



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CULTIVO DE PULPA DENTAL DE
DIENTES TEMPORALES DE PACIENTES
PORTADORES DE TRISOMÍA 21

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA
P R E S E N T A
Ericka Elizabeth Alvarez Sánchez

Director: Dr. Raúl Rosales Ibáñez

Dictaminadores:

C.D. Fernando Galván Toledo
C.D. Rubén Muñoz Arzate
Mtro. Manuel Javier Toriz Maldonado
Esp. Martha Patricia Nieto Sánchez

Los Reyes Iztacala. Edo. de México, 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



CULTIVO DE PULPA DENTAL DE DIENTES TEMPORALES DE PACIENTES PORTADORES DE TRISOMIA 21

TESIS
Para obtener el
título de **Cirujano
Dentista**

DICTAMINADORES

C.D. Fernando Galván Toledo

C.D. Rubén Muñiz Arzate

Mtro. Manuel Javier Toriz Maldonado

Esp. Martha Patricia Nieto Sánchez

Licenciatura en Cirujano Dentista

PRESENTA
Ericka Elizabeth
Alvarez Sánchez

Director:
Dr. Raúl Rosales Ibáñez

A los lectores



He pensado mucho sobre lo que debería escribir para dejar una constancia de mi paso por esta casa de estudios, siempre quise dejar algún vestigio por el cual pudieran recordarme, por el cual ser memorable, pero el tiempo pasaba y veía cada vez más lejana esa posibilidad. Las clínicas se diluían una con otra y rápidamente daban paso a los semestres sin que yo encontrara un motivo de inspiración dentro de la carrera —tenía muy clara mi meta, siempre la tuve clara, esa no era mi preocupación—. Mis desvelos se debían a la falta de interés en cada materia, en cada trabajo, era como si fuera un autómatas, un cascarón vacío que seguía órdenes —“bisela la terminación”, “amplía esa cavidad”, “aún tienes que pulir más”—. Cada orden ejecutada con presteza y sin alma. Hasta que ese momento anhelado llegó.

Me encontraba a inicios de octavo semestre, mi última oportunidad para probarme se acercaba; ya había acabado prácticamente la carrera y aún no encontraba mi motivación, la ilusión de haber entrado a la UNAM se difuminaba como el agua del aspersor de la clínica.

Integral, “Máxilo”, Oclusión, Organización, una materia tras otra y parecía otro semestre más, era el último. La siguiente materia que tendría sería “Estoma”, una materia de la cual había intentado escapar pues la doctora titular tenía fama de ser muy estricta, había tenido algunos encuentros con ella durante otras clínicas, la mayoría no eran agradables. La doctora buscaba la perfección hasta en el más mínimo detalle, aumentado la atención que ponía a cada parte de tu persona, un error, una pequeña falla enfrente de ella podía costarte la clínica, y aun así, a pesar de todos mis intentos terminé en clase con ella.

Entrando al aula había tres doctores, uno más de los que esperaba y tras terminar las presentaciones todo siguió igual; no había cambios

A los lectores

en los requisitos de la materia, el nuevo doctor en la currícula no había pedido nada. La exposición, los exámenes y los pacientes sistémicamente comprometidos seguían siendo parte de la evaluación

La semana de inicio de semestre siguió su curso, la feroz batalla por conseguir pacientes tenía lugar, las listas se cambiaban misteriosamente, los pacientes que llegaban a la clínica encontraban a “sus doctores” incluso antes de pasar por los colegas de servicio social; se libraba una competencia de resistencia para ver quién lograba estar más tiempo en la clínica para recibir aquellos pacientes que querían que se les asignara un doctor ese día, logrando así brincar a algunos de los compañeros en las listas.

Fue entonces que gracias a la intervención de Santa Apolonia o por azares del destino, un día platicando con una amiga, llegó Brisa una adolescente con dolor dental, varios de mis compañeros la habían rechazado pues sólo necesitaba “resinas y limpieza”, cosas que no contaban mucho para la clínica de integral. Mi compañera y yo habíamos decidido que cada tratamiento contaba y que no rechazaríamos a ninguno por insignificante que este fuera.

Para evitar utilizar el tiempo de la clínica de integral, decidí realizar su expediente clínico en “Estoma”, otra historia más. Hartos hasta el cansancio de hacer en cada clínica el largo interrogatorio, para octavo semestre cada alumno es especialista en burlar a cada doctor que revisara el expediente con respuestas sagaces a las omisiones en el mismo. La ficha de identificación, antecedentes, y la gran pregunta:

— ¿Alguna otra enfermedad que no esté en esta lista?

—Sí, Anemia de Fanconi.

Estas cuatro palabras cayeron como una bomba en mi cerebro, podía ver a mis neuronas haciendo sinapsis preguntándose entre ellas si alguna recordaba anteriormente esta enfermedad; las clases y todo lo

A los lectores

que había leído pasaban como una lista intentando buscar la información, incluso las infografías y videos de facebook hicieron su aparición, pero no, todo fue en vano. Manejé las palabras por separado: “Anemia”, eso era fácil, eso sí sabía que era, tendría que poner atención al sistema cardiovascular, investigar bien el tipo de alimentación, ¿pero Fanconi?, ni siquiera sabía escribirlo.

—Disculpe, la verdad nunca había escuchado de esa enfermedad, la investigaré y la próxima cita le haré más preguntas sobre ella, por lo pronto seguiremos con la historia clínica...

Mi tiempo de clínica se acababa y yo no podía terminar el expediente, sabía que debía estar con pies de plomo, la paciente tenía una enfermedad de la cual yo no había escuchado hablar nunca y no tenía conexión de internet en mi teléfono para salir del apuro; mi compañera comenzó a recoger el instrumental, era la señal que habíamos acordado para cuando llegara el paciente de la otra.

Ahí comenzó todo, esas palabras mostraron un camino diferente que se encontraba al alcance de mis dedos, cobré conciencia de que hay muchas enfermedades que son desconocidas para la mayoría de la población, de igual manera aunque la información está a nuestro alcance, si no sabes cómo buscar o sin la guía adecuada, es muy difícil acceder a ella.

El semestre marchó con celeridad, pero había un cambio en el ambiente, la clínica ya no me parecía tan vacía, esperaba alegremente a que llegaran mis pacientes y los doctores a los cuales no les pedía que me revisaran anteriormente comenzaron a parecerme más accesibles, más humanos. La enfermedad genética que mi paciente presentaba me demostró que no había personas completamente sanas, todos tenemos algo que reportar, cada parte de nuestro cuerpo es una compleja sinfonía que contiene tonos dulces escondidos tras los graves y bajos, cada parte de nosotros está descrita a la perfección

A los lectores

en nuestro código genético, y la clínica me abrió la posibilidad de dedicarme a estudiar esta rama de la ciencia.

Encontré mi vocación cuando esa pequeña Brisa trajo consigo un cambio de aires en la clínica, el cambio realmente se dio en mi corazón, por fin encontré esa parte que me hacía falta. Brisa cambió la forma de ver mi carrera, recuperé la sensación de gozo que se experimenta al extraer tu primer diente, mis manos ya no tiemblan como la primera vez que anestesié a uno de mis compañeros, pero ese sentimiento de triunfo cuando sabes que lo has hecho bien me acompaña cada día del servicio social.

A quién llegue a leer este fragmento de mi vida, quiero decirle que no me arrepiento de nada, que la carrera puede abrumar en ocasiones, que hay días en los que llegarás tan cansado a casa de todas las cosas que has tenido que cargar, que no querrás hacer nada más, que es frustrante que la calificación dependa de si tu paciente llega o no, pero la carrera es maravillosa y tarde o temprano encontrarás el camino que quieres recorrer, es una vocación tan noble y con tantas posibilidades para crecer que puede llegar a ser intimidante, pero la sonrisa de satisfacción de un paciente cuando terminas el tratamiento es lo más reconfortante que puedes ver, el abrazo de tu paciente de odontopediatría al despedirse es el más cálido de todos y no hay nada que se pueda comparar a las lágrimas de felicidad en los ojos de tu paciente de “Prosto”.

No te rindas, lucha, cree, y sigue adelante, porque así se disfruta la vida.

Agradecimientos



Lo prometido es deuda mamá, GRACIAS POR DEJARTE
MORDER.

Gracias papá porque sin tu apoyo nunca hubiera terminado.

A los dos les quiero agradecer la persona en la que me he convertido, y que a pesar de mi carácter, han dejado que tome mis decisiones no importa lo absurdas, infantiles y locas que estas suenen.

A mi familia que me ha dado un refugio y palabras reconfortantes cuando lo necesité, su “talentosa”, su “perica” logró dar un paso más en su vida, sigan creyendo en mí, que aún tengo mucho por ofrecer.

Al doctor Raúl, que creyó en la joven que se enfrentaba a las doctoras, en la niña que lloraba en las bancas, en la dentista que detestaba la clínica, y en la escritora que nunca entendió sus correcciones.

Al doctor Fernando, gracias por ser mi tutor desde los primeros semestres de la carrera hasta el final.

A ti compañero de desvelos y estrés, risas y lágrimas, tú que sigues ayudándome en cada sueño que tengo.

Índice

Introducción

11

Justificación

13

Objetivos

14

Síndrome de Down

15

Etiología y prevalencia en México

Trisomía simple

Trisomía por translocación

Trisomía por mosaicismo

Características físicas de los pacientes con trisomía 21

Afecciones orales en pacientes con síndrome de Down

Características psicológicas de los pacientes con trisomía 21

Alzheimer

Gen APP

Terapia cromosómica

34

Terapia génica

Objetivos diana

Vectores

Epigenética

52

- Transcripción
- Modificaciones covalentes y no covalentes en las histonas
 - Acetilación
 - Metilación
- Inactivación de cromosoma X
- Inserción de Xist en el cromosoma
 - Nucleasas de dedos de zinc
- Inducción del RNA de Xist a corpúsculo de Barr de cromosoma 21
- Silenciamiento de alelos específicos en el cromosoma 21
- Silenciamiento y metilación del genoma
- Corrección fenotípica in vitro

Células Troncales

69

- La célula, la unidad fundamental de los seres vivos
- Antecedentes de las células troncales
 - Clasificación de las células
- Clasificación de acuerdo a su potencialidad (Smith, 2006)
 - Células troncales totipotentes
 - Células troncales pluripotentes
 - Células troncales multipotentes
 - Células troncales oligopotentes
 - Células troncales unipotentes
- Clasificación de acuerdo a su origen (Mata-Miranda, Vazquez-Zapien, & Sánchez-Monroy, 2013)
- Características de las células troncales mesenquimales
 - Propiedades de las células troncales mesenquimales
 - Localización de las células troncales mesenquimales

Células mesenquimales orales 81

- Células mesenquimales de ligamento periodontal
- Células mesenquimales de papila apical
- Células mesenquimales del folículo dental
- Células mesenquimales del germen dental
- Células mesenquimales de la mucosa oral
- Células mesenquimales de pulpa dental

Embriología e histología de la pulpa dental 84

- Estadio de Brote
- Estadio de casquete
- Estadio de campana
- Estadio de campana inicial
- Estadio de campana avanzada

Metodología 91

- Criterios de inclusión
- Recursos
- Método
- Selección de dientes
- Extracción dental
- Transporte de dientes obtenidos
- Preparación de dientes donados
- Extracción de tejido pulpar
- Cultivo celular

Resultados 101

Discusión 104

Conclusiones 108

Introducción



A lo largo de la historia, la sociedad ha buscado distintas formas para mejorar la calidad de vida y la salud de aquellas personas que presentan algún síndrome. En el particular de este trabajo se abordará uno de los que más prevalencia tienen en nuestro país, el síndrome de Down, esta afección en especial ha sido ampliamente estudiada pues produce considerables complicaciones tanto a los portadores de ella, como a sus familiares.

En 2013, investigadores de la Universidad de Massachusetts-Worcester, realizaron avances en el campo de la terapia génica, logrando suprimir el defecto génico que causa la trisomía 21 en células troncales obtenidas a partir de fibroblastos. Por medio de enzimas de restricción llamadas nucleasas de dedos de zinc se logró imitar el mecanismo XIST con el cual se inactiva el gen 21. Usando la edición del genoma con nucleasas de dedos de zinc dirigieron un transgén XIST en el locus *DYRK1A* del cromosoma 21 dentro de iPS de síndrome de Down. El ARN XIST recubre el cromosoma 21 y desencadena modificaciones de heterocromatina estable, el silenciamiento transcripcional de todo el cromosoma y la metilación del ADN para formar un "corpúsculo de Barr de cromosoma 21". Esto proporciona un modelo para estudiar la inactivación cromosómica humana, creando un sistema para investigar los cambios en la expresión genómica y las patologías celulares de la trisomía 21, libres de ruido genético y epigenético.

La pulpa dental como fuente de células troncales fue descrita por primera vez en el 2000 por Gronthos y ha demostrado su eficacia en la ingeniería tisular al ser las células mesenquimales orales más utilizadas. A pesar de esto, este nicho se encuentra aún sin explorar

Introducción

en los pacientes con síndrome de Down, esto debido a la flora bucal que se encuentra comprometida al tener una higiene oral deficiente, la cual es aprovechada por microorganismos oportunistas como la *Cándida Albicans*, o los *Estreptococcus* sin mencionar a *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia* que han mostrado ser significativamente más prevalentes en sujetos con síndrome de Down.

Justificación



Esta investigación tiene como objetivo principal determinar si las células mesenquimales presentes en la pulpa dental de dientes temporales de pacientes con síndrome de Down pueden ser consideradas como una fuente viable sobre la cual realizar estudios de carácter genético, brindando así un nicho celular de obtención menormente invasiva en comparación con un aspirado de médula ósea.

Actualmente no se ha registrado ningún artículo que hable de la obtención de estas células o su viabilidad, haciendo de este trabajo una investigación innovadora, en un campo de la ciencia que poco a poco ha ido creciendo, como lo es la terapia cromosómica. De lograrse la obtención de estas células, se estaría facilitando la realización de estudios genéticos en sectores vulnerables de la población.

Una de las grandes ventajas para el uso de este tipo de células es su fácil obtención ya que esta puede darse durante una consulta de rutina mediante una pequeña cirugía ambulatoria no incapacitante. Esto último representa una mejoría con respecto a las otras fuentes de obtención pues los pacientes que por los síntomas que caracterizan este síndrome se ven incapacitados en la mayoría de los casos para una cirugía mayor.

Objetivos



Objetivo general.

Realizar cultivo de pulpa dental de dientes temporales de pacientes con síndrome de Down.

Objetivos específicos.

- Obtener dientes temporales de sujetos con síndrome de Down
- Realizar limpieza y preparación de los dientes temporales obtenidos
- Obtener tejido pulpar de dientes temporales de sujetos con síndrome de Down.

Síndrome de Down



El desarrollo de la vida siempre se ha caracterizado por hallarse en constante cambio, como parte de los mismos nos encontramos con diversas mutaciones que han descubierto diferentes formas de expresión, como por ejemplo aquellas que se han expresado por medio de las denominadas enfermedades raras.

El término de enfermedades raras fue usado por primera vez a mediados de la década de los años 80 en Estados Unidos (Posada, 2008), estas enfermedades son aquellas que tienen una baja incidencia en la población de cada lugar y están caracterizadas por el gran número de signos y amplia diversidad de desórdenes en los síntomas que varían no sólo de una enfermedad a otra, si no también varían dentro de los sujetos que presentan la misma enfermedad. Si bien, todos los desórdenes genéticos son enfermedades raras, este no es el único origen, también, nos encontramos que pueden desarrollarse por infecciones o enfermedades autoinmunes (Orphanet, 2012).

Casi todos los órganos se van a ver comprometidos por una de las más de 7.000 enfermedades reconocidas y su agrupación es compleja, encontrando enfermedades de baja prevalencia a lo largo de todos los tipos de enfermedades, incluido el cáncer y las enfermedades infecciosas. No obstante, la variabilidad geográfica de las enfermedades infecciosas, claramente relacionadas con factores históricos, sociales y ambientales, muestran la paradoja de que algunas de ellas son muy frecuentes en países del tercer mundo mientras que son de baja frecuencia para países desarrollados (Posada, 2008).

Las enfermedades raras son afecciones con una alta tasa de mortalidad pero de baja prevalencia. Por lo general, tienen una

Síndrome de Down

evolución crónica muy severa, con múltiples deficiencias motoras, sensoriales y cognitivas y por lo tanto suelen presentar un alto nivel de complejidad clínica que dificultan su diagnóstico y reconocimiento (Posada, 2008), algunas de estas enfermedades se presentan al momento de la adolescencia como lo son Huntington (Ramalle-Gómara, 2007) o la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, pero la mayoría de estas enfermedades son identificadas desde el nacimiento o la infancia y dentro de estas encontramos la osteogénesis imperfecta o los síndromes. (Orphanet, 2012)

Un síndrome es un padecimiento caracterizado por una serie de signos y síntomas que se dan en conjunto formando un cuadro clínico determinado (RAE, 2017). A menudo estos síndromes generan discapacidades que refuerzan la sensación de aislamiento y pueden ser una fuente de discriminación, reduciendo las oportunidades educativas, profesionales y sociales. Por lo general son personas dependientes de sus familias y con calidad de vida reducida (Gaite, 2005). Estos síndromes pueden ser detectados durante la infancia o la adolescencia como es el caso del síndrome de Tourette o al momento del nacimiento como el síndrome de Down.

El síndrome de Down, es una condición genética que ha afectado de manera económica y social a un gran número de personas en el mundo. Esta condición genética fue descrita por primera vez en 1846 como “idiotia furfurácea” por Scheerenberger (Reyes, 2009) quien describe el aspecto de una paciente con síndrome de Down. En 1866 Langdon Down, médico inglés y superintendente del asilo Earlswood, registró bajo el nombre de *mongolismo* sus observaciones del parecido físico entre varios de sus pacientes que poseían retraso mental, describiéndolos con un rostro ancho y plano, una lengua gruesa, nariz pequeña, ojos en forma ovalada y con pelo escaso, liso y oscuro, también habló sobre un poderoso don de imitación (Down, 1990), aunque sus observaciones no son muy exactas, a Down se le atribuye la descripción de este síndrome, influido por las ideas del

Síndrome de Down

Darwinismo él pensaba que esta condición era un retroceso evolutivo hacia un tipo racial primitivo (ASALSIDO, 2005) clasificándola en diversos tipos de idiocia mongólica, tales como etíope, malayo e indoamericano. Down creía también que diversas enfermedades de los padres como la tuberculosis podían romper la “barrera de las razas” durante el embarazo y permitir que padres europeos tengan hijos orientales, a él le atribuimos la descripción física de los pacientes con el síndrome que lleva su nombre.



*Ilustración 1. "La Virgen y el Niño"
Andrea Mantegna*



*Ilustración 2. "La Adoración del Niño Jesús"
Autor desconocido*

A pesar de que se le atribuye la descripción del síndrome de Down a Langdon Down, este no es el primer vestigio que se tiene de esta condición genética. El primer vestigio del que se tiene conocimiento es un cráneo sajón que remonta al siglo VII (ASALSIDO, 2005); las artes también nos dan ejemplos como es el caso de “La Virgen y el Niño” de Andrea Mantegna (1430-1506), en la imagen se puede observar a un niño que muestra las características físicas de un paciente con trisomía 21 (Ilustración 1).

Otro retrato en donde se encuentran rostros que aparentan ser personas con síndrome de Down es “La Adoración del Niño Jesús” que es de autor desconocido discípulo de Jan Joest (1455-1519), en la pintura podemos observar a un pastor y un ángel con aparente síndrome de Down (Ilustración 2).

Síndrome de Down

La descripción que Down había hecho fue válida durante una década hasta que en 1876 Frasier y Mitchell los llamaron *idiotas de Kalmuck*. Ellos aportaron el primer informe científico sobre el síndrome, en una reunión mantenida en Edimburgo cuando Mitchell presentó observaciones sobre 62 personas que tenían síndrome de Down.

En 1877, William Ireland incluyó en su libro “*Idiocy and Imbecility*” (pp.36-42), a los enfermos con Síndrome de Down como un tipo especial.

Shuttleworth (1886, pp.661-665) declaró que estos niños estaban “sin acabar...” y que “su aspecto peculiar era, en realidad, el de una fase de la vida fetal”¹ destacando que la edad de la madre era un factor de importancia y que el síndrome era una consecuencia de un decaimiento de la capacidad reproductiva de las personas.

En 1896 Smith (pp.315-320) describió la mano de una persona con síndrome de Down e hizo notar la curvatura del meñique.

En la década de 1930 Waadenburg y Penrose afirmaron que el síndrome se debía a alguna anomalía cromosómica pero no pudieron demostrarlo hasta que en 1956 Jerome Lejuene demostrara la existencia de material genético extra en el cromosoma 21 (Chávez, 2014). Esto se determinó mediante el análisis del cariotipo de niños con síndrome de Down en fibroblastos humanos cultivados y se estableció así el origen genético. Poco tiempo después se identificó que el cromosoma adicional, pequeño y acrocéntrico, correspondía al par 21, ubicado en el grupo G, según la clasificación del cariotipo humano de Denver (López, 2000).

¹ Traducción de la cita por la autora, (Shuttleworth, 1886)

Etiología y prevalencia en México

Este síndrome es una condición genética que afecta a muchas familias de nuestro país, un caso por cada 650 nacimientos, la mayoría de los casos donde se presentan estos pacientes no cuentan con los recursos necesarios para solventar sus necesidades (Sierra, 2014).

La trisomía 21 o síndrome de Down es la causa más común de discapacidad intelectual. Es generada por la aparición de tres copias en lugar de dos del par cromosómico 21, anomalía cromosómica en la cual se presentan 47 cromosomas en lugar de 46, resultando en la manifestación fenotípica propia del síndrome de Down. En el 99% de los casos, el síndrome de Down está asociado a una trisomía 21 (HSA21)², pero también se puede dar por otro tipo de trisomías de este cromosoma (Nadal, 2001).

Otras probables etiologías son: cuando en las familias ya se posee un carácter aislado de este síndrome, alteraciones en los tres primeros meses de gestación como infecciones, crisis morales o psíquicas. Hoy se conocen tres tipos de trisomía 21: por error de distribución de material genético, por mosaicismo, (algunas células serán deficientes y otras normales) y otros por aportes genéticos de los padres. El síndrome de Down ha sido además la primera cromosopatía descubierta, es la trisomía autosómica más frecuente.

