



**Universidad
Zaragoza**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Miogénesis en el tracto gastrointestinal.

Revisión bibliográfica y Diseño de proyecto

Autor:

Oscar Morales González

Directora:

Dra. M^a José Luesma Bartolomé

**Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía e Histología Humana
Curso Académico 2016-2017**

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS:

ABREVIATURAS.....	5
1. JUSTIFICACIÓN	7
2. INTRODUCCIÓN	9
2.1 Tejido muscular.....	9
2.2 Importancia de células musculares lisas. Relación/ implicación en patologías.	10
2.3 Breve recuerdo anatómico de las capas del tracto gastrointestinal.	11
2.4 Escaso conocimiento del desarrollo embrionario /fetal y de la regeneración de las células musculares lisas a nivel del tracto gastrointestinal.	15
2.5 Importancia de la Medicina Regenerativa como nuevo paradigma.	17
2.6 Recuerdo de los mecanismos de regeneración celular. Célula Madre, Mitosis, Desdiferenciación/Transdiferenciación.	18
3. OBJETIVOS	23
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA. ESTADO DEL ARTE.	25
5. DISEÑO DEL PROYECTO.....	33
5.1-Hipótesis	33
5.2-Objetivos.....	33
5.3-Método experimental y fases de trabajo	34
3-1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	34
3-2 MÉTODO EXPERIMENTAL Y FASES DEL ESTUDIO.....	36
6. CONCLUSIONES:	49
BIBLIOGRAFÍA	51

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- ASCs: células madre adultas, de su traducción del inglés “*adult stem cells*”
- DMEM: medio de águila modificado de Dulbecco, de su traducción del inglés “*Dulbecco's modified eagle's medium*”
- FACS: clasificación células activadas por fluorescencia, de su traducción del inglés “*fluorescence activated cell sorting*”
- ICC: células intersticiales de Cajal, de su traducción del inglés “*interstitial cell of Cajal*”
- ICQ: inmunocitoquímica
- ISMC: célula muscular lisa intestinal, de su traducción del inglés “*intestinal smooth muscle cell*”
- MyoD: diferenciación miogénica, de su traducción del inglés “*myogenic differentiation*”
- PBS: tampón fosfato salino, de su traducción del inglés “*phosphate buffer saline*”
- SM 22 α : proteína 22 α del músculo liso, de su traducción del inglés “*smooth muscle 22 α* ”
- SM ALFA-ACTINA: alfa actina del músculo liso, de su traducción del inglés “*smooth muscle alfa-actina*”
- SM MHC: cadena pesada de miosina del músculo liso, de su traducción del inglés “*smooth muscle myosin heavy chain*”
- SMC: célula muscular lisa, de su traducción del inglés “*smooth muscle cell*”
- SMemb: músculo liso embrionario, de su traducción del inglés “*smooth muscle embryonic*”
- SNA: sistema nervioso autónomo
- TBS: tampón Triss salino, de su traducción del inglés “*tris buffer saline*”
- VSMC: célula muscular lisa vascular, de su traducción del inglés “*vascular smooth muscle cell*”

1. JUSTIFICACIÓN

Las células del músculo liso intestinal (ISMC *Intestinal Smooth Muscle Cell*) son un componente crucial del tracto gastrointestinal del adulto y apoyan la diferenciación intestinal, el peristaltismo y la homeostasis epitelial durante el desarrollo. A pesar de estos roles críticos, el origen de las ISMC y los mecanismos responsables de su diferenciación y función, siguen siendo ampliamente desconocidos en los vertebrados (1), y lo mismo ocurre con sus procesos de regeneración tisular.

La disfunción intestinal es una condición clínica grave caracterizada por la pérdida de motilidad, de la función de absorción y la desnutrición. Los tratamientos actuales no proporcionan la solución óptima para los pacientes debido a las numerosas complicaciones resultantes (2).

Se conocen bastante bien los procesos que tienen lugar en la renovación de la mucosa intestinal. Las células madres pluripotenciales dan lugar a cuatro tipos diferentes de linajes epiteliales: enterocitos, células caliciformes productoras de mucus, células de Paneth y células enteroendocrinas. Estas células madre se localizan en posiciones específicas y expresan ciertas moléculas que las caracterizan. También se conoce que durante los procesos de regeneración ciertas células mesenquimales subyacentes a las células epiteliales, juegan un papel directo en la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células epiteliales.

Del mismo modo que lo hacen las células epiteliales, deberán de regenerarse (quizás con una tasa de renovación menor) el resto de los componentes celulares implicados en la funcionalidad del tracto gastrointestinal (neuronas, células gliales, células musculares lisas...).

JUSTIFICACIÓN

Las células musculares lisas son células heterogéneas con un amplio rango de fenotipos distintos en diferentes estadios de desarrollo, e incluso en organismos adultos se pueden encontrar células no totalmente diferenciadas. Así mismo se encuentra heterogeneidad, además de fenotípica, en su ontogénesis.

Esta heterogeneidad en sus características y origen, hace de la célula muscular lisa una población de la que se desconoce con exactitud los mecanismos de regeneración “in vivo” y de la que existe una bibliografía escasa, confusa y poco concluyente al respecto.

La oportunidad de explorar los diferentes mecanismos de regeneración tales como la mitosis, la desdiferenciación o la generación de células musculares lisas a partir de células madres adultas residentes, incluso conseguir caracterizar y expandir in vitro las células madre progenitoras de músculo liso, tendría múltiples aplicaciones incluyendo la ingeniería de órganos y tejidos dentro de la Medicina Traslacional.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Tejido muscular.

El cuerpo humano tiene la capacidad de moverse, desplazar la sangre y otros materiales a lo largo de la luz de las estructuras tubulares que forman parte de su organismo gracias a la presencia de células elongadas, especializadas y dotadas de la capacidad de contracción. Las células musculares se caracterizan por poseer grandes cantidades de proteínas contráctiles (actina y miosina) en su citoplasma, y por su particular organización celular en el tejido. Estas células musculares se dividen en tres grupos: estriadas, las cuales presentan bandas alternas claras y oscuras; lisas, carentes de estas bandas; y cardíacas con característica intermedias entre las anteriores.

Para funcionar de forma eficiente al efectuar movimientos, la mayoría de las células musculares se agrupan en diferentes haces que se distinguen con facilidad del tejido que los rodea (1,3).

Estas células constituyen el músculo esquelético, liso y cardíaco respectivamente.

- El **músculo esquelético** se une típicamente al esqueleto a través de los tendones, también se conoce comúnmente como músculo estriado debido a su morfología estriada cuando se observa bajo el microscopio. Está innervado por el sistema nervioso somático bajo control voluntario.
- El **músculo liso** se encuentra distribuido por todo el cuerpo. En general en forma de haces o láminas de células fusiformes alargadas con finos extremos agudizados. La célula muscular lisa también llamada fibra, carece del patrón estriado que se encuentra en los músculos cardíaco y esquelético, está especializada en contracciones lentas y prolongadas, se puede contraer a modo

INTRODUCCIÓN

de onda y producir movimientos peristálticos como los del tubo digestivo y la vía espermática del varón; o la contracción puede ocurrir en todo el músculo al mismo tiempo para producir movimientos expulsivos. Como característica exhibe una actividad contráctil espontánea en ausencia de estímulos nerviosos. La contracción suele estar regulada por neuronas posganglionares del sistema nervioso autónomo (SNA), la mayor parte del músculo liso está innervado en forma directa por los nervios simpáticos y parasimpáticos.

- El **músculo cardíaco** conforma el miocardio en el corazón; es estriado en apariencia y debido a la presencia de un marcapaso eléctrico las células cardíacas se contraen de una manera rítmica y coordinada para generar latidos cardíacos, bajo el control del sistema nervioso autónomo (4).

2.2 Importancia de células musculares lisas. Relación/ implicación en patologías.

Las células del músculo liso (SMCs) constituyen una proporción vital de varios órganos, formando parte de diferentes tejidos y del proceso constante de renovación. A diferencia de los músculos esqueléticos o cardíacos que se diferencian terminalmente, las SMCs en animales adultos conservan una plasticidad notable y pueden experimentar cambios profundos y reversibles en el fenotipo, en respuesta a cambios en las señales ambientales locales (5). Esta plasticidad inherente también se observa en SMCs gastrointestinales.

La formación y función del músculo liso son críticas en el desarrollo y en la vida postnatal. “In vivo” podemos encontrar células musculares lisas en múltiples localizaciones como en el sistema vascular, donde desarrollan un importante papel en la angiogénesis, en el mantenimiento de vasos y en la regulación de la presión sanguínea.

INTRODUCCIÓN

También encontramos células musculares lisas en diferentes órganos, especialmente pertenecientes a los sistemas respiratorio, genitourinario y gastrointestinal (6-8).

Estas células musculares lisas están implicadas en las principales enfermedades que afectan al hombre, tales como aterosclerosis, cáncer e hipertensión arterial.

A nivel del tracto gastrointestinal, existe una gran variedad de enfermedades digestivas y cada una tiene síntomas concretos, aunque hay algunos que son comunes a la mayoría: inflamación, dolor o dificultad para hacer las deposiciones, pérdida de peso sin aparente razón, náuseas o vómitos, dolor abdominal, diarrea y reflujo. Estos trastornos de la motilidad pueden ser por fallo en el propio músculo digestivo (disfunciones miopáticas), o en los mecanismos de control (neuropáticas intrínsecas o extrínsecas). Todo esto conlleva a la reducción de la actividad social y afecta significativamente la calidad de vida de los pacientes y al riesgo de complicaciones (cáncer de esófago, sangrado esofágico-gástrico, estenosis, perforación), siendo esto uno de los problemas más apremiantes de la medicina del siglo XXI (1, 3).

