



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU
EN CÉLULAS MESENQUIMALES OBTENIDAS DE PULPA DENTAL Y CRESTA
NEURAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:
TAPIA OROZCO LUIS OMAR

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Karlen Gazarian
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. José Luna Muñoz
CINVESTAV

Dr. Miguel Morales
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México. Abril 2017



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.

Esta tesis fue realizada en el laboratorio C-134 del departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Karlen Gazarian.

...Y es que allá el tiempo es muy largo. Nadie lleva la cuenta de las horas ni a nadie le preocupan como van amontonándose los años. Los días comienzan y se acaban. Luego viene la noche. Solamente el día y la noche hasta el día de la muerte, que para ellos es una esperanza.

Luvina

Juan Rulfo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres la libertad que me dieron de equivocarme sin condicionar su cariño y el esfuerzo empeñado para darme las mejores oportunidades a su alcance.

A mis hermanos que de alguna u otra forma alegran el día cuando su presencia o recuerdo se asoma. Les agradezco su cariño, aunque las formas de expresarlo no siempre sean las más adecuadas, siempre son la mejor receta para soltar carcajadas.

Gracias a ella quien da motivo a muchas de mis sonrisas, por su cariño y apoyo y porque siempre me ayuda a tener una perspectiva distinta.

A mis amigos, por su comprensión y por el tiempo que no pude darles mientras trabajaba en esta tesis. Tengan seguro que no olvido a nadie con esa simple palabra.

Agradezco también la crítica diferente e inspiradora del responsable del laboratorio, además del apoyo habitual y desinteresado que recibí de mis compañeros, la suma de estos eventos fueron la constante cada día de trabajo.

Al Banco Nacional de Cerebros (CINVESTAV) por sus valiosos aportes al desarrollo de esta tesis.

Termino esta etapa con una perspectiva de la biología completamente distinta a la que tenía cuando comencé el posgrado, esto debido en gran medida a los esfuerzos profesionales de los académicos y administrativos que lo conforman y a la Universidad Nacional Autónoma de México que es en conjunto un esfuerzo titánico que me da la esperanza de un país mejor.

Por último, agradezco la orientación para lograr escribir esta tesis al jurado de examen y el apoyo económico recibido durante todo el posgrado por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1 INTRODUCCIÓN	4
1.1 Expresión y estructura de TAU	4
1.2 Funciones de la proteína TAU.....	6
1.3 Fosforilación de la proteína TAU	8
1.4 Células troncales mesenquimales	9
1.5 Células mesenquimales de pulpa dental (CMPD).....	10
1.6 Diferenciación de células pluripotentes hacia cresta neural	13
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
3 HIPÓTESIS	14
4 OBJETIVO	14
4.1 Objetivos particulares	14
5 METODOLOGÍA	15
5.1 Cultivo primario de células de pulpa dental humana	15
5.2 Criopreservación de células de pulpa dental humana	15
5.3 Caracterización por análisis de tiempo de doblaje.....	16
5.4 Caracterización de células de pulpa dental humana para marcadores de progenitores neurales	16
5.5 Cultivo de la línea celular HEK293	17
5.6 Análisis de la presencia y fosforilación de la proteína TAU en células mesenquimales de pulpa dental humana	17
5.7 Análisis por microscopía confocal.....	18
5.8 Cultivo de células pluripotentes inducidas y diferenciación hacia cresta neural y linaje mesenquimal .	19
5.10 Caracterización de las células de cresta neural obtenidas a partir de iPSCs	20
5.11 Análisis de la expresión y fosforilación de la proteína TAU en células mesenquimales obtenidas a partir de células de cresta neural provenientes de iPSCs.	20
6 RESULTADOS	22
6.1 Cultivo de células de pulpa dental y caracterización para marcadores de progenitores neurales	22
6.2 Presencia y localización de la proteína TAU en células mesenquimales de pulpa dental	22
6.3 Localización celular de epítomos fosforilados de la proteína TAU en células de pulpa dental	25
6.4 Inmunodetección para cambios conformacionales de la proteína TAU en células de pulpa dental.	29
6.5 Inmunodetección de epítomos fosforilados de la proteína TAU durante el proceso mitótico	29
6.6 Diferenciación de células pluripotentes inducidas hacia cresta neural.....	33
6.7 Caracterización de células de cresta neural obtenidas a partir de iPSCs.	33
6.8 Diferenciación de células de cresta neural hacia linaje mesenquimal	34
6.9 Inmunodetección de epítomos fosforilados de la proteína TAU en células mesenquimales provenientes de iPSCs.	36
7 DISCUSIÓN	39
8 CONCLUSIONES	44
9 ANEXOS	45
ANEXO I. Marcadores neurales analizados en células de pulpa dental	45

ANEXO II. Análisis de proliferación en células de pulpa dental	46
10 REFERENCIAS	47

ABREVIATURAS

CFU-F: Unidades formadoras de colonias fibroblastoides

CMPD: Células mesenquimales de pulpa dental

CN: Cresta neural

ESC: Células troncales embrionarias

ICM: Masa celular interna

iPSCs: Células pluripotentes inducidas

ISCT: Sociedad internacional para la terapia celular

MAPs: Proteínas asociadas a microtúbulo

MO: Médula ósea

MSC: Células troncales mesenquimales

MTCC: Comité de células troncales mesenquimales

NFTs: Ovillos neurofibrilares

PHFs: Filamentos helicoidales apareados

SFB: Suero fetal bovino

RESUMEN

La proteína TAU, pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulo. Dentro de las funciones mejor caracterizadas de la proteína TAU se encuentra su participación en la regulación de la estabilidad de los microtúbulos a través de la polimerización de la tubulina en neuronas.

En la década de los 80's se identificó en muestras histológicas de pacientes con Alzheimer que la proteína TAU se hiperfosforila y se agrega en ovillos neurofibrilares, impidiendo la capacidad de la proteína para estabilizar los microtúbulos en las neuronas. Esta condición patológica afecta importantes procesos como el transporte axonal y la sinapsis. A raíz de este descubrimiento, la fosforilación de la proteína ha sido blanco de diversos estudios que han contribuido a explicar los mecanismos que promueven la agregación patológica de la proteína TAU, sin embargo, el proceso preciso no se conoce del todo, en gran parte debido a la dificultad para la obtención de neuronas humanas vivas y la falta de modelos de estudio fisiológicamente normales.

Comúnmente la proteína TAU es utilizada como marcador de células de linaje neural. Sin embargo, la proteína TAU ha sido reportada en fibroblastos, células de testículo y células tumorales de neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer cervicouterino y otros tumores.

Actualmente la información correspondiente a la regulación y función de la proteína TAU en otros linajes celulares es escasa. Un ejemplo son las células mesenquimales de pulpa dental, en las cuales la proteína TAU no ha sido reportada a pesar de que expresan marcadores neurales y poseen la capacidad de diferenciarse hacia neuronas.

En el presente estudio se reporta por primera vez, la expresión y localización citoplasmática y nuclear de la proteína TAU en células de pulpa dental y se describe en detalle su estado fosforilado mediante el uso de un grupo de anticuerpos comúnmente utilizados para analizar los cambios de la proteína TAU en cortes de tejido provenientes de personas fallecidas por la patología de Alzheimer (pSer202, pSer214, pThr231, pSer235, pSer396, pSer404, pSer422, TG3 y AT100). Los resultados revelan que las células de pulpa dental presentan todos los epítomos fosforilados que se identifican en personas con la enfermedad de Alzheimer. Adicionalmente se identificaron fosforilaciones de la proteína TAU vinculados al proceso mitótico en células de pulpa dental, situación que ha sido reportada en fibroblastos y células tumorales, sin que se conozca su función específica.

Este trabajo propone el estudio de células de pulpa dental como un modelo de investigación accesible para el estudio de las modificaciones postraduccionales de la proteína TAU. Las células de pulpa dental además brindan ventajas experimentales pues, son un modelo no tumoral, no transgénico con capacidad de presentarse en estado mitótico y postmitótico por diferenciación neuronal y que pueden permitir el estudio de los procesos que conllevan a la agregación patológica de la proteína.

ABSTRACT

TAU protein belongs to the family of microtubule associated proteins. One of the main functions of TAU protein is its role in the regulation of microtubule stability through the polymerization of tubulin in neurons.

In the 80's, it was found in histologic samples with Alzheimer patients that TAU protein is hyperphosphorylated and aggregated in neurofibrillary tangles avoiding protein ability to stabilize microtubules in neurons. This pathological condition affects important processes such as axonal transport and synapses. As a result of this discovery, phosphorylation has been subject matter which studies have helped to explain mechanisms that promote protein TAU pathological aggregation. Nevertheless, the process leading is not fully known due to the difficulty in obtaining living human neurons and the lack of physiologically normal human study models.

Commonly, TAU protein is used as a marker of neural lineage cells. However, TAU protein has been reported in fibroblasts, testicular cells and tumor cells such as neuroblastoma, breast cancer, cervical cancer, among others.

Currently, information related to regulation and function of TAU protein in other cell lineages is scarce, an example are the dental pulp mesenchymal cells, where TAU protein has not been reported despite there are expressed neural markers and that they have the ability to differentiate into neurons.

In the present study, the expression and cytoplasmic and nuclear localization of TAU protein in dental pulp stem cells is reported for the first time and its phosphorylated state is described in detail by the use of a group of antibodies commonly used to analyze changes in TAU protein in tissue samples from persons deceased by Alzheimer's disease (pSer202, pSer214, pThr231, pSer235, pSer396, pSer404, pSer422, TG3 and AT100). Results reveal that dental pulp cells present all the phosphorylated epitopes that are identified in Alzheimer's patients. In addition, phosphorylations of TAU protein linked to mitotic process were identified in dental pulp cells, situation that has been reported in fibroblasts and tumor cells and which specific function has not been fully known.

This work proposes the study of dental pulp cells as an accessible research model for the study of the posttranslational modifications of the TAU protein. They also bring experimental advantages as they are a non-tumor model, non-transgenic with capacity to present in a mitotic and postmitotic state by neuronal differentiation and that can allow the study of processes that lead the pathological aggregation of the protein.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Expresión y estructura de TAU

La proteína TAU, pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulo (MAP) y fue identificada por primera vez en 1975 por Murray Weingarten quien le dió el nombre a la proteína, caracterizó su función como regulador de la polimerización de tubulina extraída de cerebros porcinos para polimerizar microtúbulos y reportó algunas de sus propiedades como su capacidad de mantenerse estable a altas temperaturas (Weingarten et al., 1975).

En 1986 se identificó que la proteína TAU está involucrada en la enfermedad de Alzheimer agregándose hasta formar ovillos neurofibrilares (NFTs) comprometiendo su capacidad para estabilizar microtúbulos (Kosik et al., 1986). A raíz de este descubrimiento se generó un gran interés en la proteína como factor implicado en procesos neuropatológicos. Otras enfermedades neurodegenerativas también presentan agregaciones patológicas de la proteína TAU, conocidas en conjunto como taupatías. Se ha demostrado que mutaciones del gen que codifica para la proteína TAU (*MAPT*) pueden conducir a un proceso de neurodegeneración (Hutton, 1998). Sin embargo, no todas las taupatías presentan mutaciones para el gen *MAPT* lo cual evidencia que los mecanismos exactos que provocan la agregación patológica de TAU no se conocen del todo.

Aunque la proteína TAU se estudia principalmente en células neuronales, también se ha reportado su presencia en oligodendrocitos tanto *in vitro* como *in vivo* (LoPresti et al., 1995), en fibroblastos (Rossi et al., 2008), en espermatozoides y testículo (Sigala et al., 2014) y células tumorales (Spicakova et al., 2010).

El primer estudio para la secuenciación del cDNA de TAU se realizó en 1988 (Lee et al., 1988) analizando dos isoformas de la proteína en tejidos cerebrales murinos a través de clones de DNA complementario en donde se infirió que la estructura de la proteína no tiene dominios α hélice o láminas β . En el mismo año se reveló la secuencia para la proteína TAU humana y se identificó como el principal componente de los filamentos helicoidales apareados (PHFs) que son acumulaciones citoplásmicas de polímeros anormales observados en la enfermedad de Alzheimer (Goedert et al., 1988).

Actualmente se sabe que la proteína se encuentra codificada en humanos en el brazo largo del cromosoma 17 en la posición 17q21 en un solo gen (*MAPT*) de 134 kb y contiene 16 exones (-1, 1, 2, 3, 4, 4A, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 14) (Fig. 1). Su secuencia está bien conservada entre mamíferos que puede tener entre el 97 y el 100% de homología entre primates. En cerebros humanos no se ha reportado la expresión de los exones 4A, 6 y 8, mientras que el exón -1 (también llamado 0) que es parte del promotor y el exón 14 son transcritos, pero no traducidos. Debido a empalme alternativo la proteína TAU se puede encontrar en seis isoformas en el sistema nervioso central, los exones 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12

y 13 son exones constitutivos de todas las isoformas de la proteína, mientras que los exones 2,3 y 10 se expresan de manera alternativa (Fig. 1) (Martin et al., 2011).

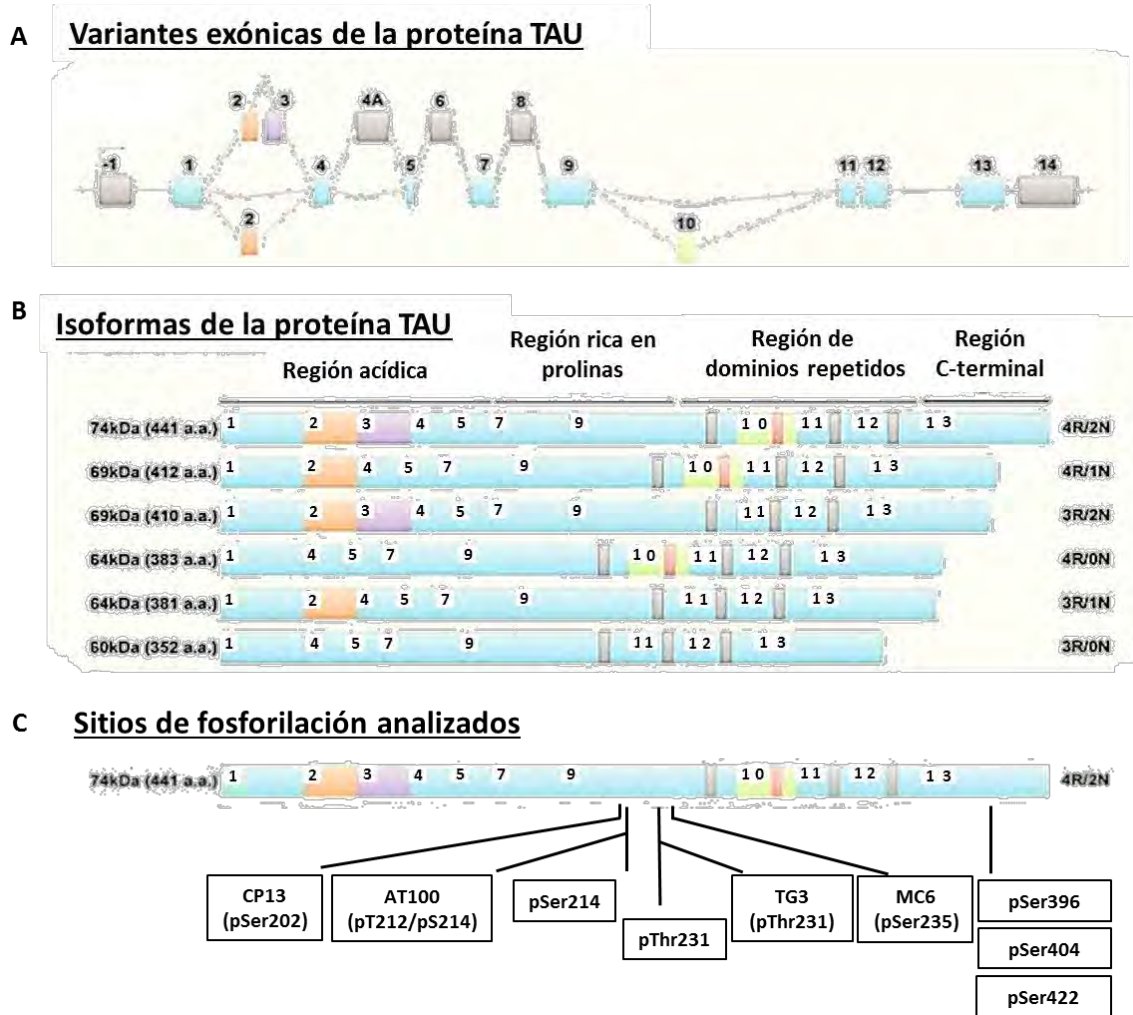


Figura 1.- Variantes exónicas, isoformas, dominios y sitios de fosforilación de la proteína TAU. A. El gen MAPT contiene 16 exones, representados por rectángulos con el número del exón en cada uno. Mediante el proceso de empalme alternativo se pueden generar seis isoformas de la proteína dependiendo de la presencia o ausencia de los exones 2 y 3 (naranja y morado) en la región N-terminal y del exón 10 (amarillo) en la región de dominios repetidos. B. Las seis isoformas de la proteína TAU poseen cuatro regiones (región ácida, región rica en prolinas, región de dominios repetidos y la región C-terminal) que las diferencian entre sí en longitud y en sus propiedades de unión a microtúbulo. C. La región media de la molécula (región rica en prolinas; aminoácidos 151-243) posee múltiples sitios de fosforilación. En la enfermedad de Alzheimer y otras taupatías estos sitios se encuentran hiperfosforilados y pueden ser reconocidos por diversos anticuerpos con epítopos dependientes de fosforilación como es el caso de los utilizados en este trabajo, los cuales se muestran en recuadros debajo de la molécula (adaptada de Martin et al., 2011).