² HSA21 terminología utilizada para referirse a la localización del cromosoma 21 en el código genético. National Human Research Institute. Consultado el día 11 de Junio del 2017 del sitio <https://www.genome.gov/19517824/learning-about-down-syndrome/>

Etiología y prevalencia en México

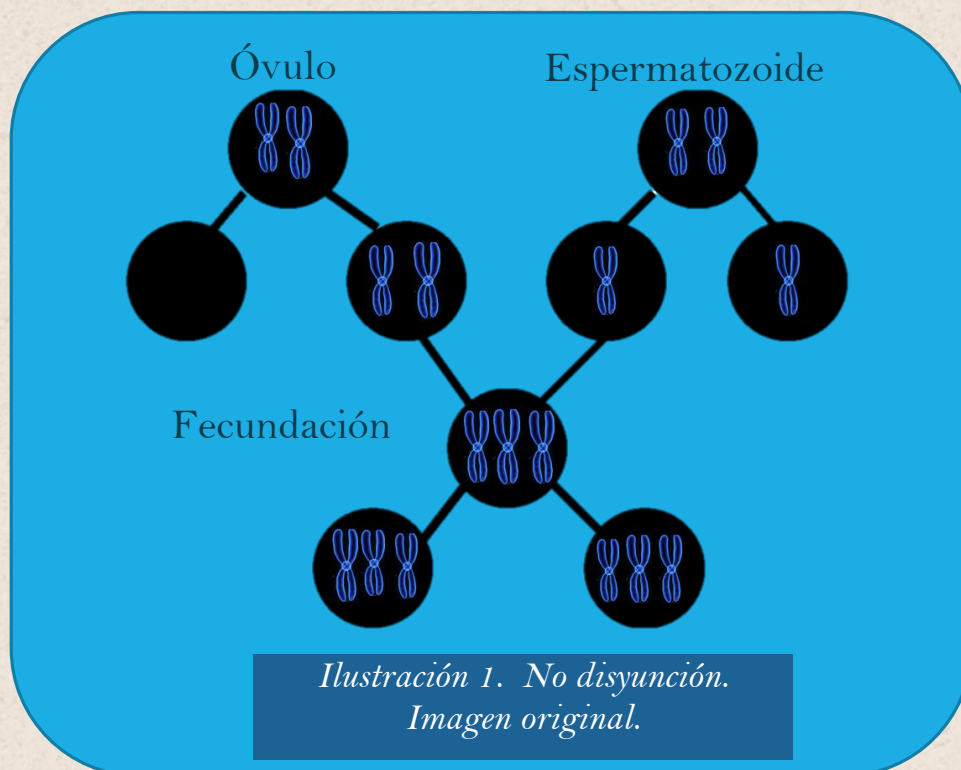
Edad de la madre (años)	Nacimiento con diagnóstico de síndrome de Down CIE-10			Total de nacimientos (vivos y muertos)	Prevalencia por 10.000 nacimientos	Índice de síndrome de Down
	Nacidos vivos	Muertes fetales	Total			
<15	15	0	15	65, 874	2.3	4.392
15-19	279	6	285	1, 615, 207	1.8	5,667
20-24	448	15	463	2, 420, 766	1.9	5,228
25- 29	449	16	465	2, 054, 958	2.3	4,314
30.34	505	18	523	1, 321, 909	4.0	2,528
35- 39	728	23	751	621, 402	12.1	827
40- 44	470	17	487	130, 170	37.4	267
>45	56	2	58	13, 305	43.6	229
Ausencia de datos	22	7	29	55, 784	-	-
Total	2, 972	104	3, 076	8, 250, 375	3.7	2, 682

Tabla 1 Prevalencia de nacimientos con síndrome de Down por grupos quinquenales de edad de la madre, México, 2008- 2011

Trisomía simple

Previo a explicar este tipo de trisomía debe conocerse el desarrollo normal de los óvulos y los espermatozoides, estos provienen de células originarias en las que, al dividirse, sus 46 cromosomas se separan: 23 van a una célula y sus correspondientes parejas se van a otra por eso cada una tiene 23 cromosomas, en algunos casos se da un proceso de *no disyunción* o *no separación*, esto es cuando la separación de las parejas de cromosomas no se realiza correctamente, dejando los dos cromosomas de la pareja. Cuando esta célula germinal de 24 cromosomas se une con otra que aportará un total de 23 cromosomas la célula resultante al momento de la concepción tendrá 47 cromosomas, y a partir de ella se formarán las demás células del nuevo organismo y todas ellas poseerán 47 cromosomas (FCSD, 1996).

La no disyunción se da con mayor frecuencia en las células germinales femeninas que en las masculinas, de forma que la trisomía es principalmente de origen materno (Antonarakis, et.al., 1992).



Trisomía simple

Aún no se comprende por qué se produce la *no disyunción*, es muy probable que sea multifactorial, pero al parecer el factor más importante es la edad de la madre. Aproximadamente en el 30% de los casos el cromosoma extra proviene del espermatozoide. Si bien la participación del padre en la trisomía 21 aún no está bien definida, la importancia a la edad de la madre se debe a que al nacer una niña, todos los óvulos que pueda llegar a producir ya se encuentran presentes de forma inmadura, y permanecerán en ella hasta que el óvulo sea liberado en su ciclo correspondiente. Esto significa que permanecerá en estado de latencia por un periodo de 20 a 40 años, brindando un gran margen de tiempo en el cual se pueda presentar algún error (García, 2009).

El 95% de las personas con síndrome de Down son por causa de una trisomía simple (García, 2009).

Trisomía por translocación

Las translocaciones suponen la separación de un fragmento de ADN³ de un cromosoma y su posterior unión a otro cromosoma (Del Abril et al., 2001). Esto quiere decir que el número total de cromosomas asciende a 46, pero el cromosoma número 21 extra va unido a otro cromosoma, dando un total de tres cromosomas número 21 en cada célula, la diferencia con lo anterior es que el cromosoma 21 no está libre, sino unido a otro cromosoma, generalmente un 14, 21 o 22 (FCSD, 1996), por lo tanto, estas personas presentan dos cromosomas del par 21 completos más un trozo de un tercer cromosoma 21 que generalmente se encuentra pegado o adherido a otro par.

³ ADN ácido desoxirribonucleico

Trisomía por translocación

Se debe a que los padres poseen en las células de su organismo, en lugar de dos cromosomas 21 completos, un cromosoma 21 completo más un trozo de otro cromosoma 21 que se desprendió y adosó a otro cromosoma.

Cuando se forman las células germinales, la pareja de cromosomas se separa: una célula se quedará con un cromosoma entero y otra con uno mixto y el 21 que no tenía pareja se irá con una de las dos células. De este modo alguna célula tendrá un cromosoma más un trozo de 21 y un 21 completo con lo cual ya tiene dos elementos 21. Este tipo de síndrome de Down es aproximadamente un 4% de los casos.

Las translocaciones pueden dividirse en Robertsonianas y no Robertsonianas. En las primeras existe una fusión de los brazos largos a nivel del centrómero o de los brazos cortos (Nadal, 2000). Aproximadamente el 50% de las translocaciones Robertsonianas que aparecen en el síndrome de Down entre el cromosoma 21 y un cromosoma del grupo D (13, 14 o 15) son de origen familiar (Giraud & Mattei, 1975).

Las translocaciones no Robertsonianas pueden ser de dos tipos: las recíprocas o en equilibrio del cromosoma 21 (C21), en las que se produce un intercambio de material entre el C21 y cualquier otro cromosoma, autosoma o cromosoma sexual; estas translocaciones pueden no tener consecuencias fenotípicas. Al transmitir las translocaciones recíprocas a la descendencia es cuando existe riesgo de originar un desequilibrio cromosómico (Nadal, 2000).

En una tercera parte aproximadamente de los casos con translocación, uno de los progenitores es portador de la anomalía. En este caso, ser portador implica un defecto en la arquitectura cromosómica, pero no implica presencia de material genético de más, es decir, no presenta el síndrome. El portador puede formar gametos con material genético de más, lo que originaría la trisomía uniéndose con otro gameto normal (FCSD, 1996).

Trisomía por translocación

La translocación trisonómica puede presentarse de forma esporádica, por ejemplo, cuando no hay evidencia en los padres o hermanos, o puede ser hereditaria, en cuyo caso uno de los progenitores es portador. El portador sano de una translocación tiene 45 cromosomas y se considera equilibrado, ya que todo el complemento normal de cromosomas se encuentra representado. El cromosoma de translocación en el portador puede ser heredado o esporádico. En los casos hereditarios la madre suele ser la portadora, de un portador pueden nacer tres tipos de hijos:

- Individuos normales, tanto en sus cromosomas como en sus características morfológicas (fenotipo).
- Individuos portadores de una translocación con fenotipo normal.
- Individuos afectados de síndrome de Down por translocación.

Trisomía por mosaicismo

En el 1% de los pacientes con síndrome de Down hay un cromosoma 21 extra entero en solo una porción de sus células corporales. Se dice que estos individuos presentan mosaicismo porque las células de su cuerpo son como un mosaico formado por piezas diferentes.

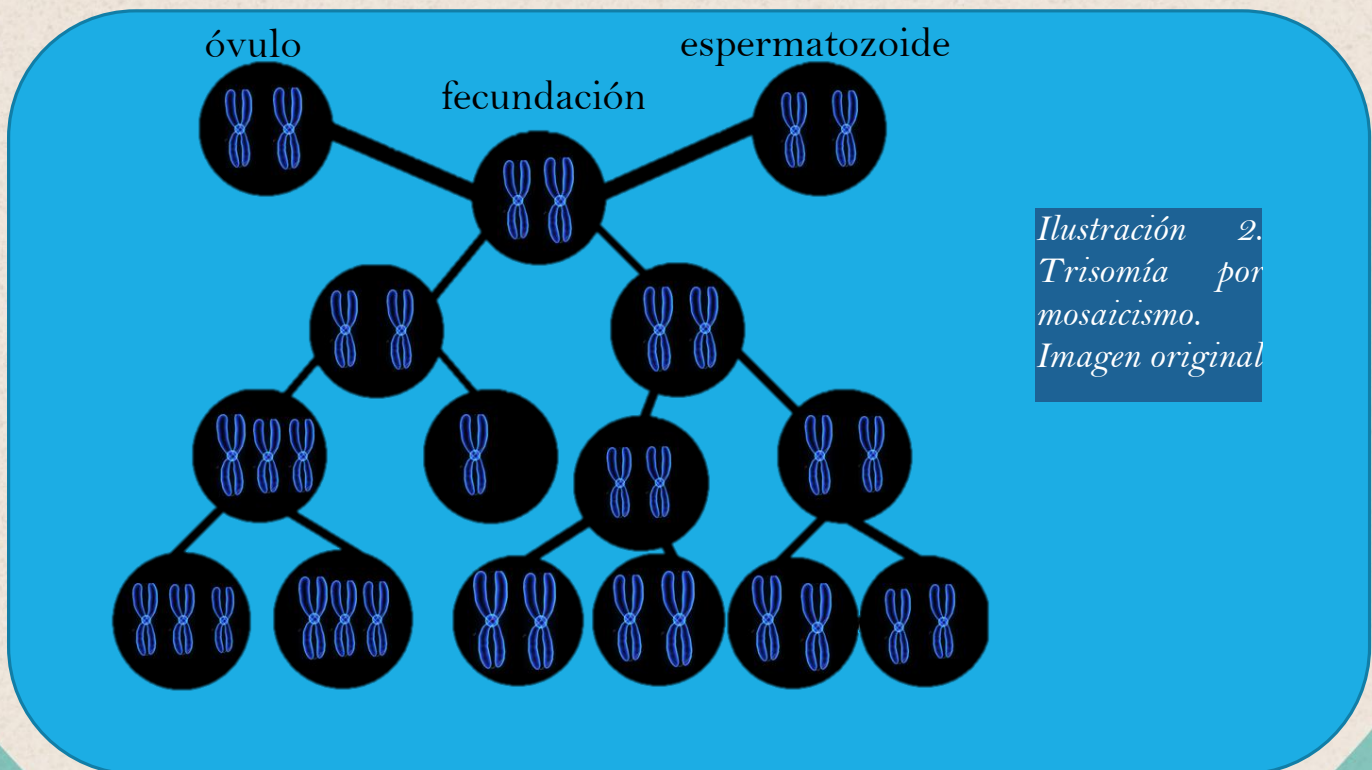
En este caso tanto el óvulo como el espermatozoide constan de un número normal de cromosomas y la primera célula que se forma de la fusión de ambos es normal y posee 46 cromosomas. Sin embargo a lo largo de las primeras divisiones de esa célula y de sus hijas surgen en alguna de ellas el fenómeno de la no disyunción de la pareja de cromosomas 21 de modo que una célula tendrá 47 cromosomas, tres de los cuales serán del par 21. A partir de ahí, todas las células que se deriven de esa tendrán 47 cromosomas y las que se deriven de las de

Trisomía por mosaicismo

46 cromosomas serán normales. Dependiendo de cuando haya aparecido la no disyunción será el porcentaje final de células trisonómicas (FCSD, 1996).

Con relación al síndrome de Down no importa cuál sea la etiología de esta condición (trisomía simple, translocación o mosaicismo) el responsable de los rasgos físicos y el rendimiento intelectual siempre será el cromosoma 21.

Existirán en un mismo individuo dos poblaciones celulares, células con 46 y con 47 cromosomas. Las personas con trisomía parcial parecen tener un desarrollo no tan afectado como en otras trisomías. En la no disyunción mitótica el cromosoma extra de una célula se pierde poco después de la fecundación un alto porcentaje del mosaicismo identificado fenotípicamente tiene un origen mitótico en un 20 % de los casos (Nadal, 2000; Richards, 1974). Se debe resaltar la gran variabilidad del fenotipo en el mosaicismo, que puede ir desde casos típicos de síndrome de Down a casos con pequeños dimorfismos, curiosamente no se han descrito casos de mosaicismo con defectos cardiacos de naturaleza congénita (Kohn, et. al., 1970).



*Ilustración 2.
Trisomía por
mosaicismo.
Imagen original*

Características físicas de los pacientes con trisomía 21

De un paciente a otro hay características que no se encuentran presentes, pero a continuación describo algunas de las más comunes:

Cabeza presentan microcefalia con el diámetro anteroposterior reducido, el crecimiento de los huesos de la parte media de la cara es menor que un paciente no Down, algunos pacientes presentan alopecia (areata o totalis).

Orejas presenta microtia con hélix doblado, la estructuras del oído se encuentran alteradas, con conductos auditivos estrechos, su implantación es más baja y ligeramente oblicuas en algunos pacientes el lóbulo se encuentra ausente o fusionado a la cabeza.

Cuello es corto, de apariencia fuerte y ancho.

Tórax puede presentar 11 costillas a cada lado del tórax de las 12 que tenemos presentes, también pueden presentar diferentes formas: pecho de embudo, es cuando el esternón tiene una depresión, cuando sobresale se le denomina pecho de horquilla, los pacientes con dilatación cardíaca congénita presentan un tórax más amplio de lado izquierdo. El 40% de los pacientes con síndrome de Down presentan anomalías cardíacas (ASALSIDO, 2005), entre las cuales destacan estenosis pulmonar y comunicación interventricular⁴. Dentro del área del



Ilustración 3. Helix doblado. Foto original Fundacion DUE A.C.

⁴ Notas personales de investigación Abril 2017

Características físicas

pecho encontramos los pulmones que también se encuentran hipoplásicos, algunos sufren de una presión arterial excesiva lo que aumenta su posibilidad de padecer neumonía.

Extremidades las extremidades inferiores son visiblemente más



Ilustración 6. Pliegue simiano. A.D.A.M.

cortas. Los huesos que componen la mano son de un 10 a 30% más pequeños comparados con los pacientes sin síndrome de Down, los dedos de las manos son cortos y anchos, el dedo meñique presenta una curvatura. En la mitad de los pacientes se alcanza a percibir un solo pliegue a través de la palma (pliegue simiano). Las huellas

dactilares también son distintas (ASALSIDO, 2005).

Cara se encuentra presente un aplanamiento facial, eritema facial continuo, los ojos, la nariz y la boca se encuentran estrechamente relacionados entre sí con las siguientes características:

Ojos: hendiduras palpebrales oblicuas, forma almendrada y presentan pliegues epicánticos, llegan a presentar hipertelorismo a consecuencia del puente nasal plano y del marcado pliegue epicantreal, lo cual da la impresión de que la distancia entre los ojos es más amplia, también llegan a presentar hipotelorismo es debida a la hipoplasia de los huesos correspondientes de la estructura media,

Características físicas

en la periferia del iris a menudo se encuentran manchas de Brushfield que desaparecen al año de vida (Kim J.H. et. al., 2002). Los defectos de refracción, tanto la miopía como la hipermetropía, son frecuentes. Se calcula que la miopía afecta al 30-50% de los niños y la hipermetropía al 20%. El estrabismo se da aproximadamente en el 49%, el nistagmus en el 35%, y la oclusión del conducto lagrimal en el 20% (ASALSIDO, 2005).

Nariz: El puente de la nariz ancho y deprimido, conductos nasales estrechos, por otra parte es ligeramente respingada con los orificios hacia el frente o hacia arriba, visualmente su nariz es pequeña en correspondencia con su cara.



Ilustración 7. Manchas de Brushfield.



Ilustración 8. Características faciales del síndrome de Down. Foto original Fundación DUE A.C.

Afecciones orales en pacientes con síndrome de Down

Las manifestaciones orales de estos pacientes son variables de paciente a paciente, al igual que los otros signos antes mencionados.

Lengua presentan macroglosia (verdadera o relativa) lo cual les da una apariencia de siempre tener la boca abierta, favoreciendo los hábitos de succión digital y respiración bucal, también se puede encontrar una lengua geográfica y o fisurada creando surcos que favorecen la colonización bacteriana, debido a las irregularidades anatómicas (Lee S., 2004).

Labios en la mayoría de los casos el labio inferior se encuentra evertido a causa del prolapso lingual, creando a su vez fisuras labiales y queilitis angular.



Ilustración 9. Respirador bucal, disminución de tercio medio facial. Foto original Fundación DUE A.C.

Alteraciones estructurales como se mencionó anteriormente, estos pacientes son propensos a desarrollar hábitos inadecuados lo que impacta directamente en el desarrollo del paladar, provocando que este colapse y tome una forma ojival, evitando el desarrollo normal del tercio medio de la cara. Estos pacientes presentan mordida abierta anterior, protrusión mandibular,

oclusión clase III.

Alteraciones dentales presentan alteraciones de número y forma de los dientes, como lo son agenesias o supernumerarios, microdoncias, taurodontismo, hipoplasia en el esmalte. También se ve alterada la erupción dentaria, esta generalmente se encuentra retrasada (Lee S., 2004).

Afecciones orales

Respiración bucal además de lo previamente explicado, la respiración bucal produce resequeidad en las mucosas, favoreciendo las infecciones por gérmenes oportunistas y la estomatitis, así como un incremento en la aparición de lesiones cariosas, enfermedad periodontal e infecciones por hongos.

Saliva los pacientes con síndrome de Down presentan un aumento en el pH salival, así como un aumento en el contenido de sodio, calcio, ácido úrico y bicarbonato, con una velocidad de secreción disminuida (Reuland, 2001).

Periodonto la enfermedad periodontal en pacientes con síndrome de Down se caracteriza por ser de una progresión rápida y severa. Los diversos factores anteriormente explicados se ven potenciados por el aumento en el número de microorganismos presentes en la flora bucal como la *Cándida Albicans*, o los *Streptococcus* sin mencionar a *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia* que han mostrado ser significativamente más prevalentes en sujetos con síndrome de Down (Culebras, et. al., 2012).

Control muscular un alto porcentaje de pacientes con síndrome de Down presentan un pobre control de la musculatura orofacial dificultando procesos como habla, masticación o la higiene (Lee S., 2004).



Ilustración 10. Alteraciones dentales. Foto original Fundación DUE A.C.

Características psicológicas de los pacientes con trisomía 21

De todas las características que suelen aparecer en las personas con síndrome de Down, se puede decir que la afección en el cerebro, que ocasiona discapacidad intelectual, es la que está presente en todos los casos junto con la presencia de modificaciones neuropatológicas similares a las de la enfermedad de Alzheimer (Dierssen et al., 2003). Las características más comunes en estos pacientes son (ASALSIDO, 2005):

- Trastornos afectivos depresión.
- Trastornos psicóticos manías, trastornos bipolares, también encontramos trastornos como el autismo y estados paranoides así como esquizofrenia.
- Trastornos de comportamiento trastornos del sueño, de movimiento, déficit de atención e hiperactividad (TDAH), conductas disociales, mutismo selectivo y estereotipias motrices.
- Trastornos específicos del desarrollo del habla y lenguaje.
- Enfermedad de Alzheimer.

Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer lleva el nombre del doctor Alois Alzheimer, el médico alemán que la describió por primera vez en 1906 a partir del estudio de caso de Auguste Deter. El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que constituye la causa más frecuente de demencia (Shenk, 2006).

Se distinguen clásicamente dos formas de enfermedad de Alzheimer:

La de origen y presentación familiar la enfermedad se inicia precozmente, entre los 40 y los 60 años y su origen es *monogénico*,

Alzheimer

debido a la mutación en tres genes: *APP* (proteína pre-amiloide) en el cromosoma 21, *PSEN1*⁵ en el cromosoma 14 y *PSEN2*⁶ en el cromosoma 1. Estas mutaciones poseen un alto grado de penetrancia y provocan un marcado aumento en la producción del péptido β -amiloide y de su deposición en el cerebro.

La de aparición esporádica no familiar esta se presenta cuando el gen *APOE*⁷ (en el cromosoma 19) se encuentra afectado⁷ comienzan en edades por encima de los 60 años. Tienen un origen multigénico, multifactorial y complejo, en donde la presencia de varios factores de riesgo facilita el desarrollo de la enfermedad.

Las neuronas observadas en personas con síndrome de Down parecen tener seriamente afectada la arborización dendrítica, así como las sinapsis (Flórez, 1994). Las dendritas, las prolongaciones del soma neuronal, constituyen las principales áreas receptoras de la información que llega a la neurona. Esa información atraviesa una zona de transferencia entre una neurona y otra, la sinapsis. Estas zonas se observan especialmente dañadas en aquellos pacientes en los cuales está presente el síndrome de Down (Ferrer & Gullota, 1990).

Gen APP

Al ser nuestra área de estudio lo concerniente al cromosoma 21 se describirá brevemente el gen APP.

El gen APP se encuentra en el cromosoma 21 en la banda q21.3., y codifica la proteína precursora beta amiloide; la estructura molecular completa de la APP aún no ha sido resuelta aunque muchos de sus

5 Las siglas hacen referencia a la localización específica dentro del cromosoma 14

6 Las siglas hacen referencia a la localización específica dentro del cromosoma 1

7 Apolipoproteína E

dominios individuales han sido cristalizados y definidos con éxito, estudios han asociado esta proteína a funciones como el crecimiento de las neuritas, la formación de la sinapsis, el tráfico de proteínas a lo largo del axón de las neuronas, la adhesión celular, y el metabolismo del calcio (Zheng, 2006).

Se han descrito diversas mutaciones en regiones críticas de la APP, incluyendo la que genera el péptido beta amiloide, esta última es responsable de la susceptibilidad heredable a la enfermedad de Alzheimer. Otras mutaciones directamente responsables del Alzheimer familiar se encuentran en las presenilinas, unas proteínas que forman parte del complejo gamma-secretasa, que es el sistema enzimático responsable en última instancia del procesamiento erróneo de la APP y de la formación del péptido beta-amiloide (Zhang, 2011).

Las mutaciones en APP causan la acumulación de β -amiloide lo que conduce a la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano, y la sobreexpresión de APP está vinculado a la enfermedad de Alzheimer en el síndrome de Down (Cataldo, 2000).

Terapia cromosómica



En vista de la problemática ocasionada por esta enfermedad en nuestro país, se han creado asociaciones civiles para tratar de dar apoyo a la sintomatología y la discriminación social a este tipo de pacientes, pero sin encontrar una solución real a estos padecimientos. Sin embargo, la aparición de la nueva medicina genómica está facilitando una proliferación de hallazgos genéticos (mutaciones puntuales de un gen o diferente expresión genotípica) sobre la base de una supuesta diferencia del fenotipo (Petersen, 2006). Estas investigaciones de medicina genómica han intentado por medio de la terapia cromosómica buscar alternativas en el tratamiento de las características más limitantes del síndrome, como es el caso de la aparición temprana de Alzheimer, el retraso mental y las cardiopatías relacionadas al síndrome de Down (Jiang, 2013).

Antes de poder hablar de terapia cromosómica tenemos que explicar algunos conceptos básicos de la terapia genética, y todo lo que esta conlleva.

La genética es la disciplina científica que se encarga de estudiar la herencia y la variación, analiza las reglas de transmisión de las características de padres a hijos; los mecanismos moleculares mediante los cuales los genes controlan el crecimiento, el desarrollo y el aspecto de las células y de los individuos; la estructura génica de las poblaciones y la variación en las frecuencias génicas que son la base del proceso evolutivo (Rodríguez, 2005). Esta ciencia cuenta con más de medio siglo de historia durante la cual ha logrado ganarse una posición en el ámbito científico, marcando una pauta para las nuevas terapias médicas, basadas en la manipulación genética y en la experimentación animal, con miras a la implementación en humanos, medicina traslacional (Wehling, 2008).

Terapia cromosómica

Los genes pueden estudiarse a nivel molecular, bioquímico, celular, poblacional o evolutivo por lo tanto la genética se divide en tres partes para su estudio (Rodríguez, 2005):

- **Genética de la transmisión**, de los caracteres hereditarios de padres a hijos a través de las generaciones.
- **Genética molecular**, que se refiere a la naturaleza química de la herencia.
- **Genética de poblaciones**, composición genética de individuos miembros de una población y cómo cambia en función del tiempo y adecuación en los espacios geográficos, es decir, micro y macroevolución.