2.3 Breve recuerdo anatómico de las capas del tracto gastrointestinal.

Se puede describir el tracto gastrointestinal simplemente como “un tubo con paredes musculares, que va desde la boca hasta el ano” (4). La pared del tubo varía en cada compartimento, pero sin embargo la estructura básica es la misma a través de todo el tracto gastrointestinal. Gracias a estas variaciones las diferentes partes realizan diferentes funciones (4) ***Figura 1.***

INTRODUCCIÓN

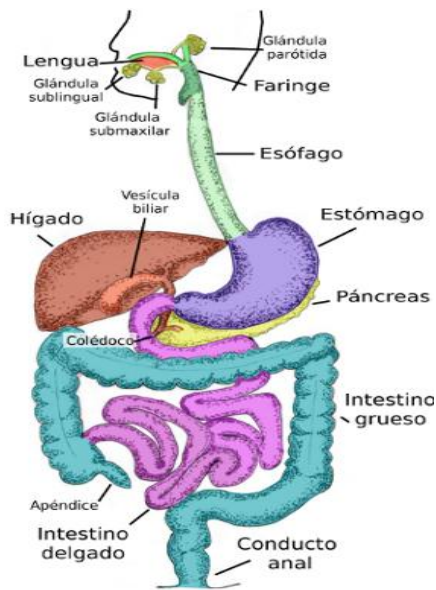


Figura 1. Esquema de los diferentes componentes del sistema digestivo. Adaptado de Atlas de histología vegetal y animal.

https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/guiada_o_a_08digestivo.php. Accedido 01-10-17.

El tracto gastrointestinal es esencialmente un tubo formado por cuatro capas de tejidos: un revestimiento mucoso, una capa submucosa de tejido conectivo en el que están embebidas los principales vasos sanguíneos del tubo, una capa muscular y una capa fibrosa.

- 1- La **mucosa** es la capa más interna de la pared gastrointestinal, está en contacto con la luz o el espacio abierto del tubo, se denomina mucosa o capa mucosa. Está compuesta a su vez de tres capas.
 - Epitelio mucoso interno, denominado mucosa.
 - Una capa de tejido conjuntivo fibroso laxo, denominado lámina propia.
 - Unas delgadas capas de tejido muscular liso, denominada muscular de la mucosa (*muscularis mucosae*).
- 2- La **capa submucosa** del tubo digestivo está compuesta por tejido conjuntivo y es más gruesa que la capa mucosa. Contiene numerosas glándulas pequeñas,

INTRODUCCIÓN

vasos sanguíneos y nervios parasimpáticos que forman parte del plexo submucoso (plexo Meissner).

3- La **muscular** es una capa espesa de tejido muscular que envuelve la submucosa. Esta porción se caracteriza por una capa interna de músculo liso circular y otra externa longitudinal, entre estas dos capas encontramos situado el plexo de Auerbach o mientérico.

4- La **capa serosa** es la más externa de la pared gastrointestinal y está constituida por una membrana serosa, que en realidad corresponde a la capa visceral del peritoneo (la membrana serosa que tapiza la cavidad abdominal y cubre sus órganos) (9) **Figuras 2, 3.**

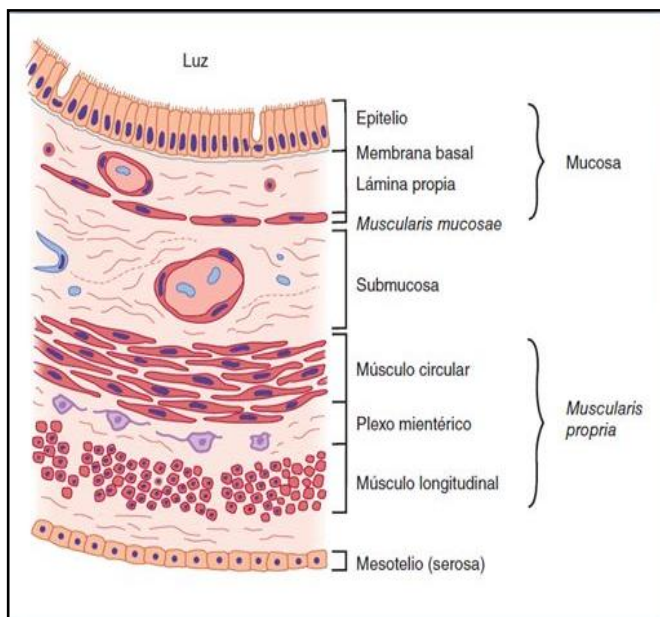


Figura 2. Organización de la pared del Intestino hacia capas funcionales. (Adaptación con autorización de Madara J. and Anderson J.: Textbook of Gastroenerology, 4th ed.,pp151-165. Copyright Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 2003).

INTRODUCCIÓN

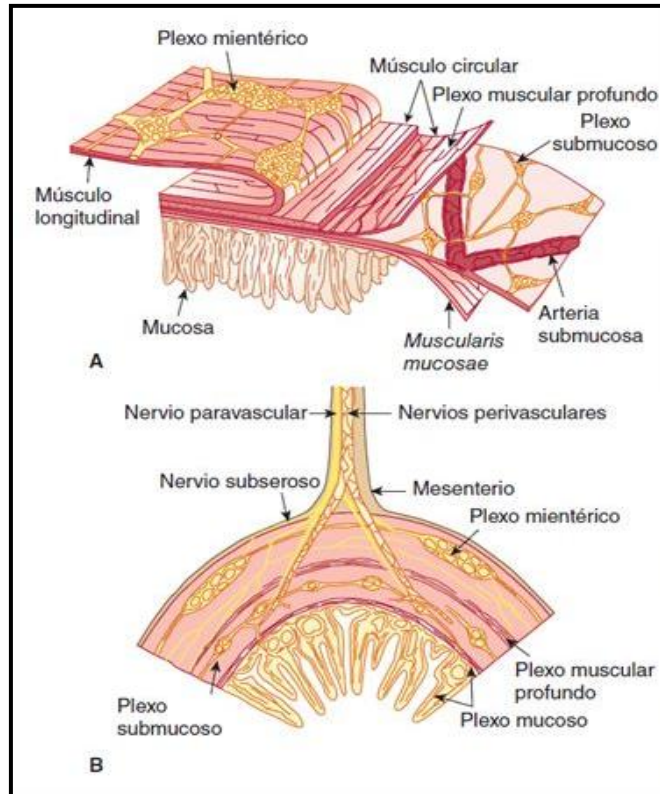


Figura 3. Organización de la pared del Intestino hacia capas funcionales.(Adaptación con autorización de Madara J. and Anderson J.: Textbook of Gastroenerology, 4th ed.,pp151-165. Copyright Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 2003).

Un elemento a resaltar es la presencia de las células intersticiales de Cajal (ICC) que se han encontrado en todo el tracto gastrointestinal humano, desde el esófago (10, 11) hasta el esfínter interno del ano (12, 13). Estas células muestran diferentes patrones de organización y características morfológicas dependiendo de su localización anatómica, de tal manera que de acuerdo con estos criterios se clasifican en varios subtipos. La forma y disposición de cada subtipo de ICC se determina principalmente por su relación con los plexos nerviosos locales, la orientación de la capa de músculo liso en la que están contenidos, y la frecuencia de las conexiones entre ellos (14) **Figura 4.**

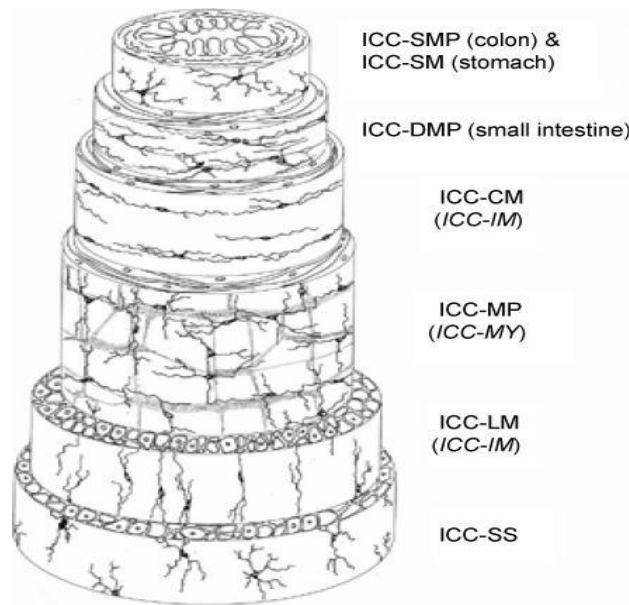


Figura 4. Representación esquemática de los subtipos de ICC que se encuentran en las diferentes capas del tracto gastrointestinal. Células intersticiales de Cajal asociadas al plexo mientérico (ICCMP), submucoso (ICC-SMP), y muscular profundo (ICC-DMP); a la capa submucosa (ICC-SM), muscular circular (ICC-CM), muscular longitudinal (ICC-LM) y serosa (ICC-SS). Komuro, 2006 (14).

2.4 Escaso conocimiento del desarrollo embrionario /fetal y de la regeneración de las células musculares lisas a nivel del tracto gastrointestinal.

A pesar de su crucial contribución a la función orgánica, poco se sabe sobre la ontogenia y los programas de desarrollo genético que impulsan la diferenciación de SMCs en vertebrados, ni de los procesos de su renovación en adultos. Un desafío clave para estudiar los mecanismos de desarrollo y diferenciación de las SMCs surge de su complejo origen, ya que proceden de tipos de células aparentemente múltiples y a veces desconocidas, pudiendo derivar del mesodermo, de la cresta neural e incluso del órgano proepicardial (6).

Las SMCs surgen de diversas poblaciones de células precursoras durante el desarrollo embrionario, y los mecanismos que especifican el fenotipo de células de músculo liso en cada una de estas poblaciones de células son en gran parte desconocidos (7). Las vías

INTRODUCCIÓN

moleculares que regulan su desarrollo a partir de precursores mesenquimales no se conocen suficientemente (8). No existen marcadores bien caracterizados disponibles para la identificación de los progenitores de SMC per se, que por definición, se especifican para un destino de músculo liso, pero no expresan proteínas marcadoras de SMC diferenciadas (15).