La proteína TAU consiste en dos dominios funcionales. Primero un dominio de proyección N-terminal (residuos 1-197 en la isoforma más larga) y segundo un dominio de unión a microtúbulo C-terminal (residuos 369-441). Los exones 2 y 3 se expresan en el dominio de proyección mientras que el exón 10 se expresa en el dominio de unión a microtúbulo, la presencia o ausencia de los exones 2 y 3 hace variar la longitud de las isoformas de TAU en el dominio de proyección, se ha demostrado que este dominio interactúa con otras proteínas del citoesqueleto en particular con proteínas de los neurofilamentos lo cual mantiene la arquitectura del axón en tejidos neuronales (Scholz & Mandelkow, 2014).

El dominio de unión a microtúbulo de la proteína TAU puede tener 3 o 4 secuencias similares repetidas (3R y 4R) de 31 o 32 residuos, la expresión del exón 10 resulta en la forma 4R de la proteína (Michel Goedert & Jakes, 1990).

1.2 Funciones de la proteína TAU

Los microtúbulos son estructuras poliméricas formadas por heterodímeros de tubulina. Están involucrados en un gran número de procesos fisiológicos como la división celular, la morfología de las células, el transporte intracelular, la estabilidad de axones en neuronas, entre otros. La proteína Tau estabiliza los microtúbulos en neuronas a través de la unión en la interfase de los heterodímeros de tubulina por medio de secuencias conservadas evolutivamente (Fig. 2A) (Kadavath et al., 2015).

En neuronas la proteína TAU regula la dinámica del citoesqueleto particularmente en axones, lo cual tiene repercusiones en el transporte axonal ya que compite con las proteínas dineína y kinesina por la unión a microtúbulos, las cuales transportan hacia el cuerpo celular y hacia la terminación axonal respectivamente (Stamer et al., 2002). El estudio de la interacción de TAU con los microtúbulos también demostró que el dominio de proyección de la proteína está implicado en el espaciamiento de los microtúbulos en el axón (Chen et al., 1992).

Aunque *in vitro* se ha demostrado la importancia de la proteína TAU en el transporte axonal, estudios con ratones inhibiendo la proteína TAU demuestran que su ausencia tiene poca influencia en el transporte axonal lo que sugiere que existen mecanismos *in vivo* para suplir la función de la proteína TAU (Yuan et al., 2008).

La proteína TAU ha sido reportada también en el núcleo de células neuronales analizada como un factor de protección al ADN frente a eventos de estrés oxidativo y estrés térmico (Sultan et al., 2011). Estudios posteriores del mismo grupo de trabajo mostraron que en ratones transgénicos *Knock out* para la expresión de TAU, el estrés térmico dañaba de manera significativa al DNA a diferencia de ratones silvestres, corroborando así el papel de TAU en la protección del DNA (Violet et al., 2014).

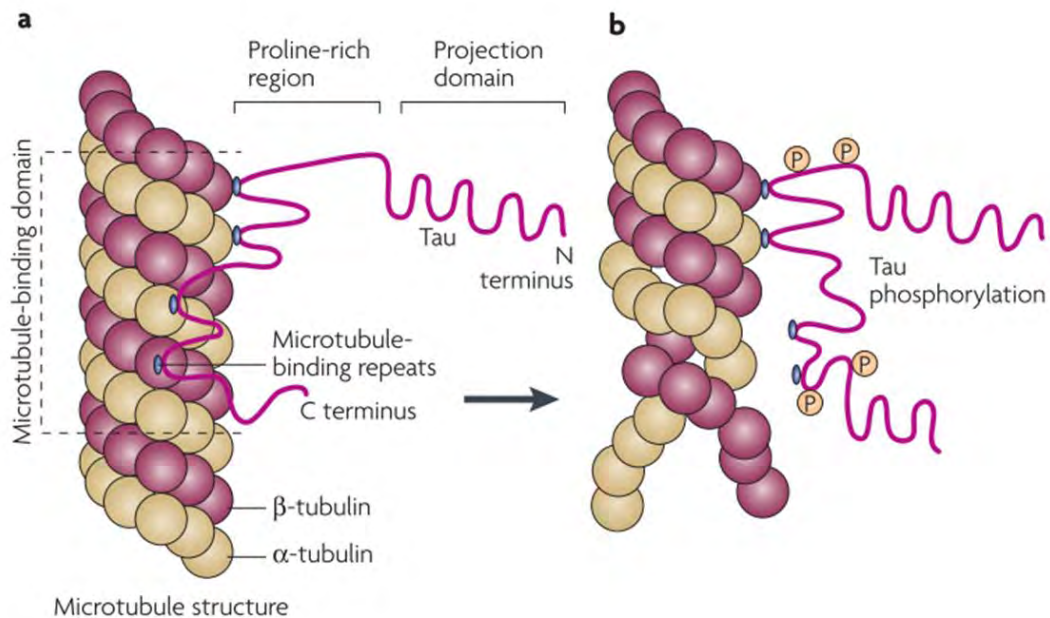


Figura 2.- Unión de la proteína TAU a microtúbulos regulada por fosforilación. A. Los microtúbulos están formados por heterodímeros de alfa y beta tubulina (esferas beige y moradas respectivamente), la polimerización de los heterodímeros en microtúbulos se regula por la proteína TAU a través de su dominio de unión a microtúbulo, mientras que la región rica en prolinas y el dominio de proyección permanecen libres. B. La fosforilación de la proteína TAU puede destabilizar la unión de la molécula al microtúbulo provocando su despolimerización (Mazanetz & Fischer, 2007).

La localización nuclear de la proteína TAU también ha sido detectada en oligodendrocitos (LoPresti et al., 1995) y en fibroblastos (Rossi et al., 2008). En el estudio de Rossi et al. se sugiere que la proteína puede estar involucrada en mantener la integridad del genoma y se presentan datos sobre la función de TAU regulando el proceso mitótico.

La participación de TAU durante el proceso mitótico también ha sido referida en células de neuroblastoma en las cuales se pueden identificar mediante anticuerpos monoclonales fosforilaciones de la proteína presentes en cortes histológicos de pacientes con la enfermedad de Alzheimer particularmente durante la etapa de metafase (Vincent et al., 1996).

En un estudio se comparó la capacidad de polimerización de tubulina entre las diferentes isoformas de TAU demostrando que aquellas isoformas con 4 regiones repetidas en el C- terminal podían promover la polimerización de tubulina más rápido que aquellas con sólo 3 regiones repetidas (Michel Goedert & Jakes, 1990).

Aún no se cuenta con la información exacta acerca de la función específica de cada isoforma de TAU, sin embargo se ha reportado que la isoforma más pequeña de TAU es la única que se expresa durante el

desarrollo embrionario de diferentes especies de mamíferos incluyendo humanos y en etapas transitorias durante la neurogénesis adulta (Takuma et al., 2003), se ha sugerido que la menor afinidad de la forma 3R por los microtúbulos es ideal para la flexibilidad del citoesqueleto durante la migración neuronal, la elongación axonal y la generación de dendritas.

Dada su localización en distintos compartimentos celulares, los antecedentes aquí presentados demuestran el papel multifuncional de la proteína TAU, sin embargo, las funciones específicas de la proteína permanecen pobremente descritas en particular en células de linaje distinto al neuronal.

1.3 Fosforilación de la proteína TAU

No solo las isoformas están relacionadas con la función de la proteína TAU, también existen modificaciones postraduccionales que regulan su función (fosforilación, glicosilación, glicación, deamidación, nitración, metilación, acetilación y ubiquitinación) (Martin et al., 2011). En particular la fosforilación es la más estudiada, debido a que en NFTs provenientes de pacientes con Alzheimer la proteína se encuentra hiperfosforilada (Fig. 1C) (Grundke-Iqbal et al., 1986).

La fosforilación de la proteína TAU es un proceso fisiológico que regula algunas de sus funciones, existen al menos 85 sitios donde puede ser fosforilada la isoforma más larga de la proteína (80 Ser o Thr y 5 Tyr) y al menos 45 de esos sitios han sido identificados experimentalmente (Hanger et al., 2009).

En particular la fosforilación puede modificar la interacción de TAU con los microtúbulos, por ejemplo se ha demostrado que la fosforilación del sitio Ser262 en la región rica en prolinas por las cinasas MARK, PKA o CAMKII puede reducir la afinidad de TAU a los microtúbulos (Bussiere & Hof, 2000). Datos similares se han obtenido para la fosforilación de la proteína TAU en los sitios Ser214 y Thr231 los cuales al ser fosforilados pueden provocar que la proteína se desprege de la estructura del microtúbulo (Lu et al., 1999).

Se han realizado comparaciones cuantitativas del estado de fosforilación en cerebros murinos durante el desarrollo, cerebros humanos sanos y afectados por la enfermedad de Alzheimer. Los reportes para los diferentes sitios analizados muestran que la fosforilación es muy superior en términos generales en cerebros de pacientes de Alzheimer que en cerebros normales, la diferencia cuantitativa varía dependiendo del sitio de fosforilación analizado. Sin embargo, también se observan altos niveles de fosforilación en cerebros murinos en desarrollo sin que exista agregación patológica de la proteína (Yu et al., 2009).

Durante el desarrollo del sistema nervioso central únicamente se encuentra la isoforma más pequeña de la proteína, la cual está altamente fosforilada (aproximadamente 7 fosfatos por molécula) en comparación con el adulto (2 fosfatos por molécula). En pacientes con la enfermedad de Alzheimer se

pueden identificar niveles más altos de fosforilación que los observados para la isoforma fetal (8 fosfatos por molécula) (Kanemaru et al., 1992).

En la enfermedad de Alzheimer han sido caracterizados por lo menos 30 sitios de fosforilación, lo cual ha sido relacionado con la acumulación de la proteína en NFTs (Grundke-Iqbal et al., 1986). La detección de algunos sitios de fosforilación en la proteína TAU puede lograrse con anticuerpos, lo cual también ha permitido identificar cambios conformacionales que dependen de su fosforilación (Jicha et al., 1997). Con el análisis en cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, ha sido posible analizar la agregación de la proteína en NFTs, como una secuencia de eventos que involucran fosforilaciones y cambios conformacionales (Luna-Muñoz et al., 2007).

La fosforilación de TAU también ha sido identificada en procesos mitóticos de células tumorales, particularmente en las líneas celulares MSN (neuroblastoma) y HeLa (cáncer cervicouterino) a través de la detección de anticuerpos monoclonales (Vincent et al., 1996). El estudio de la fosforilación en los sitios Ser396 y Ser404 ha sido analizado previamente en pacientes de Alzheimer, mediante el uso del anticuerpo PHF-1, dicho anticuerpo detecta de forma simultánea la fosforilación de ambos sitios, sin embargo estos sitios de fosforilación también se observan en células de neuroblastoma, la detección del anticuerpo es evidente en toda la célula a diferencia de la detección en células neuronales donde se identifica en procesos patológicos principalmente asociada a PHFs (Vincent et al., 1996).

En fibroblastos la fosforilación de TAU durante procesos mitóticos se ha identificado por inmunorreactividad para los anticuerpos AT8 cuyo epítipo depende la fosforilación de Ser202 y Thr205, AT100 cuyo epítipo depende de la fosforilación en Thr212 y Ser214 y HPT104 cuyo epítipo depende de la fosforilación en Thr231 (Rossi et al., 2008).

Debido a la dificultad para obtener tejido neuronal humano, se han utilizado procesos de diferenciación neuronal de células troncales, lo cual ha permitido el estudio de la proteína TAU *in vitro*, estudios realizados en células troncales embrionarias (ESC) demuestran que la diferenciación hacia linaje neuronal puede recapitular la expresión de las seis isoformas de la proteína en cultivos *in vitro* lo cual también ha sido utilizado para analizar su fosforilación (Mertensuber et al., 2013).

Otro tipo de tejido que ha demostrado la capacidad de diferenciación neuronal son las células mesenquimales de pulpa dental (Arthur et al., 2008). Actualmente no existen estudios de la proteína TAU en este tipo de células en su estado mesenquimal.

1.4 Células troncales mesenquimales

El inicio del estudio de las células mesenquimales se remonta a los trabajos de Alexander Friedenstein en la década de los 70s, reportando una subpoblación celular en la médula ósea con características adherentes de tipo fibroblastoide definida como unidad formadora de colonias fibroblastoides (CFU-F)

(Friedenstein, 1989). Posteriormente Arnold Caplan introduce el término célula troncal mesenquimal (MSC) para referirse a una célula de la médula ósea que tiene capacidad de autorrenovación y potencial de diferenciación hacia tejido adiposo, tendón, ligamento, hueso y músculo en un proceso propuesto con el nombre de mesengénesis (Caplan, 1991).

Actualmente la médula ósea puede ser clasificada en dos sistemas principales, el sistema hematopoyético que involucra a las células sanguíneas y el sistema estromal que consiste en una población heterogénea de células entre las que se incluyen las células reticulares, células adipocíticas, vasculares, endoteliales, osteoblastos entre otras que en conjunto proporcionan el microambiente hematopoyético (Paolo Bianco, 2009).

A pesar del constante estudio de las MSC aún no se ha podido demostrar su capacidad de autorrenovación, ni un grupo de marcadores únicos capaces de definir las ya que la población celular donde se obtienen es heterogénea. Los criterios actualmente utilizados para designar a una población de células como mesenquimal se basan en las recomendaciones del comité MTCC de la sociedad internacional para terapia celular (ISCT) (Dominici et al., 2006).

Dentro de estas características se establece que las poblaciones mesenquimales deben ser adherentes en cultivos *in-vitro*, presentar los marcadores de membrana CD75, CD90 y CD105 con ausencia de los marcadores CD45, CD34, CD14 y las moléculas HLA-DR además de tener la capacidad de diferenciarse hacia los linajes osteoblástico condrocítico y adipocítico en condiciones *in vitro*.

Las células mesenquimales han sido aisladas a partir de varios tejidos del organismo como la médula ósea, placenta, sangre de cordón umbilical, pulpa dental entre otras (Hass et al., 2011) (Gronthos et al., 2000).

1.5 Células mesenquimales de pulpa dental (CMPD)

En el año 2000 el grupo de Stan Gronthos describió una población con características mesenquimales en cultivos de pulpa dental que presentaban alta capacidad clonogénica comparadas con las células mesenquimales de médula ósea (Gronthos et al., 2000), las CMPD expresan los marcadores CD105, CD73, CD90, CD44 y CD29, carecen de la expresión de marcadores no mesenquimales tales como CD34, CD45 y CD33 tienen la capacidad de diferenciarse hacia osteocitos, condrocitos y adipocitos, en condiciones *in vitro*.

Las CMPD pueden aislarse de piezas dentales de personas adultas (dentición permanente) o bien de la dentición decidua (también llamada dentición de leche, dentición temporal o dentición primaria) (Eslaminejad et al., 2010).

Al igual que el resto de las fuentes de células mesenquimales, aún no se cuenta con marcadores específicos que definan una población de CMPD, por lo cual la población obtenida es heterogénea.

Además de los marcadores comunes de linaje mesenquimal, las CMPD expresan marcadores considerados neurales como NESTINA, β III-tubulina, GAD, GFAP entre otros (Miura et al., 2003). Esta situación ha sido relacionada con su origen embrionario ya que a diferencia de las células mesenquimales de la médula ósea que tienen un origen mesodermal, las CMPD se originan por la migración de células de la cresta neural (CN) (Nutti et al., 2016).

La CN es una población celular que aparece de manera transitoria durante la embriogénesis, esta población deriva de los bordes laterales de la placa neural y realiza una transición epitelio mesénquima permitiéndole la capacidad de migrar distancias considerables para generar diversos tipos celulares como son: el esqueleto craneofacial, células neuronales, odontoblastos, entre otros (Tabla 1) (Bhatt et al., 2013).

Derivados de la cresta neural
Tejidos conjuntivos y huesos de la cara y el cráneo
Ganglios del nervio craneal
Células de la glándula tiroidea
Tabique conotruncal del corazón
Odontoblastos
Dermis de la cara y el cuello
Ganglios espinales
Ganglios preaórticos y ganglios de la cadena simpática
Ganglios parasimpáticos del tubo gastrointestinal
Médula suprarrenal
Células de Schwann
Células gliales
Melanocitos
Células del músculo liso de los vasos sanguíneos de la cara y el prosencéfalo
Meninges (prosenecéfalo)

Tabla 1.- Tejidos derivados de la cresta neural. Las células de la Cresta Neural tienen la capacidad de migrar y diferenciarse hacia diversos tejidos, en esta tabla se muestran células del organismo adulto que tienen su origen embrionario en la Cresta Neural (Sadler, 2011).