Las primeras teorías de herencia fueron las del esencialismo, que dicen que todas las especies poseen una esencia que las define y las hace únicas, fue propuesta por Hipócrates y Aristóteles. Durante el renacimiento se propusieron las teorías de la epigénesis y la preformación. Durante la segunda mitad del siglo XIX Johann G. Mendel postuló patrones matemáticos exactos para la transmisión de los caracteres hereditarios discretos. El nombre de genética fue obtenido de W. Bateson en 1906 (Rodríguez, 2005).

Otra ciencia que se ha derivado de la genética es la genómica que se ha dedicado al estudio integral del funcionamiento, el contenido, la evolución y el origen de los genomas⁸ completos de los seres vivos. La genómica usa conocimientos derivados de distintas ciencias como son: biología molecular, bioquímica, matemáticas y física, por mencionar algunas.

La genómica se ha dividido para su estudio en dos etapas o eras (Rodríguez, 2005):

⁸ El genoma se define como toda la información genética presente en un organismo determinado (Rodríguez, 2005).

Terapia cromosómica

- La era genómica que comprende la:
 - genómica estructural, que trata a partir de los mapas genéticos de la localización relativa de los genes, los marcadores moleculares y los segmentos cromosómicos que permiten posicionar los segmentos de los cromosomas, alinear los pedazos de ADN secuenciados y a caracterizar la secuencia completa de un genoma, es decir, a la construcción del mapa físico.
 - genómica funcional, que trata de caracterizar tanto el conjunto de transcriptomas como el conjunto de proteínas que codifica un genoma o proteoma. Es decir, la genómica funcional es la recolección sistemática de la información sobre la función de los genes haciendo uso de la información y de los elementos de la genómica estructural.
- La era post-genómica que trata de analizar y comparar genomas y conocer cuáles son las relaciones que existen entre su estructura y función, comprende:
 - genómica comparada, que trata de encontrar las relaciones evolutivas al comparar los genomas completos de especies o taxones diferentes
 - genómica individual, que estudia las variaciones dentro de los genomas entre los individuos de la misma especie
 - proteómica celular, que estudia las proteínas que confieren a las células su forma y función, considerando que los proteomas a diferencia de los genomas son dinámicos y varían de manera espacial y temporal en los seres vivos.

Las ciencias genómicas han tenido un auge importante durante los últimos años, en mayor medida gracias a las tecnologías avanzadas de secuenciación de ADN, a los avances en bioinformática, y a las técnicas cada vez más sofisticadas para realizar análisis de genomas completos. Probablemente el más conocido es el Proyecto Genoma Humano que tiene como objetivo secuenciar completamente el ADN (Baquero, 2012).

Terapia cromosómica

En la actualidad se cuenta además con importantes servidores de acceso público, como el del NCBI (por sus siglas en inglés National Center for Biotechnology Information), que permiten que cualquier usuario con conexión a Internet acceda a la secuencia completa del genoma de decenas de organismos y a las secuencias de cientos de miles de genes de distintos organismos.

Terapia génica

La terapia génica tuvo sus orígenes en la década de los años 80 debido al gran avance que tuvo la ciencia al descubrir que las funciones biológicas están determinadas por la información genética, a falta de una definición exacta de terapia génica me basaré en las brindadas por Lacadena. La primera definición brindada por el considera que este procedimiento se basa en la administración deliberada de material genético en un paciente con la intención de corregir un defecto genético específico. La siguiente definición, considera que la *terapia génica* es una técnica terapéutica mediante la cual se inserta un gen funcional en las células de un paciente humano para corregir un defecto genético o para dotar a las células de una nueva función, material genético dentro de células o tejidos para prevenir o curar alguna enfermedad. La terapia génica es la inserción, alteración o remoción de un gen de células o tejidos biológicos para tratar alguna enfermedad (Lacadena, 1999).

Estas definiciones no abarcan de manera precisa lo que es en la actualidad la terapia génica y dejan espacio para pensar en eugenesia o modificaciones preventivas no terapéuticas, causando controversia y rechazo social. En este sentido, la definición de Strachan parece más apropiada pues no deja espacio para estas interpretaciones al definir a la terapia génica como la modificación genética de las células de un paciente para tratar una enfermedad (Strachan, 1999).

Terapia génica

La terapia génica se ha estudiado desde dos aspectos, la terapia genética somática y la germinal. La primera dirige la modificación genética a cualquier tejido corporal de los pacientes, pero estos se limitan al individuo sobre el cual se ha realizado la terapia pues carece de consecuencias hereditarias. La terapia germinal por el contrario va encaminada a la modificación genética de las células reproductoras, las células precursoras de la línea germinal o las células embrionarias de la primera etapa de desarrollo (Soutullo, 2002).

En los siguientes apartados se desarrollaran los componentes fundamentales para desarrollar una terapia génica, los cuales son los objetivos diana y los vectores.

Objetivos diana

Desde un punto de vista teórico se pueden concebir la aplicación de distintas estrategias de terapia génica dependiendo de los objetivos que se persigan y las células a las cuales se les aplicara la terapia, estas células son conocidas como objetivos diana.

La estrategia más utilizada en estas terapias consiste en la inserción génica, es decir en la introducción de una copia de un gen normal en las células tratadas. Esta técnica, conocida también como terapia de aumento génico (GAT) por el efecto que produce (Strachan, 1999), se aplica a enfermedades recesivas⁹ en las cuales no se encuentra el producto génico normal. La introducción de una variante no mutada del gen persigue la producción de la proteína funcional en una cantidad suficiente para restablecer el fenotipo normal. En este procedimiento los genes recesivos mutantes no interfieren con el

⁹ Las enfermedades recesivas son aquellas que se presentan cuando ambos progenitores son portadores del gen mutado aunque no presenten su fenotipo, es decir que estos sujetos no poseerán cromosomas dominantes (Rodríguez, 2005)

Objetivos diana

producto génico normal por lo que no es necesario proceder a su eliminación. La inserción génica es especialmente apta para enfermedades recesivas que no requieren una regulación estricta de la cantidad de producto génico producido para que el fenotipo normal pueda ser recuperado (Strachan, 1999) por ejemplo la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.

Una segunda modalidad, es la corrección dirigida de mutaciones (gene targeting) mediante algún procedimiento de modificación génica que sustituya el gen defectuoso por una copia normal del mismo o sustituya la secuencia mutada del gen por la secuencia normal, recomponiéndose de este modo la función original del gen. El mecanismo concreto para realizar esta sustitución sería la recombinación homóloga. También sería posible realizar la corrección a nivel del ácido ribonucleico (ARN) mediante el empleo de ribosomas (Strachan, 1999).

Existen otras estrategias de terapia génica como la supresión dirigida de células específicas o la inhibición dirigida de la expresión génica bloqueando el ADN, el ARN o la proteína producida por el gen (Soutullo, 2002).

Vectores

La otra variable a tomar en cuenta cuando se va a trabajar con terapia génica es el vector adecuado para la transferencia. El vector es el vehículo que transporta el gen terapéutico hasta el interior de la célula diana que queremos modificar. Las características del vector ideal serían (Bosh, 2013):

- ser reproducible y estable
- permitir la inserción de material genético
- reconocer y actuar sobre células específicas
- poder regular la expresión del gen terapéutico

Vectores

- carecer de elementos que induzcan una respuesta inmune
- ser inocuo o que sus posibles efectos secundarios sean mínimos

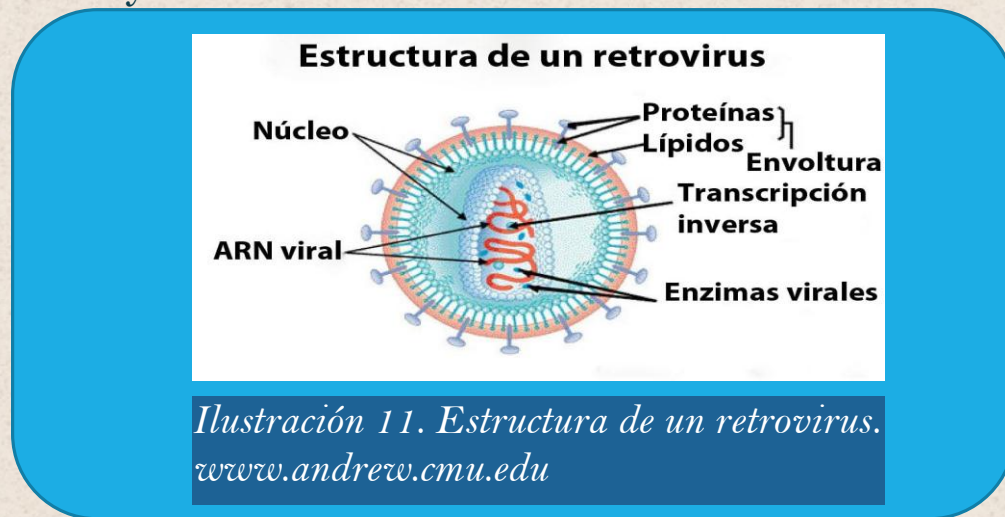
Uno de los pasos que mayores problemas ha planteado hasta ahora ha sido el de seleccionar el vector adecuado para la transferencia génica. Los principales tipos de vectores son virus, aunque también se han realizado ensayos con liposomas, conjugados moleculares y con ADN desnudo (Felgner, 1997).

Vectores virales

El uso de vectores virales dentro de la terapia génica se realiza destruyendo la actividad patogénica del virus, así como su capacidad de multiplicación dentro de las células. Para ello, se extrae de su ADN los genes responsables de estas funciones, que son reemplazados por los fragmentos de ADN terapéutico que se desean transferir. Cada tipo de vector presenta ventajas e inconvenientes distintos y hasta el momento no se ha encontrado ninguno que resulte idóneo (Friedman, 1997). La estructura de un vector viral está formada principalmente por cápside que contiene el ácido nucleico, algunos vectores también cuentan con una envoltura lipídica. Los vectores virales se agrupan en cuatro tipos de virus: *retrovirus*, *adenovirus*, *virus adenoasociados* y *herpesvirus*.

Retrovirus

Los retrovirus son un grupo ampliamente desarrollado. Son virus cuyo material genético está constituido por una molécula de ARN, esto los obliga a realizar el proceso de retrotranscripción para su replicación. Tienen la capacidad de integrarse en el genoma del huésped, con lo que ofrecen la ventaja de una expresión persistente del transgén, lo que los hace útiles para su uso en enfermedades hereditarias y crónicas.



Sin embargo, la integración en el genoma del huésped es aleatoria, presentando el riesgo de mutagénesis insercional debido a la posibilidad de alterar un gen vital o un gen supresor de tumor y por lo tanto interrumpir su expresión, o bien insertarse en un protooncogén induciendo su activación a oncogén.

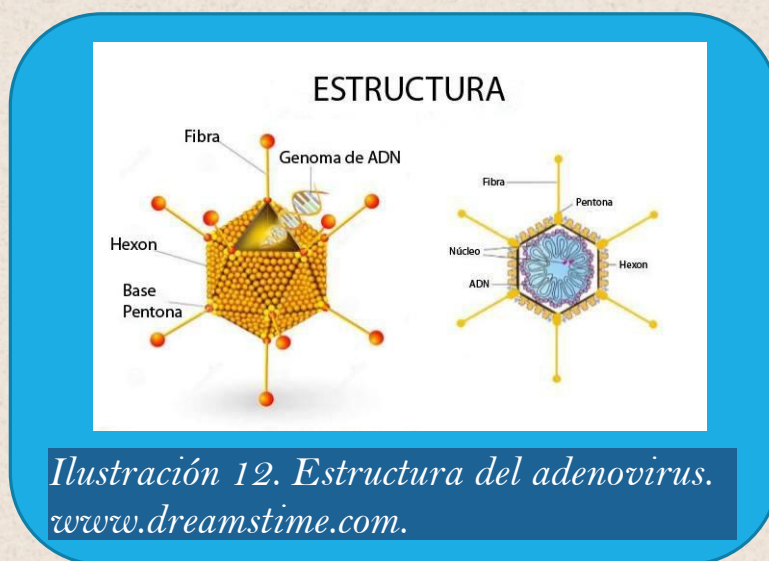
La gran desventaja que presenta este tipo de vectores es que sólo son capaces de infectar células en división. Los retrovirus recombinantes más usados son los derivados del virus de la leucemia murina, los cuales se modifican para hacerlos deficientes de replicación, con lo que se suprime su capacidad de formar partículas virales.

Dentro de este grupo también se encuentran los lentivirus con capacidad de integración estable tanto en células en reposo como en división. Sin embargo, la mayoría de ellos derivan de la familia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), por lo que los aspectos referentes a la seguridad biológica para su uso en protocolos clínicos deberán ser considerados antes de su aplicación (Sandoval, 2005).

Adenovirus

Los adenovirus son virus de ADN ampliamente desarrollados en terapia génica, su aislamiento en 1953 a partir de tejidos adenoides de niños dio origen a su nombre.

A los adenovirus recombinantes usados como vectores se les eliminan regiones de su genoma para inhibir su replicación, debido a que no se integran en el genoma del huésped, Estos virus sólo expresan el transgén en forma temporal durante su estancia en la célula.



Los adenovirus deben su uso exitoso al hecho de su seguridad biológica, porque en forma natural en el humano sólo se les ha relacionado con padecimientos de vías respiratorias. Existen más de 40 serotipos de adenovirus, de los cuales

los tipos 2 y 5 (Ad2 y Ad5) son los más utilizados como vectores génicos (Regenmorten, 2000).

Su producción es relativamente sencilla, lo que ha facilitado una administración eficiente *in vivo*. Estos virus tienen además la capacidad de infectar un amplio espectro de células eucariotas, tanto en reposo como en replicación (Russell, 2000).

El principal inconveniente para su utilización en el envío de genes a órganos o tejidos específicos, es la vigorosa respuesta inmunológica que despiertan, caracterizada por una intensa inflamación, así como por activación de linfocitos T citotóxicos (Smith, 1998). En un intento por aminorar la intensidad de la respuesta inmune despertada

Adenovirus

en el huésped por el adenovirus se han escindido extensas porciones en el genoma viral produciendo así los llamados *adenovirus gutless*¹⁰ que expresan menos proteínas virales; despertando una menor respuesta inmunológica (Narvaiza, 2003).

Adenoasociados

Los virus adenoasociados reciben este nombre debido a que se les detectó por primera vez como contaminantes en preparaciones de adenovirus. Pertenecen a la familia *parvoviridae* y son del género *dependovirus*. Su asociación con los adenovirus se debe al hecho de que son defectuosos en replicación, y dependen de un virus colaborador que proporcione las proteínas necesarias para tener dicha función (Berns, 1990).

Su genoma está constituido por una cadena sencilla de ADN (positiva o negativa) de 4,680 nucleótidos de longitud. Su genoma es muy sencillo y codifica solamente para dos genes: REP (replicación) y CAP (cápside), los cuales son sustituidos por el promotor y transgén deseado al hacerlos recombinantes. La longitud mínima aceptada para estos constructos es de 1 Kb¹¹ y la máxima longitud aceptada es la del genoma nativo (4.7 Kb), porque constructos de un tamaño mayor no mantienen una función óptima de empaquetamiento (Monahan, 2000).

¹⁰ Los adenovirus gutless, constituyen el último tipo de vectores desarrollados hasta hoy. Su genoma carece de todos los genes virales y sólo conservan las secuencias que actúan en cis. Se ha demostrado que con el empleo de estos adenovirus se detecta la expresión del transgén dos años después de su administración en animales, no inducen una respuesta inmune significativa y permiten la administración repetida del mismo vector a lo largo del tiempo (Morsy 1999)

¹¹ Una kilobase corresponde a 103 pares de nucleótidos en el DNA de doble hélice, o a 103 nucleótidos en ácidos nucleicos de hebra sencilla.

Adenoasociados

El marco de lectura abierta del gen REP codifica para varias proteínas sobrepuestas como la Rep40, Rep52, Rep68 y Rep78 involucradas en la transcripción, replicación e integración del genoma, respectivamente (Weitzman, 1994).

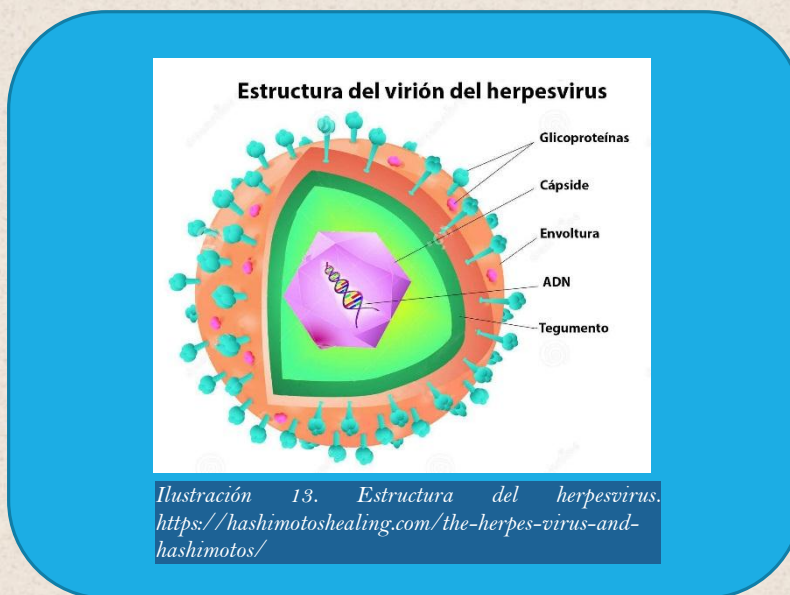
El gen CAP codifica para las proteínas que conforman la cápside del virión, conocidas como VP1 (87 Kb), VP2 (73 Kb) y VP3 (62 Kb), las cuales interaccionan con los receptores y correceptores celulares para la internalización a través de una endocitosis mediada por receptor y para el transporte del virión al núcleo celular (Berns, 1996).

El marco de lectura abierta del genoma de los virus adenoasociados (AAV por sus siglas en inglés) está flanqueado por dos secuencias terminales llamadas ITR's ("terminales de repetición invertidas" por sus siglas en inglés) de 145 nucleótidos, de los cuales 125 forman una estructura secundaria de horquilla tipo "T" al tener secuencia palindrómica. Los ITR's funcionan como *primers*¹² para la replicación del ADN y la formación de la doble cadena, además mantienen la integridad de los extremos, y en estas regiones se localizan las secuencias que le permiten la recombinación con el ADN del huésped (Samulski, 1989). El virión del AAV no contiene proteínas de envoltura y su ADN sólo se encuentra rodeado por las proteínas de la cápside, las cuales conforman una estructura icosaédrica con tamaño de 18-26 nm. Las diferencias antigénicas en las proteínas capsídicas dan lugar a los seis serotipos de AAV conocidos hasta el momento, de los cuales el serotipo dos (AAV2) es el que se ha desarrollado en la terapia génica haciéndolo recombinante (Rabinowitz, 2002).

¹² cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.

Herpesvirus

Las propiedades únicas de los herpesvirus se han explotado cada vez más en el diseño de vectores, particularmente para la terapia de las enfermedades del sistema nervioso central (Hukkanen, 2010). Los herpesvirus poseen un material genético compuesto por ADN de doble cadena lineal, brindándole la posibilidad de insertar en su genoma grandes cantidades de ADN y llevar a cabo durante largos periodos de tiempo infecciones latentes en la célula hospedadora, sin ningún efecto aparente sobre ésta (Roizman, 1996).



Los herpesvirus pueden ser vectores genómicos, no replicantes o replicantes, también conocidos como amplicones. Estos últimos son vectores que albergan sólo una cantidad mínima de secuencias viralmente derivadas, adecuadas para el suministro de hasta 150 kbp de ADN extraño (Epstein, 2009). El uso de herpesvirus de amplicon se ha mejorado adicionalmente mediante el desarrollo de vectores híbridos de virus adenoasociados, con el objetivo de una expresión transgénica a largo plazo (Chew, 2009).

Vectores no virales

Los vectores no virales son aquellos que engloban las técnicas de transducción donde el material genético es introducido con medios físicos y químicos

Vectores químicos

Los vectores químicos empezaron a utilizarse en la década de los sesenta y setenta aunque no se lograron buenos resultados en la transducción hasta mediados de los ochenta. Dentro de estos encontramos el fosfato cálcico, los liposomas catiónicos, poliméricos y la transferencia de genes mediante receptores.

La utilización del fosfato de calcio se basa en la capacidad que presentan los iones de calcio para precipitar el ADN provocando que la célula, mediante mecanismos de endocitosis, introduzca el ADN en su interior. Esta técnica no provoca toxicidad en las células receptoras, pero la expresión del transgén es transitoria y con una eficacia de transfección cercana al 10% con una toxicidad mínima. Su utilización se ve reducida a cultivos celulares en aplicaciones *in vitro* (Glover, 2005).



Vectores químicos

Los liposomas catiónicos están formados por un lípido negativamente cargado y un colípido. Estos interactúan tanto con el material genético a transferir como con las membranas celulares que deben atravesar, debido a las cargas netas negativas originadas por los grupos fosfato en el ADN y por residuos del ácido siálico de la superficie celular. Un lípido catiónico ampliamente utilizado es la lipofectina. Las ventajas de este tipo de vectores es que pueden transferir moléculas negativa o positivamente cargadas, protegen al ADN de procesos degradativos, y aceptan cadenas largas de ADN dirigiéndolas específicamente a los tejidos u órganos. Este vector no plantea problemas en modelos *in vitro*, sin embargo, *in vivo* su eficacia se encuentra disminuida, llegando incluso en algunas ocasiones a una eficacia nula (Felmand, 2003).

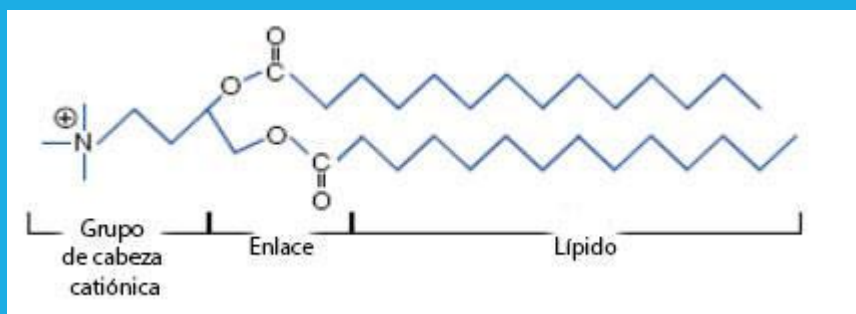


Ilustración 15. Estructura de liposoma catiónico. Rodriguex, 2005

Como último ejemplo de los vectores químicos, se encuentra la transferencia de genes mediante receptores. Esta es una técnica direccionable, debido a la inserción de moléculas, que serán reconocidas por receptores presentes en la célula diana elegida, al ser posible establecer una interacción vector/célula muy específica. La naturaleza de los ligandos es muy variada y comprende azúcares, péptidos y hormonas. Hoy día, se utilizan ligandos capaces de desestabilizar las membranas de los endosomas a pH ácidos, con lo que se evita la degradación de los vectores por los complejos enzimáticos del lisosoma (Felmand, 2003).

Vectores físicos

Este tipo de vectores realizan la transfección de material genético sin ningún tipo de catalizador químico, el vector físico más común se conoce como disparo de partículas, biolística o bombardeo de microproyectiles. En este vector, el plásmido de ADN a transferir es situado sobre la superficie de pequeñas gotas de 1 a 3 micras de diámetro de oro o tungsteno que posteriormente son aceleradas, mediante una descarga eléctrica o por un pulso de gas, hacia la célula diana. La aceleración a la que son sometidas estas partículas logra superar la membrana celular, a pesar de esto la capacidad de penetración se ve limitada. Entre las ventajas que presenta este método, y que le confieren un potencial de aplicabilidad general, destacan su fácil manejo y que un único disparo puede producir integraciones múltiples (Felmand, 2003). Las desventajas que presenta este vector son la muerte celular en la zona de descarga, la procedencia de ADN extraño y la capacidad de transcripción intrínseca aparecen grandes variaciones en la eficiencia de la expresión de los genes. Generalmente utilizados en vegetales (Klein, 1987), aunque recientemente se ha utilizado en roedores (Arsenault, 2014). Este vector ha mostrado su efectividad en modelos *in vitro* e *in vivo* (Felmand, 2003).

