 2008; Kingston y col., 2008*).

Por el contrario el efecto de la vía Shh en la ALPA de las células STRO-1(+) es difícil de interpretar, dado que estas células tienen una actividad basal de ALPA que se mantiene durante el tiempo y su incremento después de la incubación con medio osteogénico fue significativa con respecto al medio basal solamente los días 1 y 4 de diferenciación, tiempos en los cuales el tratamiento con Cyc llevó a la disminución de ALPA, que en días posteriores es recuperada. Además, la disminución a través del tiempo de ALPA no fue tan evidente como si lo fue en las células STRO-1(-). Probablemente este fenómeno sugiere que las células continúan en un estado indiferenciado o en un estado de diferenciación distinto al de las células STRO-1(-) y que el efecto de la inhibición de la vía que se observa en los días 1 y 4 es recuperado probablemente por mecanismos compensatorios.

Además, se observó que la vía de señalización Shh/Gli influye en los niveles de expresión de *RUNX2* y *OSX*, ya que el tratamiento con Cyc, aumentó significativamente los niveles de estos transcritos en los cultivos heterogéneos en los días 7 y 14. El aumento de los transcritos de genes expresados por células osteoprogenitoras y osteoblastos inmaduros probablemente indica que estas células dependen de la vía Shh/Gli para continuar su proceso de diferenciación. Por lo tanto el

tratamiento con Cyc hace que estas células no avancen al siguiente estadio de maduración. Estos resultados, indican que Shh probablemente influye en la transición de células osteoprogenitoras y de osteoblastos inmaduros hacia su completa diferenciación al linaje óseo/cemento.

Al evaluar los niveles de proteína Shh funcional (amino-terminal) en las células STRO-1(+) a los cuatro días de diferenciación al linaje óseo/cemento, se observó un aumento significativo de la proteína al ser incubadas con solamente en medio osteogénico, lo que sugiere que probablemente los niveles de Shh son regulados durante la diferenciación ósea/cementoblástica y necesarios como fuente autocrina o paracrina para llevar a cabo su función en el proceso de diferenciación.

Estos resultados indican que Shh probablemente influye en la diferenciación de las células HPLSC, osteoprogenitoras y de osteoblastos inmaduros presentes en el LPH, llevando a su completa diferenciación, lo que necesariamente implica el depósito de calcio. Además es importante mencionar que estos resultados sugieren que la actividad de Shh está acotada a una ventana temporal determinada, que en este modelo podría estar entre los días 7 y 14, tiempo durante el cual la vía influye en la diferenciación de las células. Adicionalmente la actividad de la proteína podría estar interactuando con otras vías de señalización que son indispensables para la diferenciación. Tal como se ha reportado en otros modelos, existe un evidente relación entre la Bmp-2 y Gli 2, puesto que Gli 2 tiene la capacidad de unirse al promotor de BMP-2 y activar transcripcionalmente esta vía que finalmente actúa sobre genes como

runx2 (Takahito y col., 2002; Zhao y col., 2006,). Adicionalmente existen otras vías de señalización, que han mostrado ejercer potentes funciones durante el proceso de diferenciación ósea y que probablemente se integren con los efectos de Shh. Además de Bmp2, la vía Wnt canónica es esencial para el compromiso y la diferenciación hacia el linaje osteoblástico (Peters y col., 2008). La vía Wnt ha mostrado promover la expresión de Runx2 y Alpa *in vitro* y en modelos *in vivo* ha evidenciado que su activación lleva a un incremento en la masa ósea y cuando es inhibida se presenta pérdida ósea. Existe además un sinergismo entre las señales de Bmp y Wnt, que es crítico para el desarrollo esquelético y su homeostasis. La vía Wnt canónica es necesaria para la inducción de hueso a partir de BMP-2 *in vivo* y la inhibición de GSK3, uno de los componentes de la vía Wnt, ha mostrado extender el efecto de la duración de las señales de Bmp. (Millat y col., 2009; Rodriguez-Carballo y col., 2010). Por lo tanto explorar los mecanismos que están involucrados en la integración de las señales que participan en el proceso de diferenciación ósea, determinar la ventana temporal y concentración de cada una de estas señales, incluyendo a Shh/Gli, permitiría generar nuevas alternativas terapéuticas, que incluyan la modulación de estas señales en el tratamiento de patologías y traumas para la regeneración del tejido óseo.