La formación del tejido maduro se realiza a través de la diferenciación de precursores en células musculares, y mediante la organización de estas células en un complejo tejido donde la distribución y la orientación de las células musculares, el despliegue de abundantes materiales extracelulares y la adición de otros elementos celulares como células intersticiales, fibroblastos y vasos sanguíneos son características (16).

La diferenciación de las células progenitoras musculares lisas está regulada por una gran variedad de estímulos intracelulares y ambientales, y los músculos en desarrollo exhiben un amplio espectro de fenotipos diferentes en distintas etapas de su desarrollo. Esta plasticidad fenotípica no sólo está presente en el músculo liso en desarrollo, sino que se mantiene durante la vida adulta del individuo. Hasta la fecha no se han identificado factores de transcripción que sean característicos para el linaje de células musculares lisas. Sin embargo, se ha demostrado que el factor de respuesta sérico regula la mayoría de los genes marcadores de diferenciación del músculo liso. También se ha comprobado que las células musculares lisas se desarrollan a partir de la división y diferenciación de células endoteliales y pericitos, durante el proceso de reparación después de una lesión vascular (3).

Las células del músculo liso intestinal, son un componente crucial del tracto gastrointestinal del adulto y apoyan la diferenciación intestinal, el peristaltismo y la homeostasis epitelial durante el desarrollo. A pesar de estos roles, el origen y los

INTRODUCCIÓN

mecanismos responsables de su diferenciación y función siguen siendo ampliamente desconocidos en los vertebrados. Así como los mecanismos de regeneración/repación en el adulto (17).

2.5 Importancia de la Medicina Regenerativa como nuevo paradigma.

La nueva era de la Terapia Génica y la Medicina Regenerativa ha comenzado, y contribuirá a construir un nuevo paradigma de gran magnitud que pasa por el tratamiento y el cuidado de determinadas enfermedades empleando células, tejidos, moléculas y otros componentes biológicos, con el objetivo de restituir la forma, las funciones y las propiedades de los tejidos o, incluso, de órganos dañados. La evolución de estas áreas científicas emergentes está íntimamente relacionada con su comprensión y su aplicación, así como con las posibilidades que ofrece el conocimiento de las células madre, sus procesos de regulación y los factores ambientales que influyen en su diferenciación (8).

Las enfermedades degenerativas causadas por lesiones traumáticas, defectos genéticos, el envejecimiento y el estilo de vida constituyen el problema sanitario más importante en los países desarrollados; enfermedades que tienen un efecto devastador en el bienestar y la calidad de vida de las personas afectadas. Una característica común es que en todas ellas aparecen dañados o ausentes ciertos tipos de células, lo que provoca la disfunción del correspondiente órgano o tejido (18).

Actualmente la Medicina Regenerativa y la Terapia Celular se presentan como un nuevo paradigma de la medicina, donde se pretende sustituir o complementar la medicina paliativa más tradicional por otra que fomenta la capacidad del cuerpo a curarse a sí mismo, a partir del uso de células vivas como agentes terapéuticos, objetivo de la

INTRODUCCIÓN

Terapia Celular. En este campo ya se vienen haciendo intervenciones con éxito como es el trasplante de médula, o injertos de piel en quemados graves y existen otras aplicaciones potenciales de tratamientos en enfermedades malignas como el cáncer de mama, ovario, testicular, carcinoma renal, melanoma, tumores cerebrales primarios, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso, diabetes, regeneración cardíaca y cirrosis (19).

La estrategia que se utiliza depende de cuál sea más apropiada o de la naturaleza del tejido y de la extensión del daño a reparar. En general, el trasplante de células y la inducción farmacéutica de la regeneración se han utilizado para corregir deficiencias tisulares pequeñas, mientras que el tejido bioartificial se ha utilizado para corregir defectos tisulares de mayor tamaño (20). Por otra parte, y todavía en el terreno experimental, las células madre capaces de ser progenitoras de otros tipos celulares serían una fuente inagotable para reparar tejidos y órganos, y servir de terapia en enfermedades que tienen su base en la degeneración y muerte celular. Su utilización alberga grandes esperanzas médicas a medio plazo.

Es importante comprender los desafíos o dificultades a los que se enfrentan los investigadores con células madres. El trasplante de intestino delgado rara vez se realiza clínicamente para el tratamiento del síndrome de intestino corto porque es difícil superar la poderosa respuesta de rechazo. Se espera que la medicina regenerativa pueda superar este problema (21, 22).

2.6 Recuerdo de los mecanismos de regeneración celular. Célula Madre, Mitosis, Desdiferenciación/Transdiferenciación.

Todos los órganos que integran el cuerpo, incluido el tracto gastrointestinal, se encuentran en constante estado de renovación tisular, producto del desgaste de su propio

INTRODUCCIÓN

funcionamiento y su participación en numerosos procesos sistémicos. Es de señalar que en todas sus porciones es víctima del efecto nocivo de gran número de sustancias, en especial drogas farmacológicas.

La regeneración es un proceso de reparación que restaura la arquitectura original de un tejido al recapitular parte de su desarrollo embrionario original. Se lleva a cabo como un proceso de mantenimiento (regeneración homeostática) o cuando hay daños (regeneración inducida por lesiones) (23).

El grado de habilidad regenerativa varía entre las especies. Los vertebrados en general regeneran tejidos tales como sangre, hueso, músculo y epitelio, mediante la proliferación y diferenciación de células madre de reserva o mediante hiperplasia compensatoria, como en el hígado. Pero en vertebrados no mamíferos como *urodeles* (salamandras y tritones) y algunos reptiles (lagartos) se puede regenerar una amplia gama de estructuras complejas mediante la creación de células madre locales por dediferenciación celular (24). Sin embargo, hay varios informes que sugieren que, bajo ciertas condiciones, las células diferenciadas de mamíferos pueden ser inducidas a dediferenciarse o, en un proceso relacionado, reprogramar sus núcleos para asemejarse a un estado de desarrollo anterior (1).

La mayoría de los órganos de seres vertebrados, utilizan mecanismos de regeneración tisular (células madres adultas) para mantener la homeostasis y asegurar una reparación celular adecuada (25).

Existen varios mecanismos de regeneración tisular en vertebrados: la hiperplasia compensatoria, activación de células madres adultas de reserva, la dediferenciación de células maduras y la transdiferenciación.

1- Hiperplasia compensatoria.

INTRODUCCIÓN

La hiperplasia compensatoria, a partir de procesos mitóticos, es la proliferación de células diferenciadas para regenerar tejido nuevo. La división celular por mitosis se trata de una división simétrica en la que se produce dos células hijas fenotípicamente y genéticamente idénticas entre sí. Puede ocurrir en las células de los individuos eucariontes tanto haploides como diploides.

2- Activación de células madres adultas residentes o circulantes.

En la vida embrionaria o fetal, existen subconjuntos de células limitadas por el linaje no totalmente diferenciadas, que se reservan como células madres adultas (ASCs, de su traducción del inglés *Adults Stem Cell*). Estas células pueden residir dentro de un tejido o circular en la sangre. Algunas intervienen en el crecimiento juvenil después del nacimiento y otras para la regeneración a lo largo de la vida (26, 27). Las ASCs tienen varias características; son autorrenovables y típicamente se dividen asimétricamente para dar lugar a una célula igual a sí misma que asegura la auto-renovación y otra célula que no es exactamente igual a la anterior y que se encuentra comprometida en una dirección tisular. Tienen diferentes grados de potencial desarrollo, dependiendo del tejido que sirven y/o donde se encuentren en la etapa de desarrollo de un linaje dado. La regeneración a través de ASCs es la vía más común de regeneración tisular (28, 29).

La célula madre o *stem cell* tiene la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse para producir diversos tipos de células especializadas. Por su potencial de diferenciación, se clasifican en células totipotentes, pluripotentes o multipotentes. Existen células madres en el embrión, el feto y el adulto.

La Terapia Celular consiste en sustituir células dañadas o ausentes, por células sanas. Algunas investigaciones recurren a células fetales en proceso de diferenciación; el futuro de estas células en el campo de la investigación es incierto, ya que su origen

INTRODUCCIÓN

plantea problemas éticos y, sobre todo, porque podrían sustituirse favorablemente por células adultas. Las células madres embrionarias, aisladas de embriones humanos, conservan la capacidad casi infinita para dividirse y algunas de sus líneas guardan sus propiedades pluripotenciales aun después de diez años de cultivo. Las células madre adultas son una alternativa para las células embrionarias. Si se confirma su plasticidad, se concebirá la reprogramación del destino de una célula madre, de tal forma que siga nuevas vías de diferenciación; proceso conocido como transdiferenciación (30, 31).

3- Desdiferenciación.

La desdiferenciación es una pérdida de especialización fenotípica que convierte las células adultas diferenciadas, en células madre, las cuales luego proliferan y se diferencian en tejidos de reemplazo (32). La desdiferenciación es un mecanismo relativamente común de regeneración en vertebrados inferiores. Los peces regeneran las aletas por desdiferenciación, y ciertas especies de lagarto pueden regenerar colas por este mecanismo. Los renacuajos anuros, las larvas y anfibios, utilizan la desdiferenciación para generar una amplia variedad de tejidos y estructuras complejas que los mamíferos no pueden regenerar, incluyendo extremidades, colas, lente, médula espinal, retina neural e intestino (33).

4-Transdiferenciación.

Otra opción que sigue la naturaleza para regenerar un tejido perdido o dañado es la transdiferenciación. El proceso de transdiferenciación requiere que una célula ponga en marcha mecanismos de desdiferenciación y rediferenciación que darán como punto final otro tipo celular. Ésta consiste en la transformación de una célula diferenciada disponible, en una célula con otras funciones o de diferente linaje que se necesita sustituir.