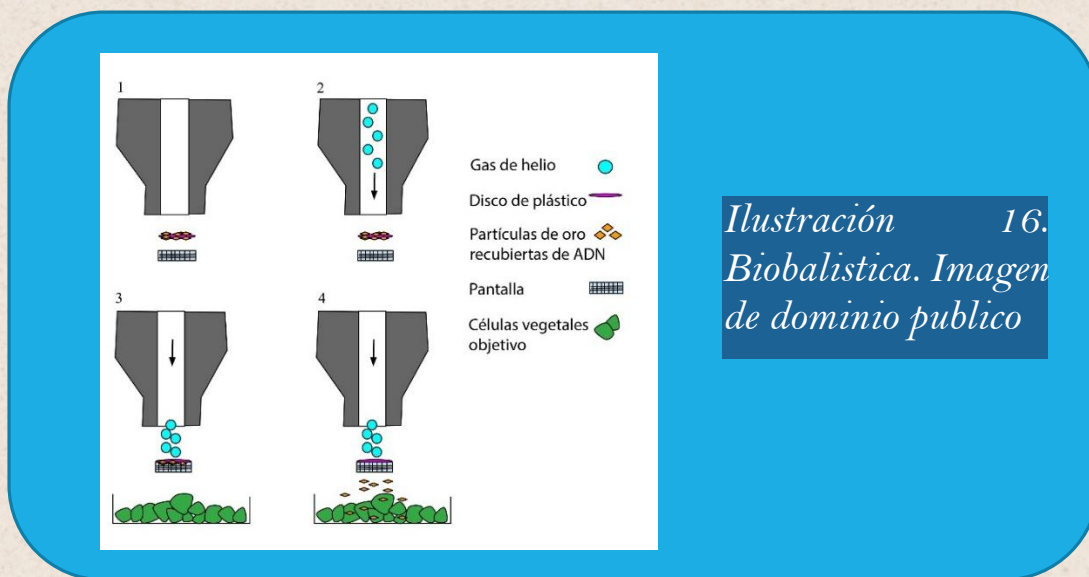


Ilustración 16.
Biolística. Imagen
de dominio público

Vectores físicos

El siguiente vector físico que se describirá es la micro inyección, es una técnica laboriosa que requiere células aisladas para su realización pues el ADN es introducido mediante una inyección en el núcleo de las células gracias a la ayuda de un micro manipulador, evitando de este modo la degradación lisosomal y citoplasmática. Cuando la célula diana se recupera del daño e inserta el material genético presenta una alta eficacia en su expresión. Esta técnica se suele utilizar con frecuencia en estudios *in vitro*, aunque también en la terapia génica germinal, un método *in vivo* donde se lleva a cabo la microinyección directa de ADN en los pronúcleos del óvulo recién fecundado o en el citoplasma. En vertebrados inferiores e invertebrados es la técnica de transferencia de genes más utilizada y en mamíferos ha resultado exitosa (Felman, 2003).



Ilustración 17. Micro inyección. Universidad Zaragoza

Otro ejemplo de vector físico es la electroporación. Este método consiste en la aplicación de una corriente eléctrica a una mezcla de ADN y células en suspensión, Estas últimas son capaces de abrir poros en la membrana celular que permiten la entrada del gen en su interior. La eficiencia de la transferencia depende del pulso eléctrico, distancia entre electrodos, fuerza iónica del tampón de suspensión celular y de la naturaleza de las células. Entre las ventajas de este

Vectores físicos

vector se encuentran que las células pueden ser aisladas del organismo y sometidas a un control de calidad en el que se realiza una selección de las mejores células que son cultivadas en el laboratorio antes de ser implantadas en el paciente. La gran desventaja que presenta esta técnica es el hecho de que muchas células mueren al no soportar el choque eléctrico, por lo que no es la forma más indicada en algunos tipos celulares.

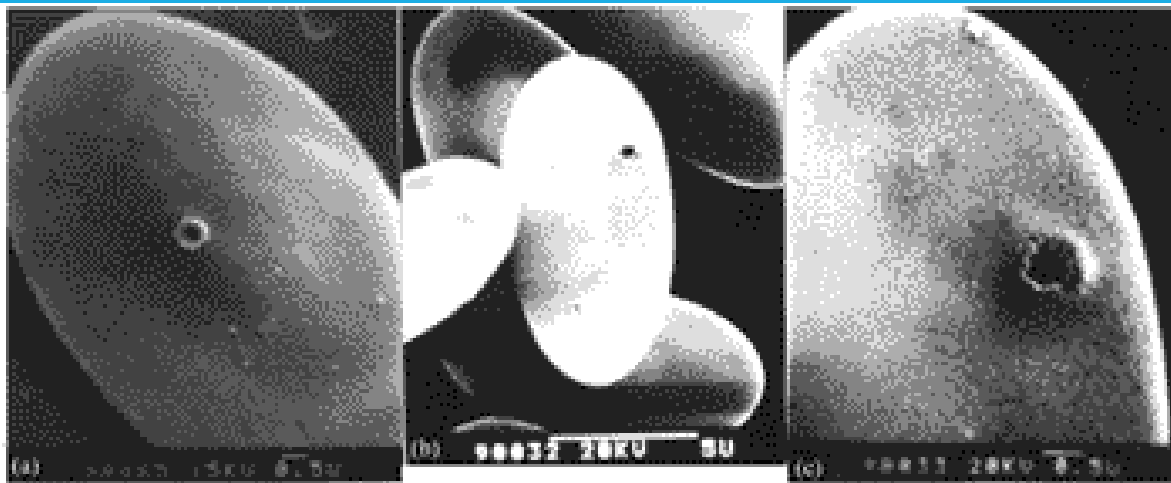


Ilustración 18 Apertura en la membrana celular por microscopía electrónica de barrido. Universidad Zaragoza

Actualmente los vectores de transferencia siguen siendo el dilema más importante que presenta la terapia génica y que más ha limitado la obtención de resultados hasta el punto que hay investigadores como Friedman (1997, pp. 49) que sostienen que las estrategias tienen que cambiar “Casi con toda seguridad, las herramientas del futuro no van a ser los prototipos que se están ensayando hoy en los laboratorios. Y no habrá una técnica ideal para cada enfermedad, sino que existirán muchas opciones”.

Vectores físicos

En los últimos años se han visto grandes avances en los estudios que intentan corregir defectos genéticos en aquellas células donde un solo gen es el afectado, como es el caso de la distrofia muscular, estas investigaciones abarcan desde los estudios *in vitro* hasta ensayos preclínicos en animales (Lee, 2011). En cambio, la corrección genética de la sobre escritura de los genes trisonómicos, se ha mantenido fuera del alcance. Una de las teorías sobre las que se trabaja para resolver este desorden puede ser mediante la inserción de un gen que silencie epigenéticamente todo el cromosoma. Estas investigaciones han sido posibles gracias a la terapia cromosómica.

Epigenética



84

La terapia cromosómica es una línea de investigación relativamente joven pues apenas cuenta con algunas décadas de estudio. Esta se logró desarrollar utilizando enfoques epigenéticos presentes en el código de personas con síndrome de Down.

El término epigenética se emplea para designar a las modificaciones en el ADN y en la cromatina que son estables durante varios ciclos de división celular pero que no involucran cambios en la secuencia del ADN del organismo. Estos cambios juegan un papel importante en la diferenciación celular ya que permiten a las células mantener de forma estable diversas características aun cuando contienen la misma información genética (Rodríguez, 2005).

A menudo se atribuye a Conrad Waddington la acuñación del término “epigenética” en el año 1942 como “la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos que dan lugar al fenotipo” (Waddington, 1942, pp. 565).

Así podemos decir que la epigenética es un fenómeno que cambia el resultado de un cromosoma sin modificar la secuencia de ADN, en este sentido la epigenética se refiere a la memoria celular que se hereda a las células descendientes y que se basa en la herencia de estructuras proteicas. La epigenética puede definirse como el estudio de un cambio estable en la expresión de los genes o del fenotipo celular, sin que ocurran cambios en el apareamiento de las cadenas del ADN (Rodríguez, 2005).

Debido a que el fenotipo de una célula o de un individuo se afecta por los genes que se transcriben, los cambios heredables en el estado transcripcional pueden dar origen a efectos epigenéticos (Lewin, 2004). Existen a nivel celular diferentes niveles en la regulación de

Epigenética

la expresión génica, algunos de ellos son la remodelación de la cromatina¹³, la modificación de las histonas, la metilación del ADN, y silenciamiento mediado por moléculas de ARN (Neisa, 2004).

Transcripción

La transcripción es el proceso inicial de la expresión génica la cual se lleva a cabo mediante la conversión de un gen del ADN a una molécula complementaria de ARN, el ARN mensajero (ARNm). La transcripción de genes o activación se debe a las modificaciones en la estructura de la cromatina; para que un gen pueda transcribirse se requiere de la presencia de diversos factores de transcripción, proteínas reguladoras y del ARN polimerasa II los cuales generan la estructura basal de la transcripción (Rodríguez, 2005).

Para que la transcripción se lleve a cabo se requiere que los genes se vuelvan transcripcionalmente activos, proceso que provoca una configuración más laxa en la cromatina. Además durante este proceso se requiere que los nucleosomas se reorganicen dejando expuestos al gen para su transcripción. De igual manera cuando se requiere de la represión génica los octámeros de las histonas se mueven hacia una posición que impide la transcripción. Estos cambios dinámicos en la posición de los nucleosomas se conocen genéricamente como remodelaciones de la cromatina (Rodríguez, 2005).

¹³ La remodelación de la cromatina puede iniciarse por modificaciones en las proteínas histonas o por adición de grupos metilo al ADN

Modificaciones covalentes y no covalentes en las histonas

Las histonas son las proteínas más conservadas de la naturaleza, esto se debe a la función estructural que realizan en el empaquetamiento del ADN en el núcleo. Las colas de las histonas contienen residuos específicos de lisinas que son capaces de modificarse covalentemente mediante la unión a grupos acetilo y metilo; en las serinas la modificación más frecuente es la fosforilación.

Estas reacciones ocurren después de que las proteínas histonas han sido traducidas y aún después de que las histonas se han incorporado a un nucleosoma. Las histonas se sintetizan durante la fase S y son incorporadas a las hebras hijas del ADN detrás de la horquilla de replicación (Rodríguez, 2005).

Las modificaciones covalentes de las histonas son mutuamente excluyentes, lo que imposibilita que una histona sea acetilada y metilada al mismo tiempo. Las modificaciones en las secuencias de las histonas incluyen la acetilación, la metilación y la ubiquitinación (Rodríguez, 2005).

Acetilación

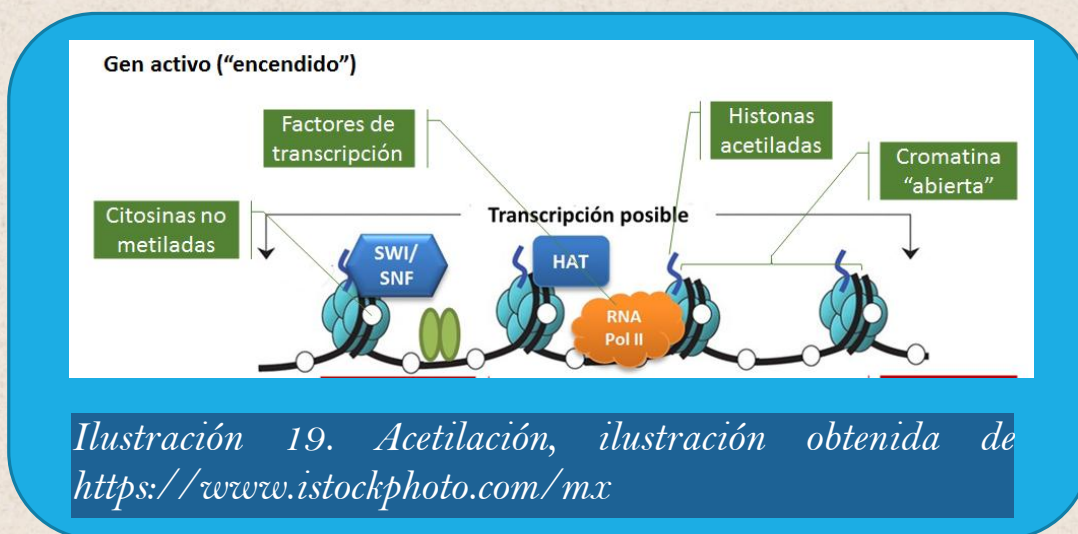
La reacción de acetilación de las histonas es la mejor conocida. Se realiza entre el grupo amino terminal de un residuo de lisina en presencia de acetil coenzima A (CoA). La reacción es reversible lo que implica que los grupos acetilo pueden añadirse o removerse del mismo residuo de histonas (Rodríguez, 2005).

Existen alrededor de 44 residuos de lisinas en las histonas que son capaces de aceptar grupos acetilo, cuya presencia o ausencia provee una gran cantidad de información genética. Por esta razón las modificaciones covalentes de las colas de las histonas se denominan, por analogía con el código genético, “código de las histonas”,

Acetilación

información que es guardada en las histonas mismas más que en la secuencia de nucleótidos (Rodríguez, 2005).

El proceso de acetilación como regulador, fue propuesto por primera vez en los años 60 (Alfrey, 2004) y se ha convertido, junto con la metilación, en la modificación más estudiada hasta el momento. La interpretación de la información alcanzada hasta el 2000, condujo a Strahl y Allis a proponer en ese año la hipótesis del “código de histonas” (Strahl, 2000).



Se conocen actualmente más de 150 modificaciones de las histonas con un enorme número de patrones posibles cuyos efectos en la estructura de la cromatina y en la regulación transcripcional están empezando a desvelarse. Las evidencias sugieren que los genes activos son ricos en grupos acetilo, están hiperacetilados; mientras que los inactivos carecen de grupos acetilo, están hipoacetilados. La enzima encargada de incorporar grupos acetilo es la acetiltransferasa de las histonas (HAT), enzima que se une al ADN en las regiones reguladoras de algunos genes activando la transcripción mediante la acetilación de las histonas vecinas. De la misma manera las enzimas desacetilasas de las histonas (HDAC) son claves en la represión génica pues remueven los grupos acetilos (Rodríguez, 2005).

La acetilación ocurre sobre lisinas, de las cuales, sólo 14 se han identificado como sitios diana (Fischle, 2003).

Metilación

La metilación de histonas es la modificación química mejor caracterizada y aparentemente es un proceso más estable que la acetilación (Sun, 2002). Esta ocurre sobre algunas argininas y lisinas, pero su interpretación es más confusa, por cuanto las lisinas pueden sufrir monometilación, dimetilación o trimetilación y las argininas monometilación o dimetilación (Bottomley, 2004). Dichas sutilezas parecen tener repercusiones funcionales diferentes (Jackson, 2004).

La metilación de la cromatina se presenta en los residuos de citosina del dinucleótido CpG. Las regiones del genoma ricas en estos dinucleótidos o con alta densidad de CpG se conocen como islas de CpG en las cuales la metilación del ADN correlaciona con la represión transcripcional. La metilación del ADN es mediada por las ADN metiltransferasas (DNMTs). Se han encontrado que existe una asociación entre los dos procesos que reprimen la transcripción: la metilación del ADN y la desacetilación de las histonas (Hendrich, 1998). Se asume que la metilación atrae a desacetilasas que eliminan los grupos acetilo de las colas de las histonas lo cual estabiliza al nucleosoma y reprime la transcripción. Por el contrario la desmetilación del ADN permite que las acetiltransferasas agreguen grupos acetilo al ADN promoviendo la transcripción (Rodríguez, 2005).

La lectura del código de histonas corre por cuenta de unas proteínas que comparten un dominio de unión a las lisinas metiladas llamado cromodominio (Jacobs, 2002) y por proteínas con dominios de unión a acetilaciones llamados bromodominios (Lachner, 2002). Curiosamente, algunas proteínas que contienen cromodominios son en ellas mismas HMTs (Hendrich, 1998) y algunas de las que contienen bromodominios son HATs (Fuks, 2003), sugiriendo que un evento primario de metilación o acetilación puede extender una reacción en cadena que modifica las histonas vecinas.

Metilación

La asociación de la metilación del ADN con la represión génica fisiológica se sugirió por primera vez hace casi 30 años (Antequera, 1990); su participación en procesos patológicos fue demostrada en 1990 con base en que la inactivación de genes, en líneas celulares derivadas de cáncer, se asociaba con la metilación de las islas CpG (Strathdee, 2002). Dentro de los procesos fisiológicos involucrados se encuentran: la regulación transcripcional, el mantenimiento de la estabilidad cromosómica, la modulación de la estructura de la cromatina, la inactivación de uno de los cromosomas X en mujeres, la impronta genómica y el silenciamiento de retrotransposones (Hendrich, 1998).

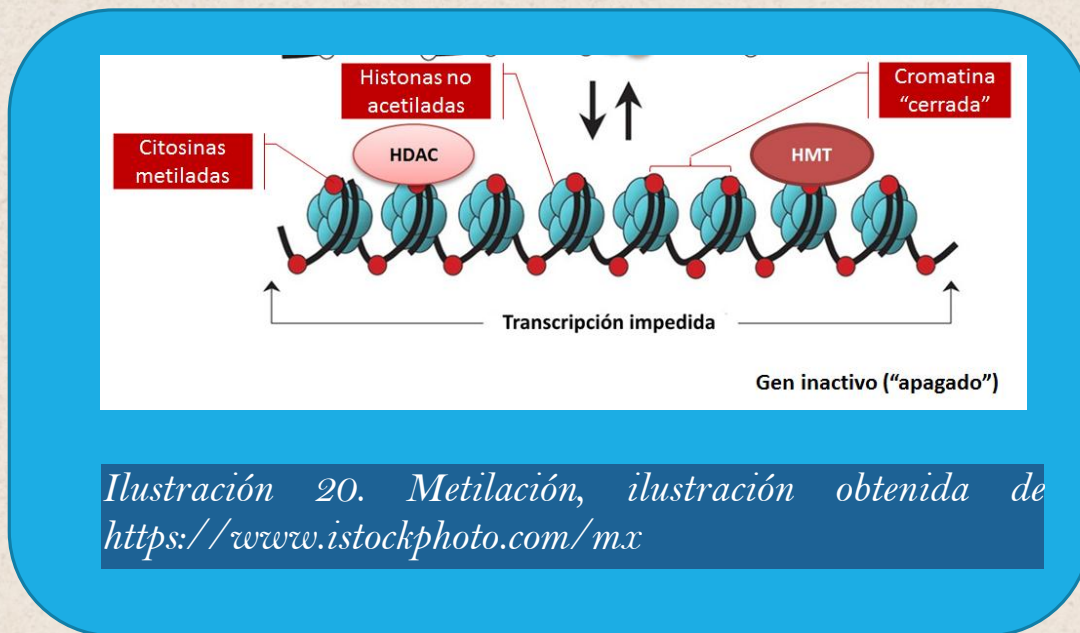
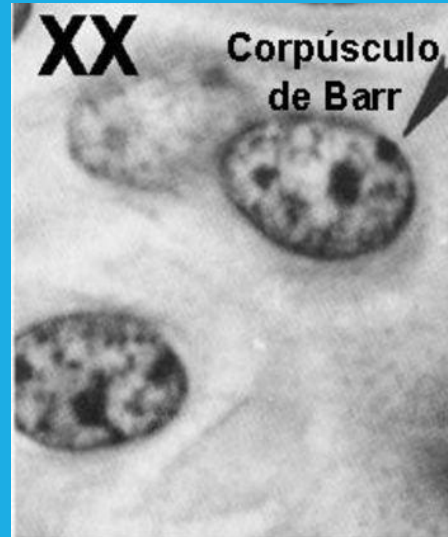


Ilustración 20. Metilación, ilustración obtenida de <https://www.istockphoto.com/mx>

Inactivación del cromosoma X

La inactivación de un cromosoma X es una regulación epigenética que se encarga de compensar las diferentes cargas de genes ligados al cromosoma X en los mamíferos, esta compensación de dosis génica es un proceso que consiste en inactivar de manera aleatoria de uno de los cromosoma X en el embrión para evitar un desequilibrio entre la expresión de los genes ligados al cromosoma X (Deng, 2014).

En cualquier célula en la que se lleve a cabo esta inactivación del cromosoma X, se encontraran unas estructuras densas y heterocromáticas llamadas corpúsculos de Barr. Estos corpúsculos son los cromosomas X compactados para evitar su expresión. En 1949 Murray Barr describió que las células femeninas se podían distinguir por la presencia en su núcleo de un corpúsculo de cromatina, pegado a la pared interna del núcleo, que recibe el nombre de corpúsculo de Barr. En 1999 Mary Lyon sugirió que este corpúsculo representaba un cromosoma X el cual se desarrolla en la hembras de manera compacta, tomando la estructura conocida como heterocromatina, una forma condensada y por lo tanto visible de la cromátida (Lewin, 2004).

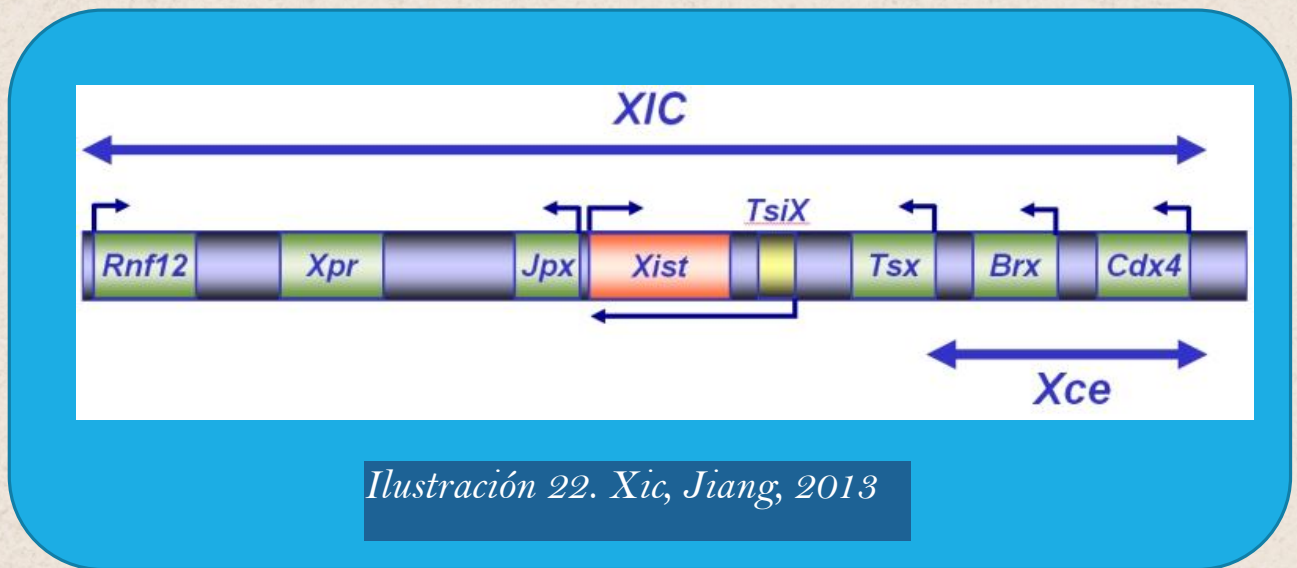


*Ilustración 21.
Corpúsculo de Barr.
<https://www.istockphoto.com/mx>*

Las secuencias involucradas en este silenciamiento se han mapeado en Xq13.2 y se han descrito varios componentes de la maquinaria de inactivación cromosómica presentes en esta región (Rodríguez, 2005).