Finalmente, los resultados de este trabajo sugieren que Shh promueve la proliferación de las células troncales/progenitoras presentes en el LPH y probablemente modularía la diferenciación de células comprometidas en el linaje óseo/cemento.

4.1. Perspectivas

Aunque en este trabajo se caracterizó la actividad mitogénica de Shh en la población de células troncales/progenitoras presentes en el LPH, este factor debe ser explorado como un factor de nicho a nivel molecular para estudiar los modelos de regeneración en el LPH, los tejidos de soporte del diente y ser utilizado en las terapias celulares regenerativas. Por lo tanto se requiere de experimentos con modelos *in vivo* que permitan analizar la función de esta proteína a nivel fisiológico en este tejido adulto. Por ejemplo, la inyección de esferas recubiertas con agonistas o antagonistas de la vía de Shh en el ligamento periodontal de ratas en condiciones control, en las que los tejidos periodontales se encuentren sanos. Posteriormente, evaluar la expresión de STRO-1 y MUC18/CD146, la incorporación de BrdU y el antígeno de proliferación Ki67. Así mismo generar defectos periodontales, haciendo ventanas quirúrgicas en el tercio medio radicular, como se ha reportado anteriormente (*Leckic y col., 2001*) y luego evaluar la expresión de los componentes de la vía en ventanas temporales determinadas, durante el proceso de cicatrización de los defectos creados, para analizar la función de Shh en condiciones similares a las patologías o traumas.

Por otra parte, el establecimiento de Shh como una proteína que modula la diferenciación al linaje óseo requiere ser mejor explorado, y aunque se observaron importantes cambios en la expresión de los transcritos de *RUNX2* y *OSX* después del tratamiento con Cyc a los 7 y 14 días del proceso de diferenciación ósea, es necesario determinar los niveles de proteína de Runx y Osx, en estos mismos tiempos. Igualmente se

requiere evaluar los niveles de proteína funcional de Shh durante todo el proceso de diferenciación ya se evidenció una inducción de la expresión de Shh con la incubación de solamente medio osteogénico. Para evaluar el efecto autocrino de la vía, se requeriría de tratamientos con anticuerpos que bloqueen la señal de Shh o incluso de dominantes negativos que inhiban su secreción al medio de cultivo, bloqueando un posible efecto autocrino de esta proteína en este modelo. Igualmente sería necesario cuantificar la cinética de los niveles de esta proteína durante la diferenciación en las células STRO-1(-).

Será necesario también observar los niveles de marcadores osteo/cementoblásticos en etapas tardías de la diferenciación como el colágeno tipo I, osteocalcina y osteopontina, que probablemente den cuenta del cambio en el depósito de calcio observado después de los tratamientos con Cyc.

Además para determinar la ventana temporal de acción de Shh durante la diferenciación ósea, se requiere hacer experimentos de inhibición farmacológica durante la primera y segunda semanas de diferenciación, retirar los inhibidores del medio de cultivo y evaluar durante la tercera semana del proceso de diferenciación la expresión de los transcritos y /o proteínas para Runx2, Osx, Colágeno tipo I, Osteopontina y Osteocalcina. Por último, para evaluar la especificidad de la acción de Shh sobre osteoblastos inmaduros, es necesario observar el efecto de Shh durante la tercera semana de diferenciación, tratando las células con el inhibidor o los agonistas de la vía solo durante la tercera semana del proceso de diferenciación.

5. CONCLUSIONES

5.1. Se lograron obtener cultivos celulares viables a partir de terceros molares incluidos de ligamento periodontal humano. Estas células expresaron marcadores mesenquimales y tienen una baja proporción de células troncales (5%)

5.2. Se lograron aislar y caracterizar las células troncales mesenquimales STRO-1(+) presentes en el ligamento periodontal humano. Estas células son clonogénicas, expresan marcadores característicos de células troncales y tienen el potencial de diferenciarse a varios linajes.