INTRODUCCIÓN

De forma natural la transdiferenciación ocurre en dos pasos:

- a. La célula se desdiferencia.
- b. Se activa el programa de desarrollo natural que permite que la célula se diferencie en el nuevo linaje celular que se necesita (34).

3. OBJETIVOS

Por todo ello, en el presente trabajo de fin de máster se plantea como objetivo una profunda revisión bibliográfica sobre el estado actual en materia de regeneración del músculo liso a nivel gastrointestinal, y el diseño metodológico de lo que pretende ser un trabajo más ambicioso, consistente en la exploración de los mecanismos regenerativos descritos anteriormente a nivel del tracto gastrointestinal.

- 1- Revisión bibliográfica (Estado del Arte).
- 2- Diseño del proyecto posterior. (Objeto de tesis doctoral).

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA. ESTADO DEL ARTE.

Tras realizar una revisión bibliográfica sobre los **mecanismos de regeneración** (descritos en el apartado “Introducción”) presentes en el músculo liso del tracto gastrointestinal, hemos encontrado escasa o poca literatura concluyente que arroje conocimiento sobre los mismos; de ahí que hayamos abierto el espectro a una búsqueda de los mecanismos observados en la regeneración de músculo liso en otras localizaciones fuera del tracto gastrointestinal, e incluso de otras estirpes musculares, que pueda servir como modelo en el diseño de nuestro proyecto a largo plazo.

De este modo, la literatura consultada con respecto a los diferentes mecanismos podría ser resumida de la siguiente manera:

1- Con respecto al **primer mecanismo**, la **hiperplasia del músculo liso intestinal**, fue descrita por Gabella, quien observó cómo las células musculares aumentan en número mediante mitosis de células completamente diferenciadas (35, 36). La aparición de mitosis y la degeneración de algunas SMC se observa ocasionalmente en cualquier músculo visceral y en todo momento de la vida, también, en hipertrofia por sobrecarga, en la que las células musculares viscerales pueden duplicar o triplicar su volumen (37). Los mecanismos implicados en el crecimiento hipertrófico son desconocidos. Se discuten tres posibles factores: factores mecánicos (especialmente el estiramiento), la descarga nerviosa alterada y los factores tróficos (38).

2- En relación al **segundo mecanismo**, la **reserva y la activación de células madre adultas**, no se ha demostrado que el intestino sea una fuente de SMCs; es decir, los precursores o células musculares indiferenciadas no se observan dentro del músculo para su posterior desarrollo (37), aunque no se puede descartar que la población de células madre circulantes pueda dar lugar a células similares a músculo liso. Sin embargo, la generación de nuevas células de músculo liso a partir de precursores mesenquimales ha sido bien documentada en diferentes lugares como el útero humano adulto. Estas células precursoras se han descrito como similares a miofibroblastos o células musculares inmaduras, que se convierten en células musculares diferenciadas durante la fase lútea o al inicio del embarazo (4).

Por otra parte, existe alguna evidencia de que los pericitos y SMCs podrían originarse a partir de células madre mesenquimales multipotentes, aunque el origen de estas células murales y los cambios moleculares asociados con remodelación vascular mediada por pericitos todavía están mal entendidos (4, 5, 38).

3- El **tercer mecanismo** de regeneración; **la desdiferenciación**.

La desdiferenciación es un mecanismo por el cual la célula muscular lisa recupera un fenotipo de célula menos diferenciada, y se caracteriza por la pérdida de expresión de marcadores génicos de célula adulta tales como la SM α -actina, SM myosin heavy chain (SMMHC) y SM 22 α (15). Éste es un proceso bien estudiado y documentado en cardiomiocitos y células musculares lisas vasculares; no en el caso de las células del músculo liso del intestino, donde hay poca literatura sobre la miogénesis. En este

sentido, destacaremos trabajos relacionados con el proceso de desdiferenciación en el tracto gastrointestinal en vertebrados mamíferos y no mamíferos.

- En relación a las células musculares lisas vasculares, la desdiferenciación celular, se ha descrito en los mecanismos de reparación vascular. En el paradigma clásico, la lesión de la pared vascular induce diferenciación de células musculares lisas vasculares, su proliferación y migración, de la túnica media hacia la íntima, para la reparación tisular, en respuesta a una lesión o enfermedad (39). De este modo, las células del músculo liso arterial cambian de un fenotipo contráctil a uno sintético caracterizado por la proliferación activa (39). En este sentido, es bien sabido que el músculo liso muestra una gran plasticidad fenotípica conocida como “modulación fenotípica”, lo cual hace referencia a la alteración de su fenotipo hacia otros menos diferenciados, en respuesta a estímulos extracelulares (40). La citada “modulación fenotípica” de las células musculares lisas vasculares es esencial para el desarrollo y la progresión de enfermedades vasculares tales como la arterioesclerosis o la estenosis (41). Este mecanismo de “modulación fenotípica” se ha documentado en cultivos “in vitro” de células musculares lisas arteriales, donde se observan cambios en la morfología celular y en la expresión de las isoformas de actina (42). Demostrándose una disminución en las expresiones de los marcadores de SMC: SM alfa-actina (alfa actina de músculo liso), SM MHC (cadena pesada de miosina de músculo liso) y SM 22 α (proteína 22 α de músculo liso) (43). Por estas modulaciones del proceso de desdiferenciación, parece lógico pensar que la disminución en la síntesis de proteínas del citoesqueleto resulte en su desorganización, observable a nivel ultraestructural y en una modificación de su

perfil inmunocitoquímico (ICQ). De hecho, a nivel experimental se ha observado que después de varios días de cultivo, las contracciones en las células musculares lisas cesan y experimentan proliferación (43).

- En cuanto a los cardiomiocitos, el proceso de desdiferenciación también se ha descrito en esta estirpe de células musculares. Teniendo en cuenta que la enfermedad cardíaca es la principal causa de muerte en el mundo occidental, la desdiferenciación de cardiomiocitos se encuentra actualmente en estudio y está asociada a la regeneración. Aunque su función es, en gran parte, desconocida. Se ha demostrado que la desdiferenciación de cardiomiocitos aumenta la resistencia al estrés y la supervivencia celular, (44) siendo un proceso adaptativo del miocardio, (45) más que una respuesta adversa. Aunque el corazón de los mamíferos no puede regenerarse vigorosamente después de que cesa la proliferación de cardiomiocitos, los cardiomiocitos posnatales se desdiferencian después de la lesión (46). Este proceso se caracteriza por desaparición de patrones altamente organizados de miosinas, titina y desmina, que favorecen la desorganización de los sarcómeros y generan un estado parecido al fenotipo de los cardiomiocitos embrionarios y fetales (47), que incluso reexpresan marcadores de cardiomiocitos embrionarios como alfa-actina de músculo liso (46, 48). Szibor et al. (49) resumen la remodelación de cardiomiocitos como: reestructuración del aparato contráctil; reordenamiento del citoesqueleto; y cambios en el metabolismo energético; modulaciones caracterizados por cambios en la expresión de genes específicos de cardiomiocitos “maduros” e “inmaduros”. En otros ordenes filogenéticos como en el pez cebra (50) y en los

tritones anfibios (51), los cardiomiocitos se regeneran eficientemente después de la lesión (e incluso bajo ciertas condiciones, pueden re-expresar varios genes de células madre, -50-), existiendo una proliferación de cardiomiocitos desdiferenciados, que se rediferencian después de una fase de proliferación para recuperar un estado completamente funcional. Los mamíferos podrían haber adquirido vías de señalización que inhiben esta diferenciación completa (48).

- En relación a la miogénesis de las células del músculo liso intestinal, (propósito del proyecto de investigación cuyo diseño se presenta en este trabajo), no existe gran evidencia bibliográfica.

* En general, en el campo de la gastroenterología, se ha postulado que las condiciones micro-ambientales alteradas, incluida la microbiota, pueden desencadenar la remodelación del SMC entérico, que implica cambios fenotípicos y las consiguientes alteraciones de la contracción y deterioro de la motilidad intestinal. Este cambio se acompaña de una pérdida de diferenciación con disminución de la expresión de los marcadores contráctiles, así como una mayor proliferación, síntesis y liberación de varias moléculas de señalización (52, 53).

* El proceso de **desdiferenciación en el tracto gastrointestinal de vertebrados no mamíferos**, es bien conocido (*“in vivo”*) en la especie *Holothuria glaberrima* (pepino de mar), donde la regeneración intestinal implica una notable desorganización de la capa muscular con desdiferenciación de miocitos. Esta desdiferenciación celular implica la activación nuclear, las interrupciones de las uniones intercelulares y la pérdida del aparato contráctil por la formación

y eliminación de estructuras fusiformes (54). Otros estudios histológicos basados en el marcaje de 3H-timidina, después de la sección transversal del tritón (55) y la rana adulta (56), indican que las células serosas y de músculo liso en cada extremo cortado del intestino, experimentan dediferenciación y proliferan para formar un blastema mesenquimal que regenera las paredes intestinales. La formación del blastema representa una fase de transición en la que las células intestinales responden a la lesión con dediferenciación para convertirse en células progenitoras embrionarias, que reponen el tejido dañado. El mecanismo de regeneración de anfibios por dediferenciación es de importancia, ya que la comprensión de este mecanismo puede ofrecer información sobre cómo inducir químicamente la regeneración de tejidos en los mamíferos (33). Todos estos resultados podrían sugerir que parte del programa regenerativo que ocurre en los vertebrados no mamíferos permanecería en el intestino de los mamíferos y podría proporcionar una base para estudiar la dediferenciación en las células musculares lisas del intestino de mamíferos.