Inactivación del cromosoma X

La inactivación del cromosoma X empieza en una región llamada XiC (centro de inactivación del cromosoma X) que está localizado en el fragmento Xq13 y que contiene los elementos necesarios para el recuento de cromosomas X, para la elección del cromosoma X y para el mecanismo de silenciamiento (Navarra, 2012).



El proceso comienza con la localización de las dos regiones Xic de los dos cromosomas X. Xic es un locus que contiene toda la información para inactivar a todos menos un cromosoma X, la selección del cromosoma que se va a inactivar y la iniciación del silenciamiento. En Xic, se localiza Xce (elemento controlador del X) el cual está implicado en el proceso de elección del cromosoma X que se va a inactivar. En la XiC hay dos secuencias de ARN no codificantes muy importantes llamadas Xist y Tsix, que son complementarias una de la otra y controlan el proceso de inactivación X (Payer, 2016).

Xist es un ARN que no posee un marco de lectura abierta, es decir, no codifica para ninguna proteína y se produce por ambos cromosomas X antes de la inactivación. Una vez elegido el cromosoma que se va a inactivar, Xist se estabiliza, cubre sólo a un

Inactivación del cromosoma X

cromosoma X e inicia el silenciamiento del mismo. A medida que se expande por el cromosoma, se van silenciando los genes, adoptando una configuración de heterocromatina. Además se produce la metilación de la histona H3 y la desacetilación de la histona H4. En un principio los dos cromosomas X expresan Xist, aunque de forma inestable. Durante el proceso de inactivación, uno de estos dos Xist es degradado por otro ARN llamado DXPas34, que se encuentra también en el locus Xic, evitando así la inactivación de uno de los cromosomas. Entonces se transcribe Tsix en sentido opuesto en la hebra complementaria de Xist para bloquear la posterior transcripción de Xist y asegurar que el Xa no se inactive en algún momento (Heard, 2005).

Una vez que la inactivación se ha llevado a cabo, XIST induce modificaciones epigenéticas en el ADN, así como, metilaciones que impedirán la transcripción del material genético contenido en el X inactivo. Estas modificaciones son hereditarias y se pasarán a las células hijas. Es muy importante tener claro que la inactivación del cromosoma X es incompleta, es decir, no afecta a todos los genes del cromosoma. De hecho, se estima que sólo un 65% de los genes presentes en el cromosoma X se inactivan, un 20% de los genes se inactivan sólo parcialmente y un 15% escapan totalmente al proceso de inactivación (Carrel, 2005).

Al conjuntar toda esta información surgió la idea de corregir las funciones de las células de pacientes con síndrome de Down mediante la inserción de un gen que silencie epigenéticamente todo el cromosoma, en un ambiente libre de variación genética y epigenética (Jiang, 2013).

Inserción de Xist en el cromosoma 21

Entendiendo que el proceso de silenciamiento natural del cromosoma X demuestra que la cromatina autosómica tiene una capacidad sustancial para ser silenciada (Lee, 1996). La estrategia del modelo perseguida por Jiang y su equipo logró crear un modelo manejable que permite estudiar la biología de la inactivación cromosómica humana mediante la inserción de XIST en la copia del cromosoma 21 creando una modificación epigenética, para poder llevar a cabo esta inserción fueron necesarias las nucleasas de dedos de zinc (Jiang, 2013).

Nucleasas de dedos de zinc

Las nucleasas dedos de Zinc (ZFN) son enzimas que se unen y cortan secuencias de ADN de doble cadena, se componen de dos partes: los dedos de zinc y la nucleasa Folk. Los dedos de zinc son proteínas capaces de reconocer a un trinucleótido de una secuencia específica y pueden manipularse de manera modular para dirigir su unión a una secuencia en particular, formando el dominio de unión. La nucleasa de Folk es el dominio de rotura del ADN y es una nucleasa de *Flavobacterium okeanoikoites* modificada para generar un corte independiente en la secuencia. Cuando estos dominios son fusionados pueden unir secuencias específicas de 18pb¹⁴ (Peña, 2015).

El dominio Folk ha sido crucial para el éxito de ZFN, ya que posee varias características que apoyan el objetivo de segmentación dirigida dentro de genomas complejos. Por ejemplo, Folk debe

¹⁴ es una unidad que consta de dos nucleobases

Nucleasas de dedos de zinc

dimerizar para escindir DNA. Como esta interacción es débil (Vanasmee, 2001), la escisión por FokI como parte de una ZFN requiere dos eventos de unión adyacentes e independientes, los cuales deben ocurrir tanto en la orientación correcta como con la separación apropiada para permitir la formación de dímeros. El requisito de dos eventos de unión al ADN permite la focalización específica de sitios de reconocimientos largos y potencialmente únicos (de 18 a 36 pb). Además, la dependencia de la dimerización productiva ha estimulado el desarrollo de variantes que se escinden sólo como un par de heterodímeros, mejorando así la especificidad mediante la eliminación de homodímeros no deseados (Miller, 2007).



Ilustración 23. Dedos de zinc.
<https://www.istockphoto.com/mx>

Por lo tanto, puede utilizarse para introducir pequeñas inserciones o deleciones en el sitio de la ruptura, un resultado que puede ser explotado para interrumpir un gen diana. Alternativamente, si se proporciona un ADN de donante homólogo diseñado por el

Nucleasas de dedos de zinc

investigador en combinación con las ZFN, la información codificada en esta plantilla puede usarse para reparar, dando lugar de este modo a la corrección génica (Fyodor, 2010).

Demostrando con lo anterior, que su utilización era factible en las células iPS, que tienen un único potencial terapéutico y de desarrollo para formar diversos tipos de células, y por lo tanto, sería importante para cualquier esfuerzo futuro en terapia celular *ex vivo* (Takahashi, 2006). Jiang utilizó iPSC de un paciente masculino portador de síndrome de Down. En un solo paso integró, el transgén XIST controlado con doxiciclina en el cromosoma 21 y un transgén que portaba el componente de control de la doxiciclina (rtTA) en el puerto seguro del cromosoma 19 AAVS1, cuya interrupción no produce efectos adversos conocidos (DeKolver, 2010).

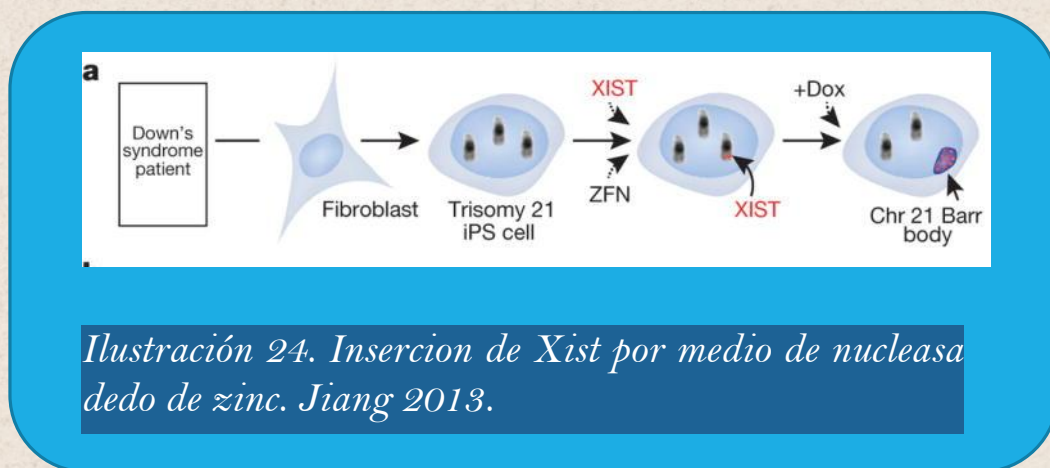


Ilustración 24. Inserción de Xist por medio de nucleasa dedo de zinc. Jiang 2013.

Resultando positiva en el 98,5% de las colonias en la presencia de Xist superponiendo uno de los tres alelos DYRK1A, a través de modificaciones en las condiciones de edición, obtuvieron subclones con Xist integrado en dos o incluso los tres alelos de DYRK1A (Jiang, 2013).

Inducción del RNA de Xist a corpúsculo de Barr de cromosoma 21

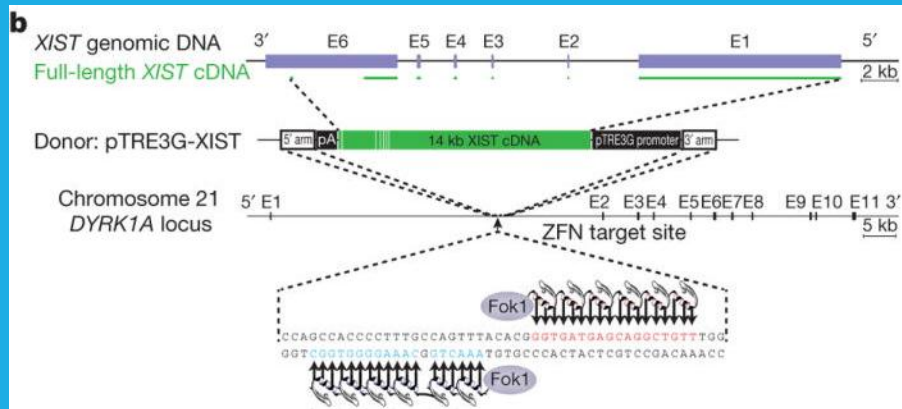


Ilustración 25. Inserción de Xist en un cromosoma 21. Jiang, 2013

En los seis clones independientes, se indujo la expresión del transgén y se detectó ARN Xist tres días más tarde por medio de FISH. Se observó en más del 85% de las células un “territorio” de ARN Xist localizado sobre cromosoma 21. A los cinco días de la inducción de Xist observaron que el cromosoma 21 modificado presentaba marcas de heterocromatina incluyendo H3K27Me3, UbH2A y H4K20Me en 90% -100% de células (Jiang, 2013).

Silenciamiento de alelos específicos en el cromosoma 21

Para medir la transcripción general a través de los XIST dirigidos al cromosoma 21, analizaron el núcleo heterogéneo de ARN (hnRNA) de expresión y para distinguir los cromosomas X inactivos de los activos (Hall, 2002), basado en la hibridación in situ con el ARN de repetición CoT-1. Esto demostró que el territorio ocupado por el ARN de Xist del cromosoma 21 se redujo por hnRNA, esto fue detectado por CoT-1, similar a la inactivación cromosoma X (Hall, 2002).

A continuación utilizaron ARN FISH de varios colores para determinar la presencia de focos de transcripción en cada alelo para seis genes específicos del cromosoma 21, un enfoque que demostró discriminar genes activos frente a silenciados en el cromosoma X (Clemson, 1996). Sin la expresión de XIST, hay tres focos brillantes de transcripción en cada alelo *DYRK1A*, pero después de la expresión de XIST, el alelo diana se vuelve más débil o indetectable, indicando supresión de *DYRK1A* (Jiang, 2013).

Se examinaron cuatro locus de XIST: *ITSN1*, *USP25*, *CXADR* y *COL18A1*. En los cuales se observó el silenciamiento en el 100% de las células que contienen ARN XIST. También se encontró que los clones que transportaban XIST en dos o tres copias del cromosoma 21 después de 20 días en doxiciclina la mayoría o todas las células habían perdido la localización o la expresión de XIST sin silenciar el gen *APP*. Demostrando así, que hay selección in vitro y adaptación epigenética para evitar la creación de una monosomía funcional de acuerdo a lo que se observa en las células monosómicas en pacientes mosaico (Jiang, 2013).

Inicialmente, hay tres focos brillantes evidentes de transcripción de ARN. La expresión de XIST a corto plazo dio como resultado una represión incompleta del alelo diana; Que después de 20 días fue completamente silenciado (Jiang, 20013).

Silenciamiento y metilación del genoma

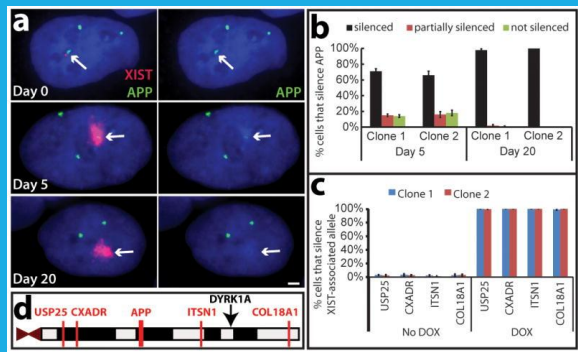


Ilustración 26. Xist induce silenciamiento en células diana. Jiang, 2013

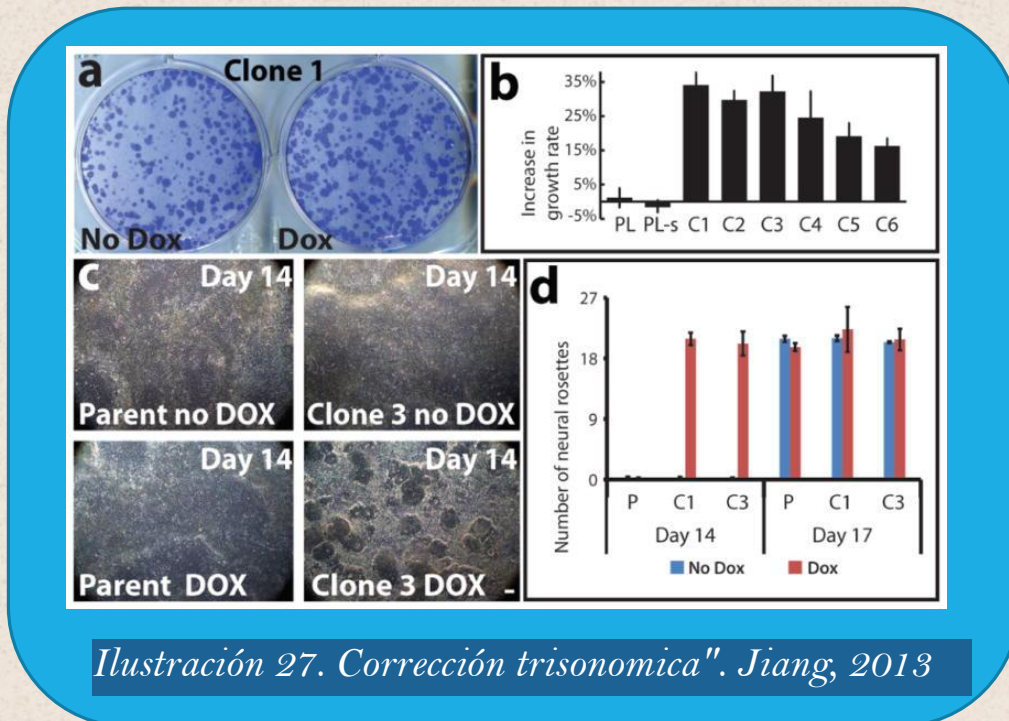
Al demostrar que es posible el silenciamiento de alelos específicos, como es el caso del gen APP, se extendió este genoma a todo el perfil de expresión. Con doxiciclina durante tres semanas, se observó que en el cromosoma 21 hay una represión del 95% de los genes expresados (Jiang, 20013).

La trisomía 21 puede afectar las vías de expresión del genoma, pero las diferencias atribuibles a la trisomía 21 se confunden por la variabilidad genética y epigenética (Yahya-Graison, 2007). Además del silenciamiento transcripcional, la inactivación de X se estabiliza por la hipermetilación de las islas CpG promotoras.

Además del silenciamiento transcripcional, la inactivación de X se estabiliza por hipermetilación de las islas CpG promotoras (Csankovszki, 2001) que ocurre tarde en el proceso de silenciamiento, el 97% de los genes que contienen islotes CpG exhibieron un fuerte aumento en la metilación del promotor del ADN, dentro del rango de lo observado para la inactivación de X (Cotton, 2011). Este cambio barrió todo el cromosoma, con la interesante excepción de un puñado de genes que "escapan" a la metilación en ambos clones (Jiang, 2013).

Corrección fenotípica *in vitro*

La compensación de la dosis para contrarrestar del desequilibrio cromosómico presenta un nuevo paradigma, con oportunidades para avanzar en la investigación del síndrome de Down en múltiples direcciones, incluyendo un nuevo medio para investigar las patologías celulares de este síndrome, que son en gran parte desconocidas. La inducción del silenciamiento de la trisomía 21 en cultivos paralelos de células por lo demás idénticas puede revelar patologías celulares debidas a la trisomía, que podrían estar ocultas por diferencias entre aislamientos celulares. Se examinó la proliferación celular y la formación de roseta neural para buscar un impacto en el fenotipo celular (Jiang, 2013).



Hay evidencia acerca de deterioro proliferativo en el cerebro de los sujetos con síndrome de Down (Haydar, 2012); Sin embargo, se ha observado que esto varía en las muestras de fibroblastos *in vitro*. Esto se resolvió cuando se compararon cultivos celulares idénticos, con y sin doxiciclina durante una semana. La inducción de XIST en seis

Corrección fenotípica *in vitro*

subclones transgénicos independientes resulto en colonias más grandes y más numerosas en solo 7 días. Así, un deterioro proliferativo ligado a la sobreexpresión del cromosoma 21 puede ser rápidamente mejorado mediante la compensación de dosis (Jiang, 2013).

Se diferenciaron las iP_s obtenidas de síndrome de Down en células troncales neuronales, 12 días después de la inducción neural de cultivos ya confluentes, comenzaron a formar rosetas neurales y dos días después estaban repletas, esto fue confirmado por PAX6 y SOX1, en paralelo, los cultivos no inducidos con XIST siguieron sin mostrar rosetas neurales. Los cultivos no corregidos requerían 5 días más en medios de inducción neural para igualar a los otros cultivos. No hubo efecto de la doxiciclina sobre la neurogenesis de la línea parental.

Células troncales



La teoría de la divina proporción y los fractales nos habla de que toda partícula forma parte de un algo y ese algo es la parte de un complejo superior que es la parte de otro que lo supera en magnitud, o sea, que nuestro Universo y nosotros mismos estamos determinados, sin lugar a dudas, esto se aplica a cada parte de la naturaleza, y es así como nos encontramos con los átomos que forman la materia viva: carbono, hidrógeno, oxígeno nitrógeno, azufre y fósforo; la unión de estas pequeñas partículas forma moléculas como las bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y tiamina) que se unen en pares de bases que componen la doble hélice del ADN que sigue enrollándose hasta formar histonas que a su vez crean a los nucleosomas, estos últimos son la unidad fundamental de los telómeros que forman el cromosoma, y como bien sabemos estas pequeñas partes son componentes fundamentales del núcleo celular, a pesar de que hemos escalado en niveles de composición, hasta encontrarnos en uno en el cual la estructura tiene la capacidad de sobrevivir por sí misma, aun no es visible al ojo humano. La unión de las células va escalando, formando tejidos, órganos y aparatos hasta llegar a crear a un ser vivo tal como lo percibimos.

Antecedentes de las células troncales

La importancia de estudiar las células troncales o mesenquimales, se debe a su capacidad para diferenciarse a distintos linajes, lo cual atrajo el interés de los científicos hacia sus métodos de obtención, aislamiento y cultivo. Estas células, también llamadas *Stem Cells*

Antecedentes

fueron descritas por primera vez en 1868, por el biólogo alemán Ernst Haeckel, quien influido por las ideas del Darwinismo se valía de la esquematización por medio de árboles para representar la evolución de los organismos de un ancestro en común, a estos los llamó *STAMMBAÜME* “Árbol Genealógico” (Haeckel, 1874).

Siguiendo esta misma línea, decidió usar el término *STAMMZELLE*, para así describir que cada organismo unicelular proviene de un ancestro del que se suponen los organismos multicelulares evolucionaron. En la tercera edición de su libro, Haeckel da un gran salto de la evolución a la embriología donde propuso que un óvulo fertilizado podría ser llamado como *Stem cells*, este término lo empleó para determinar 2 premisas: el ancestro unicelular del cual todos los organismos multicelulares provienen y cómo el óvulo fertilizado da origen a todas las células del organismo. El término célula troncales o *stem cell* era referido a lo que hoy en día empleamos para células germinales (Ramalho- Santos & Willenbring, 2007).

Basado en los estudios de Haeckel y Boveri, Wilson popularizó el término *stem cell* por medio de su libro “*The cell in development and inheritance*” (Wilson, 1896).

Maximow, Neuman y Dantschakoff, a principios del siglo XX, comenzaron a usar el término *stem cell* para referirse a un precursor común del linaje sanguíneo, localizando este término en artículos hematopoyéticos (Ramalho- Santos & Willenbring. 2007).

El descubrimiento de las *MeSenchymal Stem Cell* (células troncales mesenquimales) se le atribuye a Friedenstein que comenzó sus trabajos mediante la observación de un reservorio de células troncales mesenquimales provenientes del estroma de medula ósea adulta. La aisló mediante la recolección de medula ósea, demostrando así que contenía poblaciones celulares capaces de auto mantenerse y

Antecedentes

diferenciarse (Friedenstein, 2010). También describió un tipo de célula no hematopoyética presente en la médula ósea capaz de formar colonias fibroblásticas *in vitro*. Estas células fueron llamadas “UFC-F” (unidades formadoras de colonias fibroblásticas).

Las *STEM CELL* o células troncales son células no especializadas, que tienden a auto replicarse o renovarse después de un trauma, daño o envejecimiento. Estas células muestran una habilidad para dar origen a una variedad de diferentes tipos celulares encontrados en capas embriológicas germinales (Pittenger et al., 2012).

La renovación de las poblaciones celulares se debe a la existencia, en todos los tejidos y órganos, de una población de células que no están terminalmente diferenciadas, y que todavía tienen una capacidad proliferativa ilimitada, estas son las células troncales (Baker, 2008).

Clasificación de las células

Clasificación de acuerdo a su potencialidad (Smith, 2006)

Células troncales totipotentes

Del latín *totus* que significa “completo”. Este tipo de células tienen el potencial para generar a un individuo completo, tanto tejidos embrionarios (ectodermo, mesodermo y endodermo) como extraembrionarios (saco vitelino, alantoides, amnios y corion). Estas células se originan cuando el espermatozoide fertiliza el ovocito formando una célula diploide que se conoce como cigoto (René et al., 2007)

Clasificación de acuerdo a su potencialidad

Células troncales pluripotentes

Del latín *plures* que significa “muchos o varios”. Este tipo de células tiene la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de tejido humano, excepto el tejido extraembrionario. Estas células originan a las células precursoras de las tres capas embrionarias: mesodermo, ectodermo y endodermo.

Un requisito a cumplir para formar parte de esta categoría es que la célula debe ser capaz de diferenciarse a progenitores especializados procedentes de cualquier capa embrionaria, demostrando su funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de las células en las que se ha diferenciado, produciendo un establecimiento claro y persistente de estas en el tejido diana, tanto en presencia como en ausencia de daño en los tejidos en los cuales se injerta (Niño & Carlos, 2005).

Células troncales multipotentes

Del latín *multus* que significa “muchos”. Este tipo de células proliferan para crear células diferenciadas que forman algún tejido *in vivo*. Pueden dar origen a distintos tipos celulares siempre y cuando pertenezca a la misma capa embrionaria. Una vez desarrolladas, estas se renovan durante toda la vida del individuo a diferencia de las dos anteriores que solo están presentes durante la etapa embrionaria (Aguilera, 2015).

Células troncales oligopotentes

Del griego *oligo* que significa “poco”. Este tipo de células tiene la capacidad de diferenciarse en dos o más linajes dentro de un tejido (Mateos Rojas, Bertholdo, & Castillo, 2012).

Clasificación de las células

Células troncales unipotentes

Del latín *unus* que significa “uno”. Este tipo de células son específicas de un tejido, lo que quiere decir que corresponden a las células que se diferencian a una sola línea celular. Se les nombra progenitoras, según el tipo de órgano o tejido al que dan origen *in vivo*. (René et al., 2007).

Clasificación de acuerdo a su origen (Mata-Miranda, Vazquez-Zapien, & Sánchez-Monroy, 2013)

Células embrionarias

Son células pluripotentes derivadas de la masa celular interna del blastocito que se replica continuamente en un estado indiferenciado. Son capaces de diferenciarse hacia todos los linajes celulares *in vivo* y a muchos tipos de células *in vitro* (Jiang, 2002).