5.3. Las células troncales mesenquimales STRO-1(+) expresan los componentes de la vía de señalización Shh/Gli, son capaces de responder a la ganancia o pérdida de función farmacológica. Así mismo, estas células poseen cilios primarios, en los cuales se observó una localización subcelular de Smo, una vez son tratadas con agonistas de la vía.

5.4. Shh tiene una función mitogénica específica sobre la población de células troncales/progenitoras presentes en el ligamento periodontal humano.



5.5. Se evidenció un menor depósito de calcio en las células tratadas con el inhibidor Cyc durante el proceso de diferenciación al linaje óseo/cemento tanto en las células STRO-1 (+) como en las STRO-1(-).

5.6. Se logró establecer que Shh influye en la diferenciación de las células osteoprogenitoras y osteoblastos inmaduros, durante la diferenciación al linaje óseo.

6. BIBLIOGRAFIA

- Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S (2008). Adult Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate Toward Functionally Active Neurons Under Appropriate Environmental Cues. *Stem Cells* 26:1787-1795.
- Bartold M, Shi S, Gronthos S (2006). Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontology* 2000 40:164-172.
- Beertsen W, McCulloch C, Sodek J. (1997). The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontology* 2000 13:20-40.
- Berkovitz B, Moxham B, Newman H (1998). The Periodontal Ligament in Health and Disease. Mosby-Wolfe, Segunda Edición. P 9-30.
- Binner-Becktor K, Nolting D, Becktor P, Kjær I (2007). Immunohistochemical localization of epithelial rests of Malassez in human periodontal membrane. *European Journal of Orthodontics* 29: 350-353.
- Bonucci E (2002). Crystal ghosts and biological mineralization: fancy spectres in an old castle, or neglected structures worthy of belief? *Journal of Bone Mineral Metabolism* 20:249-265.
- Caspary T, Larkins C, Anderson K. (2007). The Graded Response to Sonic Hedgehog Depends on Cilia Architecture. *Developmental Cell* 12: 767-778.
- Clement V, Sanchez P, V de Tribolet N, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A (2007). HEDGEHOG-GLI1 Signaling Regulates Human Glioma Growth, Cancer Stem Cell Self-Renewal, and Tumorigenicity. *Current Biology* 17:1-8.
- Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young K E, Corden J L, Westphal H, Beachy P A (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407-413.
- Chen S, Marino V, Gronthos S, Bartold, P (2006). Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *Journal of Periodontal Research* 41: 547-553.

- Cho M, Garant P (2000) Development and general structure of the periodontium. *Periodontology 2000* 24:9-27.
- Christensen ST y Ott CM (2007). A Ciliary Signaling Switch. *Science* 317:330-331.
- Dassule HR, Lewis P, Bei M, Maas R, McMahon AP (2000). Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development* 127(22):4775-85.
- Dorozhkin, S. (2009). Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. *Materials* 2:399-498.
- Fendrich V, Esni F, Garay MV, Feldmann G, Habbe N, Jensen JN, Dor Y, Stoffers D, Jensen J, Leach, SD *et al.* (2008). Hedgehog signaling is required for effective regeneration of exocrine pancreas. *Gastroenterology* 135:621-631.
- Feng F, Akiyama, K, Liu Y, Yamaza T, Wang TM, Cheng J-H, Wang BB, Huang T-J, Wang S, Shi S (2010). Utility of PDL progenitors for *in vivo* tissue regeneration: a report of 3 cases. *Oral Dis.* 16: 20-28.
- Foster B, Popowicz T, Fong HK, Somerman MJ (2007). Advances in Defining Regulators of Cementum Development and Periodontal Regeneration. *Current Topics in Developmental Biology* 78: 47-125.
- Freshney, R (1987). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, p. 220, Alan R. Liss, Inc., New York.
- Grachtchouk V, Grachtchouk M, Lowe L, Johnson T, Wei L, Wang A, de Sauvage F, Dlugosz A (2003). The magnitude of hedgehog signaling activity defines skin tumor phenotype. *The EMBO Journal* 22(11): 2741-2751.
- Grachtchouk M, Liu J, Wang A, Wei L, Bichakjian C, Garlick J, Paulino A, Giordano T, Dlugosz A (2006). Odontogenic Keratocysts Arise from Quiescent Epithelial Rests and Are Associated with Deregulated Hedgehog Signaling in Mice and Humans. *The American Journal of Pathology* 169(3):806-814.
- Gritli-Linde A, Bei M, Maas R, Zhang X, Linde A, McMahon A (2002). Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. *Development* 129: 5323-5337.
- Goetz S, Anderson K (2010). The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nature review genetics* 11: 331-344