* Acerca del proceso de **dediferenciación en el tracto gastrointestinal en mamíferos**, se ha encontrado escasa bibliografía. McGeachie (57) llevó a cabo un estudio ultraestructural sobre la regeneración de la musculatura lisa de la tenia del colon (del latín, “*taenia coli*”) del conejillo de Indias, después de una lesión por aplastamiento. Tras el análisis evolutivo del tejido, notificó la rápida regeneración del tejido muscular liso, y observó la presencia de pequeñas células con forma de huso que invadieron la zona lesionada, la mayoría de las cuales, a los 7 días del aplastamiento, habían asumido el tamaño y las características morfológicas de células musculares lisas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En base a la revisión bibliográfica realizada, se puede afirmar que la miogénesis en el tracto gastrointestinal de los mamíferos sigue sin estar clara y, en particular, el proceso de desdiferenciación de las células del músculo liso a este nivel aún no ha sido descrito claramente desde el punto de vista morfológico e inmunocitoquímico, ni tampoco se han identificado células madre locales.

Sin embargo, el conocimiento actual acerca del proceso de desdiferenciación en el tejido muscular liso (sobre todo vascular) permite plantear, como punto de partida en el estudio de la desdiferenciación del tejido muscular liso intestinal, varias premisas:

- La modulación fenotípica en respuesta a estímulos extracelulares, se acompaña por una pérdida de diferenciación y disminución en la expresión de marcadores de proteínas del citoesqueleto (responsables de la contractilidad celular), lo que podría complementarse con una re-expresión de marcadores embrionarios (40, 42).

Las SMCs provienen de poblaciones diversas de precursores celulares durante el desarrollo embrionario, y los mecanismos por los cuales se alcanza el fenotipo celular de músculo liso en cada una de estas poblaciones se desconocen en gran medida (58).

No hay disponibilidad de marcadores bien diferenciados para la identificación de progenitores de SMCs, (19) y según refiere la bibliografía, entre los marcadores más utilizados, la cadena pesada de miosina de músculo liso (SM-MHC) parece ser la más específica. Ninguno de los marcadores restantes (α -SMA, SM22 α , SM-MHC, calponina, caldesmona, smoothelin y, más recientemente, miocardina), podrían considerarse estrictamente como específicos del músculo liso, debido a su expresión compartida en varios tipos de células relacionadas, incluyendo cardiomiocitos, células mioepiteliales, miofibroblastos, células estrelladas y fibroblastos activados (59).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La SM-MHC, presenta tres isoformas: *SMI*, *SM2* y *SMemb*. *SMI* se expresa en células musculares lisas adultas y embrionarias, *SM2* lo hace sólo en células adultas mientras que *SMemb* es expresada sólo durante la embriogénesis. *SMemb* parece específica para el fenotipo embrionario (60). Por lo que se seleccionó este marcador para el estudio inmunohistoquímico del proyecto de investigación expuesto a continuación; así como el marcador Myo D, por ser un factor de regulación miogénica.

Por último, es de interés **distinguir** el proceso de **Desdiferenciación**, del proceso de **Apoptosis**. Una célula apoptótica clásica tiene una morfología muy distintiva: la cromatina se condensa alrededor de la membrana nuclear y con frecuencia aparece en forma de media luna. Sin embargo, en el proceso de desdiferenciación, nunca se ha observado la condensación de la cromatina en cuerpos apoptóticos, y, por el contrario, el núcleo celular parece presentar actividad transcripcional (61).

5. DISEÑO DEL PROYECTO

5.1-Hipótesis

En la búsqueda bibliográfica acerca de los conocimientos sobre la regeneración/repación de las células de musculatura lisa a nivel del tracto gastrointestinal y de sus mecanismos de regeneración celular en general, se puede deducir, resumir y concretar las siguientes hipótesis.

Se desconoce con exactitud los mecanismos de regeneración de las células musculares lisas a nivel del tracto gastrointestinal “in vivo”. Una posible hipótesis sería, además de cierta capacidad mitótica de dichas células, la existencia en el adulto de células indiferenciadas o poco diferenciadas capaces de convertirse bajo determinadas circunstancias en células musculares lisas. Quizás las propias células musculares sufran un proceso de desdiferenciación que les facilitara recuperar características de células musculares menos diferenciadas antes de sufrir de mitosis; e incluso tampoco podemos excluir la presencia de otras poblaciones celulares que, tras un proceso de transdiferenciación, se encaminaran hacia células musculares lisas.

5.2-Objetivos

Centrado en la búsqueda de evidencias compatibles con procesos regeneración/repación tisular de desdiferenciación descritos en la bibliografía, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Explorar la existencia de células adultas precursoras de células musculares lisas.
2. Caracterizar el nicho tisular de dichas células.

3. Explorar el proceso de desdiferenciación de células musculares lisas maduras e incluso la transdiferenciación de otras estirpes celulares locales en células musculares lisas; ambos procesos compatibles con la existencia de progenitores.

5.3-Método experimental y fases de trabajo

3-1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la consecución de los objetivos anteriores nos planteamos realizar un estudio de tipo experimental y observacional a 4 años; que será abordado en diferentes fases en las que utilizaremos una combinación de distintas metodologías de la siguiente manera:

- 1- En una primera fase se pretende caracterizar los posibles mecanismos de regeneración incluidas las posibles células progenitoras y la identificación de mediante técnicas histoquímicas, inmunohistoquímicas y de microscopía electrónica.
- 2- En una segunda fase se plantea aislar estas células mediante técnicas de separación celular (FACS: Immunofluorescence activated cell sorting).
- 3- En una tercera fase se pretende cultivar y conseguir la proliferación de estas células progenitoras.
- 4- En la cuarta fase, se buscaría la caracterización fenotípica de dichas células en las diferentes fases de crecimientos en cultivos celulares.

Puesto que tratamos de buscar evidencias sobre los mecanismos de regeneración/reparación del músculo liso, el diseño experimental parte de la obtención de fragmentos intestinales de animales de experimentación y de biopsias humanas, sobre los que se realizarán las técnicas que expondremos a continuación.

DISEÑO DEL PROYECTO

Como animales de experimentación utilizaremos:

- Ratones CD1 y ratas Wistar utilizados como modelo ya que de ellos existen diferentes animales transgénicos comercializados, que pueden proporcionarnos datos complementarios; así como conejos de experimentación. De estos animales utilizaremos tres grupos de edad: recién nacidos, jóvenes y adultos para valorar el índice de regeneración en función de la edad.

Durante la extracción de los fragmentos intestinales, se tomarán muestras de las diferentes partes del tubo digestivo: esófago, estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon) e intestino grueso (ciego, colon, recto).

Con relación a las muestras humanas utilizaremos:

- Fragmentos intestinales humanos obtenidos de piezas de resección quirúrgica enviadas a biopsiar al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital clínico Lozano Blesa, asegurándonos de que la patología por la que ha sido remitido al centro no afecta al correcto funcionamiento ni a la motilidad intestinal. Los fragmentos utilizados provienen de los extremos distales de resección en los que el patólogo habrá definido la falta de alteración morfológica. Todas las muestras serán recogidas tras informe consentido de los pacientes.

Tanto para la obtención de muestras animales como humanas se solicitarán los preceptivos permisos a la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza y al Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA).

DISEÑO DEL PROYECTO

3-2 MÉTODO EXPERIMENTAL Y FASES DEL ESTUDIO

El estudio experimental se llevará a cabo en las siguientes fases como se ha mencionado anteriormente, según la metodología experimental utilizada:

1ª FASE: Las células progenitoras de células musculares lisas, presentarán una combinación de marcadores de diferenciación que nos permitirá su identificación tisular. Lo mismo ocurrirá con procesos de diferenciación en los que las células musculares lisas deberían expresar marcadores de estadios menos diferenciados. Podremos así realizar también una valoración cuantitativa inicial para conocer si partimos de una población celular suficiente para intentar su aislamiento en la fase 2.

Metodología experimental: Caracterización inmunohistoquímicas "in situ" de estas células progenitoras utilizando marcadores específicos de células madre mesenquimales: CD73, CD90, CD 105, y por otra parte marcadores de precursores de células musculares lisas gastrointestinales: SMembr y MyoD, en combinación con marcadores específicos de proliferación (Ki67, BrdU).

Para ello utilizaremos:

- Técnicas inmunohistoquímicas sobre cortes de parafina. Método "En Vision"
- Técnicas de inmunofluorescencia sobre cortes de parafina, utilizando anticuerpos secundarios unidos a fluoróforos de distinta longitud de onda para poder establecer la colocalización de los distintos anticuerpos primarios mediante microscopía confocal.

MÉTODO “EN VISION”

Se realizará tal, como se describe en el Trabajo Final de Master de Doña Carmen Bergas (62) que recoge el protocolo utilizado en el Departamento de Anatomía e Histología Humanas por el Grupo de Investigación B83: “Neurobiología: Células Madre Adultas” dirigido por la Profesora Doctora Concepción Junquera, de la siguiente manera:

El método “En Vision”, es un método inmunohistoquímico desarrollado por la casa Dako, con una alta sensibilidad, y que puede aplicarse tanto a secciones de tejido incluidas en parafina como a secciones de tejido congelado. Esta técnica “En Vision” se basa en la unión del anticuerpo secundario a un polímero de dextrano de gran tamaño, que puede llevar asociadas hasta ocho moléculas de peroxidasa, lo que amplía enormemente la señal. Las piezas se fijarán de 6 a 12 horas en una solución de formaldehído al 10%, neutralizado con metanol purísimo (Panreac 143091). Una vez fijadas, se pasan directamente (sin lavar) al alcohol, para seguir el proceso estándar de inclusión en parafina. Los cortes se recogen en portas gelatinizados, se dejan secar toda la noche y al día siguiente se meten en estufa a 56°C durante unos minutos. Se llevan a xilol 20 minutos (dos pasos de 10 minutos cada uno), para seguir la rehidratación de forma convencional.