Células adultas

También llamadas somáticas, postnatales o mesenquimales (Perdomo, n.d.) células progenitoras, multipotenciales, con capacidad de auto renovación, y diferenciación a células especializadas con la finalidad de reparar lesiones y renovar células seniles.

Presentan la capacidad de alterar drásticamente el fenotipo en respuesta a los cambios del microambiente en donde se desarrollan (Acevedo Toro & Cortez Márquez, 2008). Se ha definido como una célula especializada dentro de las células de la organización de las células de un tejido específico de un organismo ya desarrollado, con capacidad de diferenciación restringida, únicamente es capaz de generar células del tejido que representa (Jiang, 2002).

Células troncales mesenquimales

Para el presente estudio se realizó énfasis en las células troncales adultas, multipotentes, debido a su relativa facilidad en la obtención, su capacidad de adherencia, de proliferar en cultivos y por su capacidad de diferenciarse en múltiples linajes mesenquimales bajo condiciones controladas *in vitro* (Pittenger, 2012).

El término mesénquima proviene de su origen griego *meso* que significa “medio o infusión” haciendo referencia a las células mesenquimatosas que proliferan y migran tempranamente en el desarrollo embrionario de las capas ectodermal y endodermal (Caplan, 1991).

Las células troncales mesenquimales (*MSC's*) son células troncales adultas que residen en varios tejidos como médula ósea, grasa y músculo, estas células poseen la habilidad de proliferar y diferenciarse en linajes específicos de la capa germinal mesodermal (Xiao, Peperzak, van Rijn, Borst, & de Bruijn, 2010). Estas células constituyen una población heterogénea de células estromales multipotentes que proliferan *in vitro* adheridas al plástico, poseen morfología semejante a la de los fibroblastos capacidad para formar colonias y potencial de diferenciación hacia diversos linajes (Uccelli, Moretta, & Pistoia, 2008).

Morfológicamente estas células se caracterizan por poseer cuerpos pequeños, prolongaciones largas y estrechas, con apariencia fibroblastoide o ahusada, poseen núcleos prominentes, redondos y numerosas mitocondrias (Ozen et al., 2014).

Características de las células troncales mesenquimales

Los requerimientos mínimos necesarios para que una célula sea considerada mesenquimal son los siguientes.

- Adherencia al plástico.
- Expresión de antígenos de superficie.
- Capacidad de diferenciación hacia diferentes linajes.

Adherencia al plástico

El primer requisito que estas células deben presentar es la adherencia al plástico en condiciones estándares de cultivo, puesto que a la observación en el microscopio óptico invertido estas células deberán presentar morfología alargada y fusiforme, parecida a la de los fibroblastos.

Expresión de antígenos de superficie

Como segundo requisito, la presencia de un fenotipo o marcadores específicos positivos iguales o mayores a 95% y otro negativo iguales o menores al 2%, estos marcadores específicos son (Dominicci et al., 2006) (véase tabla 2).

Siendo estos los marcadores de membrana que señala Maximo Dominicci, no obstante se han encontrado reportes en la literatura científica otros marcadores específicos como (Lee et al., 2014, Gonsalves, Lobato da Silva, Cabral, Zanjani, & Almeida-Porada, 2006, Ponta, Sherman, & Herrlich, 2003) (véase tabla 3).

Expresión de antígenos de superficie

Positivos	Negativos
CD75 CD95 CD105	CD14 CD11b CD34 CD45 CD73 CD90 HLA-DR CD79 CD19

Tabla 2 Maracadores de membrana Dominicci.

Positivo	Negativo
<ul style="list-style-type: none"> • STRO1 • CD23 • CD44 • CD59 • CD73 • CD90 • CD166 • MHC1 • ALFA-SMA • VIMETINA 	<ul style="list-style-type: none"> • CD14 • CD31 • CD33 • CD49d • CD49f • CD51 • CD54 • CD71 • CD106 • CD133 • MHC II • CYTOKERATINA • DESMINA

Tabla 3 . Tabla de marcadores de membrana (Lee et al., 2014, Gonsalves, Lobato da Silva, Cabral, Zanjani, & Almeida-Porada, 2006, Ponta, Sherman, & Herrlich, 2003)

Características de las células troncales mesenquimales

Capacidad de diferenciación

El tercer requisito es la multipotencialidad hacia linaje osteogénico, condrogénico, neurogénico y adipogénico, también hay otros linajes a los que se le puede diferenciar, estos son linaje miogénico, linaje hepático y pancreático. Estas células deben de tener la capacidad de diferenciarse hacia los linajes correspondientes mediante condiciones específicas y los inductores correctos

LINAJE	INDUCTORES	REFERENCIA
Osteogénico	Dexametasona, β -glicerol fosfato y Ácido Ascórbico.	(Bunnell, Estes, Guilak, & Gimble, 2008; Coelho & Fernandes, 2000; Langenbach & Handschel, 2013; McCulloch & Tenenbaum, 1986; Mostafa et al., 2012; J.-B. Park, 2012; Solchaga, Cassiède, & Caplan, 1998)
Condrogénico	Insulina, ácido ascórbico, TGF β 1, transferrina	(Alegre Aguarón et al., 2012; Brittberg et al., 1994; Brohem et al., 2013; Bunnell et al., 2008)
Neurogénico	Ácido valproico, hidrocortisona, KCL, BHA, insulina, foskolin, mercaptoetanol, IBMX, indometacina.	(Bunnell et al., 2008; Karaoz et al., 2009; Zuk et al., 2003; Zuk, PA, 2001)
Adipogénico	Insulina, metil-isobutil-xantina, hidrocortisona, indometacina	(Brohem et al., 2013; Bueno et al., 2009; Bunnell et al., 2008; Chase, Rao, & Vemuri, 2011; Huang, Chen, Lin, Shieh, & Chan, 2008; Tan et al., 2013; Zuk et al., 2003; Zuk, PA, 2001)

Tabla 4 Multipotencialidad de las células mesenquimales

Propiedades de las células troncales mesenquimales

Las células troncales mesenquimales poseen características que sirven para distinguirlas de las demás células y estas son: plasticidad, capacidad inmunomoduladora y capacidad para migrar a un tejido específico (*Homing*).

Plasticidad de las células troncales mesenquimales

La capacidad de estas células de tomar diferentes formas al tejido original tanto *in vivo* como *in vitro* se le ha denominado como “plasticidad” (Bianco, Riminucci, Gronthos, & Robey, 2001). En este término aplica las siguientes sinonimias: metaplasia o transdiferenciación (Maria, Khosravi, Mezey, & Tran, 2007; Tosh & Slack, 2002).

Capacidad inmunomoduladora de las células troncales mesenquimales

Al decir que las células troncales mesenquimales poseen capacidad inmunoreguladora se hace referencia a que estas células son capaces de eludir al reconocimiento del sistema inmunitario o inhibir respuestas de origen inmunitario, en principio porque inhiben la proliferación de linfocitos T (CD4 y CD8) ya que las deja paralizadas en la fase G0 del ciclo celular, más no las destruye. Este efecto inmunosupresor se magnifica cuando hay un contacto de célula con célula, esta atracción se lleva a cabo debido a la alta concentración de quimiocinas liberadas por el linfocito T (R. Haddad & Saldanha-Araujo, 2014).

Propiedades de las células troncales mesenquimales

Además inhiben la maduración de monocitos y de células progenitoras hematopoyéticas (CD34) hacia células dendríticas. Estas células dendríticas poseen un rol fundamental en la presentación de los antígenos a los linfocitos T CD4, durante la maduración de células dendríticas, estas adquieren la expresión de moléculas coestimuladoras e incrementan la expresión de las moléculas de MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de clase I y II que conforman el denominado sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*), (Rodríguez, Cabrera Galván, & De León Delgado, 2015) Estas células dendríticas incubadas con células troncales mesenquimales inhiben la expresión de MHC y la producción de interleucina 12 (IL-12). Disminuyendo el potencial inflamatorio de las células dendríticas debido a la inhibición de la producción de factor de necrosis tumoral (TNF), (Uccelli et al., 2008). Las células troncales mesenquimales inhiben la proliferación de linfocitos B, inhiben la producción de citoquinas de estas células, al igual que inhiben la actividad citotóxica de células NK (*Natural Killers*) y su proliferación (Gebler, Zabel, & Seliger, 2012; Uccelli, Moretta, & Pistoia, 2006).

Capacidad migratoria a tejidos específicos (homing) de las células troncales mesenquimales

Es el proceso por el cual, las células migran a los órganos diana o sitio de lesión, dicha capacidad migratoria es dependiente de los receptores de quimiosinas, tales como CCR1, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR12 y moléculas de adhesión como integrin-alfa4, VCAM e ICAM, las cuales juegan un rol en la movilización de

Propiedades de las células troncales mesenquimales

Las células mesenquimales, estas células se movilizan hacia el tejido diana por medio de una combinación de señales moleculares del sitio de lesión dependientes a un gradiente de concentración, a este fenómeno se le conoce como quimiotaxia (Sohni & Verfaillie, 2013).

Localización de las células troncales mesenquimales

Los tejidos adultos poseen reservorios de células troncales los cuales contribuyen al mantenimiento y la regeneración, estas células mantienen una afinidad por circundar vasos sanguíneos por lo que pueden ser consideradas como “pericitos” (Doherty et al., 1998). Estas células se encuentran principalmente asociadas a estructuras de tejido conectivo.

Algunos de esos tejidos son los siguientes: tejido adiposo, médula ósea, sangre periférica y de cordón umbilical, hígado, tendones, membrana sinovial, líquido amniótico, músculo esquelético, gelatina de Wharton (Baksh, Song, & Tuan, 2004).

Células mesenquimales orales



Las células troncales mesenquimales provenientes de estructuras estomatológicas también son una fuente o un recurso prometedor para la obtención de este tipo de células ya que estas pueden auto renovarse y producir diferentes tipos celulares (Emoke et al., 2012).

Células mesenquimales de ligamento periodontal

Las células mesenquimales del ligamento periodontal (PDLSCs) han demostrado poder desarrollar otros linajes celulares como cementoblastos, adipocitos y células de colágeno tanto *in vivo* como *in vitro* (Seo et al., 2004).

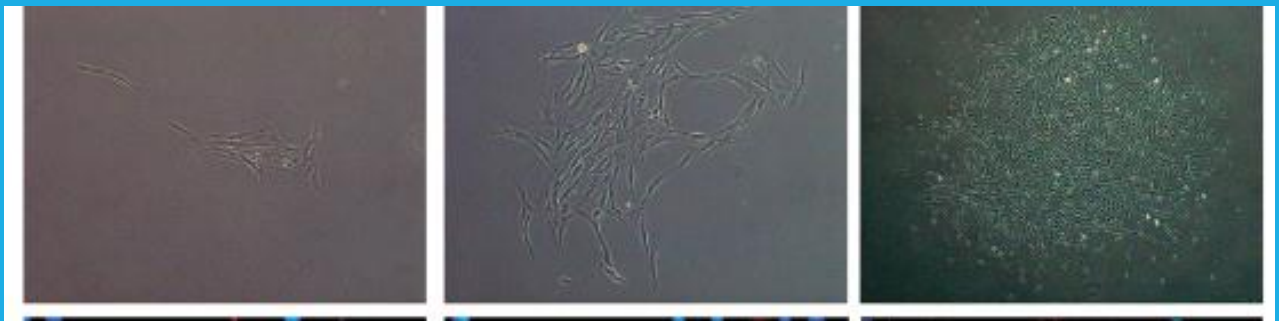
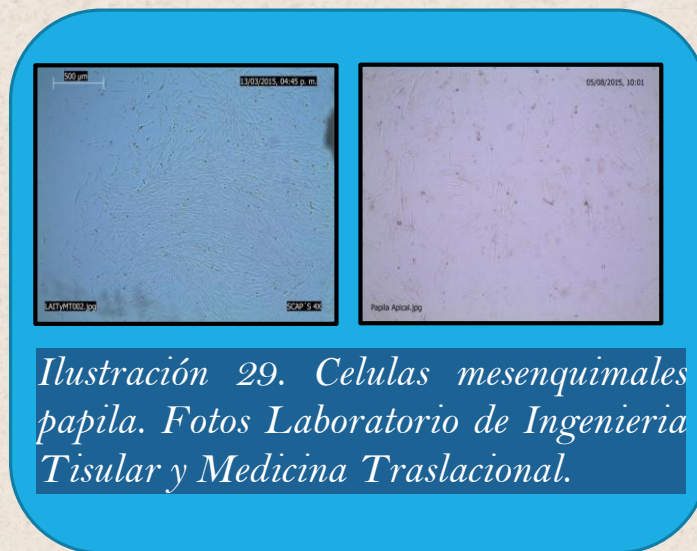


Ilustración 28. Cultivo de PDLSC a los 9 y 14 días. Park 2011

Células mesenquimales de papila apical

Las células mesenquimales de papila apical (SCAP) han reportado la capacidad de diferenciarse a tejido osteogénico y odontogénico (Kamata, 2004). Sonoyama (2006) realizó la caracterización total de estas células que demostraron tener una mayor actividad para diferenciarse hacia diferentes linajes como son el adipogénico, condrogénico, osteogénico y dentinogénico.



Células mesenquimales del germen dental

Las células mesenquimales del germen dental (hTGSCs) han demostrado la capacidad de diferenciarse en osteogénico, adipogénico y neurogénico (Yalvac, 2009).

Células mesenquimales del folículo dental

Las células mesenquimales del folículo dental (DFPC) han reportado su integridad en cultivo durante al menos 15 pasajes y capacidad para diferenciarse en cementoblastos *in vitro* y de formar cemento *in vivo*. Las células del folículo dental tienen la capacidad de formar ligamento periodontal después de la implantación *in vivo* (Morsczech, 2005).

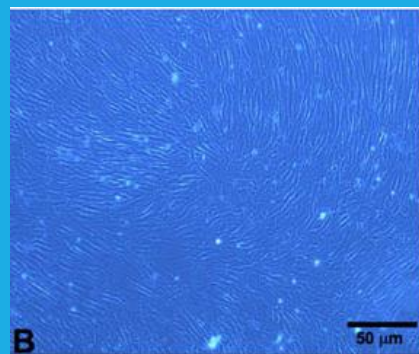


Ilustración 30. Células mesenquimales de folículo dental a 14 días. Brizuela 2013

Células mesenquimales de la mucosa oral

Las células mesenquimales de la mucosa oral (GMSC) fueron aisladas por primera vez en 2013 por Yang, que describió su capacidad de formar colonias clonogénicas. Estas células cuentan con la capacidad de auto renovación y formación de tejido conectivo, así como funciones inmunoregulatoras (Geetanjali, 2010).

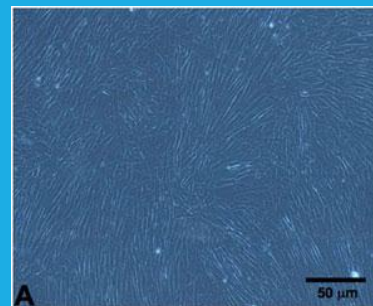


Ilustración 31. Células mesenquimales la mucosa oral a 14 días. Brizuela 2013

células mesenquimales de pulpa dental

Las células mesenquimales de pulpa dental (DPSCs) fueron aisladas por primera vez a partir de terceros molares permanentes en el 2000 por Gronthos presentando un potencial de diferenciación para otros tejidos *in vitro* tales como: odontoblastos, adipocitos, condrocitos y osteoblastos. En estudios *in vitro* de DPSCs se ha demostrado producir nódulos de calcificación y en estudios *in vivo*, pueden formar tejidos semejantes a la dentina con una forma irregular (Gronthos, 2000).

Para la obtención de este tejido se ha utilizado diferentes dientes como es el caso de los terceros molares, dientes supernumerarios, dientes que por alguna indicación ortodoncia tengan que ser extraídos y dientes temporales próximos a exfoliarse o con raíz .

La principal diferencia de la pulpa dental de temporales y dientes permanentes es que estos últimos no pueden producir el complejo dentino-pulpar. Diversos estudios refieren que las células obtenidas de dientes temporales (SHEDs) tienen una mayor capacidad de diferenciarse en una variedad de tipos celulares, mayor tasa de proliferación en comparación con DPSCs, afirmando que son un tejido más inmaduro, y con una clara ventaja ya que ofrecen la recolección de células mesenquimales sin dolor con mínima invasión, ya que se recuperan de un tejido considerado desechable y de fácil acceso (Miura et al., 2003).

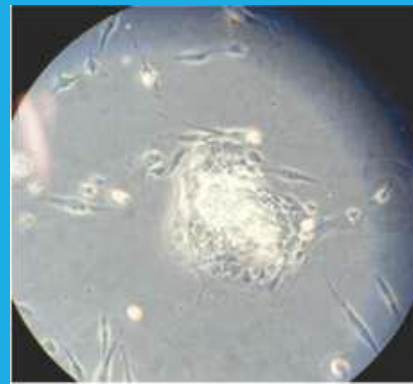


Ilustración 32. Células mesenquimales la mucosa oral a 14 días. Brizuela 2013

Embriología e histología de la pulpa dental



Los dientes tienen su origen en dos de las tres capas blastodérmicas primitivas, el ectodermo y el mesodermo, donde desarrolla un importante papel el ectomesénquima, o mesénquima migrado a la mandíbula o maxilar desde las crestas neurales (Lumsden AG, 1988). Las células de la cresta neural tienen su origen en el ectodermo a lo largo de los bordes laterales de la placa neural y migran en forma extensiva. La porción ectodérmica dará lugar al esmalte, mientras que las células mesenquimales darán lugar a los tejidos mesodérmicos: dentina, pulpa y cemento (Bergenholtz G y cols., 1985).

La papila dental, de la cual se origina la pulpa madura, se desarrolla a medida que se da la proliferación de las células ectomesenquimáticas, y cuando estas se condensan en la vecindad de la lámina dental en los sitios en los cuales se desarrollarán los dientes. (Cohen, 2008).

El primer indicio de la formación de los dientes comienza en la tercera semana de vida embrionaria, y se puede estudiar desde dos puntos de vista:

- Morfogénesis en esta fase ocurre el proceso de formación del patrón que constituirá la corona del diente y luego la formación del patrón que constituirá la raíz dentaria
- Histogénesis o citodiferenciación, en esta fase ocurre el proceso de formación de los tejidos dentarios: el esmalte, la dentina y la pulpa a partir de los patrones de la corona y la raíz dentaria

Hacia la sexta semana de vida intrauterina las cuatro zonas odontogénicas maxilares se unen formando una lámina dental

Embriología e histología de la pulpa dental

continúa y las dos zonas odontogénicas mandibulares se fusionan por la línea media. Estos campos se conocen como los arcos epiteliales. Los dientes comienzan la invaginación de la lámina dental en el mesenquima subyacente, que se encuentra en el borde libre de cada arco.

Estadio de Brote

Después de la lámina dental, un pliegue divide los carrillos y los labios de los arcos dentarios. La lámina dental comienza a mostrar sitios de actividad mitótica produciendo brotes dentarios esto es producto de la proliferación de las células de la lámina dentaria del germen, está constituido por células periféricas cuboides y células centrales o internas poligonales.

Estadio de casquete

Hacia el final de la octava semana, aparece una concavidad en la superficie profunda del brote. El diente está en la etapa de casquete, el epitelio dentario se va agrandando y proliferando en los tejidos conectivos especializados más profundos, hay mayor actividad en las células contiguas con el brote dentario ectodérmico. Zonas de densidad celular aumentan originando eventualmente a las porciones no adamantinadas del diente y su matriz periodontal (Bergenholtz G. y cols., 1985).

Estadio de casquete

En este estadio el germen dentario está constituido por:

- Órgano del esmalte: de origen ectodérmico, dará origen al esmalte dentario, conformado por epitelio dental externo, epitelio dental interno y retículo estrellado.
- Esbozo de la papila dentaria: de origen ectomesenquimático, se ubica por debajo del órgano del esmalte y dará origen al complejo dentinopulpar.
- Esbozo de saco o folículo dentario: de origen ectomesenquimático que rodea a todo el germen dentario, dará origen a los tejidos de soporte del diente.

Estadio de campana

Esta última inicia alrededor de las semanas 14 a 18 de vida intrauterina y se divide en dos.

Estadio de campana inicial

Representa el agrandamiento del tamaño total del germen dentario y la profundización de su superficie. Las células en el centro segregan un mucopolisacárido ácido en el espacio extracelular entre las células epiteliales que cubren al germen, lo que resulta en una atracción del agua y un agrandamiento del germen. Una zona de las células estriadas pero interconectadas, el retículo estrellado, se produce en el centro del germen. Las células epiteliales próximas a la papila se desarrollan en una capa de células productoras de esmalte, el epitelio dentario interno, las células epiteliales a lo largo del filo conductor del germen forman el epitelio dentario externo,

Estadio de campana inicial

que eventualmente da origen a la cutícula dental. En este estadio se observan las siguientes estructuras en el germen dentario:

- Órgano del esmalte: epitelio dental externo, retículo estrellado, estrato intermedio, epitelio dental interno, asas cervicales y membrana basal
- Papila dentaria
- Saco o folículo dentario: capa celulovascular y capa fibrilar

Estadio de campana avanzada

Es la última etapa en el proceso de morfodiferenciación coronario y es donde logra evidenciarse el proceso de citodiferenciación, por consecuente el inicio de formación de los tejidos duros del diente.

La diferenciación de los odontoblastos productores de dentina en la papila dental es iniciada por las células vecinas el epitelio interno. La formación del esmalte no puede ocurrir hasta que se haya depositado la correcta cantidad de dentina. En la zona de la curva cervical las células vecinas de los dos epitelios se constriñen progresivamente alrededor de la papila dental para dejar solo una pequeña abertura, que se convertirá en el foramen apical. Por este proceso de histodiferenciación, una masa de células epiteliales derivada del ectodermo se diferencia progresivamente en los componentes del diente que determinan la forma de la corona iniciando la formación dentaria y del esmalte.

Después de esta cuarta etapa, el germen dentario queda constituido de la siguiente forma:

El órgano del esmalte se reduce a nivel de los bordes incisales o en el caso de los dientes posteriores, en las zonas donde estarán las futuras cúspides, convirtiéndose en una estructura parecida a un epitelio.

Estadio de campana avanzada

A nivel del tercio medio del germen dentario se mantiene el retículo estrellado y el epitelio dental externo.

A nivel de la unión entre el epitelio dental interno y el epitelio dental externo se inicia la formación del modelo radicular, por lo que la estructura anteriormente llamada asa cervical se convierte en vaina radicular de Hertwig (Ferraris, 2009).

Histología

La pulpa es un tejido conjuntivo laxo compuesto de células, fibras colágenas y reticulares, sustancia fundamental, vasos sanguíneos y nervios. Es la forma madura de la papila dentaria y el único tejido blando del diente (Bergenholtz G. y cols., 1985).

Mientras que las células periféricas se diferencian hacia odontoblastos, el resto se diferencian hacia fibroblastos, lo que supone un grado de diferenciación mucho menor. Muchas de las células mesenquimales permanecen indiferenciadas una vez finalizada la odontogénesis, conservando su potencial de diferenciación (Bergenholtz G. y cols., 1985). Se pueden diferenciar 4 zonas en la pulpa dental:

- Zona odontoblástica en la periferia: justo debajo de los odontoblastos se encuentran las células de Höhl, que son preodontoblastos (Sinanan y cols., 2004).
- Zona acelular o zona de Weil por debajo de los odontoblastos, esta zona es pobre en células y rica en colágeno.
- Zona muy rica en células adyacente a la capa anterior.
- Zona central, donde están presentes los nervios y vasos (Bergenholtz G. y cols. 1985).

Después de la erupción dental, la dentina reparativa se forma por odontoblastos en respuesta a erosión mecánica o a degradación causada por bacterias (Kitamura y cols., 1999; Smith y Lesot, 2001). Estos odontoblastos surgen de la proliferación y diferenciación de células precursoras que residen concretamente en la zona celular de la pulpa dental, alrededor de la zona perivascular (Ruch, 1998; Tecles y cols., 2005).