- Hardcastle Z, Mo R, Hui C, Sharpe P (1998). The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development* 125: 2803-2811.
- Hiruma Y, Inoue A, Shioama A, Otsuka E, Hirose S, Yamaguchi A, Hagiwara H. (1998) Endothelins inhibit the mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells through the A-type endothelin receptor. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 275:1099-1105.
- Huang GT-J, Gronthos S, Shi S (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative Medicine. *J Dent Res* 88(9):792-806.
- Hou T, Li C, Liu B, Liu C, Liu, HW (2007). Modulation of osteogenic potential by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in human periodontal ligament cells: effect of serum, culture medium, and osteoinductive medium. *Journal of Periodontal Research* 42: 244-252
- Ingram W, Wicking C, Grimmond SM, Forrest AR, Wainwright BJ (2002). Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells. *Oncogene* 21:8196 -8205.
- Ivanovski S, Gronthos S, Bartold PM (2006). Stem cells in the periodontal ligament. *Oral Diseases* 12: 358-363.
- Jiang J y Hui C (2008). Hedgehog Signaling in Development and Cancer. *Developmental Cell* 15:801-812.
- Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung JY, Kim ES, Yang HC, Choung PH (2007). Isolation and Characterization of Postnatal Stem Cells from Human Dental Tissues. *Tissue Engineering* 13:767-773.
- Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C (2009). Genetic Control of Bone Formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25:629-48
- Kasaj A, Willershausen B, Reichert C, Gortan-Kasaj A, Zafiropoulos G, Schmidt M (2008). Human periodontal fibroblast response to a nanostructure hydroxyapatite bone replacement graft in vitro. *Archives of Oral Biology* 53:683-689
- Khan M, Seppala M, Zoupa M, Cobourne M (2007). Hedgehog pathway gene expression during early development of the molar tooth root in the mouse. *Gene Expression Patterns* 7: 239-243.
- Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA (2004). Hedgehog signalling in

- Kiefer, J (2010). Primer and Interviews: Diverse Connections between Primary Cilia and Hedgehog Signaling. *Developmental dynamics* 239:1255–1262
- Kimura H, Ng JMY, Curran T (2008). Transient Inhibition of the Hedgehog Pathway in Young Mice Causes Permanent Defects in Bone Structure. *Cancer Cell* 13, 249–260.
- King P, Guasti L, Laufer E (2008). Hedgehog signalling in endocrine development and disease. *Journal of Endocrinology* 198:439-450.
- Kingston K, Yanming M, Chao B, Pao-Tien W, Chuang P, Clemens T, Young M, Yang Y (2008). Hedgehog Signaling in Mature Osteoblasts Regulates Bone Formation and Resorption by Controlling PTHrP and RANKL Expression. *Developmental Cell* 14, 674–688
- Kobayashil M, Takiguchil T, Suzuki R, Yamaguchi A, Deguchil K, Shionomel M, Miyazawal Y, Nishihara T, Nagumo M, Hasegawa, K (1999). Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Stimulates Osteoblastic Differentiation in Cells Isolated from Human Periodontal Ligament. *Journal of Dental Research* 78(10): 1624-1633
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. (1997) Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89(5):755-64.
- Komori T (2010). Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res* 339:189–195
- Kuznetsov S, Mankani M, Bianco P, Robey P. (2009) Enumeration of the colony-forming units–fibroblast from mouse and human bone marrow in normal and pathological conditions. *Stem Cell Research* 2: 83–94
- Lekic P, Rajshankar D, Chen H, Tenenbaum H, Mcculloch C (2001). Transplantation of Labeled Periodontal Ligament Cells Promotes Regeneration of Alveolar Bone. *The Anatomical Record* 262:193–202.
- Lin NH, Menicanin D, Mrozik K, Gronthos S, Bartold PM (2008). Putative stem cells in regenerating human periodontium. *J Periodont Res* 2008; 43: 514–523.