Técnica: método En Vision DAko®. Para una mejor recuperación antigénica se colocan las preparaciones en un cestillo dentro de una olla a presión, en la que se pone: 200cc de tampón citrato (Dako S2031) + 1800cc de agua destilada; es importante controlar el pH = 6 con NaOH 0.2 M. Cuando se inicia la ebullición se cuentan 3 minutos, se enfría hasta perder presión y se deja 20 minutos más; después se lavan los cortes con agua destilada durante 3 minutos.

DISEÑO DEL PROYECTO

La peroxidasa endógena se inhibe con un bloqueante (Dako S2001), colocando una gota encima de cada corte, y lavando en PBS o solución tampón buffer (3 lavados de 3 minutos cada uno). Se diluye el anticuerpo primario, según concentraciones indicadas, utilizando el diluyente de anticuerpos (Dako S2022), y se pone una gota del anticuerpo primario encima de cada corte. Se incuba de 30 minutos a 2 horas en cámara oscura. Después de 3 lavados de 3 minutos cada uno en PBS, se coloca una gota del anticuerpo secundario, conjugado con el polímero enzimático, encima de cada corte (Dako K5007) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Realizados 3 lavados en PBS de 3 minutos cada uno se procede al revelado mediante DAB (Diaminobencidina) 1 ml + cromógeno 1 µm (Dako K3468) colocando una gota encima de cada corte durante 10 minutos. Después de 3 lavados en agua destilada, se contrasta el tejido con hematoxilina de Harris 10 segundos, para, a continuación deshidratar los cortes y montar con DPX.

INMUNOFLUORESCENCIA

Para la realización de esta técnica utilizaremos piezas previamente incluidas en parafina, realizaremos los cortes histológicos que tendremos que desparafinar y rehidratar. Para ello realizaremos una serie de pasos, que consisten en sumergir la pieza en soluciones por un periodo de tiempo determinado. En primer lugar, introduciremos los portos en Xilol 2 veces durante 10 minutos, continuamos con pases en Alcoholes de 100°, 96° y 70° respectivamente con una duración de 4 minutos y lavamos con PBS (Phosphate Buffered Saline) dos pases de 3 minutos de duración. Concluida esta primera fase proseguimos a la fijación en metanol durante 5 minutos, dejamos secar 20 minutos y volvemos a lavar en PBS en 3 pases de 5 minutos y seguidamente lavamos en buffer bloqueantes (PSB+Triton+BSA), 2 pases de 15 minutos. Realizaremos una incubación

DISEÑO DEL PROYECTO

con una mezcla de los anticuerpos primarios con un tiempo máximo de 20 horas, lavamos nuevamente en PBS 3 pases de 5 minutos, preparamos incubación con mezcla de anticuerpos secundarios fluorocromos durante 90 minutos, continuaremos con lavado en PBS en 3 pases de 5 minutos, incubación con DAPI (marca DNA) 1 minuto, volvemos a lavar en PBS en 3 pases de 5 minutos y finalmente montamos en solución Dako para inmunofluorescencia. **Figura 5.**



Figura 5. Equipamiento de laboratorio para tinción de muestras

2ª FASE: Las células progenitoras deberán presentar características ultraestructurales de células indiferenciadas (núcleo voluminoso, escaso citoplasma, etc...), fenotípicamente podrán distinguirse de las células diferenciadas de su entorno. En los procesos de desdiferenciación también deberán observarse modificaciones morfológicas de las células musculares lisas conducentes a adquirir características fenotípicas de una célula mesenquimal. Este proceso implica la pérdida del fenotipo contráctil y la activación nuclear para preparar la célula para la proliferación o una posible transición a un tipo de célula mesenquimal.

Metodología experimental: Caracterización ultraestructural de dichas células mediante la observación de:

DISEÑO DEL PROYECTO

- Cortes semifinos realizados en ultramicrotomo teñidos con azul de toluidina, como fase previa para retallar y realizar cortes ultrafinos de células previamente seleccionadas.
- Desarrollo de la técnica de inmuno-oro para determinados anticuerpos (CD73, CD90, CD105, SMemb y MyoD) para el marcaje positivo de las células precursoras musculares, así como las desdiferenciadas; técnica que permitirá la correlación entre microscopía electrónica e inmunohistoquímica a través del marcaje con oro coloidal.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (M.E.)

Se realizará, tal como se describe en el Trabajo Final de Máster de Doña Carmen Bergas (62), de la siguiente manera:

Las piezas de tejido para M.E., se retallan controladamente bajo lupa y se fijan en 1 ml de glutaraldehído al 25% + 4 ml de solución de tampón Millonig (fosfato monosódico al 2.26%, hidróxido sódico al 2.5%, glucosa al 5.4%, cloruro cálcico al 1%) a pH=7.3. Las piezas permanecen en esta mezcla de 4 a 5 horas a temperatura de 4°C tras las cuales, se lavan durante 20 minutos con solución de tampón de Millonig; después pueden permanecer en la nevera durante meses.

La inclusión de las piezas se realiza durante 5 días de la siguiente manera:

PRIMER DÍA: fijación durante 2 horas en Fijador de Palade (una parte de solución de osmio al 2%, una parte de solución tampón). La solución de osmio supone 1 gr de osmio, 25 ml de agua destilada; se realiza siempre bajo campana extractora por la gran toxicidad de los vapores, dejándola posteriormente en frasco de cristal oscuro herméticamente cerrada y a 4°C. La solución tampón

DISEÑO DEL PROYECTO

supone 10 ml de acetato sódico al 1.904%, 10 ml de Veronal sódico al 2.58%, 10 ml de ácido clorhídrico 0.1N y 20 ml de agua destilada. Seguidamente se lavan las piezas con tampón de Palade en 3 tandas de 15 minutos cada una. Se procede a la inmersión en cubetas de acetona de gradación ascendente (30% durante 15 minutos, al 50% 2 tandas de 15 minutos, 70% 2 tandas de 15 minutos). El contraste se realiza con acetato de uranilo (2 g de uranilo en 100cc de acetona al 70%, se agita durante 1 hora completamente a oscuras), y se dejan las piezas hasta el día siguiente. Antes de ser utilizada la solución del acetato de uranilo debe ser centrifugada durante 20 minutos a 3000 revoluciones.

SEGUNDO DÍA: se realiza la inmersión de las muestras en 2 tandas de acetona al 90% durante 15 minutos cada una, 2 tandas de acetona al 100% una de 15 minutos y otra de 30 minutos, tras la cual se introduce en sulfato de cobre, en saturación con acetona al 100% durante 30 minutos. Posteriormente otros 30 minutos en sulfato de cobre, 2 tandas de 60 minutos en óxido de propileno, en nevera y la inclusión en araldita I (endurecedor 10 ml + plastificante 0.15 ml + resina 10 ml). El proceso continúa con la inmersión en 3 partes de óxido de propileno + 1 de araldita I 120 minutos, 120 minutos en 2 partes de óxido de propileno + 3 partes de araldita I hasta el día siguiente.

TERCER DÍA: inclusión en araldita I durante 30 minutos, 120 minutos incluida en araldita I en estufa a 50°C, quedando las piezas inmersas en araldita hasta el día siguiente.

CUARTO/QUINTO DÍA: inclusión en araldita II (endurecedor 10 ml, acelerador 0.4 ml, plastificante 0.15 ml, resina 10 ml) durante 30 minutos, a continuación en araldita II en 2 tandas, estufa a 50°C durante 30 minutos y una

DISEÑO DEL PROYECTO

segunda tanda en estufa 60 minutos. Se incluyen en cápsulas, dejando en estufa a 70°C durante 48 horas como mínimo. Y por último, la salida de la inclusión, en la que se sacan los bloques de araldita con las piezas incluidas de las cápsulas y se las etiquetaba convenientemente según la rutina del laboratorio de microscopía electrónica.

El tallado de los bloques se realiza con un piramidotomo, eliminando la araldita sobrante hasta llegar a la pieza, para el corte se utilizan cuchillas de vidrio con balsa recoge cortes. Los cortes semifinos, de 1-0.5 μm , se realizan con cuchilla de diamante, en un ultramicrotomo RMC (MT XC Biotecnology Tools, Arizona). **Figura 6.**



Figura 6. Ultramicrotomo RMC (MT XC Biotecnology Tools, Arizona)

La tinción de los cortes se realiza con gotas de azul de toluidina (agua destilada 50 ml, tetraborato de sodio 0.5 g, azul de toluidina 0.25 g, agitado durante dos horas y filtrado), colocadas en los cortes semifinos sobre plancha caliente.

Se realiza una selección a microscopio óptico de los cortes semifinos y se realizan cortes ultrafinos a 600 Å, se recogen en la balsa con la cuchilla en alcohol al 30% y se colocan en las rejillas de cobre de 200 retículas.

DISEÑO DEL PROYECTO

Se contrastan las muestras según el método Reynolds por inmersión en el reactivo de plomo (1.33 g de nitrato de plomo, 1.76 g de citrato sódico en 30 ml de agua destilada desionizada, 8 ml de hidróxido sódico 1N y se diluye hasta 50 ml pH=12) durante 5-30 minutos y se lava con hidróxido sódico 0.02N de 2 a 5 minutos; posteriormente se lavan varias veces con agua destilada.

La observación de las muestras obtenidas se realiza en un microscopio electrónico de la casa GEOL (JM-1010), acoplado a una cámara digital de la casa GATAN Inc. (Pleasanton, CA).