Metodología



Criterios de inclusión

Durante el desarrollo de esta investigación se obtuvieron dientes temporales de sujetos con síndrome de Down donados por clínicas particulares, contando con el consentimiento informado por los tutores para la donación de los dientes.

Los dientes seleccionados para esta investigación fueron aquellos que cumplieron las siguientes características:

- dientes temporales de sujetos con síndrome de Down
- dientes sin presencia de lesiones cariosas
- solo se aceptaron las donaciones de dientes de aquellos pacientes que contaban con su historia clínica debidamente llenada y su consentimiento informado firmado¹⁵.

Recursos

Anestesia

- Benzocaína 20 mg (Zeyco)
- Lidocaína al 2% con epinefrina 1:100 000 (Zeyco)
- Jeringa carpule
- Agujas

¹⁵ Ejemplo de consentimiento informado véase el anexo 1

Recursos

Exodoncia simple

- Fórceps infantil
- Pinzas de mosco largas
- Gasas estériles

Transporte

- Tubos de 15 ml estériles
- Medio de transporte (solución fisiológica con Penicilina 1000 U/ml, Estreptomicina 1mg/ml y Anfotericina B 2.5mg/ml al 10%)
- Solución antibiótico-antimicótico (Sigma-Aldrich)

Extracción pulpar

- Cucharilla para dentina #5
- Micropipetas (10, 100, 1000 μ l Boeco)
- Puntas para Micropipetas (Biologix)

Cultivo pulpar

- Cabina de bioseguridad con flujo laminar (Telstar Bioadvanced II)
- Máquina de centrifuga (Sigma modelo 2.15 KL)
- Propipeta o Pipeteador (S1 Pipet Filler Thermo Scientific)
- Micropipetas (10, 100, 1000 μ l Boeco)
- Pipetas Serológicas (TPP)
- Puntas para Micropipetas (Biologix)
- Cajas de cultivo estéril de 25 cm² Tipo Falcón (Nunclon™ Surface).
- DPBS (Sigma-Aldrich)
- Medio de cultivo DMEM (Biowest)
- SFB (suero fetal bovino, Biowest)

Método

Selección de dientes

Para obtener los dientes que se utilizarían como objeto de estudio en esta investigación se visitaron diversas instituciones educativas particulares así como Centros de Atención Múltiple (CAM) con la finalidad de crear un acercamiento a los pacientes con síndrome de Down y sus familiares. De estas visitas se obtuvo el contacto de diversos consultorios particulares en los cuales los pacientes con síndrome de Down asisten para recibir atención odontológica.



Ilustración 33. Fundación CEDAC, Naucalpan Edo. Mex.



Ilustración 34. Fundación Mosaico Down. Evento deportivo Six flags Mexico



Ilustración 35. CAM Indios Verdes. Jornada de salud



Ilustración 36. Fundación Todos Somos Iguales. Cuautitlan Izcalli, Edo. Mex

Método

Se asistió a la Fundación DUE A.C. (Ciudad de México), lugar que brinda servicio odontológico y psicopedagógico a pacientes con diversas discapacidades incluidos los pacientes con trisomía 21. El proceso de desensibilización para la consulta odontológica está basado en el modelo psico-odontológico *SANPE* el cual consta de seis sesiones en conjunto con un psicólogo que se encarga de reducir el nivel de estrés y ansiedad que presente el paciente en el acercamiento a la unidad dental y durante el primer contacto con el instrumental. Durante la primera sesión dentro del modelo *SANPE* se realiza la historia clínica médica y psicológica.

La recolección de muestras dentales se realizó en dos momentos distintos con un mes de diferencia entre ellos, esto es debido a la disponibilidad de horarios de los pacientes donadores y del consultorio dental particular.

Extracción dental

Para el acondicionamiento del paciente previo a la extracción dental se aplicó por medio de una torunda de algodón Clorhexidina al 0.12% en la periferia del diente a extraer.

Al ser dientes temporales próximos a exfoliación la extracción dental se llevó a cabo bajo anestesia tópica con benzocaína de 20mg (Zeyco), en el caso de los dientes supernumerarios o aquellos que aún presentaban porción radicular fueron anestesiados localmente infiltrando con lidocaína al 2% con epinefrina 1:100 000 (Zeyco)

Una vez anestesiado, se procede a la sindesmotomía, o a la separación del tejido periodontal del diente, cuando esta se encuentra con una reabsorción que sobrepasa el tercio cervical radicular, solo se requiere del instrumental de sindesmotomía para realizar la extracción. En el caso de que la raíz sobrepase el tercio cervical radicular se requiere después de la sindesmotomía el uso de fórceps,

Método

estos requieren de movimientos suaves, buscando estabilidad y apoyo mediante la sujeción de los dientes vecinos. El bocado de los fórceps debe colocarse bajo la unión amelo cementaria. Para la extracción de los dientes anteriores se deben realizar movimientos vestíbulo-palatinos y rotacionales.

Transporte de dientes obtenidos

Posterior a la extracción del diente este es colocado en un tubo de punta cónica de 15 ml con medio de transporte a una temperatura de 4 °C para su envío al Laboratorio Académico de Ingeniería Tisular y Medicina Traslacional, (Clínica Odontológica Cuauhtémoc, UNAM).

Los tubos son identificados con los datos del paciente, y el diente obtenido (incisivo, canino, mesiodent), posteriormente son colocados dentro de la hielera para su transporte.

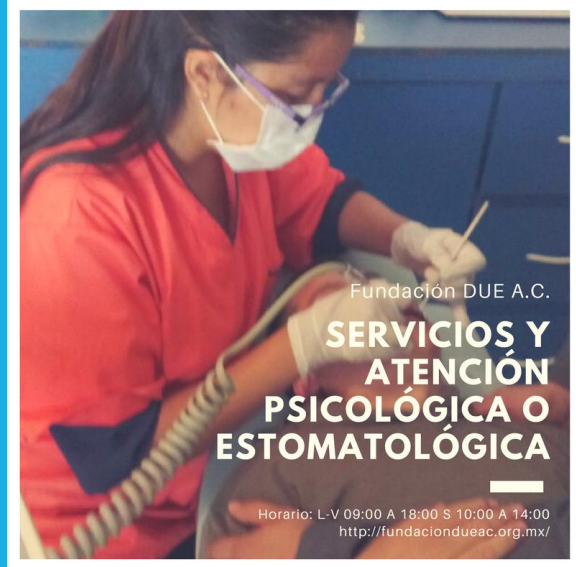


Ilustración 37. Foto Fundación DUE A.C.

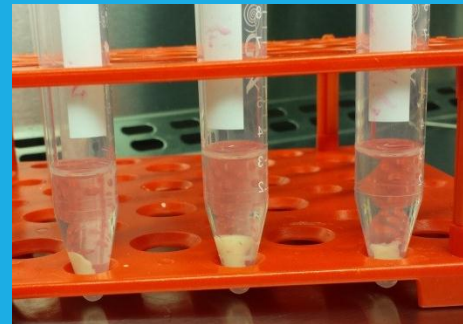


Ilustración 38. Transporte de dientes. Laboratorio de Ingeniería tisular y medicina traslacional.

Método

Aquellas muestras que de la boca del paciente al tubo de 15 ml sufrieron alguna contaminación o tuvieron contacto con algún objeto no estéril fueron descartados para esta investigación.

La preparación del medio de transporte se realiza dentro de la cabina de bioseguridad con flujo laminar en una zona de esterilidad, para su preparación se requiere solución fisiológica a la cual se le agregaron antibióticos (penicilina 1000 U/ml, y estreptomina 1mg/ml) y antifúngicos (anfotericina B 2.5mg/ml) con la finalidad de crear un medio de preservación profiláctica.

Preparación de dientes donados

Todos los procedimientos de preparación de medios, aislamiento y cultivo de la pulpa dental se realizaron en condiciones de esterilidad, realizando todas las operaciones en una cabina de bioseguridad con flujo laminar (Telstar Bioadvanced II).

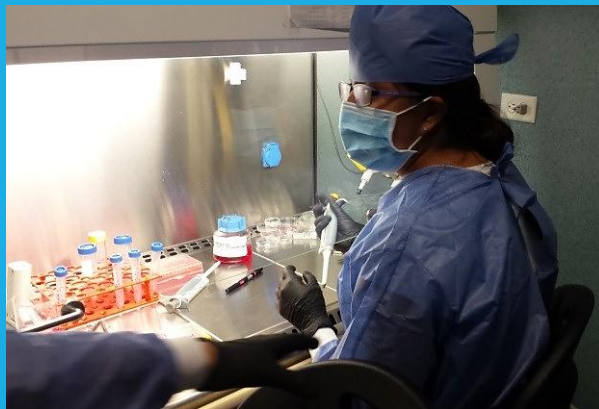


Ilustración 39. Cabina de bioseguridad con flujo laminar Laboratorio de Ingeniería tisular y medicina traslacional.

Método

Una vez llegadas las muestras al laboratorio se realizó un lavado con medio de transporte y se colocaron en tubos nuevos, almacenándolos a 4°C durante cuatro horas, transcurrido el tiempo se volvieron a lavar cambiando los tubos y el medio de transporte y se almacenan durante 24 horas a 4°C.

Transcurridas las 24 horas, se esterilizó el área blanca mediante limpieza con hipoclorito de sodio y luz ultravioleta. La cabina de bioseguridad con flujo laminar fue esterilizada con etanol al 70% y luz ultravioleta durante 15 min.

Extracción de tejido pulpar

Dentro de la cabina de bioseguridad con flujo laminar, se procedió a la obtención de la pulpa dental de su respectiva corona con la ayuda de la cucharilla para dentina #5 y las pipetas, una vez separada la pulpa dental se colocó en un nuevo tubo de 1.5 ml de punta cónica con medio de transporte.

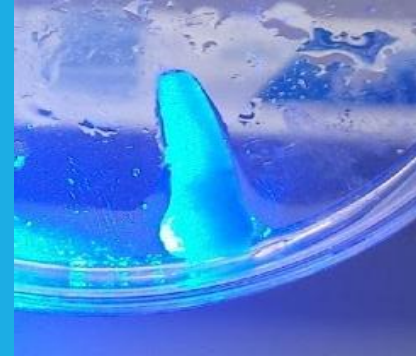


Ilustración 40. Fluorescencia diente temporal con raíz. Laboratorio de Ingeniería tisular y medicina traslacional.

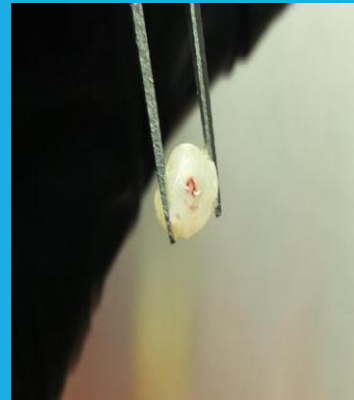


Ilustración 41. Extracción de pulpa dental. Laboratorio de Ingeniería tisular y medicina traslacional.

Método

Cultivo celular

La preparación del medio de cultivo fue llevada a cabo por el personal encargado del área blanca dentro del Laboratorio de Ingeniería Tisular para la realización de este fue utilizado DMEM (Biowest) como base enriqueciéndolo con Suero Fetal Bovino (Biowest) y un preparado de solución antibiótica y antimicótica consistente en penicilina (1000U/ml), estreptomina (1mg/ml) y anfotericina B (2.5mg/ml), este medio fue filtrado para su esterilización de manera suave, fluida y constante.

El tejido pulpar de los dientes temporales y el tejido ligamentario que se logró obtener de un diente con porción radicular aun presente fueron cultivados por la técnica de digestión enzimática.

Para la realización de esta investigación se preparó una solución enzimática con 5mg de colagenasa (Colagenase from clostridium histolyticum, Sigma-Aldrich) y 2mg de dispasa (Dispase II, Sigma-Aldrich) por mililitro de PBS (Dulbecco's phosphate Bueffered Saline, Biowest).



Ilustración 42. Extracción de pulpa dental. Laboratorio de Ingeniería tisular y medicina traslacional.



Ilustración 43. Pulpa dental, diente temporal. Laboratorio de Ingeniería tisular y medicina traslacional.

Método

Los tejidos pulpareos recuperados fueron fragmentados con una hoja de bisturí #15 y con ayuda de una cucharilla de 2mm de diámetro. Los explantes resultantes se sumergieron en 100 micro litros de la solución enzimática y se colocaron en tubos cónicos o/y Eppendorf individuales de 1.5ml, debidamente etiquetados, los cuales fueron almacenados en la incubadora durante 20 minutos con la finalidad de disgregar los enlaces peptídicos de los tejidos dejando solamente las células.

Transcurrido el tiempo se lleva a cabo la inactivación de la solución enzimática agregando medio de cultivo. Esta solución fue centrifugada a 1000 revoluciones por minuto durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se elimina la solución sobrante del tubo dejando solo el *pellet*, para re-suspenderlo en un mililitro de medio de cultivo que será sembrado en una caja de cultivo estéril de 25 cm² Tipo Falcón (Nunclon™ Surface) debidamente etiquetada marcando el tipo de tejido que contiene y la fecha en la cual fue sembrado.

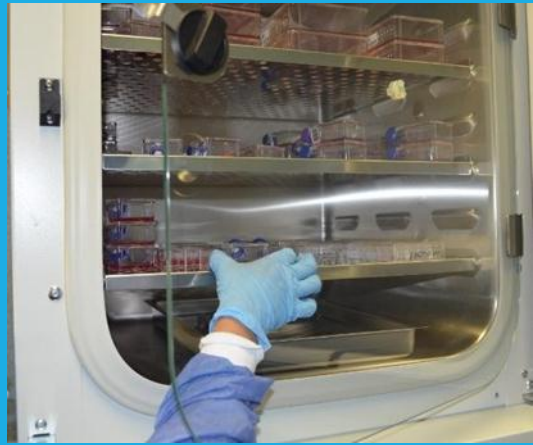


Ilustración 44. Incubadora Binder. Laboratorio de Ingeniería tisular y medicina traslacional.



Ilustración 45. Caja de cultivo. Laboratorio de Ingeniería tisular y medicina traslacional.

Método

Después de colocados se esperó la adhesión del tejido a la caja de cultivo durante 10 minutos dentro de la incubadora (Binder modelo CB150UL), con un ambiente húmedo controlado al 95% y CO₂ al 5% a una temperatura de 37°C. Transcurrido este tiempo se agregó 5ml de Medio de cultivo.

El medio de cultivo fue reemplazado con la ayuda de una pipeta de 5ml (Eppendorf), por cultivo fresco, a las 24 horas.

Resultados



Obtención de las muestras

La recolección de dientes para esta investigación fue llevada a cabo dentro de consultorios particulares de manera exitosa por medio de extracciones dentales simples a pacientes menores de 10 años los cuales están diagnosticados con trisomía 21. Esta recolección se dio en dos momentos distintos, durante la primera recolección se obtuvieron cinco muestras. La segunda recolección se llevó a cabo un mes después durante la cual se obtuvieron cuatro muestras.

Preparación de las muestras para cultivo celular

Para la preparación del primer bloque se realizó la limpieza de las muestras obtenidas siguiendo la técnica establecida por el Laboratorio de Ingeniería Tisular para la obtención de células mesenquimales a partir de pulpa dental de terceros molares. En dicha técnica se establece el uso de una solución de transporte adicionada con antibiótico y antimicótico al 10%.

Debido a los resultados obtenidos durante el primer bloque, los cuales se describirán más adelante, para la segunda recolección de muestras se aumentó el porcentaje de la solución antibiótica y antimicótica en un 5%, manteniendo los valores de tiempo durante los cuales las muestras obtenidas se mantienen expuestas a esta solución transportadora.

Obtención de las células mesenquimales a partir de tejidos pulpaes

Después de 24 horas del sembrado de los tejidos pulpaes se realizó cambio de medio de cultivo, durante este procedimiento se observaron las cajas bajo el microscopio óptico invertido con la finalidad de observar las primeras colonias celulares y evaluar su adherencia a la superficie plástica de la caja de cultivo.

Las primeras células del cultivo primario aparecieron tras la primera semana de cultivo, estas mostraban una morfología cuboidal, también se encontraban colonias celulares las cuales mostraban poca adherencia.



Ilustración 46. Cultivo celular contaminado. Laboratorio de Ingeniería tisular y medicina traslacional.

El primer bloque de muestras obtenidas constaba de las cajas 1 a la 5, las cuales fueron tratadas con la solución antibiótica y antimicótica al 10% mostraron contaminación por *candida albicans* y *estreptococcus* a los 10 días posteriores al sembrado celular, mientras que las cajas

Obtención de las células mesenquimales a partir de tejidos pulpaes

del segundo bloque (de la 6 a la 9) fueron tratadas con la solución de antimicótico y antibiótico al 15%. La caja número 8 sufrió contaminación celular a las 48 horas de haber sido sembrada mientras que las tres cajas restantes aun no presentaban proliferación celular.

Las cajas 6, 7 y 9 fueron desechadas pasados los 10 días, sin que las células de estas cajas mostraran una adherencia al plástico o una proliferación celular.



Ilustración 47. Cultivo celular no proliferante. Laboratorio de Ingeniería tisular y medicina traslacional.

Discusión



El avance que ha tenido la terapia genética a lo largo de esta década nos ha permitido conocer los diferentes elementos de los cuales disponemos para lograr en un futuro hacer de este tipo de tratamientos una práctica clínica común.

El elemento primordial para esta sería la obtención de las células diana, las cuales principalmente son células troncales, esto es debido a su capacidad de adherencia, su capacidad de diferenciarse en múltiples linajes mesenquimales bajo condiciones controladas *in vitro* y su capacidad de renovación que se presentan después de un traumatismo, enfermedad o envejecimiento natural. (Pittenger, 2012); sin embargo la presencia de estas células en órganos adultos es baja lo que complica su obtención (Banks, 2004).

Las células troncales mesenquimales son células que residen en varios tejidos como médula ósea, tejido adiposo y músculo (Xiao, Peperzak, van Rijn, Borst, & de Bruijn, 2010). Durante el último cuarto de siglo numerosos estudios han demostrado que la cavidad oral contiene una serie de nichos celulares de fácil acceso en comparación con las otras fuentes mencionadas. En la actualidad numerosos estudios avalan el uso de estas células orales para su aplicación a la ingeniería tisular, siguiendo esta línea de estudio se propone ocupar células de obtención oral en la terapia genética enfocada a la corrección de los fenotipos en sujetos con síndrome de Down.

Las células troncales pueden ser aisladas de tejidos adultos de la cavidad bucal, por ejemplo en dientes permanentes y temporales, ligamento periodontal, encía, hueso alveolar, folículo dental y papila apical.

Discusión

Durante la presente investigación no se encontraron referencias publicadas que hagan alusión a la obtención por nichos orales de células provenientes de sujetos con síndrome de Down, tras lo cual nos dimos a la tarea de obtener este tipo de células. Se realizó un enfoque a las células de pulpa dental pues este fue el primer tejido oral aislado de manera eficaz por Gronthos en el 2000.

En su trabajo Gronthos (2000) refiere obtener estas células de terceros molares impactados, debido a las características cardíacas de los sujetos con síndrome de Down, nos encontramos con limitantes a las técnicas quirúrgicas agresivas lo cual nos guió a la obtención de dientes temporales, ya que estos pueden ser obtenidos mediante extracciones simples que se llevan a cabo en procesos ambulatorios.

Dichos procesos dado las respuestas al dolor que presentan estos sujetos han sido realizados bajo el mínimo de anestésico, esto fue corroborado por Hennequin en el 2000 y corroborado por Valkenburg en 2015 quienes han realizado estudios sobre el umbral del dolor de sujetos con síndrome de Down sugiriendo un umbral al dolor más alto en los primeros, es decir, menor sensibilidad al dolor.

Las células troncales obtenidas de dientes temporales, pueden provenir de dientes temporales extraídos por indicación del odontólogo o de dientes en proceso de exfoliación, se ha demostrado que las células obtenidas de la pulpa remanente de dientes temporales tiene similitudes con las células recolectadas del cordón umbilical (Shi, 2003), mostrando así las células de pulpa dental de dientes temporales una ventaja sobre las obtenidas de cordón umbilical que radica en el tiempo durante el cual podemos obtener estas células, ya que estas últimas se pueden obtener hasta los 12 años de vida aunque autores como Shi recomiendan que los dientes sean obtenidos de sujetos entre los 7 y los 8 años de edad.

Aunado a lo anterior, se ha demostrado que las células de pulpa dental (SHED) poseen una mayor tasa de proliferación comparadas con células troncales de médula ósea adultas (BMSSCs), (Shi, 2003).

Discusión

Los sujetos que presentan síndrome de Down poseen una variedad de complicaciones psicológicas y médicas entre las que encontramos diversas manifestaciones orales, si bien se ha descrito una menor prevalencia de lesiones cariosas, estos pacientes suelen presentar con una mayor frecuencia las enfermedades periodontales de inicio precoz (Culebras, 2012).

En los estudios de saliva realizados por Areias en 2012 (pp. 15-20) se encontró una disminución del 36% en la cantidad de saliva secretada por sujetos con síndrome de Down comparada con aquellos que no padecen el síndrome, aunque en estos pacientes se presentan babeo, este es provocado por la apertura bucal continua aunado a una mala postura de la lengua y a la hipotonía de la musculatura orofacial, y no necesariamente a una hipersialia. También Areias reportó que estos sujetos tienen una disminución del 29% en la secreción de la inmunoglobulina A.

Estos factores propios de los sujetos con síndrome de Down han favorecido la persistencia de diferentes microorganismos en la flora bucal, volviéndola agresiva para el periodonto. Debido a esto se adecuó la solución de transporte, puesto que algunos autores como es el caso de Munshi en 2009 refieren que los dientes temporales extraídos se pueden transportar en una solución salina; basándonos en la flora bucal patognomónica del síndrome de Down se optó por adicionar a la solución de transporte una solución antibiótica y antimicótica.

Munshi también reporta la aplicación de tres lavados a las muestras obtenidas mediante PBS, al encontrarnos en fase de estandarización de técnica para la obtención de células mesenquimales de sujetos con síndrome de Down se realizaron lavados al momento de arribo de las muestras al laboratorio y a las cuatro horas. Siguiendo con el procedimiento de Munshi la recolección del tejido pulpar se llevó a cabo mediante cucharillas estériles, el tejido obtenido fue colocado en PBS para mantener el tejido nutrido.

Discusión

Cuando la pulpa remanente se ha separado de la corona esta se coloca en una solución de 3 mg por ml de colagenasa tipo I y 4 mg por ml de dispasa durante 1 hora a 37°C según la investigación realizada por Shi. En este trabajo se ha utilizado 5 mg por ml de colagenasa y 2 mg por ml de dispasa durante 20 minutos, esto debido a que el tejido pulpar ha sido segmentado antes de ser sometido a esta solución, lo que facilita la digestión del mismo.

Durante la segunda semana del cultivo se puede observar la confluencia celular, con morfología en forma de huso, estas características fueron reportadas para las células mesenquimales por Friedenstein en 2009.

Conclusiones




Debido al poco impulso en investigación que se presenta en nuestro país se encontraron varios obstáculos para la realización de este trabajo, el más grande fue la dificultad para lograr el contacto con las instituciones responsables y el enlace con los padres de familia, este obstáculo fue superado gracias al apoyo brindado por Fundación DUE, en donde se realizaron pláticas grupales a los padres de familia para explicarles la investigación a realizar con los dientes obtenidos y el empleo del tejido obtenido, la fundación también otorgo la capacitación del sistema SANPE con el que se realizó la desensibilización de los pacientes, así como, el personal para la obtención de los dientes, misma que se realizó dentro de sus instalaciones.