Uno de los trabajos pioneros en la identificación del origen embrionario de las CMPD fue el de Chai y colaboradores (2000). En este trabajo se realiza un ratón doble transgénico para la activación de beta galactosidasa inducida por el promotor para WNT1 utilizando el sistema Cre/lox. La proteína WNT1 se expresa de manera transitoria durante el desarrollo del sistema nervioso central, dicha expresión

comienza en la placa neural. Los precursores de las células de cresta neural provienen de células que expresan el marcador WNT1. Utilizando este enfoque se logra la expresión de β - galactosidasa de manera constitutiva en todas las células migrantes de la cresta neural y puede ser monitoreado durante las diferentes etapas de la embriogénesis (Fig.3) (Chai et al., 2000).

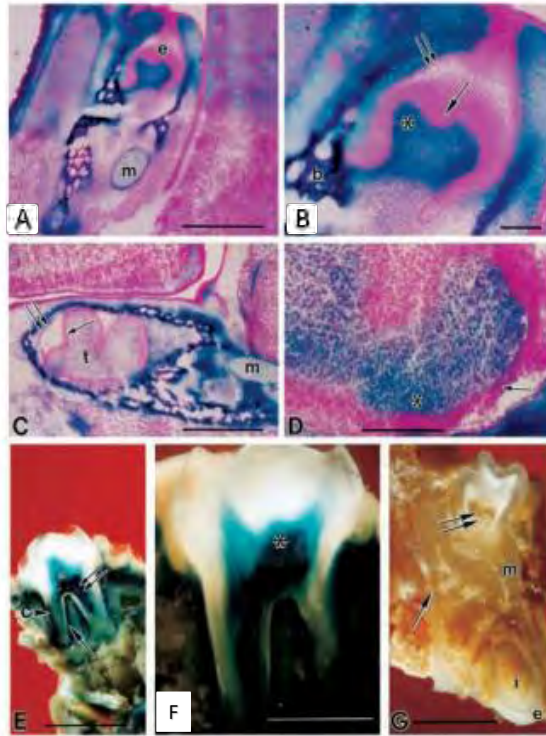


Figura 3.- Contribución de células de cresta neural en la morfogénesis dental. A. Se muestran células provenientes de cresta neural (azul) durante distintas etapas del desarrollo dental de ratones transgénicos para la expresión constitutiva de β galactosidasa en células provenientes de la cresta neural. En los recuadros A-D se sigue el periodo en que las células provenientes de cresta neural comienzan a ser bordeadas por el epitelio del esmalte en embriones de 15.5 (A y B) y 17.5 días (C y D). Los recuadros E y F muestran dientes de ratones transgénicos adultos de seis semanas de edad donde se observa la contribución de células β galactosidasa positivas (azul) en dentina, pulpa dental, cementum y ligamento periodontal. El recuadro G muestra un organismo control que no expresa β galactosidasa (Chai et al., 2000).

En particular se ha reportado que CMPD provenientes de dentición decidua tienen mayores porcentajes de expresión de marcadores neurales (Majumdar et al., 2016).

La información disponible sobre la expresión y regulación de la proteína TAU en células de pulpa dental y células de cresta neural es escasa. Los métodos convencionales para la obtención de células de cresta neural en mamíferos se basan en la diferenciación de células pluripotentes hacia ectodermo y en la posterior selección de células con marcadores de cresta neural (p75, HNK1 y AP2) a través de sorting para enriquecimiento de cultivos (Gabsang et al., 2007), sin embargo hoy en día es posible analizar

células con las características de la cresta neural en humanos gracias a la diferenciación directa de células troncales embrionarias (ESC) (Thomson et al., 1998) y células pluripotentes inducidas (iPSCs) (Takahashi et al., 2007) hacia cresta neural (Menendez et al., 2011).

1.6 Diferenciación de células pluripotentes hacia cresta neural

Las células pluripotentes son células con la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse hacia cualquier tejido de las tres capas embrionarias. Desde el establecimiento de las primeras líneas celulares pluripotentes humanas (Thomson et al., 1998), se ha analizado cuales son los procesos que promueven la diferenciación de estas células y se ha logrado establecer métodos de diferenciación en condiciones *in vitro* hacia distintos linajes celulares.

Para evaluar la eficiencia de diferenciación se realizan análisis de la morfología celular, del inmunofenotipo y de las características biológicas de las células diferenciadas. Actualmente es posible obtener células con características de cresta neural por diferenciación directa de células pluripotentes (Menendez et al., 2011). El método se desarrolló basándose en la diferenciación de células pluripotentes hacia neuroectodermo (Chambers et al., 2009) mediante la cual se obtienen células positivas para la expresión de la proteína PAX6, un marcador temprano de neuroectodermo.

La eficiencia de diferenciación en la obtención de células PAX6 positivas es de 80% del total de las células diferenciadas, el resto de las células presentan marcadores de cresta neural (p75, HNK1 y AP2). En el pasado los estudios de la cresta neural humana se lograban con el enriquecimiento de esta fracción celular, con el método propuesto por Menéndez et al. se logra la obtención de cultivos positivos para la expresión de marcadores de cresta neural con una eficiencia reportada de más del 90% del total de las células obtenidas. Dicho método se basa en la activación de la cascada de señalización de WNT y la inhibición de la cascada de señalización de Activina A/Smad con SB 431542. Adicionalmente se reportó la capacidad de las células de cresta neural obtenidas para diferenciarse hacia células neuronales, mesenquimales, musculares, condrocitos, adipocitos y osteocitos.

En esta tesis se plantea analizar la posible presencia de la proteína TAU en células de pulpa dental y células de cresta neural provenientes de células pluripotentes, a través de la inmunodetección de anticuerpos diseñados previamente para el estudio de la enfermedad de Alzheimer. Se sabe que las células pluripotentes no expresan la proteína TAU (Iovino et al., 2010) sin embargo es posible que la diferenciación de células pluripotentes hacia cresta neural promueva la expresión de la proteína.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La proteína TAU ha sido descrita ampliamente en tejidos neuronales debido a su participación en diferentes neuropatologías, sin embargo, la información correspondiente a su regulación y función es escasa en otros linajes celulares. Un ejemplo, son las células mesenquimales de pulpa dental. Actualmente la literatura no contiene datos de que células de pulpa dental expresan la proteína TAU, por lo cual los aspectos relacionados a su regulación en estas células en particular su fosforilación no han sido descritos.

La presencia, localización y fosforilación de la proteína TAU en células de pulpa dental, puede ser caracterizada por inmunodetección con anticuerpos que suelen ser empleados para el estudio de la proteína en la enfermedad de Alzheimer.

Si se comprueba que las células mesenquimales de pulpa dental expresan la proteína TAU, estas representarían un modelo biológico humano de amplio interés clínico para el estudio de las modificaciones de la proteína TAU, ya que dichas células no son tumorales, son altamente proliferativas y tienen la capacidad de diferenciarse hacia linaje neuronal.

3 HIPÓTESIS

Dado que las células de pulpa dental expresan marcadores de progenitores neurales, existe la posibilidad de que también se exprese la proteína TAU lo cual permitiría utilizar dichas células como modelo para estudiar su fosforilación.

4 OBJETIVO

Analizar la presencia y fosforilación de la proteína TAU en células de pulpa dental humana mediante el uso de anticuerpos que se han empleado previamente para el estudio de la proteína TAU en cortes histológicos de pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

4.1 Objetivos particulares

- Aislar células de pulpa dental humana.
- Caracterizar su expresión de marcadores de progenitores neurales.
- Analizar la localización de la proteína TAU total y fosforilada en células mesenquimales de pulpa dental humana a través de la detección de anticuerpos utilizados en el estudio de la enfermedad de Alzheimer.
- Obtener células de cresta neural por diferenciación de células iPSCs.

-Caracterizar las células de cresta neural obtenidas para los marcadores p75, HNK1, SOX10, así como para la proteína TAU.

5 METODOLOGÍA

5.1 Cultivo primario de células de pulpa dental humana

Para el aislamiento de células de pulpa dental se colectaron molares de individuos sanos de edades comprendidas entre 5 y 11 años, bajo carta de consentimiento y con la aprobación del Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM). Los dientes fueron colocados en una solución de PBS suplementada con antibiótico y antimicótico (Anti-Anti; Invitrogen 1:100 μ L). Se separó el tejido gingival y se desinfectó la superficie del diente sumergiéndolo en una solución oral antiséptica comercial. Se trituró el diente para exponer la pulpa utilizando fórceps. Se retiró la pulpa y se sumergió en medio OptiMEM (Gibco) suplementado con Anti-Anti. Se cortó la pulpa en fragmentos pequeños. Los fragmentos de pulpa fueron digeridos parcialmente por tratamiento con Colagenasa I 3 mg/ml (Sigma) durante 30 min a 37 °C. Luego de la digestión se adicionó medio OptiMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 1%. Se centrifugó la suspensión a 1500 rpm por 7 min. El precipitado fue resuspendido en medio de cultivo suplementado al 1% con SFB, EGF 10 ng/mL (PeproTech), FGF 20 ng/mL (PeproTech) y Anti-anti; cada digestión y las resiembras posteriores fueron sembradas en una caja Petri en el mismo medio y fueron mantenidas dentro de una incubadora a 37 °C con 5% de CO₂. Se cambió el medio cada 2 días. Las células que se adhirieron al plato se mantuvieron en las mismas condiciones y se expandieron hasta alcanzar 80% de confluencia durante 10 días. Las células obtenidas se recuperaron con tratamiento de tripsina 0.4% en PBS durante 5 min a 37 °C y fueron utilizadas para ensayos de marcadores y detección de sitios de fosforilación de la proteína TAU.

5.2 Criopreservación de células de pulpa dental humana

Los cultivos de CMPD pueden ser criopreservados una vez alcanzado el 80% de confluencia. Las células fueron tratadas con tripsina 0.4% en PBS e incubadas por 3 min a 37 °C y posteriormente fueron recuperadas y centrifugadas durante 7 min a 1500 rpm. El sobrenadante se desechó y las células fueron resuspendidas en medio OptiMEM para después ser alicuotadas en tubos de criopreservación (1x10⁶ células) al 10% de SFB y 10% de DMSO. Finalmente, las células fueron congeladas con un descenso paulatino de la temperatura de 4 °C, -20 °C, -80 °C y preservadas en nitrógeno líquido.

5.3 Caracterización por análisis de tiempo de doblaje

Para el análisis de tiempo de doblaje se sembraron 5×10^4 células por pozo en un plato de 6 pozos. Las células fueron cultivadas en medio suplementado con SFB al 1%. Se realizaron conteos del número de células obtenidas a las 48, 72 y 96 horas de incubación con este medio de cultivo, realizando 2 repeticiones por cada tiempo. El tiempo de doblaje (t_d) fue obtenido a partir de la fórmula:

$$\ln A = \frac{\ln 2}{t_d} t + \ln A_0$$

Donde t es el tiempo transcurrido hasta el momento del conteo (medido en horas), A_0 es el número de células al inicio del experimento (5×10^4) y A es el número de células al tiempo t . El valor de t_d se obtuvo de la pendiente de la curva $\ln A$ vs t a los diferentes tiempos de conteo. Los conteos celulares se realizaron por medio de una cámara de Neubauer con un factor de dilución 2 (proporción 1:1) en azul de tripano (Gibco). Para el ajuste de tendencia lineal se utilizaron los datos de conteo y su respectiva desviación estándar, y fue calculado por medio del programa GraphPad Prism.

5.4 Caracterización de células de pulpa dental humana para marcadores de progenitores neurales

Una vez alcanzaron confluencia de 80% las células de pulpa dental obtenidas se levantaron con tratamiento de tripsina 0.4% en PBS durante 3 min a 37 °C, posteriormente son recuperadas y centrifugadas durante 7 min a 1500 rpm. El sobrenadante se desecha y las células fueron lavadas con PBS 0.2% BSA, centrifugadas de nueva cuenta 7 min a 1500 rpm resuspendidas en Citofix fixation buffer (Becton Dickinson) e incubadas con los diferentes anticuerpos (Tabla 2) por 15-30 min, posteriormente, las células se lavaron con PBS y centrifugaron de nueva cuenta en las condiciones antes mencionadas. Cada ensayo fue resuspendido en buffer PBS + 2 mM EDTA + 0.5% BSA. El número de células (5×10^5), la dilución de anticuerpos y las condiciones de incubación se realizaron bajo las recomendaciones del fabricante. Los anticuerpos utilizados para la caracterización fueron fabricados por Miltenyi™ y se muestran en la Tabla 2. La evaluación de las muestras y su análisis se realizó utilizando un citómetro Attune® y su software respectivo en la unidad de citofluorometría del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Anticuerpo	Clase
Anti A2B5-PE	IgM
Anti GFAP –Alexa 647	IgG
Anti doblecortina-PE	IgG
Anti PSA NCAM- APC	IgM
Anti MAP 2B –Alexa 647	IgG
Anti CD24- FITC	IgG
Anti CD15	IgG
Anti TUJ1	IgG
Anti CD271	IgG

Tabla 2.- Anticuerpos utilizados en la caracterización de marcadores de progenitores neurales.

Se analizaron 1×10^4 eventos lo cual representa el porcentaje de 100% para cada ensayo utilizando como control células sin marcaje de ningún anticuerpo. Como control positivo de fluorescencia se utilizaron los marcadores CD73, CD90 y CD105 (Miltenyi) en células de pulpa dental conjugados con los diferentes fluorocromos.

5.5 Cultivo de la línea celular HEK293

Los cultivos de la línea celular HEK293 se realizaron en medio D-MEM suplementado al 10% en SFB y Anti-anti 1:100 y fueron mantenidas dentro de una incubadora a 37 °C con 5% de CO₂. El medio fue reemplazado cada 2 días.

5.6 Análisis de la presencia y fosforilación de la proteína TAU en células mesenquimales de pulpa dental humana

Mediante la técnica de inmunofluorescencia se analizó la presencia y localización de la proteína TAU en cultivos de CMPD, como control fue utilizada la línea celular HEK293 (ATCC® CRL-1573™). Las células (1×10^4) fueron cultivadas en laminillas de 16 pozos (NUNC™), se realizaron 2 lavados con PBS y fueron fijadas con paraformaldehído al 1% durante 10 min, posteriormente fueron bloqueadas con una solución 0.3% de Tritón, 1% de BSA y 5% de SFC en PBS. Para estos ensayos se utilizó el anticuerpo primario T46 (Thermo) el cual se une a la proteína independientemente de su fosforilación, 3 experimentos independientes fueron realizados con 3 repeticiones cada uno. La incubación de anticuerpo secundario (se realizó a una dilución de 1:1500 en una solución 0.5% de SFC y 0.1% de BSA en PBS durante 30 min y se incluyó un pozo control sin anticuerpo primario por cada repetición para evaluar especificidad de anticuerpo secundario. El análisis por inmunofluorescencia se llevó a cabo con

ayuda de un microscopio invertido (Olympus modelo IX71), la tinción de ácidos nucleicos se realizó con Hoescht 33342 (Thermo Scientific) según lo recomendado por el proveedor.

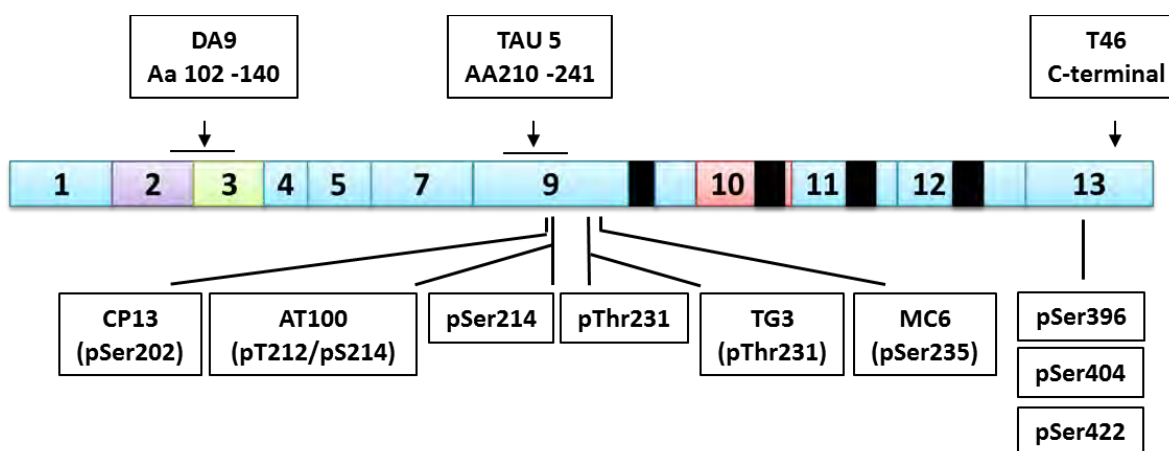
La fosforilación de la proteína TAU fue analizada mediante la incubación de los anticuerpos primarios pSer214, pThr231, pSer396 y pSer404 (Abcam) en CMPD (1×10^4) a diluciones recomendadas por las hojas técnicas de cada anticuerpo en una solución 0.1% Tritón X-100 (Sigma) y 1% BSA en PBS durante toda la noche. La incubación de anticuerpo secundario se realizó a una dilución de 1:1500 en una solución 0.5% de SFC y 0.1% de BSA en PBS durante 30 min. El análisis por inmunofluorescencia se llevó a cabo con ayuda de un microscopio invertido (Olympus modelo IX71).