INMUNO-ORO POSTEMBEDDING

Para la realización de esta técnica seguiremos una serie de pasos, según el protocolo diseñado para nuestro estudio, los cuales se describen a continuación:

Sobre cortes flotantes (50-70 μ m) se aplica Borohidruro al 1% en H₂O, 30 minutos*: se puede hacer sobre las rejillas sumergiéndolas o colocadas en un soporte durante 15 min. (Eliminar enlaces fijadores). Continuaremos durante todo el proceso sumergiendo la pieza en diferentes soluciones y niveles de concentración:

- Ácido periódico 1% en H₂O (filtrar). (Eliminar resina) 10 minutos.
- Lavar en H₂O (filtrar) 3 pases de 3 minutos c/u.
- Secar las rejillas con papel de filtro.
- Metaperiodato sódico 2% en H₂O (filtrar). (Eliminar Os) 15 minutos.
- Lavar en H₂O (filtrar). 3 pases de 3 minutos c/u.

DISEÑO DEL PROYECTO

- Secar las rejillas con papel de filtro.
 - *• Borohidruro al 1% en, H₂O sino se aplicó antes. 30 minutos.
 - TBS: Tris-HCl 0.05 M pH 7.4 + NaCl 0.9% (filtrar). 3 minutos.
 - Incubar en Ovoalbúmina al 1% en TBS (filtrar). (Bloqueo) 30 minutos.
 - Lavar en TBS (filtrar). 2 pases de 10 minutos c/u.
 - Secar las rejillas con papel de filtro.
 - Incubar con lo diversos anticuerpos a sus correspondientes concentraciones en TBS con NGS 1%. Durante 2 horas.
 - Lavar en TBS (filtrar). 2 pases de 10 minutos c/u.
 - Lavar en TB (Tris-ClH 0.05M, pH 7.6) con 1% BSA y 0.5% Tween-20. Durante 10 minutos.
 - Secar las rejillas con papel de filtro.
 - Incubar con los anticuerpos marcados con el oro coloidal en TB con 1% BSA y 0.5% Tween-20. En oscuridad y ambiente húmedo. (no filtrar). Durante 2 horas.
- **INTENSIFICAR (opcional)**
- Lavar en H₂O (filtrar). 3 pases de 5 minutos c/u.
 - Contrastar con Acetato de Uranilo (solución saturada en H₂O, 10%) (filtrar). Durante 30 minutos.

DISEÑO DEL PROYECTO

- Contrastar con Citrato de Plomo (filtrar). 10 minutos.

Intensificación:

- Lavar en H₂O. 2 pases de 5 minutos c/u.
- Lavar en PBS. 2 pases x 7 minutos.
- Glutaraldehído 2% en PBS. 2 minutos.
- Lavar con H₂O. 4 pases de 5 minutos.
- Intensificación con plata, mezcla de Timm. (no filtrar). 1 minuto.
- Contrastar con Acetato de Uranilo (solución saturada en H₂O, 10%) 45 minutos. En oscuridad.
- Lavar en H₂O. 3 pases de 5 minutos c/u.

3ª FASE: El estudio "in vitro" permitirá valorar la capacidad proliferativa de estas células en cultivo. Si esta población es pluripotente la utilización de medios específicos de diferenciación o cocultivos con células productoras de determinados factores de crecimiento permitirán definir las distintas rutas que conduzcan a las células hasta su diferenciación final.

Método experimental: Cultivos diferenciales y amplificación. Los cultivos se realizarán:

- A partir de explantes de pequeños fragmentos de la capa muscular del intestino.

DISEÑO DEL PROYECTO

- Tras disgregación enzimática tisular.
- A partir de poblaciones seleccionadas mediante sorting (FACS).

CULTIVOS CELULARES

Para llevar a cabo los cultivos de células “in vitro” y tratar de lograr el desarrollo de los distintos tipos de células para nuestro estudio, aplicaremos el siguiente protocolo:

- Lavar el intestino 5 veces en placas de Petri diferentes.
- Trocear el tejido con tijeras estéril.
- Lavar los fragmentos 3 veces en placas de Petri diferentes.
- Incubación con colagenasa a 2,5mg/ml durante 30 minutos a 100 rpm y 37°C+10µg de DNasa. Añadir 3 ml de medio con antibióticos (sin sueros) + 1 ml de colagenasa a 10 mg/ml. Activación previa de la estufa 1 h a 37°C.
- Disgregar en campana con pipeta durante 10 minutos.
- Filtrar a 40µm.
- Centrifugar durante 2 minutos a 1000 rpm y 25°C. Eliminar el sobrenadante.
- Añadir 2 ml de medio con suero.
- Centrifugar durante 2 minutos a 1000 rpm y 25°C. Eliminar el sobrenadante.
- Resuspender en 1 ml de medio de cultivo.
- Sembrar a la densidad apropiada. 50 000 cel/cm². Un requerimiento importante es cambiar el medio de cultivo cada 48 horas.

DISEÑO DEL PROYECTO

4ª FASE: El aislamiento de poblaciones celulares homogéneas de células progenitoras musculares es fundamental para realizar una caracterización genotípica de las mismas.

Metodología experimental: Aislamiento y análisis mediante citometría de flujo y FACS (fluorescent-activated cell sorting).

- En intestino humano partiremos dos localizaciones distintas: biopsias realizadas de las dos capas musculares (longitudinal y circular).
- En pequeños animales eliminaremos exclusivamente la mucosa, dado que el espesor de la pared intestinal (aproximadamente 2 mm.) no permite un tallaje tan fino.

Tras digestión enzimática y siguiendo protocolos convencionales las células serán seleccionadas por FACS mediante el análisis de marcadores de superficie utilizando cócteles antigénicos (como por ejemplo: CD73, CD90, CD105, SMembr y MyoD), analizándose la distribución de las distintas poblaciones.

FACS

La técnica de FACS se realizará en el CIBA (Centro de Investigación Biomédica de Aragón), donde se llevarán a cabo todos los estudios pertinentes.

1- CRONOGRAMA



En una primera fase se pretende caracterizar los posibles mecanismos de regeneración incluidas las posibles células progenitoras mediante técnicas histoquímicas, inmunohistoquímicas y de microscopia electrónica.



En una segunda fase se plantea aislar células mediante técnicas de separación celular (FACS: Immunofluorescence activated cell sorting).



En una tercera fase pretende cultivar y conseguir la proliferación de estas células progenitoras.



En la cuarta fase, se buscaría la caracterización fenotípica de dichas células en las diferentes fases de crecimientos en cultivos celulares.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES:

- Las **células del músculo liso intestinal** son un componente crucial del tracto gastrointestinal, que apoyan la diferenciación intestinal, el peristaltismo y la homeostasis frente a estímulos extracelulares. A pesar de estos roles fundamentales, los mecanismos responsables de su diferenciación, así como **los mecanismos de regeneración/reparación** en el adulto, siguen siendo **desconocidos** en los vertebrados-mamíferos tal y como atestigua la escasa literatura encontrada al respecto en la búsqueda bibliográfica realizada en el presente trabajo.
- El **proyecto de investigación** (cuyo diseño es planteado en las páginas previas), centra su objetivo principal en la **búsqueda de evidencias acerca de los procesos de regeneración/reparación del tejido muscular liso intestinal**, haciendo hincapié en el proceso de **desdiferenciación** como uno de los mecanismos de reparación del tracto gastrointestinal, junto con la **hiperplasia**, y la reserva de **células madre adultas**; ya que ninguno de los tres procesos son mutuamente excluyentes.
- La consecución del presente proyecto de investigación, debería **aportar luz** no sólo a la **presencia de células desdiferenciadas en la pared del intestino**, que participan en la remodelación del músculo liso intestinal (lo cual parece demostrado), sino también a su **potencial proliferativo**.
- La pérdida de funciones del tracto gastrointestinal está asociada a una **alta tasa de morbilidad y mortalidad**. El desarrollo de técnicas basadas en la biología y diferenciación celular, podrían suponer un futuro prometedor para el campo de la regeneración del tejido intestinal, así como para la planificación de **terapias efectivas**.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Leislie P. Gartner. James L. Hiatt. *Histología Básica*. Barcelona: Elsevier; 2011. p. 94.
- 2- Zakhem E, Tamburrini R, Orlando G, Koch KL, Bitar KN. Transplantation of a Human Tissue-Engineered Bowel in an Athymic Rat Model. *Tissue Eng Part C Methods*. 2017 Nov;23(11):652-60.
- 3- Sanders KM, Ward SM, Koh SD. Interstitial Cells: Regulators of Smooth Muscle Function. *Physiol Rev*. 2014; 94:859-907.
- 4- Pottn Thibodeau. *Anatomía y Fisiología*. 8ª edición. Barcelona: Elsevier; 2013. p. 754-6.
- 5- Owens GR, Regeneration of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev*. 1995;75:487-517.
- 6- Kumar MS, Owens GK. Combinatorial control of smooth muscle-specific gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 May 1;23(5):737-47.
- 7- Chatterji S, Lam CH, Ho CH, Proske DC and Baker AB. Syndecan-1 regulates vascular smooth muscle cell phenotype. *PLoS One*, 2014 Feb 25;9(2):e89824.
- 8- Hoggatt AM, Simon GM, Herring BP. Cell-specific regulatory modules control expression of genes in vascular and visceral smooth muscle tissues. *Circ Res*. 2002 Dec ;91(12):1151-9.
- 9- Collins JT, Bhimji SS. *Anatomy, Abdomen, Small Intestine*. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2017 Oct.
- 10- Faussone-Pellegrini MS, Cortesini C. Ultrastructure of striated muscle fibers in the middle third of the human esophagus. *Histol Histopathol*. 1986 Apr;1(2):119-28.