- Lin NH, Gronthos S, Bartold M (2009). Stem cells and future periodontal regeneration. *Periodontology 2000* 51:239-251.
- Lin Z, Pontelli V, Kempeinen K, Franco L, Jin O, Sugai J, Giannobile W (2010). LMP1 regulates periodontal ligament progenitor cell proliferation and differentiation. *Bone* 47:55-64.
- Lindroos B, Mäenpää K, Ylikomi T, Oja H, Suuronen R, Miettinen S. (2008). Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 368: 329–335.
- Liu Y, Zheng Y, Ding G, *et al.* (2008). Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells* 26:1065–1073.
- Lossdörfer S, Götz W, Jäger A (2005). PTH (1-34) Affects Osteoprotegerin Production in Human PDL Cells *in vitro*. *J Dent Res* 84:634-638
- McCulloch CA (1985). Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. *Anatomical record* 3:258-62
- Mak KK, Bi Y, Chuang PT, Clemens T, Young M, Yang Y. (2008) Hedgehog Signaling in Mature Osteoblasts Regulates Bone Formation and Resorption by Controlling PTHrP and RANKL Expression. *Developmental Cell* 14, 674–688.
- Marie P (2008). Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473 : 98–105
- Marichal N, García G, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz O, Russo RE (2009). Enigmatic central canal contacting cells: immature neurons in "standby mode"?. *J Neurosci.* 29:10010-10024.
- McQuillan DJ, Richardson MD, Bateman JF. (1995) Matrix Deposition by a Calcifying Human Osteogenic Sarcoma Cell Line (SAOS-2). *Bone* 16(4):415-26.
- Mas C, Ruiz i Altaba A (2010). Small molecule modulation of HH-GLI signaling: current leads, trials and tribulations. *Biochem Pharmacol.* 80(5):712-23
- Mimeault M, Batra S. (2010) Frequent Deregulations in the Hedgehog Signaling Network and Cross-Talks with the Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Involved in Cancer Progression and Targeted Therapies. *Pharmacological reviews* 62:497-524

- Mosmann T. (1983) Rapid Colorimetric Assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65:55-63.
- Mouri Y, Shiba H, Mizuno N, Noguchi T, Ogawa T, Kurihara H (2003). Differential gene expression of bone-related proteins in epithelial and fibroblastic cells derived from human periodontal ligament. *Cell Biology International* 27:519-524.
- Mrozik K, Gronthos S, Shi S, Bartold M (2010). A Method to Isolate, Purify, and Characterize Human Periodontal Ligament Stem Cells. *Methods Mol Biol.* 666:269-84.
- Mukherjee S, Frolova N, Sadlonova A, Novak Z, Steg A, Page G, Welch D, Lobo-Ruppert S, Ruppert M, Johnson M, Frost A (2006). Hedgehog Signaling and Response to Cyclopamine Differ in Epithelial and Stromal Cells in Benign Breast and Breast Cancer. *Cancer Biology & Therapy* 5 :(6) 674-683.
- Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, Muneta T, Ishikawa I (2006). Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research* 41; 303-310.
- Nakatomi M, Morita I, Eto K, Ota MS (2006). Sonic Hedgehog Signaling is Important in Tooth Root Development. *J Dent Res* 85(5):427-431.
- Nancy A, Bosshardt D (2006). Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology* 2000 40: 11-28.
- Nanci A (2008). Periodontium. En Ten Cate's Oral Histology. 7 edición. Mosby.
- Nishio C, Wazen R, Kuroda S, Moffatt P, Nanci A (2010). Disruption of periodontal integrity induces expression of apin by epithelial cell rests of Malassez. *Journal of periodontal research* 45(6):709-13
- Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287(5785):795-801.
- Ohba S, Kawaguchi H, Kugimiya F, Ogasawara T, Kawamura N, Saito T, Ikeda T, Fujii K, Miyajima T, Kuramochi A, Miyashita T, Oda H, Nakamura K, Takato T, Chung U (2008). Patched1 Haploinsufficiency Increases Adult Bone Mass and Modulates Gli3 Repressor Activity. *Developmental Cell* 14, 689-699