5.7 Análisis por microscopía confocal

Los cultivos celulares mantenidos en portaobjetos con cámara multipozos fueron fijados con paraformaldehído (Sigma) al 4% en PBS (Gibco). Por 30 min, al término fueron lavadas 3 veces con PBS, por 5 min cada uno. Los cultivos celulares se permeabilizaron con Tritón X-100 (Sigma), por 10 min a temperatura ambiente. Se bloqueó con albumina libre de IgG (Sigma) al 0.2% en PBS por 20 min a temperatura ambiente, trascurrido el tiempo, los cultivos celulares se pusieron en contacto con los anticuerpos dirigidos contra la proteína TAU (Fig. 4) por 24 h a 4°C. Al día siguiente las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS, por 5 min cada uno y se pusieron en contacto con faloidina diluida en PBS por 15 min a temperatura ambiente. En oscuridad concluido el tiempo se lavaron 2 veces con PBS por 5 min y se pusieron en contacto con TO-PRO-3 en PBS (1:1000) por 10 min. En oscuridad se montan en un medio acuoso anti-apagamiento (Vectashield).

Los anticuerpos DA9, TAU5, CP13, AT100, TG3, MC6 y pSer422 fueron amablemente donados por el Banco Nacional de Cerebros (responsable Dr. José Luna Muñoz).

Los sitios de unión de los anticuerpos utilizados en relación a la proteína TAU se muestran en la figura 4, las flechas marcan la posición del epítipo detectado por cada anticuerpo, el epítipo de algunos anticuerpos depende de más de una posición o de cambios conformacionales de la molécula. Los portaobjetos teñidos para los diferentes anticuerpos se montaron en un medio acuoso anti-apagamiento de fluorescencia. Estas inmunotinciones se analizaron mediante microscopía confocal (Leica confocal SP8). Las tinciones triples, se analizaron con un objetivo 20X y plan apocromático 100X de inmersión en aceite (AN 1.4), se obtuvieron de 10-15 cortes ópticos, con una distancia entre ellos de 0.8-1.0 μm . Para evitar la contaminación de un canal a otro, triples tinciones se capturaron de una manera secuencial, a través de la muestra en el eje z. Las colectas de imágenes se proyectaron y se analizaron en un plano bidimensional (proyección), usando pseudocolores verde (fluoresceína), rojo (rodamina) y azul (CY5). Los fluorocromos en las múltiples tinciones se excitaron a 488 nm (para FITC), 530 nm (rodamina) y 650 nm (CY5).



Tau Total		Sitios de fosforilación		Cambios conformacionales dependientes de fosforilación	
Anticuerpo	Epitopo	Anticuerpo	Epitopo	Anticuerpo	Epitopo
DA9	aa102-140	CP13	pSer202	TG3	pThr231
TAU5	Aa210-241	Anti-TAU Ser214	pSer214	AT100	pT212/pSer214
T46	C-terminal	Anti-TAU Thr231	pThr231		
		MC6	pSer235		
		Anti-TAU Ser396	pSer396		
		Anti-TAU Ser404	pSer404		

Figura 4.- Posición de los epítomos de la proteína TAU que son reconocidos por los anticuerpos utilizados en el presente estudio. El esquema muestra con números los exones presentes en la isoforma más larga encontrada en células neuronales de la proteína TAU. Los anticuerpos TAU5, DA9 y T46 detectan a la proteína con independencia de su fosforilación, los demás anticuerpos dependen de algún sitio de fosforilación (Tabla) o bien de algún cambio conformacional.

5.8 Cultivo de células pluripotentes inducidas y diferenciación hacia cresta neural y linaje mesenquimal

Células iPSCs generadas en el laboratorio C-134 del Instituto de Investigaciones Biomédicas (Cevallos, 2013) utilizando vectores lentivirales con la combinación de los factores OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, c-Myc y KLF4 fueron utilizadas para diferenciación hacia cresta neural y linaje mesenquimal. La expansión se realizó en medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con ITS 2X, FGF 100 ng/mL, TGF-beta 2 ng/mL). Las células son incubadas bajo estas condiciones hasta observar la aparición de colonias compactas.

Para la diferenciación hacia cresta neural las células fueron cultivadas en laminillas de 16 pozos (NUNC™) expuestas al medio de diferenciación hacia cresta neural (StemDiff Neural induction Medium suplementado con BIO 2 uM, SB 4315425 uM), durante 15 días.

La diferenciación mesenquimal se realizó por exposición al medio DMEM/F12 suplementado con SFB 1%, ITS 1X (Gibco), EGF 10 ng/mL, PDGF 10ng/mL, FGF 5ng/mL por 4 días. El cambio de medio se realizó cada 2 días.

5.10 Caracterización de las células de cresta neural obtenidas a partir de iPSCs

Después de quince días de exposición al medio de diferenciación de cresta neural, las células obtenidas fueron caracterizadas por inmunofluorescencia de triple tinción para la expresión de la proteína SOX10, TAU y la detección de núcleos con Hoescht. Con este fin las células fueron fijadas en laminillas con 16 pozos (NUNC™) con paraformaldehído al 4% durante 10 min y posteriormente bloqueadas con una solución 0.3% de Tritón X-100, 1% de BSA y 5% de SFC en PBS.

La incubación de anticuerpo primario (SOX10 Abcam y T46 Thermo) se realizó a la dilución recomendada por el fabricante en una solución 0.1% Tritón X-100 y 1% BSA en PBS durante toda la noche. La incubación de anticuerpo secundario se realizó a una dilución de 1:1500 en una solución 0.5% de SFC y 0.1% de BSA en PBS durante 30 min (Fig. 4). Las células fueron analizadas en un microscopio invertido de marca Olympus (modelo IX71).

También se realizó un ensayo de citometría de flujo para la coexpresión de marcadores de cresta neural (p75 y Hnk-1) y la detección de marcadores mesenquimales (CD73 y CD105). El número de células, la dilución de anticuerpos y las condiciones de incubación se realizaron bajo las recomendaciones del fabricante (Miltenyi). La evaluación de las muestras y su análisis se realizó utilizando un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson) y su software respectivo en la unidad de citofluorometría del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Como control fueron utilizadas células sin marcaje de ningún anticuerpo.

5.11 Análisis de la expresión y fosforilación de la proteína TAU en células mesenquimales obtenidas a partir de células de cresta neural provenientes de iPSCs.

Células obtenidas mediante la diferenciación mesenquimal fueron cultivadas y fijadas en laminillas con 16 pozos (NUNC™) con paraformaldehído al 1% durante 10 min y posteriormente bloqueadas con una solución 0.3% de Tritón X-100 (Sigma), 1% de BSA y 5% de SFC en PBS con el fin de analizar la fosforilación de la proteína TAU en los sitios pSer214, pThr231, pSer396 y pSer404 (Fig.4).

La incubación de anticuerpo primario se realizó a una dilución de 1:500 en una solución 0.1% Tritón y 1% BSA en PBS durante toda la noche. La incubación de anticuerpo secundario se realizó a una dilución

de 1:1500 en una solución 0.5% de SFC y 0.1% de BSA en PBS durante 30 min y se incluyó un pozo control sin anticuerpo primario por cada repetición para evaluar especificidad de anticuerpo secundario.

6 RESULTADOS

6.1 Cultivo de células de pulpa dental y caracterización para marcadores de progenitores neurales.

El procesamiento de la pulpa dental mediante el método utilizado (modificado de Gronthos et al., 2000) permitió la obtención de cultivos con células adherentes con morfología fibroblastoide desde el primer día en el plato (Fig. 5A). Las células de pulpa dental se adhirieron durante las primeras 12 h posteriores al procesamiento de las piezas dentales alcanzando confluencia luego de 10 días de cultivo. El tiempo de doblaje obtenido bajo las condiciones de cultivo utilizadas fue de 37 h evaluado por conteos a diferentes tiempos en una cámara Neubauer.

Las células de pulpa dental utilizadas en el laboratorio, expresan los marcadores mesenquimales CD73, CD90 y CD105 (Gazarian & Ramírez-García, 2017). Adicionalmente se ha reportado que las células de pulpa dental expresan marcadores neurales (Foudah et al., 2014). Para corroborar esta posibilidad con las condiciones de trabajo utilizadas en este estudio se realizó una caracterización para la presencia de marcadores neurales (ANEXO I) en células de pulpa dental por citometría de flujo. Las células control (1×10^4 eventos sin marcaje) se representan por histogramas grises (Fig. 5B-K), mientras que los ensayos para cada marcador neural (1×10^4 eventos) se representan por histogramas morados en el mismo gráfico. Los límites de fluorescencia para evaluar los porcentajes se establecieron al final del histograma gris de los ensayos control (barra izquierda Fig.5B-K). El análisis demostró que las células de pulpa dental expresan los marcadores GFAP (96.6%) (Fig.5B), NESTINA (95.7%) (Fig. 5C) y DOBLECORTINA (93.8%) (Fig. 5D). Los porcentajes representativos de dos experimentos se muestran en orden descendente en la tabla de la figura 5.

6.2 Presencia y localización de la proteína TAU en células mesenquimales de pulpa dental

Para estudiar la presencia de la proteína TAU en las células de pulpa dental se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando tres anticuerpos distintos (T46, TAU5 y DA9) cuyos epítomos son independientes del estado de fosforilación de la proteína.

La detección de la proteína TAU mediante el anticuerpo T46 que detecta a la proteína TAU total por unión en la región C- terminal fue positiva (Fig. 6A) y su localización tanto en núcleo como en citoplasma fue evidenciada por el contraste con la tinción de núcleos de Hoescht (Fig. 6B-C, canal azul), como control fue utilizada la línea celular HEK293 (Fig. 6D-F) negativa para la expresión de TAU (Santa-Maria et al., 2007).

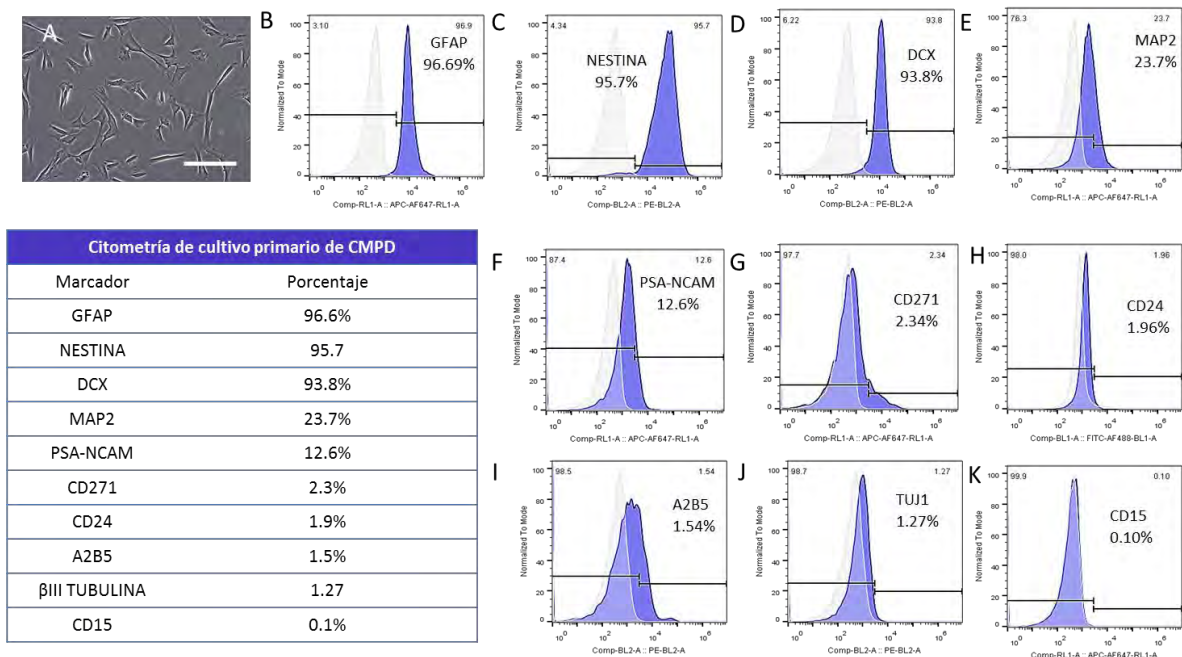


Figura 5.- Cultivo de células de pulpa dental y evaluación de la expresión para marcadores de progenitores neurales. A. Las células de pulpa dental se adherieron al plato desde las primeras 12 h de cultivo y presentaban morfología fibroblastoide. Barra=100 μ m. B-D. Células de pulpa dental positivas para la expresión de los marcadores GFAP, NESTINA y DOBLECORTINA (histogramas morados), como control fueron utilizadas células de pulpa dental sin marcaje de ningún anticuerpo (histogramas grises). E-K. Porcentajes obtenidos para los marcadores MAP2, PSA-NCAM, CD271, CD24, A2B5, TUJ1 y CD15.

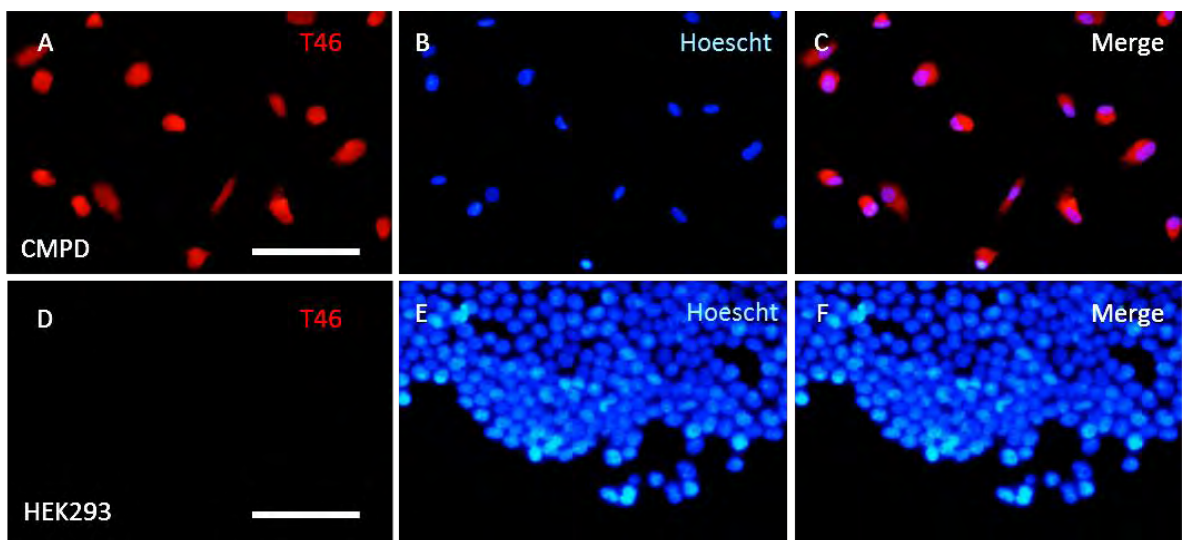


Figura 6.- Inmunodetección de la proteína TAU en células de pulpa dental con el anticuerpo T46. A-C. Cultivo de células mesenquimales de pulpa dental positivas para la detección de la proteína TAU por el anticuerpo T46 (canal rojo). Se observa colocalización de la proteína TAU (canal rojo) con la tinción de ácidos nucleicos de Hoescht en el núcleo (canal azul) y en su periferia. D-F. La línea celular HEK293 fue utilizada como control negativo para la presencia de la proteína TAU (Canal rojo). Microscopía de epifluorescencia. Barra=100 μ m.

La localización de la proteína TAU en células de pulpa dental también fue analizada mediante microscopía confocal con el anticuerpo TAU5 el cual detecta la proteína TAU total en los aa 210 a 241 independientemente de su fosforilación y el anticuerpo DA9 que detecta la secuencia de aminoácidos 102-140 de la proteína.

La inmunorreactividad del anticuerpo TAU5 evidenció una tinción difusa citoplasmática en la mayoría de las células de pulpa dental (Fig. 7A, canal verde) y en el núcleo lo cual es evidenciado por el contraste con la tinción de ácidos nucleicos con TO-PRO (Fig. 7B-C, canal azul).

La detección de fluorescencia para el anticuerpo DA9 de la proteína TAU es tenue en el citoplasma con mayor intensidad en los núcleos (Fig. 7D-F, canal verde).