BIBLIOGRAFÍA

- 11- Torihashi S, Nishi K, Tokutomi Y, Nishi T, Ward S, Sanders KM. Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of Cajal to a smooth muscle phenotype. *Gastroenterology*. 1999 Jul;117(1):140-8.
- 12- Hagger R, Gharaie S, Finlayson C, Kumar D. Regional and transmural density of interstitial cells of Cajal in human colon and rectum. *Am J Physiol*. 1998 Dec;275(6 Pt 1):G1309-16.
- 13- Hagger R, Gharaie S, Finlayson C, Kumar D. Distribution of the interstitial cells of Cajal in the human anorectum. *J Auton Nerv Syst*. 1998 Nov 10;73(2-3):75-9.
- 14- Komuro T. Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *J Physiol*. 2006 Nov 1;576(Pt 3):653-8.
- 15- Deaton RA, Gan Q, and Owens GK. Sp1-dependent activation of KLF4 is required for PDGF-BB-induced phenotypic modulation of smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009;296:1027-37.
- 16- Stasyshyn AR. Gastroesophageal reflux disease: the results of videolaparoscopic fundoplication at five years after surgery. *Wiad Lek*. 2017;70(4):751-3.
- 17- Fisiología y patología de la motilidad gastrointestinal. André J.P.M. Smout, Louis M.A. Akkermans. Peterfield:Wrightson Biomedical;1992. p. 15-17, 42.
- 18- Trowe MO, Airik R, Weiss AC, Farin HF, Foik AB, Bettenhausen E, et al. Canonical Wnt signaling regulates smooth muscle precursor development in the mouse ureter. *Development*. 2012 Sep;139(17):3099-3108.
- 19- Majesky MW, Dong XR, Regan JN, Hoglund VJ. Vascular smooth muscle progenitor cells: building and repairing blood vessels. *Circ Res*. 2011 Feb 4;108(3):365-77.
- 20- Stocum DL. *Regenerative biology and medicine*. Oxford: Elsevier; 2006. p. 11.
- 21- Gabella G. Development of visceral smooth muscle. *Results Probl Cell Differ*. 2002;38:1-37.

BIBLIOGRAFÍA

- 22- Wojciech Pawlina. Histología. Texto y atlas. Correlación con biología molecular y celular. 7º Edición. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2015. p. 367-70.
- 23- Gays D, Hess C, Camporeale A, Ala U, Provero P, Mosimann C, et al. An exclusive cellular and molecular network governs intestinal smooth muscle cell differentiation in vertebrates. 2017 Feb 1;144(3):464-78.
- 24- Zakhem E, Tamburrini R, Orlando G, Koch KL, Bitar KN. Transplantation of a Human Tissue-Engineered Bowel in an Athymic Rat Model. Tissue Eng Part C Methods. 2017 Nov;23(11):652-60.
- 25- Gays D, Hess C, Camporeale A, Ala U, Provero P, Mosimann C, et al. An exclusive cellular and molecular network governs intestinal smooth muscle cell differentiation in vertebrates. Development. 2017 Feb 1;144(3):464-78.
- 26- Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. Cell. 2000 Jan 7;100(1):143-55.
- 27- Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell. 2000 Jan 7;100(1):157-68.
- 28- Baguñà J. Planarians. In: Ferretti P, Géraudie J, editors. *Cellular and Molecular Basis of Regeneration: From Invertebrates to Humans*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.; 1998. p. 135-65.
- 29- Sánchez Alvarado A. Regeneration in the metazoans: why does it happen? Bioessays. 2000 Jun;22(6):578-90.
- 30- Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. Nature. 2001 Nov 1;414(6859):92-7.
- 31- Bishop AE, Buttery LD, Polak JM. Embryonic stem cells. J Pathol. 2002 Jul;197(4):424-9.
- 32- Brockes JP. Progenitor cells for regeneration: Origin by reversal of the differentiated state. In: Ferretti P, Geraudie J (ed). *Cellular and Molecular Basis of Regeneration: From Invertebrates to Humans*. Chichester: John Wiley;1998. p. 63-77.

BIBLIOGRAFÍA

- 33- Stocum DL. Amphibian regeneration and stem cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2004;280:1-70.
- 34- Jopling C, Boue S, Izpisua Belmonte JC. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Feb;12(2):79-89.
- 35- Gabella G. Hypertrophic smooth muscle. I. Size and shape of cells, occurrence of mitoses. *Cell Tissue Res*. 1979 Sep 2;201(1):63-78.
- 36- Gabella G. Hypertrophic smooth muscle. II. Sarcoplasmic reticulum, caveolae and mitochondria. *Cell Tissue Res*. 1979 Sep 2;201(1):79-92.
- 37- Gabella G. Cells of visceral smooth muscles. *J Smooth Muscle Res*. 2012;48(4):65-95.
- 38- Klein D, Meissner N, Kleff V, Jastrow H, Yamaguchi M, Ergün S, et al. Nestin(+) tissue-resident multipotent stem cells contribute to tumor progression by differentiating into pericytes and smooth muscle cells resulting in blood vessel remodeling. *Front Oncol*. 2014 Jun 26;4:169-80.
- 39- Orlandi A, Bennett M. Progenitor cell-derived smooth muscle cells in vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2010 Jun 15;79(12):1706-13.
- 40- Deaton RA, Gan Q, Owens GK. Sp1-dependent activation of KLF4 is required for PDGF-BB-induced phenotypic modulation of smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Apr;296(4):H1027-37.
- 41- Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004;84:767–801.
- 42- Etienne P, Parés-Herbuté N, Mani-Ponset L, Gabrion J, Rabesandratana H, Herbuté S, et al. Phenotype modulation in primary cultures of aortic smooth muscle cells from streptozotocin-diabetic rats. *Differentiation*. 1998 Aug;63(4):225-36.

BIBLIOGRAFÍA

- 43- Zheng JP, Ju D, Shen J, Yang M, Li L. Disruption of actin cytoskeleton mediates loss of tensile stress induced early phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells in organ culture. *Exp Mol Pathol*. 2010 Feb;88(1):52-7.
- 44- Kubin T, Ando H, Scholz D, Bramlage P, Kostin S, van Veen A, et al. Microvascular endothelial cells remodel cultured adult cardiomyocytes and increase their survival. *Am J Physiol*. 1999 Jun;276(6 Pt 2):H2179-87.
- 45- Taegtmeyer H, Sen S, Vela D. Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Feb;1188:191-8.
- 46- Morrissey EE. Rewind to recover: dedifferentiation after cardiac injury. *Cell Stem Cell*. 2011 Nov 4;9(5):387-8.
- 47- Driesen RB1, Verheyen FK, Schaart G, de Mazière A, Viebahn C, Prinzen FW, et al. Cardiotin localization in mitochondria of cardiomyocytes in vivo and in vitro and its down-regulation during dedifferentiation. *Cardiovasc Pathol*. 2009 Jan-Feb;18(1):19-27.
- 48- Kubin T, Pöling J, Kostin S, Gajawada P, Hein S, Rees W, et al. Oncostatin M is a major mediator of cardiomyocyte dedifferentiation and remodeling. *Cell Stem Cell*. 2011 Nov 4;9(5):420-32.
- 49- Szibor M, Pöling J, Warnecke H, Kubin T, Braun T. Remodeling and dedifferentiation of adult cardiomyocytes during disease and regeneration. *Cell Mol Life Sci* 2014;71(10):1907-16.
- 50- Jopling C, Sleep E, Raya M, Martí M, Raya A, Izpisua Belmonte JC. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*. 2010 Mar 25;464(7288):606-9.
- 51- Laube F, Heister M, Scholz C, Borchardt T, Braun T. Re-programming of new cardiomyocytes is induced by tissue regeneration. *J Cell Sci*. 2006 Nov 15;119(Pt 22):4719-29.

BIBLIOGRAFÍA

- 52- Scirocco A, Matarrese P, Carabotti M, Ascione B, Malorni W, Severi C. Cellular and Molecular Mechanisms of Phenotypic Switch in Gastrointestinal Smooth Muscle. *J Cell Physiol.* 2016 Feb;231(2):295-302.
- 53- Mills JC, Sansom OJ. Reserve stem cells: Differentiated cells reprogram to fuel repair, metaplasia, and neoplasia in the adult gastrointestinal tract. *Sci Signal.* 2015 Jul 14;8(385):re8.
- 54- García-Arrarás JE, Valentín-Tirado G, Flores JE, Rosa RJ, Rivera-Cruz A, San Miguel-Ruiz JE, et al. Cell dedifferentiation and epithelial to mesenchymal transitions during intestinal regeneration in *H. glaberrima*. *BMC Dev Biol.* 2011 Oct 17;11:61.
- 55- Odelberg SJ. Cellular plasticity in vertebrate regeneration. *Anat Rec B New Anat.* 2005 Nov;287(1):25-35.
- 56- Sun G, Shi YB. Thyroid hormone regulation of adult intestinal stem cell development: mechanisms and evolutionary conservations. *Int J Biol Sci.* 2012;8(8):1217-24.
- 57- McGeachie JK. A quantitative study of smooth muscle regeneration in the taenia of the guinea pig caecum. *J Anat.* 1970 Jan;106(Pt 1):196.
- 58- April MH, Gina M, Simon B, Paul H. Cell-specific regulatory modules control expression of genes in vascular and visceral smooth muscle tissues. *Circ Res.* 2002;91:1151-9.
- 59-Merkulova-Rainon T, Broquères-You D, Kubis N, Silvestre JS, Lévy BI. Towards the therapeutic use of vascular smooth muscle progenitor cells. *Cardiovasc Res.* 2012 Jul 15;95(2):205-14.
- 60- Bai H, Masuda J, Sawa Y, Nakano S, Shirakura R, Shimazaki Y, et al. Neointima formation after vascular stent implantation. Spatial and chronological distribution of smooth muscle cell proliferation and phenotypic modulation. *Arterioscler Thromb.* 1994 Nov;14(11):1846-53.

BIBLIOGRAFÍA

61- Potten CS, Wilson JW, Booth C. Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. *Stem Cells* 1997;15(2):82–93.

62- Berga MC. Marcadores Salivales en lesiones potencialmente malignas de la cavidad oral y en carcinoma oral de células escamosas. Trabajo Fin de Máster. Zaragoza: Universidad de Zaragoza; 2013-2014.