- Palma V, Ruiz i Altaba A (2004). Hedgehog-GLI signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development* 131 (2):337-345
- Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sánchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132(2):335-44.
- Pan Y, Bai CB, Joyner AL, Wang B (2006). Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol Cell Biol* 26(9):3365-77.
- Pan J, Snell W (2007). The Primary Cilium: Keeper of the Key to Cell Division. *Cell* 129:1255-1257
- Piters E, Boudin E, Van Hul W (2008). Wnt signaling: A win for bone. *Arch Biochem Biophys* 473(2):112-6.
- Psaltis PJ, Paton S, See F, Arthur A, Martin S, Itescu S, Worthley SG, Gronthos S., Zannettino ACW (2010). Enrichment for STRO-1 Expression Enhances the Cardiovascular Paracrine Activity of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Cell Populations. *J. Cell. Physiol.* 223: 530–540
- Regl G, Neill G, Eichberger T, Kasper M, Ikram M, Koller J, Hinter H, Quinn A, Frischauf AM, Aberge F (2002). Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells. *Oncogene* 21:8196 – 8205.
- Rincón JC, Young WG, Bartold PM (2006). The epithelial cell rests of Malassez – a role in periodontal regeneration?. *Journal of Periodontal Research* 41: 245–252.
- Robbins D, Hebrok M (2007). Hedgehogs: la dolce vita. Meeting Report. EMBO reports. Abril de 2007
- Rohatgi R, Milenkovic L, Scott M (2007). Patched1 Regulates Hedgehog Signaling at the Primary Cilium. *Science* 317: 372-376.
- Rodríguez JP, González M, Ríos S, Cambiázo V. (2004) Cytoskeletal organization of human mesenchymal stem cells (MSC) changes during their osteogenic differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* 93(4):721-31.
- Rodríguez-Carballo E, Ulsamer A, Susperregui AR, Manzanares-Céspedes C, Sánchez-García E, Bartrons R, Rosa JL, Ventura F (2010). Conserved regulatory motifs in osteogenic gene promoters integrate cooperative effects of canonical Wnt and BMP pathways. *J Bone Miner Res.* En prensa.

- Ruiz i. Altaba, A., Mas, C., Stecca, B (2007). The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends in Cell Biology* (17)9: 438-447.
- Sanchez P, Hernandez A, Stecca B, Kahler A, DeGueme A, Barrett A, Beyna M, Datta M, Datta S, Ruiz i Altaba A (2004). Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *PNAS* 101 (34):12561-12566
- Schipani E y Kronenberg HM (2009). Adult mesenchymal stem cells. En *StemBook*, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook, <http://www.stembook.org>.
- Seidel K, Ahn C, Lyons D, Nee A, Ting K, Brownell I, Cao T, Carano R, Curran T, Schober M, Fuchs E, Joyner A, Martin G, de Sauvage F, Klein O (2010). Hedgehog signaling regulates the generation of ameloblast progenitors in the continuously growing mouse incisor. *Development* 137: 3753-3761
- Seo B, Miura M, Gronthos S, Bartold P, Batouli S, Brahim J, Young M, Gehron Robey P, Wang C, Shi S (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet* 364: 149-55.
- Seo B, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R, Shi S (2005). Recovery of Stem Cells from Cryopreserved Periodontal Ligament. *Journal of Dental Research* 84(10):907-912. Sharpe P, Cobourne M (2005). Sonic Hedgehog Signaling and the Developing Tooth. *Current Topics in Developmental Biology* 65: 255-287.
- Shimonishi M, Sato J, Takahashi N, Komatsu M (2005). Expression of type IV collagen and laminin at the interface between epithelial cells and fibroblasts from human periodontal ligament. *European Journal of Oral Sciences* 113: 34-40.
- Simpson F, Kerr M, Wicking C (2009). Trafficking, development and hedgehog. *Mechanisms of development* 126:279-288
- Sonoyama W, Seo B, Yamaza T, Shi S (2007). Human Hertwig's Epithelial Root Sheath Cells Play Crucial Roles in Cementum Formation. *Journal of Dental Research* 86(7):594-599.
- Stecca B, Ruiz I Altaba A (2009). A GLI1-p53 inhibitory loop controls neural stem cell and tumour cell numbers. *EMBO J* 28: 663-676.
- Stamatakis D, Ulloa F, Tsoni S, Mynett A, Briscoe J (2005). A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube. *Genes & Development* 19:626-641