Los sujetos incluidos en el estudio fueron pacientes sistémicamente y psicológicamente comprometidos se encontró la presencia de *Candida Albicans* y *Streptococo Mutans* dentro de la flora bucal dificultando la obtención de células mesenquimales, esta se encuentra presente por la falta de higiene relacionada a la poca motricidad orofacial y manual. En ese sentido, el medio de cultivo empleado al ser altamente nutritivo favorece la propagación de bacterias y hongos no deseados; este obstáculo se trató modificando las concentraciones de antibiótico/antimicótico, y estandarizar la dosis adecuada de los fármacos, lo cual se logró al notar la presencia de células en el segundo día de cultivo de la pulpa dental de pacientes con trisomía 21. La investigación se encuentra actualmente en proceso para favorecer la proliferación de las células obtenidas de la pulpa dental de pacientes con síndrome de Down.

Bibliografía

- Arsenault, J., Nagy, A., Henderson, J.T., O'Brien, J.A. Regioselective Biolistic Targeting in Organotypic Brain Slices Using a Modified Gene Gun. J. Vis. Exp. (92), e52148, doi:10.3791/52148 (2014)
- ASALSIDO. (2005). DOSSIER SOBRE SÍNDROME DE DOWN. Asociación Almeriense para el Síndrome de Down. Recuperado el 17 de octubre de 2016, de http://www.asalsido.org/down/descargas/2005/sindrome_down.pdf
- Banks, D., Song L, Tuan RS., Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med. 2004 Jul-Sep;8(3):301-16.
- Bergenholtz, G., I. A. Mjor, W. R. Cotton, C. T. Hanks, S. Kim, C. D. Torneck and H. O. Trowbridge (1985). "The biology of dentin and pulp. Consensus report." J Dent Res 64 Spec No: 631-3
- Berns KI, Giraud C. Biology of adeno-associated virus. Curr Top Microbiol Immunol 1996; 218: 1-23.
- Berns KI. Parvovirus replication. Microbiol Rev 1990; 54: 316-29
- Bosh Fatima, Roca Carles, Anguela Xavier, Ruzo Albert, Center of Animal Biotechnology and Gene Therapy, Universidad Autonoma de Barcelona [Víctor Sánchez Clares] (2013 Abril 21) Gene therapy [Archivo de video]. Recuperado de <https://www.youtube.com/watch?v=znZVsNBkrQs&t=503s>

- 
- Bottomley MJ. Structures of protein domains that create or recognize histone modifications. *EMBO reports* 2004; 5: 464-469
 - Brizuela C, Claudia, Galleguillos G, Sussy, Carrión A, Flavio, Cabrera P, Carolina, Luz C, Patricia, & Inostroza S, Carolina. (2013). Aislación y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Provenientes de Pulpa y Folículo Dentario Humano. *International Journal of Morphology*, 31(2), 739-746
 - Cataldo A. M., Peterhoff C. M., Troncoso J. C., Gomez-Isla T., Hyman B. T., Nixon R. A. Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am. J. Pathol.* 2000;157:277-286
 - Chávez, A. D. (2014). Síndrome de Down. *Revistas Bolivianas*, 45.
 - Clemson, C. M., McNeil, J. A., Willard, H. F. & Lawrence, J. B. XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J. Cell Biol.* 132, 259–275 (1996)
 - Cotton, A. M. et al. Chromosome-wide DNA methylation analysis predicts human tissue-specific X inactivation. *Hum. Genet.* 130, 187–201 (2011).
 - Csankovszki, G., Nagy, A. & Jaenisch, R. Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J. Cell Biol.* 153, 773–784 (2001).

- Culebras Atienza J. Silvestre-Rangil, F.J. Silvestre Donat. (2012). Alteraciones odonto-estomatológicas en el niño con síndrome de Down. *Revista Española de Pediatría*, 68 n°6.
- DeKelver, R. C. et al. Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome. *Genome Res.* 20, 1133–1142 (2010)
- Down, J. L. (1990). *Mental Affections of Childhood and Youth*. Londres: Cambridge University Press.
- Epstein AL. Progress and prospects: biological properties and technological advances of herpes simplex virus type 1-based amplicon vectors. *Gene Ther.* 2009;16:709–15
- Feldman SH. Components of gene therapy experimentation that contribute to relative risk. *Comp Med* 2003;53(2):147-58.
- Ferrer, L. & Gullota, F. (1990). Down's syndrome and Alzheimer's disease: Dendritic spine counts in the hippocampus. *Acta Neuropathologica*, 79, 680-685
- Fischle W, Wang Y, Allis CD. Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* 2003; 425: 475-479
- Flores, F., Montesinos, J., & Mayani, H. (2006, Septiembre-Octubre). Células mesenquimales troncales: historia biología y aplicación clínica. *Revista de Investigación Clínica*, 58, pp.498-511.
- Flórez, J. (1994). Trastornos neurológicos. En S. M. Pueschel & J. K. Pueschel (Eds.), *Síndrome de Down. Problemática biomédica* (pp. 171-187). Barcelona: Masson- Salvat Medicina.
- histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 2305–2312

- Fraser M, Mitchell A. Kalmuck idiocy: report of a case with autopsy with notes on 62 cases. *J ment sci* 1876; 22: 169-79
- Friedmann Theodore, "Problemas de la terapia génica", *Investigación y Ciencia*, nº 251, Agosto de 1997, pp. 44-50
- Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1. *Fundación Catalana síndrome de Down*. (1996). Aspectos médicos y psicopedagógicos. Barcelona. Masson.
- Fyodor D. Urnov, Edward J. Rebar, Michael C. Holmes, H. Steve Zhang and Philip D. Gregory, *Genome editing with engineered zinc finger nucleases*, 2010 Macmillan
- Gaite L, Cantero P, González-Lamuño D, García Fuentes M. *Necesidades de los Pacientes Pediátricos con Enfermedades Raras y de sus Familias en Cantabria*. Real patronato sobre Discapacidad. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. 2005. Documento 69
- García Alba Javier, *Déficit neuropsicológicos en síndrome de down y valoración por doppler transcraneal*. Universidad Complutense De Madrid, Facultad De Psicología, 978-84-693-1269-8
- García-Alba, J. & Portellano, J. A. (2004). *Enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down: estudio de su interacción*. *Polibea*, 70, 14-19
- García-Alba, J. & Portellano, J. A. (2009). *Déficit neuropsicológicos en síndrome de Down y valoración por doppler transcraneal*. *Polibea*, 978-84-693-1269-8
- Giraud, F. & Mattei, J. F. (1975). *Epidemiological aspects of trisomy 21*. *Journal of Genetics Human*, 23 (Suppl.), 1-30.


- Glover DJ, Lipps HJ, Jans DA. Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat Rev Genet.* 2005 Apr;6(4):299-310.
- Gronthos, S. and P. J. Simmons (1995). "The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro." *Blood* 85(4): 929-40.
- Gronthos, S., J. Brahim, W. Li, L. W. Fisher, N. Cherman, A. Boyde, P. DenBesten, P. G. Robey and S. Shi (2002). "Stem cell properties of human dental pulp stem cells." *J Dent Res* 81(8): 531-5.
- Gronthos, S., M. Mankani, J. Brahim, P. G. Robey and S. Shi (2000). "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25): 13625-30.
- Gu W, Roeder RG. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 1997; 90: 595-606
- Hall, L. L. et al. An ectopic human XIST gene can induce chromosome inactivation in post differentiation human HT-1080 cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 8677–8682 (2002)
- Haydar, T. F. & Reeves, R. H. Trisomy 21 and early brain development. *Trends Neurosci.* 35, 81–91 (2012).
- Heard, E. Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 482–489 (2005)
- Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6538-6547
- Huang, A. H., Y. K. Chen, L. M. Lin, T. Y. Shieh and A. W. Chan (2008). "Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth." *J Oral Pathol Med* 37(9): 571-4.

- Hukkanen, V. (2010). Herpesvirus Vectors in Gene Therapy. *The Open Virology Journal*, 4, 94–95.
- J H Kim, J-M Hwang, H J Kim and Y S Yu. (2002). Characteristic ocular findings in Asian children with Down syndrome. *Nature Publishing Group Jackson JP, Johnson L, Jasencakova Z, Zhang X, PerezBurgos L, Singh PB, et al. Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in Arabidopsis thaliana. Chromosoma* 2004; 112: 308-315
- Jacobs SA, Khorasanizadeh S. Structure of HP1 Chromodomain Bound to a Lysine 9 Methylated Histone H3 Tail. *Science* 2002 295: 2080-2083
- Jiang, J., et al. (2013). "Translating dosage compensation to trisomy 21." *Nature* 500(7462): 296-300.
- Kitamura, C., K. Kimura, T. Nakayama and M. Terashita (1999). "Temporal and spatial expression of c-jun and jun-B protooncogenes in pulp cells involved with reparative dentinogenesis after cavity preparation of rat molars." *J Dent Res* 78(2): 673-80
- Klein RM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Biotechnology*. 1987;24:384–386
- Kohn, G., Taysi, K., Atkins, T. & Mellman, W. (1970). Mosaic mongoloism. I. Clinical correlations. *The Journal of Pediatrics*, 76, 874-879.
- LACADENA, J.R. 1999 *Genética General: Conceptos fundamentales*. Editorial Síntesis S.A., Madrid, 623 pp.
- Lachner M, Jenuwein T. The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 286–298

- Lee, B. and B. L. Davidson (2011). "Gene therapy grows into young adulthood: special review issue." *Hum Mol Genet* 20
- Lee, J. T., Strauss, W. M., Dausman, J. A. & Jaenisch, R. A 450 kb transgene displays properties of the mammalian X-inactivation center. *Cell* 86, 83–94 (1996)
- Lee, L. T., P. C. Kwan, Y. F. Chen and Y. K. Wong (2008). "Comparison of the effectiveness of autologous fibrin glue and macroporous biphasic calcium phosphate as carriers in the osteogenesis process with or without mesenchymal stem cells." *J Chin Med Assoc* 71(2): 66–73.
- Lee, S. Y., P. C. Chiang, Y. H. Tsai, S. Y. Tsai, J. H. Jeng, T. Kawata and H. M. Huang (2010). "Effects of cryopreservation of intact teeth on the isolated dental pulp stem cells." *J Endod* 36(8): 1336–40.
- Lewin B. *Genes VIII*. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall; 2004: 987
- Lumsden, A. G. (1988). "Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ." *Development* 103 Suppl: 155–69.
- Magallanes Fabián, Miriam, Carmona Rodríguez, Bruno, & Álvarez Pérez, Marco Antonio. (2010). Aislamiento y caracterización parcial de células madre de pulpa dental. *Revista odontológica mexicana*, 14(1), 15–20.
- Marks PA, Miller T, Richon VM. Histone deacetylases. *Curr Opin Pharm* 2003; 3: 344–351
- Miller, J. C. et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nature Biotech.* 25, 778–785 (2007).

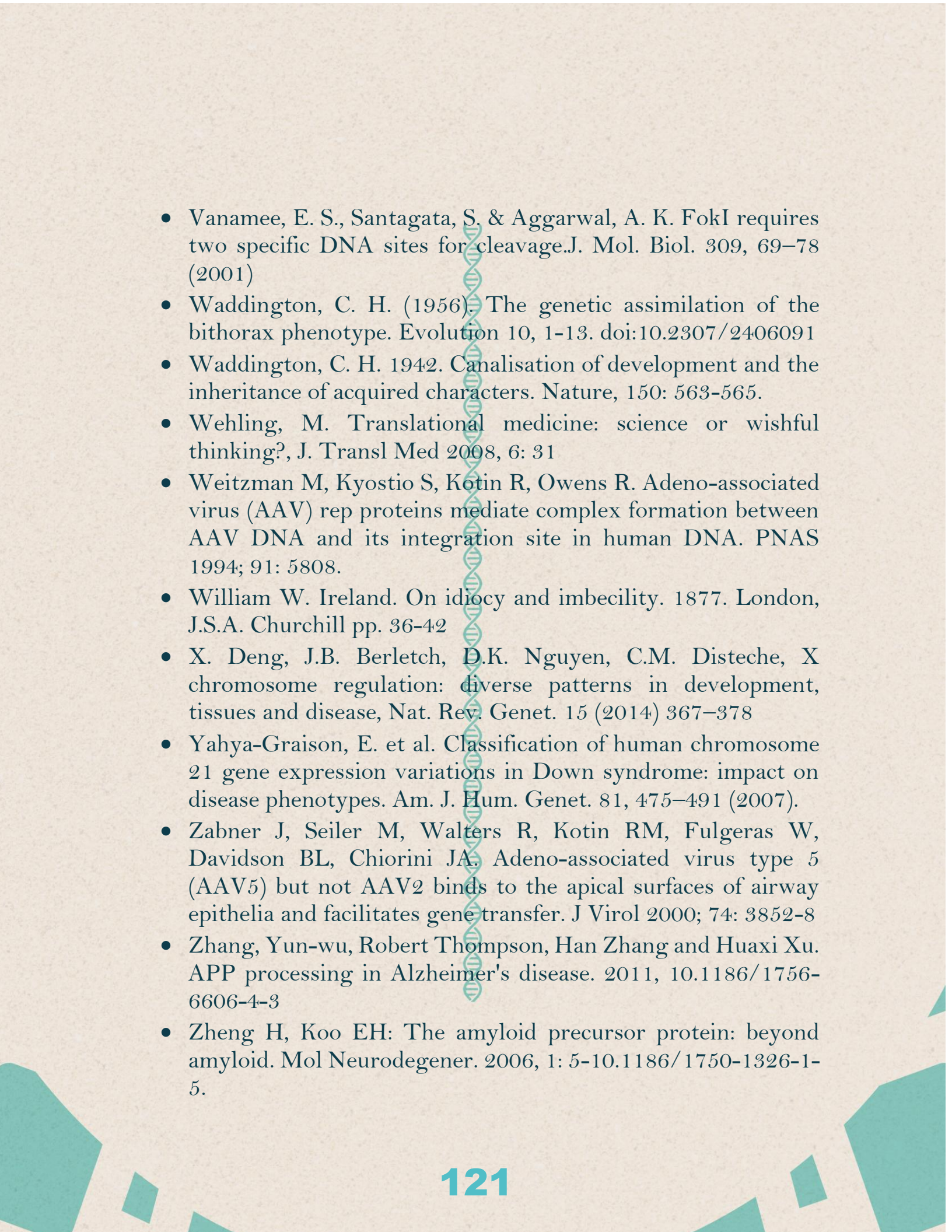
- Moehle EA, et al. Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:3055–3060
- Monahan PE, Samulski J. Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons? *Mol Med Today* 2000; (6): 433-40
- Morsy MA, Caskey CT. Expanded-capacity adenoviral vectors the helper-dependent vectors. *Mol Med Today* 1999; 5: 18-24.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; 393: 386-389
- Narvaiza I, G. Mazzolini, C. Qian, J. Prieto, I. Melero, Vectores adenovirales de primera generación, el vector por excelencia en inmunoterapia génica del cáncer, División de Terapia Génica. Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA). Clínica Universitaria y Facultad de Medicina. Universidad de Navarra, Pamplona (Navarra), España. Vol. 22 / Núm 2/ Abril-Junio 2003: 225-242
- Nolte, R. T., Conlin, R. M., Harrison, S. C. & Brown, R. S. Differing roles for zinc fingers in DNA recognition: structure of a six-finger transcription factor IIIA complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 2938–2943 (1998).
- Orphanet versión 5.02.0- Last update 2017-03-22, Last update of the text 25/10/2015 http://www.orpha.net/consor/cgi.bin/Education_AboutRareDisease.php?Ing=EN Consultada 23 de marzo del 2017

- Patricia M López Morales, Rubén López Pérez, Gustavo Parés Vidrio, Aida Borges Yáñez, Leticia Valdespino Echaurren. (2000). Reseña histórica del síndrome de Down. AMD, 193-199.
- Peña Ramirez, Y. (2015). edición de genomas con nucleasas sitio-dirigidas. CONACYT <http://www.conacyt.mx>. Disponible en: <http://www.conacyt.mx/cibiogem/images/cibiogem/Herramientas-ensenanza-investigacion/Seminarios/Docs/Ed-genomas-nucleasas-dirigidas.pdf> Consultado el día 17 de abril del 2017.
- Petersen A. Health: 2006: The genetic conception of health: is it as radical as claimed? 10: 481-500.
- Philip L. FELGNER, “Terapia génica sin virus”, Investigación y Ciencia, nº 251, Agosto de 1997, pp. 52-57.
- Posada, M., Martín-Arribas, C., Ramírez, A., Villaverde, A., & Abaitua, I. (2008). Enfermedades raras: Concepto, epidemiología y situación actual en España. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 31(Supl. 2), 9-20.
- Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X, Samulski RJ. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 2002; 76(2): 791-801.
- Ramalle-Gómara E, González MA, Perucha M, Quiñones C, Lezaun ME, Posada-De la Paz M, en nombre del Grupo REPIER (Red de Investigación Epidemiológica de Enfermedades Raras). Mortalidad por la enfermedad de Huntington en España en el período 1981-2004. *Rev Neurol* 2007; 45: 88-90.
- Real academia de ciencias exactas, físicas y naturales. Diccionario esencial de las ciencias. Madrid: Espasa Calpe; 2001: 335

- 
- Reuland-Bosma W, van der Reijden WA, van Winkelhoff AJ: Absence of a specific subgingival microflora in adults with Down's syndrome. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 1004–1009. C Munksgaard, 2001.
 - Reyes, R. R. (2009). Síndrome de Down y logopedia. Cultivalibros.
 - Richards, B. W. (1974). Investigation of 142 mosaic mongols and mosaic parents of mongols; Cytogenetic analysis and maternal age at birth. *Journal of Mental Deficiency Research*, 18, 199-208.
 - Robertson KD. DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene* 2002; 21: 5361–5379
 - Rodríguez Arnaiz, Rosario y et. al. (2005). Conceptos básicos de genética. Universidad Nacional Autónoma de México. 978-607-02-7969-0
 - Roizman B. The function of herpes simplex virus genes: A primer for genetic engineering of novel vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:11307–12.
 - Ruch, J. V. (1985). "Odontoblast differentiation and the formation of the odontoblast layer." *J Dent Res* 64 Spec No: 489-98.
 - Russell WC. Update in adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 2000; 81: 2573-604.
 - Samulski RJ, Chang LS, Shenk T. Helper free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 1989; 63: 3822-8.
 - Sandoval RAS, Salazar MAM, Armendáriz-Borunda J; Vectores virales en terapia génica. Ventajas de los vectores adenoasociados; *Rev Gastroenterol Mex* 2005

- Shuttleworth GE. Mongolian imbecility. Br Med J 1886; 2: 661-5
- Sierra Romero María del Carmen, Eduardo Navarrete Hernández , Sonia Canún Serrano , Aldelmo E. Reyes Pablo y Javier Valdés Hernández. (2014). Prevalencia del síndrome de Down en México utilizando los certificados de nacimiento vivo y de muerte fetal durante el periodo 2008-2011. doi: 10.1016/j.bmhimx.2014.09.002
- Sinanan, A. C., N. P. Hunt and M. P. Lewis (2004). "Human adult craniofacial muscle-derived cells: neural-cell adhesionmolecule (NCAM; CD56)-expressing cells appear to contain multipotential stem cells." Biotechnol Appl Biochem 40(Pt 1): 25-34.
- Smith CA, Woodruff LS, Rooney C, Kitchingman GR. Extensive crossreactivity of adenovirus-specific cytotoxic T cells. Hum Gen Ther 1998; 9(10): 1419-27.
- Smith, A. J. and H. Lesot (2001). "Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair?" Crit Rev Oral Biol Med 12(5): 425-37
- Smith, T. T. (1896) 'A peculiarity in the shape of the hand in idiots of the mongol type.' Pediatrics, 2, 315-320
- Sonoyama, W., Y. Liu, D. Fang, T. Yamaza, B. M. Seo, C. Zhang, H. Liu, S. Gronthos, C. Y. Wang, S. Wang and S. Shi (2006). "Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine." PLoS One 1: e79.
- Sonoyama, W., Y. Liu, T. Yamaza, R. S. Tuan, S. Wang, S. Shi and G. T. Huang (2008). "Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study." J Endod 34(2): 166-71.
- Soutullo D. Terapia génica ayer y hoy. 2002. Disponible en: <http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/tgdaniel.htm> consultado el 03 de abril del 2017
-

- Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000; 403: 41-45
- Sun ZW, Allis CD. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 2002; 418: 104-108)
- Takahashi, Kazutoshi. Yamanaka, Shinya. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors, *Cell*, Volumen 126, Issue 4, 25 Agosto 2006, Páginas 663-676, ISSN 0092-8674
- Tecles, O., P. Laurent, S. Zygouritsas, A. S. Burger, J. Camps, J. Dejou and I. About (2005). "Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury." *Arch Oral Biol* 50(2): 103-8.
- Theodore FRIEDMANN, "Problemas de la terapia génica", *Investigación y Ciencia*, nº 251, Agosto de 1997, pp. 44-50.
- Thesleff, I. and P. Sharpe (1997). "Signalling networks regulating dental development." *Mech Dev* 67(2): 111-23.
- Tom STRACHAN y Andrew P. READ, *Genética molecular humana*, Ediciones Omega, S. A., Barcelona, 1999
- Universidad de Navarra, Facultad de ciencias, Departamento de Genética, Asignatura: Human molecular genetics, 2011-2012, Disponible en: <http://www.unav.es/ocw/genetica/tema11-4.html> consultado el día 07 de abril del 20017.
- Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet.* 2010;11:636-646
- Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL. Adenoviridae. In: *Virus taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* San Diego Academic Press; 2000, p. 227-38.

- 
- Vanamee, E. S., Santagata, S. & Aggarwal, A. K. FokI requires two specific DNA sites for cleavage. *J. Mol. Biol.* 309, 69–78 (2001)
 - Waddington, C. H. (1956). The genetic assimilation of the bithorax phenotype. *Evolution* 10, 1-13. doi:10.2307/2406091
 - Waddington, C. H. 1942. Canalisation of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*, 150: 563-565.
 - Wehling, M. Translational medicine: science or wishful thinking?, *J. Transl Med* 2008, 6: 31
 - Weitzman M, Kyostio S, Kotin R, Owens R. Adeno-associated virus (AAV) rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *PNAS* 1994; 91: 5808.
 - William W. Ireland. On idiocy and imbecility. 1877. London, J.S.A. Churchill pp. 36-42
 - X. Deng, J.B. Berletch, D.K. Nguyen, C.M. Disteche, X chromosome regulation: diverse patterns in development, tissues and disease, *Nat. Rev. Genet.* 15 (2014) 367–378
 - Yahya-Graison, E. et al. Classification of human chromosome 21 gene expression variations in Down syndrome: impact on disease phenotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 475–491 (2007).
 - Zabner J, Seiler M, Walters R, Kotin RM, Fulgeras W, Davidson BL, Chiorini JA. Adeno-associated virus type 5 (AAV5) but not AAV2 binds to the apical surfaces of airway epithelia and facilitates gene transfer. *J Virol* 2000; 74: 3852-8
 - Zhang, Yun-wu, Robert Thompson, Han Zhang and Huaxi Xu. APP processing in Alzheimer's disease. 2011, 10.1186/1756-6606-4-3
 - Zheng H, Koo EH: The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener.* 2006, 1: 5-10.1186/1750-1326-1-5.



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACION DE DIENTES

No. De Expediente Clínico _____

Yo _____ en pleno uso de mis facultades, por mi propio derecho, de manera libre e informada, manifiesto donar el (los) diente (s) _____, el día _____ de _____ del 20____.*

Nombre del donador _____

Firma _____

Declaración del prestador de servicio:

He explicado al paciente o persona autorizada para otorgar el presente consentimiento, el uso que se hará en el proyecto de investigación con título "Cultivo de pulpa dental de dientes temporales de sujetos con Síndrome de Down". El paciente donante _____ ha comprendido la explicación y ha consentido la donación del (los) diente (s) _____.

Clínica Odontológica _____

Nombre del prestador del servicio _____

Firma _____

*Reglamento de la Ley General de Salud en materia de control sanitario de la disposición de órganos y tejidos y de cadáveres de seres humanos en los Artículos 313, 314 (Párrafos III, IV, X, XIII), 315 (Párrafos I, III, IV), 316, 317, 317 BIS 1, 319, 323 (Párrafos I y II), 327, y los demás relativos y aplicaciones.