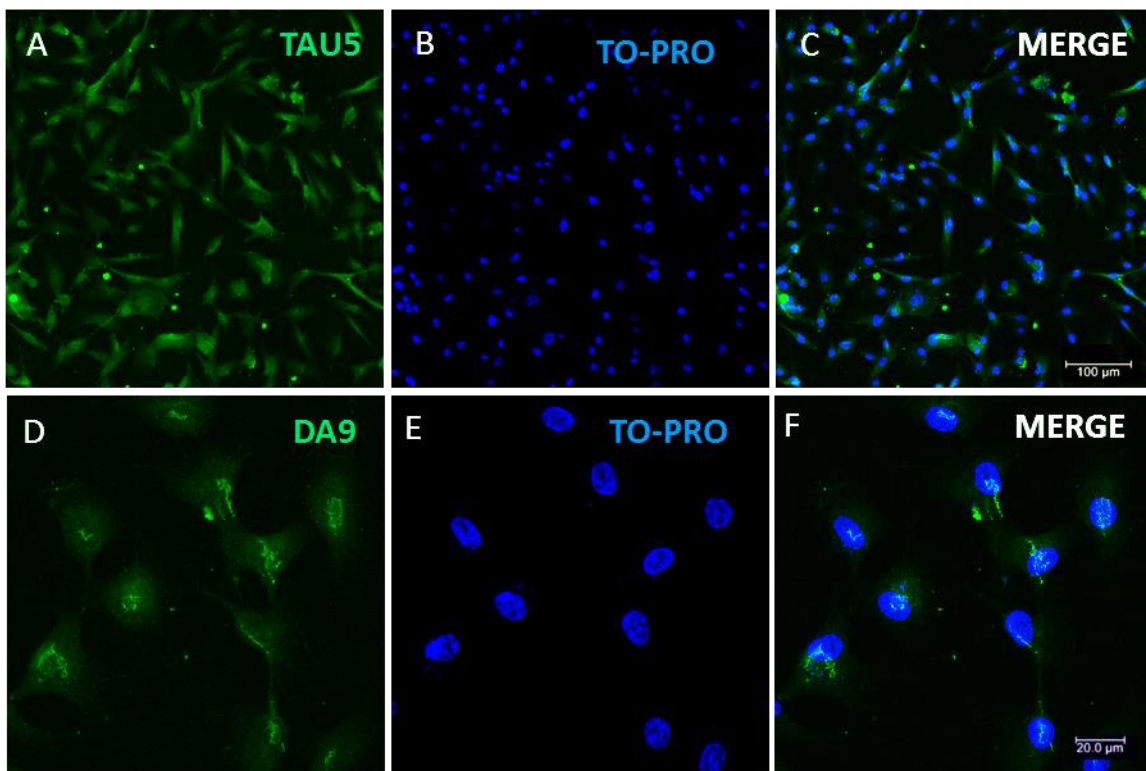


Figura 7.- Inmunodetección de la proteína TAU por los anticuerpos TAU5 y DA9. A-C. Cultivo de células de pulpa dental positivas a la detección de la proteína TAU por el anticuerpo TAU5 (canal verde), contrastado con la tinción de ácidos nucleicos por TO-PRO (canal azul). D-F. Inmunodetección del anticuerpo DA9 (canal verde), contrastado con la tinción de ácidos nucleicos por TO-PRO (canal azul). La detección puede observarse tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células.

Adicionalmente se identificó la presencia de filamentos afines a faloidina en el citoplasma de las células de pulpa dental, la faloidina es una micotoxina del grupo de las falotoxinas producida por el hongo *Amanita phalloides* con la capacidad de impedir la despolimerización de los filamentos de actina. La detección de filamentos de actina permitió delimitar la morfología de la célula y detallar la

localización de la proteína TAU. En algunas células se identificó colocación de filamentos de actina (Fig. 8B, flecha, canal rojo) con la detección para el anticuerpo DA9 (Fig. 8A, flecha, canal verde) en la región perinuclear lo cual es evidenciado por la tinción de ácidos nucleicos por TO-PRO (Fig. 8C y D, canal azul).

Esta observación puede estar vinculada a lo reportado por Elie et al., (2014) donde demuestra que la proteína TAU puede interactuar con los filamentos de actina uniéndose al mismo tiempo que el microtúbulo (Elie et al., 2014).

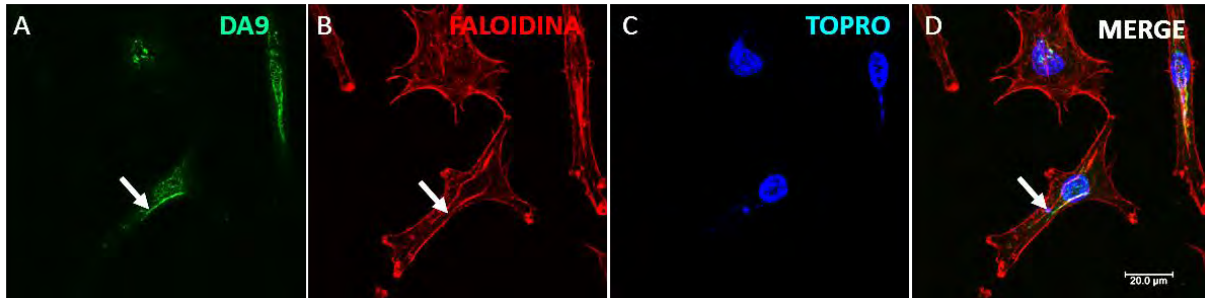


Figura 8.- Inmunotinción para el anticuerpo DA9 contatreado con faloidina y TO-PRO-3. A. Células de pulpa dental positivas a la detección del anticuerpo DA9 (canal verde). B. Detección de F actina por faloidina (canal rojo) C. Tinción de ácidos nucleicos por TO-PRO (canal azul) D. Contraste de los distintos canales de fluorescencia, la inmunorreactividad del anticuerpo DA9 se puede observar en un patrón granulado dentro del núcleo lo cual es evidenciado por la tinción de ácidos nucleicos, en algunas células la proteína TAU colocaliza con filamentos de F actina positivas a la tinción con faloidina en la región perinuclear (A, B y D, flechas).

6.3 Localización celular de epítomos fosforilados de la proteína TAU en células de pulpa dental

La fosforilación en la región rica en prolinas de la proteína TAU fue analizada a través de inmunodetección de los anticuerpos CP13, pThr231 y MC6 (Fig. 9). Para el anticuerpo Cp13 que detecta la fosforilación en la posición Ser202 la señal de fluorescencia se identificó tenue en el citoplasma e intensa en el núcleo de las células (Fig. 9A-C, flecha, canal verde), lo cual es evidenciado por el contraste con TO-PRO (Fig. 9C, canal azul) y faloidina (Fig. 9C, canal rojo).

La inmunorreactividad del anticuerpo pThr231 evidenció una tinción difusa citoplasmática en la mayoría de las células (Fig. 9D-F, canal verde). Sin embargo, algunas células presentan fluorescencia intensa localizada en núcleo (Fig. 9E, flecha, canal verde). La localización dentro del núcleo detectada por el anticuerpo pThr231 se evidencia en las imágenes contrastadas con TO-PRO (Fig. 9F, canal azul). En algunas células la fluorescencia detectada por inmunorreactividad al epítomo pThr231 colocalizó con los filamentos de actina detectados por faloidina (Fig. 10).

Estas observaciones son similares a los obtenidos por la detección con el anticuerpo AD9 (Fig. 8) que también colocaliza con filamentos de actina.

La inmunorreactividad del anticuerpo MC6 cuyo epítipo depende de la fosforilación en el sitio Ser235 fue detectada en todas las células tanto en núcleo como en citoplasma (Fig. 9G-I). La mayoría de las células mostraron inmunorreactividad al anticuerpo MC6 en un patrón moteado dentro del núcleo de la célula (Fig. 9H e I, flecha). Este patrón moteado o granuloso ha sido observado previamente en cultivos primarios de fibroblastos humanos en interfase (Rossi et al., 2008).

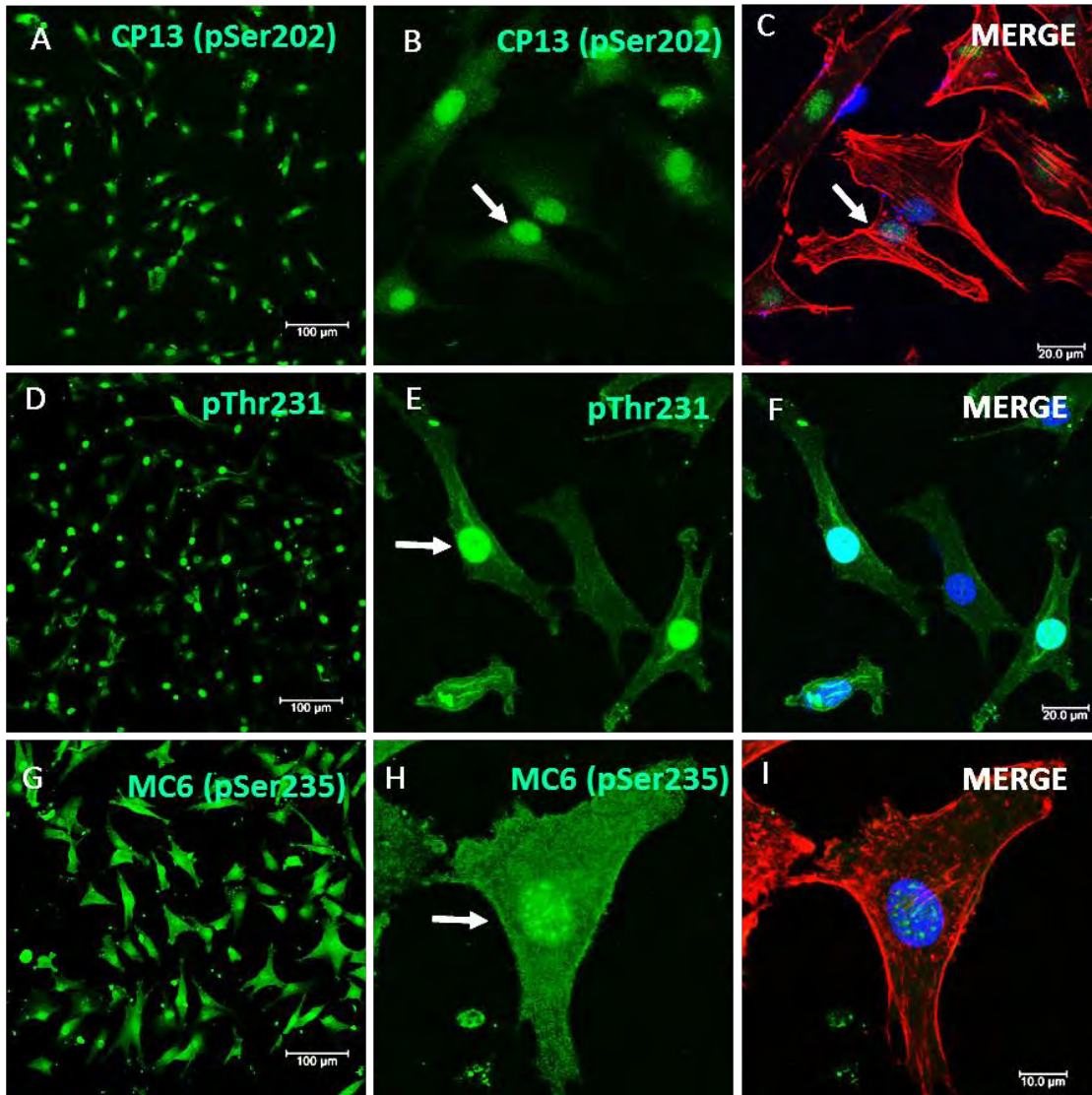


Figura 9.- Inmunodetección de sitios fosforilados de la región rica en prolinas de la proteína TAU en células de pulpa dental. A-C. Células de pulpa dental positivas a la detección del anticuerpo CP13 que reconoce un epítipo dependiente de la fosforilación de Ser202, la detección se puede observar tanto en el citoplasma como en el núcleo de las CMPD. A mayor aumento se aprecia la detección de fluorescencia es más intensa en los núcleos de las células (B y C, flechas) lo cual es evidenciado por la tinción con TO-PRO (C, canal azul). D-F. Para el anticuerpo pThr231 se observa fluorescencia tenue tanto en citoplasma como en el núcleo de las células de pulpa dental. A mayor aumento la detección de fluorescencia es más intensa en los núcleos de algunas células (flecha). G-I. La inmunorreactividad del anticuerpo MC6 el cual detecta la fosforilación de la Ser 235 de la proteína TAU, se observa tanto en citoplasma como en el núcleo de las células en un patrón punteado intranuclear (H, flecha).

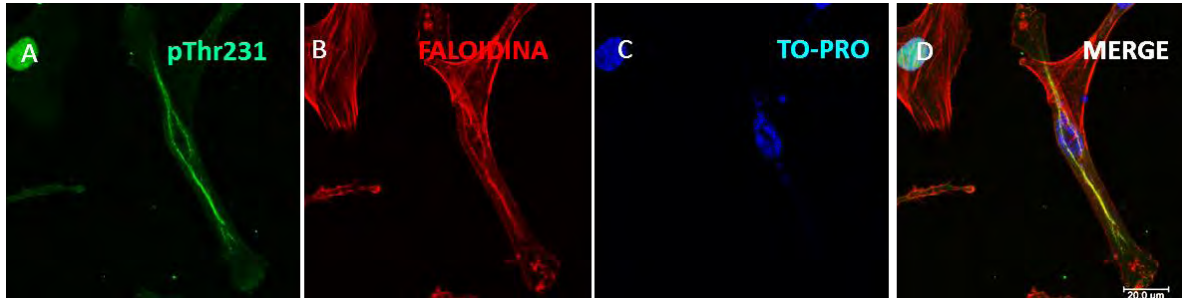


Figura 10.- Inmunotinción para el anticuerpo pThr231 contratneído con faloidina y TO-PRO. A. Cultivo de células de pulpa dental positiva para la detección del anticuerpo pThr231. B. Detección de F actina por faloidina (canal rojo) C. Tinción de ácidos nucleicos por TO-PRO (canal azul) D. Contraste de los distintos canales de fluorescencia, la inmunorreactividad del anticuerpo pThr231 se puede observar colocalizando con filamentos de F actina positivas a la tinción con faloidina en la región perinuclear.

La fosforilación en la región C-terminal de la proteína TAU fue analizada a través de Inmunodetección de los anticuerpos pSer396, pSer404, pSer422 (Fig. 11). La inmunorreactividad del anticuerpo pS396 fue detectada en la mayoría de las células tanto en núcleo como en citoplasma (Fig. 11 A-C, canal verde). La intensidad de fluorescencia en la mayoría de las células se encontró asociada al núcleo, lo cual fue evidenciado por el contraste con TO-PRO (canal azul) y faloidina (canal rojo) (Fig. 11 B y C).

Para el anticuerpo pSer404 señal de fluorescencia se identificó tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células (Fig. 11D-F, canal verde). A mayor aumento se observa que la fluorescencia detectada para este anticuerpo es más intensa en el núcleo de las células y presenta un patrón punteado (Fig. 11E), lo cual es evidenciado por el contraste con TO-PRO (canal azul) y faloidina (canal rojo).

El estudio de la fosforilación en los sitios Ser396 y Ser404 ha sido analizado en pacientes de Alzheimer, mediante el uso del anticuerpo PHF-1, dicho anticuerpo detecta de forma simultánea la fosforilación de ambos sitios presente en NFTs (Augustinack, et al., 2002) estos sitios de fosforilación también se observan en células de neuroblastoma, la detección es evidente en toda la célula a diferencia de la detección en células neuronales donde se observan asociados a NFTs.

El anticuerpo pSer422 tiene la capacidad de discriminar entre cortes histológicos de pacientes sanos y cortes histológicos de pacientes con la enfermedad de Alzheimer principalmente en NFTs (Augustinack et al., 2002) la detección en células de pulpa dental mediante este anticuerpo mostró un patrón similar a la detección con los anticuerpos Ser396 y Ser 404 tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células (Fig. 11G-I).