- Strutt B, Khalil W, Killinger D (1996). Growth and differentiation of human adipose stromal cells in culture. En *Methods in Molecular Medicine: Human cell culture protocols*. Humana Press Inc p. 47
- Taipale J, Chen J, Cooper M, Wang B, Mann R, y col. (2000). Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* 406: 1005-1009.
- Takahito Y, Kataoka H, Kinto N, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto, M, Iemura S, Ueno N, Shibata Y, Kurosawa H, Yamaguchi A (2002). Sonic Hedgehog Is Involved in Osteoblast Differentiation by Cooperating With BMP-2. *Journal of Cellular Physiology* 193:225-232.
- Talic NF, Evans CA, Daniel JC, Zaki AE (2003). Proliferation of epithelial rests of Malassez during experimental tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 123(5):527-33.
- Thesleff I (2003). Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *The Journal of Cell Science* 116(9) 1647-1648.
- Thesleff I. y Tummers, M (2009). Tooth organogenesis and regeneration. En *StemBook*, Ed. The Stem Cell Research Community, StemBook,
- Trubiani O, Di Primio R, Traini T, Pizzicannella J, Scarano A, Piattelli A, Caputi S (2005). Morphological and cytofluorimetric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded ex vivo from periodontal ligament. *Int J Immunopathol Pharmacol* 18(2):213-21.
- Van der Horst G, Farih-Sips H, Lowik C, Karperien M (2003). Hedgehog stimulates only osteoblastic differentiation of undifferentiated KS483 cells. *Bone* 33 : 899-910
- Volponi A, Pang I, Sharpe, P (2010). Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends in Cell Biology* 20(12):715-722
- Wang Y, Zhou Z, Walshc C, McMahon P (2009). Selective translocation of intracellular Smoothed to the primary cilium in response to Hedgehog pathway modulation. *Proceedings of National Academy of Sciences.* 106: 2623-2628.
- Warzecha J, Göttig S, Chow KU, Brüning C, Percic D, Boehrer S, Brude E, Kurth A (2007). Inhibition of osteosarcoma cell proliferation by the Hedgehog-inhibitor cyclopamine. *Journal of Chemotherapy* 19(5):554-61
- Wang Y, Zhou Z, Walshc C, McMahon P (2009). Selective translocation of intracellular Smoothed to the primary cilium in

- Wong SY, Reiter J (2008). The Primary Cilium: At The Crossroads Hedgehog Signaling. *Curr Top Dev Biol.* 85:225-260.
- Wong S, Seol A, Alexandre NE, Bichakjian CK, Epstein E (2009). Primary cilia can both mediate and suppress Hedgehog pathway-dependent tumorigenesis. *Nature Medicine* 15: 1055-1062.
- Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S (2009). Multiple Differentiation Capacity of STRO-1+/CD146+ PDL Mesenchymal Progenitor Cells. *Stem Cells Dev.* 18: 487-496.
- Yamanaka T, Sakamoto Y, Zhang Y, Shigeaki H, Akagawa Y, Okamoto T (2000). Isolation and Serum Free culture of epithelial cells derived from epithelial rests of Malassez in human periodontal ligament. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 36:518-553.
- Yuasa T, Kataoka H, Kinto N, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M, Iemura S, Ueno N, Shibata Y, Kurosawa H, Yamaguchi A. (2002). Sonic hedgehog is involved in osteoblast differentiation by cooperating with BMP-2. *J Cell Physiol.* (2):225-32.
- Zhao M, Qiao M, Harris S, Chen D, Oyajobi B, Mundy G (2006). The Zinc Finger Transcription Factor Gli2 Mediates Bone Morphogenetic Protein 2 Expression in Osteoblasts in Response to Hedgehog Signaling. *Molecular and Cellular biology* 26(6):6197-6208.