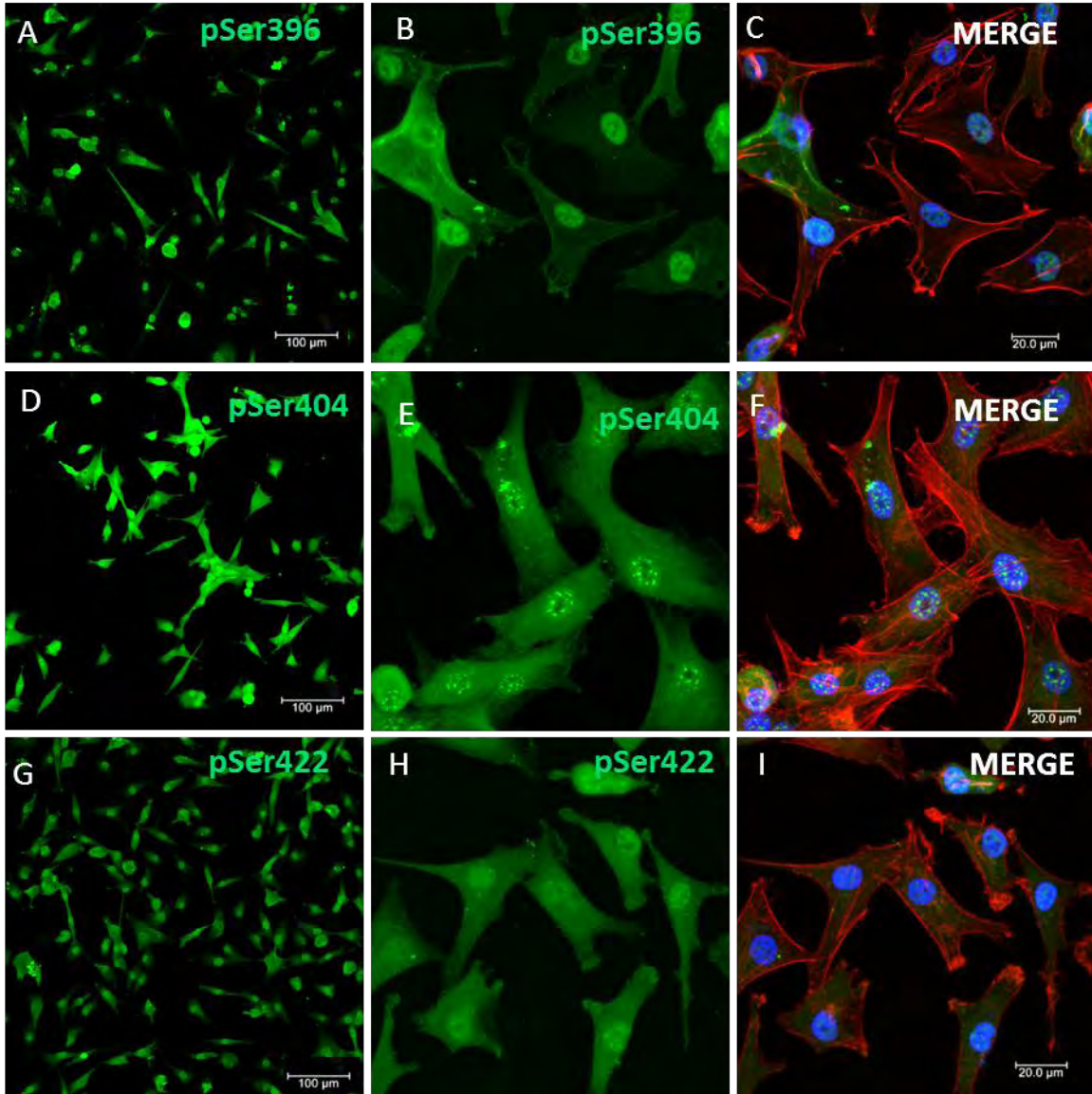


Figura 11.- Inmunodetección de sitios fosforilados en la región C-terminal de la proteína TAU en células de pulpa dental. A-C. Células de pulpa dental positivas a la detección del anticuerpo pSer396 tanto en el citoplasma como en el núcleo. A mayor aumento se aprecia la detección de fluorescencia es más intensa en los núcleos de las células (B y C) lo cual es evidenciado por la tinción con TO-PRO (C, canal azul). D-F. Para el anticuerpo pSer404 se observa fluorescencia tenue tanto en citoplasma como en el núcleo de las células de pulpa dental. A mayor aumento la detección de fluorescencia es más intensa en los núcleos de algunas células en un patrón punteado evidente. G-I. La inmunoreactividad del anticuerpo pSer422, se observa tanto en citoplasma como en el núcleo de las células en un patrón punteado intranuclear.

6.4 Inmunodetección para cambios conformacionales de la proteína TAU en células de pulpa dental.

La inmunorreactividad observada para el anticuerpo TG3 (Fig. 12 A-C) cuyo epítipo depende de un cambio conformacional de la molécula TAU dependiente de la fosforilación del residuo T231 (Jicha et al., 1997), mostró que en la mayoría de las células se presenta principalmente en el citoplasma lo cual fue evidenciado por el contraste con TO-PRO (canal azul) y faloidina (Canal rojo). Algunas células presentaron fluorescencia para el anticuerpo TG3 dentro del núcleo en un patrón punteado, a diferencia de otras células en el mismo campo óptico (Fig. 12D-F).

Para el anticuerpo AT100 (Fig. 12G-I) se identificó un patrón contrario a lo observado para el anticuerpo TG3 en este patrón se identifica que el epítipo reconocido se encuentra principalmente asociado al núcleo en un patrón punteado lo cual es evidenciado por el contraste con TO-PRO (canal azul) y faloidina (Canal rojo).

6.5 Inmunodetección de epítipos fosforilados de la proteína TAU durante el proceso mitótico

Se ha descrito previamente que la fosforilación de la proteína TAU aumenta durante procesos mitóticos (Rossi, et al., 2008) en particular la detección de fluorescencia para el anticuerpo TG3 se localizó rodeando a los cromosomas en diversas etapas de la mitosis en células de pulpa dental. En la figura 13 se observa la condensación del material genético con ayuda del contraste de la tinción de ácido nucleicos de TO-PRO (Fig. 13B, canal azul) mientras que la detección para F-actina (Fig. 13C, canal rojo) se encuentra localizada principalmente en la periferia de las células redondeadas. También se observa fluorescencia por inmunodetección del anticuerpo TG3 rodeando a los cromosomas alineados en el plano ecuatorial durante la etapa de metafase (Fig. 13E-H). Células en etapa de anafase demuestran fuerte intensidad de fluorescencia para el anticuerpo TG3 principalmente colocalizando con los cromosomas. Finalmente, una vez que las células se han separado lo cual se identifica por la tinción de faloidina (Fig. 13O), la intensidad de fluorescencia para el anticuerpo TG3 es uniforme dentro del núcleo y en el citoplasma (Fig. 13M-P).

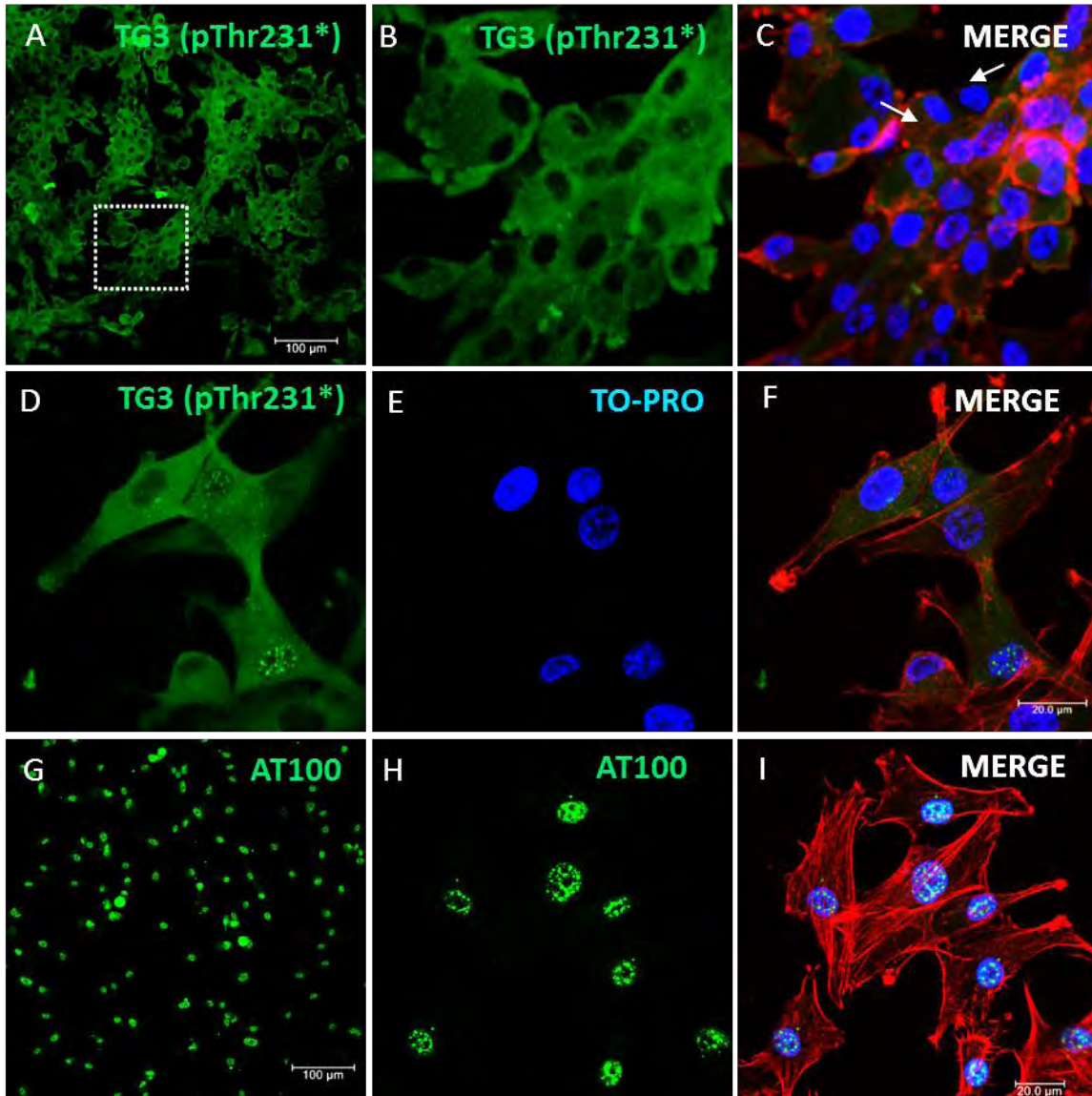


Figura 12.- Inmunodetección para los anticuerpos TG3 y AT100 en células de pulpa dental. A-C. Células de pulpa dental positivas a la detección con el anticuerpo TG3 (canal verde), en el citoplasma de la mayoría de las células (A, canal verde), zonas del mismo campo óptico (recuadro punteado) se muestran amplificadas (B y C). La tinción de ácidos nucleicos con TO-PRO (C, canal azul, flechas) evidencia la ausencia de fluorescencia en los núcleos de la mayoría de las células. D-F. Algunas células positivas para la detección del anticuerpo TG3 tienen fluorescencia en el núcleo presentando un patrón punteado (D). G-I. A diferencia del anticuerpo TG3, la detección para el anticuerpo AT100 se encuentra principalmente asociada al núcleo en un patrón granulado (G-I).

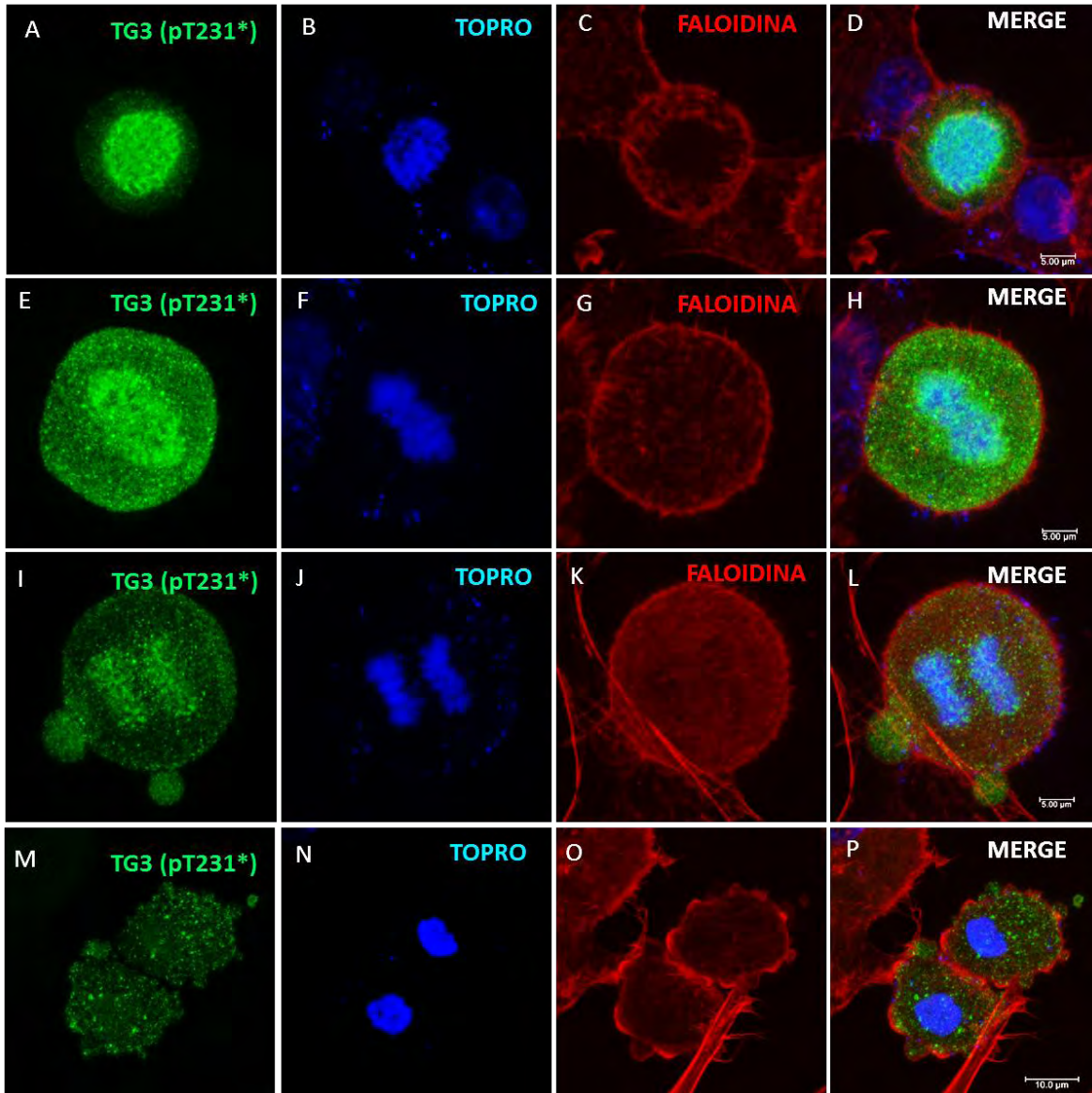


Figura 13.- Inmunotinción para el anticuerpo TG3 en células de pulpa dental durante diferentes etapas del proceso mitótico. A-D. Célula positiva para la detección del anticuerpo TG3 (canal verde) durante la profase, la morfología de la célula se evidencia por la tinción de F actina de faloidina (canal rojo), se puede identificar la compactación del material genético por la tinción de TO-PRO (canal azul). E-H. Célula positiva para la detección del anticuerpo TG3 (canal verde) durante la metafase evidenciada por la alineación en el plano ecuatorial de los cromosomas (canal azul), la intensidad de fluorescencia para el anticuerpo TG3 se identifica rodeando a los cromosomas. I-L. Célula positiva para la detección del anticuerpo TG3 (canal verde) durante la anafase, los cromosomas se pueden observar separados del plano ecuatorial ligeramente distanciados hacia los polos (canal azul). M-P Células independientes después del proceso mitótico la detección con el anticuerpo TG3 (canal verde) puede observarse difusa en ambas células, la morfología fibroblastoide característica de las células de pulpa dental aún no se observa (canal rojo).

Algunas células en procesos mitóticos también mostraron inmunorreactividad para el anticuerpo MC6 alrededor de los cromosomas, lo cual fue evidenciado por el contraste con TO-PRO (Fig. 14 A-D, canal azul) y faloidina (Fig. 14 A-D, canal rojo). Durante el proceso mitótico los centrosomas se disponen en los polos opuestos de la célula facilitando el ensamblaje del huso mitótico formado por microtúbulos, los cuales invaden el espacio nuclear para anclarse a los cromosomas a través de los cinetocoros. La detección del anticuerpo MC6 puede observarse en los alrededores de los cromosomas y en los polos opuestos de la célula probablemente asociados a los centrosomas durante la etapa de anafase (Fig. 14 A-D).

Mediante el uso del anticuerpo AT100 es posible detectar un cambio conformacional que involucra la fosforilación de los sitios Thr212 y Ser214. A diferencia de lo observado para el anticuerpo TG3 este cambio conformacional se observa principalmente en forma punteada en los núcleos de las células (Fig. 12G-I). Células redondas en división muestran señal de fluorescencia difusa a diferencia de células con morfología fibroblastoide en interfase, en las cuales se observa mayor intensidad de fluorescencia (Fig. 14E-H).

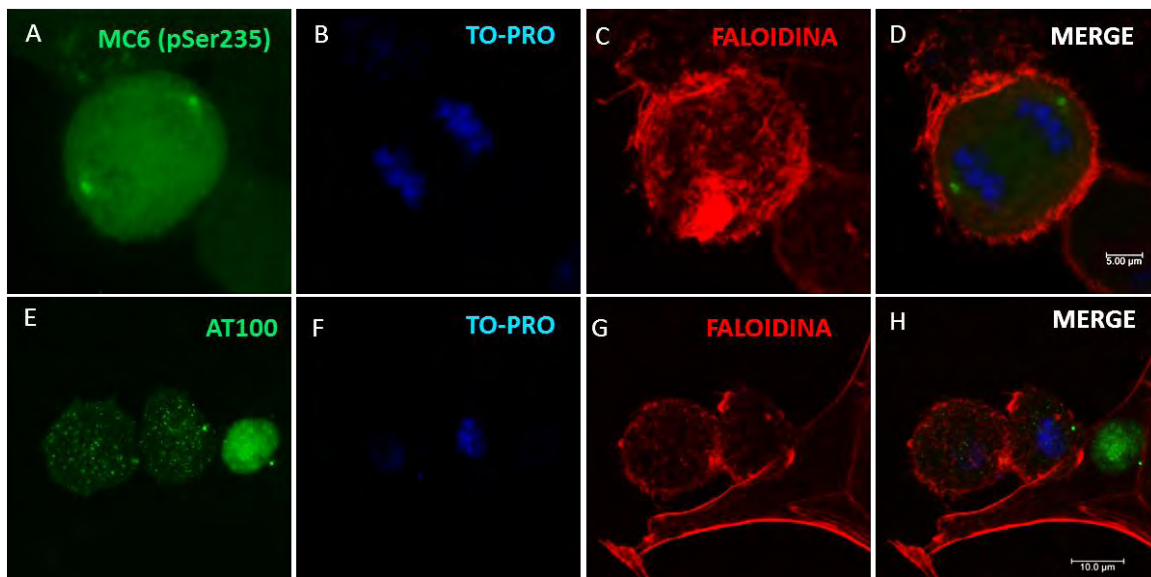


Figura 14.- Inmunodetección para los anticuerpos MC6 y AT100 en células de pulpa dental durante el proceso mitótico. A-D. Célula de pulpa dental en anafase positiva para la detección del anticuerpo MC6 (canal verde) cuyo epítipo depende de la fosforilación de la proteína TAU en el sitio Ser235. Se puede observar mayor intensidad en los polos opuestos de la célula posiblemente interactuando con los centriolos. Los cromosomas separados del plano ecuatorial se pueden observar distanciados hacia los polos lo cual es evidenciado por la tinción de ácidos nucleicos por TO-PRO (canal azul). E-H. Células de pulpa dental redondas después del proceso mitótico, junto a una célula de morfología fibroblastoide (interfase) positivas para la detección del anticuerpo AT100 (canal verde). La intensidad de fluorescencia es evidente en el núcleo de la célula fibroblastoide a diferencia de la detección en las células redondas, la morfología se evidencia por la tinción de F-actina con faloidina (canal rojo).

6.6 Diferenciación de células pluripotentes inducidas hacia cresta neural

Los cultivos realizados de iPSCs mostraron la morfología característica reportada para células pluripotentes, crecían en colonias celulares con poco citoplasma, además de bordes regulares y brillantes en microscopía de fases (Fig. 15A) (Thomson et al., 1998).

Las células iPSCs fueron diferenciadas mediante el método establecido por Menéndez en 2011 hacia cresta neural en el cual se inhibe la cinasa GSK3 β un antagonista de la cascada de señalización de WNT y se inhibe la cascada de señalización TGF β . Los cultivos obtenidos presentaban la morfología característica de cresta neural (Fig. 15C) (Gabsang Lee et al., 2007; Menendez et al., 2011).

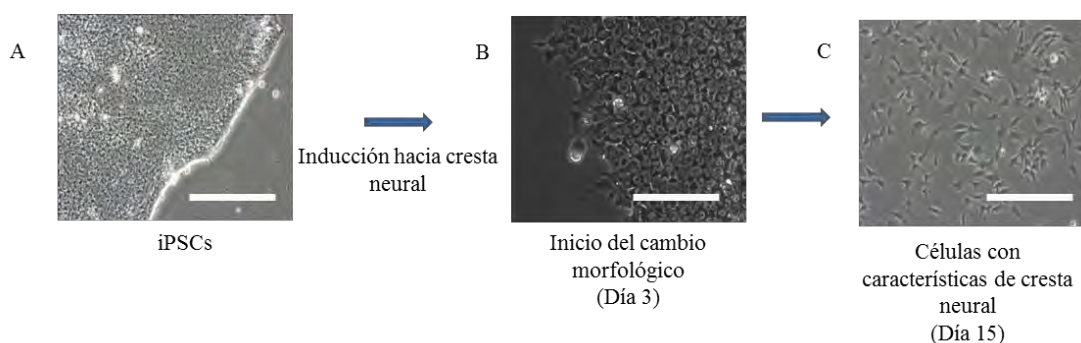


Figura 15.- Cambio morfológico de células iPSCs diferenciadas hacia cresta neural a través del tiempo. A. Células iPSCs en microscopía de fases, se observa una colonia celular con bordes regulares. B. Células iPSCs sometidas al medio de inducción hacia cresta neural al tiempo de 3 días, los bordes regulares de las células originales se pierden y algunas células presentan morfología tipo cresta neural. C. Morfología de células después de 15 días de exposición al medio de diferenciación hacia cresta neural. Barra =100 μ m.

6.7 Caracterización de células de cresta neural obtenidas a partir de iPSCs.

La proteína SOX10 es parte de una familia de factores de transcripción involucrada en el desarrollo embrionario y suele ser utilizada como marcador de células de cresta neural. Para evaluar si en las células diferenciadas hacia cresta neural se expresa esta proteína se realizó una inmunofluorescencia por detección del anticuerpo SOX10, los resultados demuestran que la proteína SOX10 se encuentra presente en la mayoría de las células, el análisis se llevó a cabo con un microscopio de epifluorescencia (Fig. 16, canal verde), la localización de la fluorescencia fue evidenciada por la tinción de Hoescht (Fig. 16, canal azul). En el mismo ensayo se realizó inmunodetección para la proteína TAU con el anticuerpo T46 que detecta a la proteína TAU en su región C-terminal independientemente de su fosforilación, los resultados mostraron que la expresión de TAU no fue inducida por el proceso de diferenciación hacia cresta neural, ya que no se observa fluorescencia para la detección del anticuerpo T46 en el cultivo (Fig. 16, canal rojo, negativo).

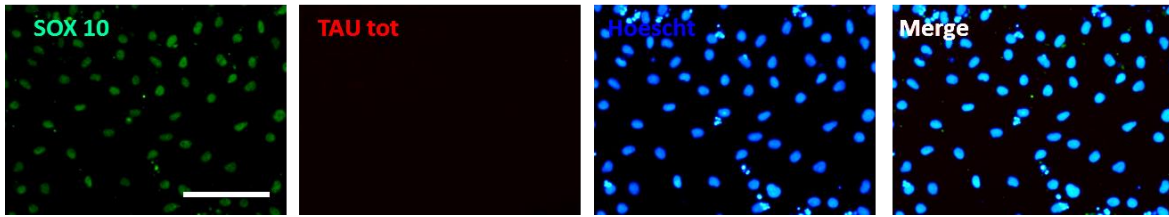


Figura 16.- Inmunofluorescencia para las proteínas SOX10 y TAU total contrateñidas con Hoescht en células diferenciadas hacia cresta neural. La inmunoreactividad para el anticuerpo SOX10 (Canal verde) se observa en los núcleos de la mayoría de las células en cultivo, evidenciado por la tinción de ácidos nucleicos por Hoescht (canal azul) a diferencia de la tinción para el anticuerpo T46 que detecta a la proteína TAU total (canal rojo) que no presenta fluorescencia. Microscopía de epifluorescencia. Barra =100µm. Resultados representativos de dos experimentos.

Mediante citometría de flujo se analizó la expresión de marcadores de cresta neural y marcadores mesenquimales en las células diferenciadas hacia cresta neural. Se encontró que el 75% de las células coexpresan los marcadores de cresta neural p75 y Hnk1 (Fig. 17, A) y son negativas para los marcadores mesenquimales CD73 y CD105 (Fig.17, B).

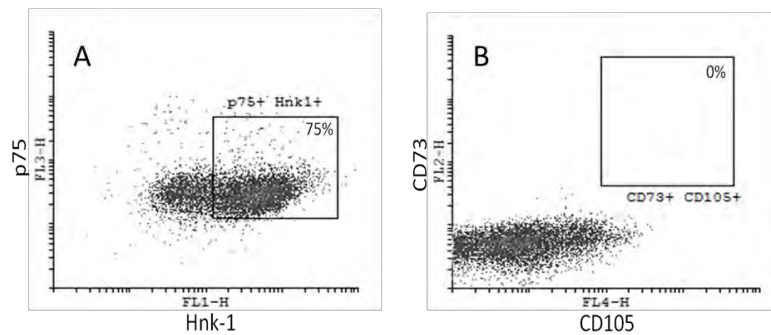


Figura 17.- Caracterización por citometría de flujo para marcadores de cresta neural y para marcadores mesenquimales en células de cresta neural. A-. Histograma de células de cresta neural obtenidas por diferenciación de iPSCs, el 75% de las células analizadas (1×10^4) coexpresan los marcadores p75 y HNK-1 (marcadores de cresta neural). B. En otro ensayo células del mismo origen fueron analizadas para la expresión de los marcadores mesenquimales CD73 y CD105, el porcentaje de células que coexpresan ambos marcadores es de 0%.Resultados representativos de dos experimentos.

6.8 Diferenciación de células de cresta neural hacia linaje mesenquimal

Las células de cresta neural obtenidas a partir de células pluripotentes tienen la capacidad de diferenciarse hacia el linaje mesenquimal (Gabsang Lee et al., 2007). Utilizando este enfoque se obtuvieron células adherentes con morfología característica de linaje mesenquimal en un proceso que tuvo 4 días de duración (Fig. 18 B).

Mediante un ensayo de citometría se analizó la adquisición de marcadores mesenquimales (CD73 y CD105) posterior a la diferenciación de células de cresta neural hacia linaje mesenquimal, los resultados muestran un aumento en el porcentaje de células con la expresión de dichos marcadores (90%) (Fig. 19B) , así mismo se analizó el porcentaje de células que aún coexpresaban los marcadores de cresta neural (p75 y HNK1) después de la diferenciación mesenquimal, dicho porcentaje se observa drásticamente reducido (5%) (Fig. 19A).

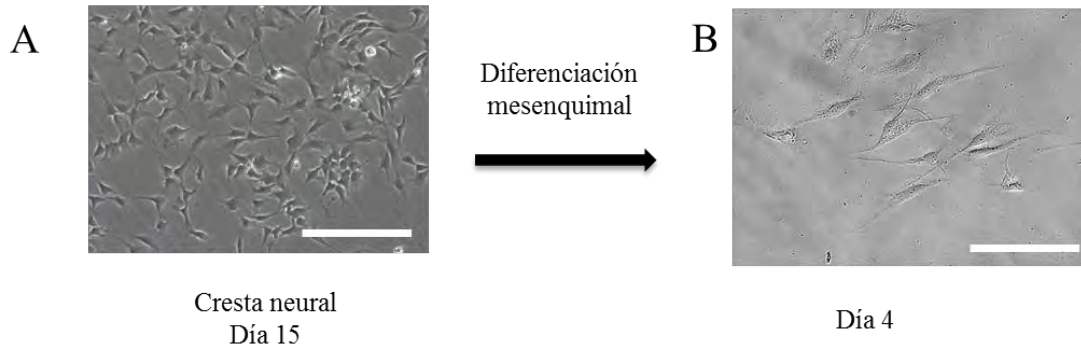


Figura 18.- Diferenciación de células de cresta neural hacia linaje mesenquimal. A-Células de cresta neural provenientes de iPSCs en microscopía de fases Barra =100µm. B. Células obtenidas con morfología fibroblastoide, tras la diferenciación mesenquimal, las células obtenidas tenían la capacidad de adherirse al plato después de 4 días de inducción. Barra =20 µm.

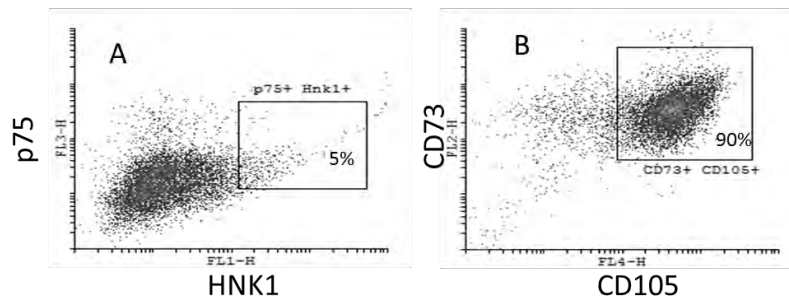


Figura 19.- Caracterización por citometría de flujo en células mesenquimales obtenidas de células de cresta neural. A. Células de cresta neural diferenciadas hacia linaje mesenquimal son analizadas para la expresión de los marcadores p75 y HNK1, los resultados muestran que tras el proceso de diferenciación mesenquimal solo el 5% de células coexpresan ambas proteínas. B. Células de cresta neural diferenciadas hacia linaje mesenquimal coexpresan los marcadores mesenquimales CD73 y CD105 en un 90% de las células analizadas. Resultados representativos de dos experimentos.

6.9 Inmunodetección de epítomos fosforilados de la proteína TAU en células mesenquimales provenientes de iPSCs.

Se realizó una comparación de la fosforilación entre células de pulpa dental y células mesenquimales provenientes de la diferenciación de células de cresta neural, particularmente en la región rica en prolinas de la proteína TAU en los sitios Ser214 y Thr231, los cuales al ser fosforilados pueden provocar que la proteína se desprende de la estructura del microtúbulo en neuronas (Lu et al.,1999). Los resultados demuestran que células mesenquimales de ambas fuentes presentan inmunodetección para los dos epítomos dependientes de fosforilación (Fig. 20).

La fosforilación en el sitio Ser214 se localiza en el núcleo y en citoplasma tanto en células de pulpa dental (Fig. 20A) como en células provenientes de iPSCs (Fig. 20C).

La fosforilación en el sitio Thr231 en células dentales se observa tanto en núcleo como en citoplasma (Fig. 20B) a diferencia de las células mesenquimales provenientes de iPSCs donde la fosforilación Thr231 se localiza en el núcleo (Fig. 20D).

También se realizó una comparación de la fosforilación de la proteína TAU en su región C-terminal, particularmente en los sitios Ser396 y Ser404 entre ambas fuentes de células mesenquimales. Para el sitio S396 la fosforilación en células dentales se observa principalmente asociada al núcleo (Fig. 21A) situación que también se observa en células mesenquimales provenientes de iPSCs (Fig. 21C). La localización para el anticuerpo pSer404 en células de pulpa dental se identifica en el núcleo y en citoplasma evidenciado por la tinción de ácidos nucleicos de Hoescht (Fig. 21B). En células mesenquimales obtenidas a partir de la diferenciación de células pluripotentes se puede observar que la detección para el anticuerpo pSer404 se encuentra principalmente asociada al núcleo celular (Fig. 21D). Las diferencias en cuanto a localización de los epítomos fosforilados de la proteína TAU demuestran que la regulación de la fosforilación de la proteína es diferente dependiendo la fuente de las células mesenquimales.

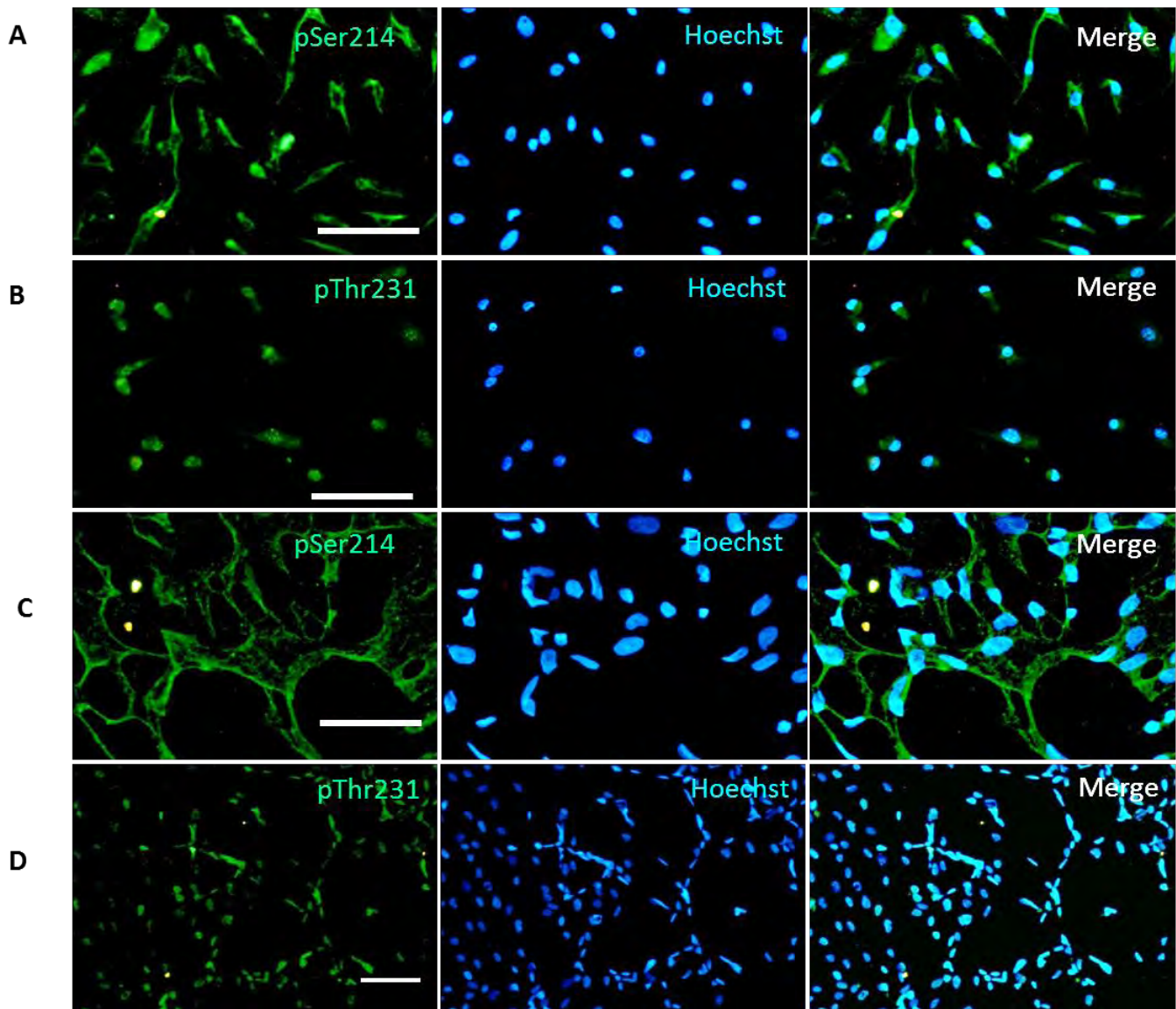


Figura 20.-Inmunodetección de los anticuerpos pSer214 y pThr231 en células mesenquimales de pulpa dental y células mesenquimales derivadas de iPSCs. A. CMPD positivas para la detección del anticuerpo pSer214 (canal verde), la detección se observa tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células, evidenciado por la detección de ácidos nucleicos de Hoescht (canal azul). Barra =20 μ m. B. CMPD positivas a la detección del anticuerpo pThr231 (canal verde), la detección se observa principalmente en el núcleo de las células, también se observó tenue en el área perinuclear. Barra =20 μ m. C. Células mesenquimales obtenidas por diferenciación de iPSCs positivas para la detección del anticuerpo pSer214 (canal verde), la detección se observó tanto en el núcleo como en el citoplasma. Barra =20 μ m. D. Células mesenquimales obtenidas por diferenciación de iPSCs positivas para la detección del anticuerpo pThr231 (canal verde), la detección se observó principalmente en el núcleo de las células diferenciadas. Barra =100 μ m. Microscopía de epifluorescencia.

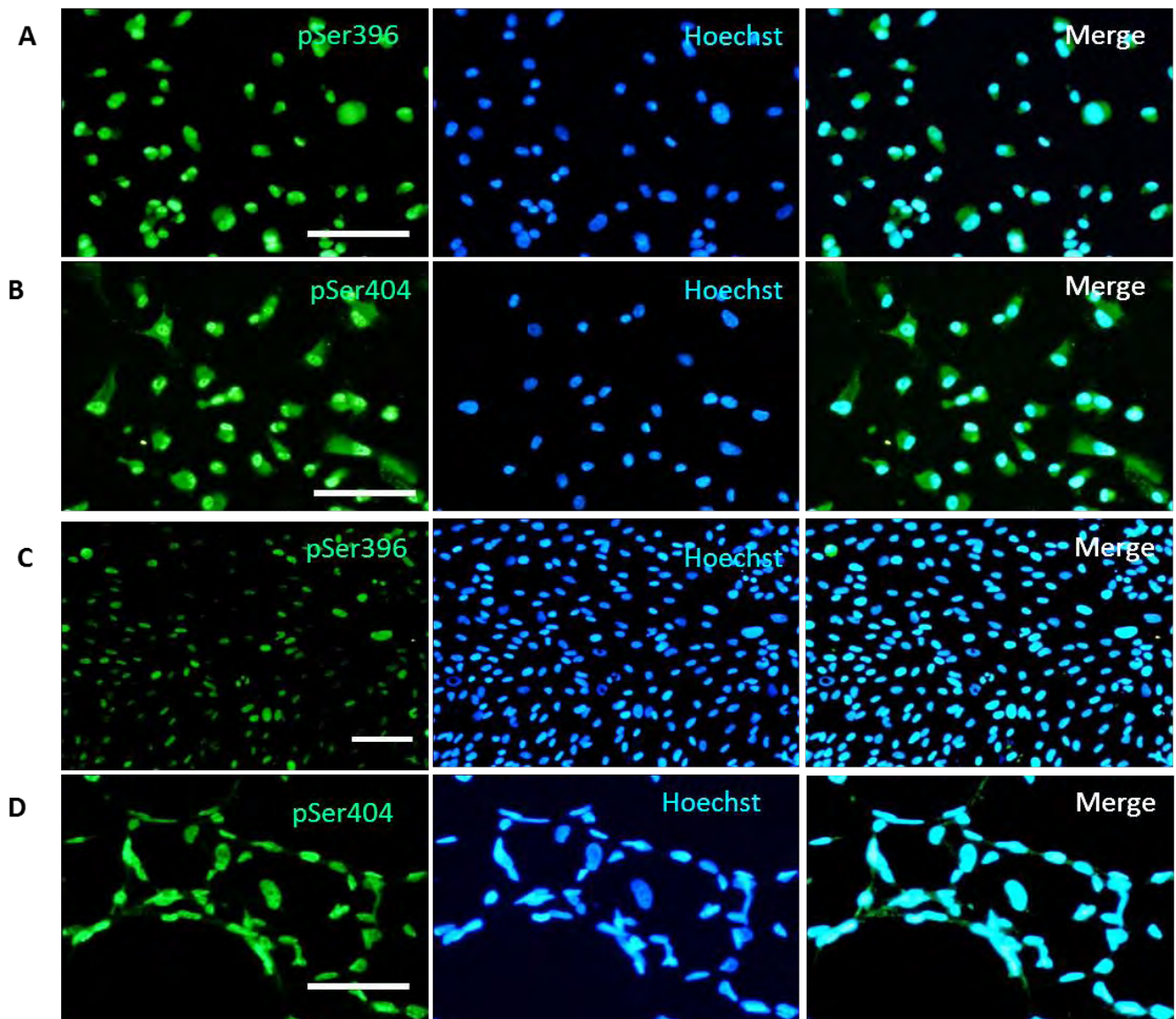


Figura 21. Inmunodetección de los anticuerpos pSer396 y pSer404 en CMPD y células mesenquimales derivadas de iPSCs. A. CMPD positivas para la detección del anticuerpo pSer396 (canal verde), la detección se observa tanto en el núcleo como en el área perinuclear de las células, evidenciado por la detección de ácidos nucleicos de Hoescht (canal azul). Barra =20 μm . B. CMPD positivas a la detección del anticuerpo pSer404 (canal verde), la detección se observó tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células analizadas. Barra =20 μm . C. Células mesenquimales obtenidas por diferenciación de iPSCs positivas para la detección del anticuerpo pSer396 (canal verde), la detección se observó únicamente en el núcleo de las células analizadas. Barra =100 μm . D. Células mesenquimales obtenidas por diferenciación de iPSCs positivas para la detección del anticuerpo pSer404 (canal verde), la señal se observó tanto en el núcleo como en el citoplasma. Barra =20 μm . Microscopía de epifluorescencia.

7 DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó un estudio de la presencia de la proteína TAU en una población aislada de pulpa dental humana que se caracteriza por la expresión de marcadores típicos de células progenitoras neurales. El resultado más importante del estudio es la demostración por primera vez de que la proteína TAU está presente en el citoplasma y núcleo de CMPD fisiológicamente normales y que la proteína presenta fosforilación en al menos 8 de los sitios identificados previamente en personas con la enfermedad de Alzheimer.

Las células de pulpa dental tanto de terceros molares como de dentición decidua han sido bien caracterizadas en años recientes y han sido clasificadas como mesenquimales basándose en su potencial de diferenciación y en la expresión de marcadores mesenquimales (CD73, CD90 y CD105) lo que las establece como un sistema de amplio interés biomédico principalmente en medicina regenerativa (Park, Cha, & Park, 2016). Adicionalmente se ha demostrado que las células de pulpa dental tienen la capacidad de diferenciarse hacia linaje neural y presentan expresión de marcadores neurales como NESTINA, β III-tubulina, GAD, GFAP entre otros (Miura et al., 2003). El motivo por el cual estas células expresan marcadores neurales no ha sido identificado, sin embargo tanto su potencial de diferenciación neural como la expresión de marcadores neurales han generado gran interés por su potencial para la investigación de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer.

Los métodos de cultivo pueden modificar la expresión de marcadores de células de pulpa dental (Gazarian & Ramírez-García, 2017), por este motivo se analizó la existencia de marcadores neurales bajo el método de obtención utilizado en el presente trabajo. Los resultados demuestran que las células obtenidas bajo esta metodología son positivas a GFAP, NESTINA Y DOBLECORTINA. A pesar de expresar marcadores neurales, la proteína TAU no ha sido estudiada a profundidad en CMPD.

La proteína TAU se expresa en células de distintos linajes celulares, localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo: en citoplasma regulando elementos del citoesqueleto mientras que en el núcleo confiriéndole protección al DNA genómico (Sultan et al., 2011), la descripción de TAU en distintos compartimentos celulares ha llevado a considerarla como una proteína multifuncional (Mazanetz & Fischer, 2007).

En este estudio analizamos la presencia de la proteína TAU en células de pulpa dental utilizando tres anticuerpos distintos (T46, TAU5 y DA9). Los resultados obtenidos con los tres anticuerpos demuestran que la mayoría de células de pulpa dental presentan la proteína TAU tanto en citoplasma como en núcleo. El anticuerpo DA9 mostró colocalización con F-actina proteína fundamental del citoesqueleto, la localización en el citoplasma ha sido vinculada con la regulación de los elementos del citoesqueleto, los resultados obtenidos muestran que en células de pulpa dental existe colocalización con F-actina, el

grupo de Elie en 2014 demostró que la proteína TAU puede interactuar con F-actina e incluso unirse simultáneamente con microtúbulos situación que puede ser la causa de la colocalización observada (Elie et al., 2014).

La proteína posee gran interés biomédico debido a su participación en diversas neuropatologías (Taupatías) en particular en la enfermedad de Alzheimer donde la proteína se observa agregada (NFT's) e hiperfosforilada en el citoplasma provocando que su función en la estabilidad de los microtúbulos se vea comprometida (Martin et al., 2011).

La hiperfosforilación observada en la enfermedad de Alzheimer puede estar patológicamente relacionada con la enfermedad por procesos diferentes ya que la hiperfosforilación de TAU puede modificar la compartimentalización de TAU hacia el espacio somatodendrítico como respuesta a agentes de estrés, desestabilizando los axones y provocando pérdida de conexiones sinápticas (Hoover et al., 2010) también puede evitar que la proteína sea degradada, un ejemplo se encuentra en la fosforilación del sitio S422 el cual evita que caspasa 3 pueda cortar a la molécula en la posición Asp421 (Guillozet-Bongaarts et al., 2006).

La descripción de las formas agregadas de la proteína TAU en el soma de neuronas afectadas por la enfermedad de Alzheimer, contribuyó a la descripción de diferentes etapas de la patología y ha permitido la reconstrucción de los eventos iniciales de dicha agregación (Luna-Muñoz et al., 2007).

Otros estudios demuestran que la hiperfosforilación de TAU no necesariamente involucra la agregación patológica de la proteína, tal es el caso de animales en hibernación o anestesiados (Arendt et al., 2003; Planel et al., 2007), sin embargo, se sabe que la hiperfosforilación es un evento previo a la agregación patológica en la enfermedad de Alzheimer.

La caracterización de la fosforilación de la proteína TAU en células de pulpa dental, mostró que todos los sitios analizados (pSer202, pSer214, pThr231, pSer235, pSer396, pSer404 y pSer422) estaban presentes en la mayoría de las células. Dentro de los anticuerpos analizados se incluyen epítomos que son considerados determinantes de las etapas iniciales, avanzadas y finales de la formación de ovillos neurofibrilares (Augustinack et al., 2002). Las diferencias observadas en la inmunorreactividad de los anticuerpos pueden deberse a la cantidad de moléculas fosforiladas en esa posición o bien a la exposición del epítomo detectado por el anticuerpo ya que la proteína puede adoptar diversas conformaciones (Hyman et al., 2005).

Adicionalmente se observó que en algunas células la fosforilación en Thr231 colocalizó con los filamentos de F-actina (Fig. 8) dicha colocalización, también observada con el anticuerpo DA9 podría indicar una función de TAU regulada por fosforilación en la interacción de microtúbulos y F actina.

La presencia de sitios de fosforilación observados en la enfermedad de Alzheimer apoyan la idea de que las CMPD pueden ser utilizadas como un sistema para analizar la fosforilación de TAU lo que puede

permitir la identificación del proceso que conlleva a la agregación de la proteína ya que hasta la fecha no ha sido descrito.

Dentro de los procesos que podrían desencadenar la agregación de TAU se ha estudiado la toxicidad mediada por β amiloide en el cual el proceso puede estar relacionado con una reentrada a ciclo celular en neuronas posmitóticas (King & Cidlowski, 1995) o bien anormalmente activado por factores de estrés que invariablemente culmina en un proceso apoptótico (King & Cidlowski, 1995).

Aún no se sabe cómo es que la reentrada a ciclo celular puede provocar hiperfosforilación. La proteína TAU tiene al menos 85 sitios potencialmente fosforilables con una o varias cinasas involucradas en el proceso (Hanger et al., 2009); cdc2 una de ellas, tiene la capacidad de fosforilar a TAU en células que reentran a ciclo celular permitiendo postular esta cinasa como responsable de los altos niveles de fosforilación (Pei et al., 2002).

Una de las problemáticas para entender el proceso de agregación de TAU en células neuronales es la carencia de modelos que permitan estudiar la fosforilación de tau de una manera adecuada tanto en etapa mitótica y post mitótica de la diferenciación neuronal. Los sistemas actualmente utilizados son cortes de tejidos de personas fallecidas, células tumorales y sistemas no humanos o transgénicos en los que se sobreexpresa a la proteína TAU lo cual no representa un proceso fisiológico.

El objetivo de nuestro estudio fue analizar a las células de pulpa dental como un modelo novedoso para la investigación de las modificaciones de la proteína TAU observadas en procesos neurodegenerativos (taupatías).

Otra de las modificaciones que sufre la proteína TAU en procesos neurodegenerativos es la presencia de cambios conformacionales (Weaver, Espinoza, Kress, & Davies, 2000). Solo dos anticuerpos de los utilizados en este estudio requieren no solo fosforilación sino también cambios conformacionales de la proteína para el reconocimiento de su epítipo: TG3 y AT100. Ambos anticuerpos han sido utilizados para la discriminación entre personas con y sin la enfermedad de Alzheimer (Jicha et al., 1997).

El reconocimiento del epítipo TG3 que involucra la fosforilación de Thr231 se localizó en citoplasma, pero no en el núcleo, este patrón de localización podría estar vinculado a la adopción de diferentes conformaciones dependiendo el compartimento celular. Por otro lado, el reconocimiento del anticuerpo AT100 fue observada principalmente en el núcleo celular en un patrón punteado, lo cual también se observa con los anticuerpos pSer396, pSer404 y pSer422. La fosforilación en diversos sitios en un patrón punteado asociado al núcleo también fue observada en un estudio previo por el grupo de Rossi et al., en fibroblastos por la detección de los anticuerpos AT8, HPT104 y AT100. Una posibilidad del patrón punteado observado es que la proteína se encuentra concentrada pero no agregada irreversiblemente ya que este patrón se pierde durante procesos mitóticos. Esta observación nos lleva a la posibilidad de que TAU sea un componente permanente del núcleo, pero en un estado de conformación distinto reflejado

por la detección del anticuerpo TG3 y AT100. Esta posibilidad puede ser analizada mediante ensayos de fraccionamiento celular.

Desde el descubrimiento de la proteína TAU Weingarten et al., propusieron que proteína TAU podría estar relacionada en la regulación de la estructura del huso mitótico permitiendo una correcta segregación de cromosomas. El cambio conformacional detectado por el anticuerpo TG3 que depende de la fosforilación en Thr231, mostró que hay una fuerte relación de TAU con la mitosis en este tipo de conformación (Jicha et al., 1997), lo que apoya la teoría de que las células afectadas por la enfermedad de Alzheimer pueden estar sufriendo un proceso de reentrada a ciclo celular presentando el epítipo de TG3 lo cual ha sido propuesto previamente (Vincent et al., 1996). La fosforilación del sitio Ser235 evidenciado por inmunorreactividad del anticuerpo MC6 el cual también se observa en pacientes con Alzheimer, también fue detectada asociada a procesos mitóticos rodeando los cromosomas y con alta intensidad en la región que ocupan los centrosomas durante la anafase.

Los reportes de Inoue et al. (2014) demuestran que la proteína TAU se puede detectar durante el proceso meiótico en la espermatogénesis, juntos estos datos demuestran la participación de la proteína TAU regulando los procesos de disyunción mitótica y meiótica en procesos aun pobremente descritos (Inoue et al., 2014; Sigala et al., 2014). Cabe destacar que un análisis realizado previamente en el laboratorio demostró que la mayoría de las células mesenquimales de pulpa dental en cultivo eran positivas a Ki67 una proteína que no se encuentra en células quiescentes o postmitóticas (ANEXO II) lo que demuestra que más del 95% de las células de pulpa dental en cultivo se encuentran en alguna fase del ciclo celular, la ausencia de fosforilación de tau puede obedecer a que el estado fosforilado no es necesario en estados postmitóticos, por tal motivo es necesario un modelo que permita estudiar los cambios en la fosforilación de TAU en células mitóticas y durante su diferenciación neuronal (postmitóticas) lo cual puede ser analizado en células de pulpa dental.

El desarrollo reciente de sistemas ESCs e iPSCs mantienen la promesa de proveer información basándose en la diferenciación hacia neuroepitelio para el estudio de TAU (Mertens J., Stuber K. & J., 2013).

Existe suficiente evidencia del origen embrionario en la cresta neural de las células mesenquimales de pulpa dental en mamíferos (Chai et al., 2000; Cordero et al., 2012). La expresión de marcadores neurales en células de pulpa dental ha sido vinculada en diferentes estudios con su origen embrionario (Karaöz et al., 2011)(Arthur et al., 2008)(Osathanon, et al., 2014).

Los avances en el desarrollo de metodologías para la diferenciación de células pluripotentes humanas *in vitro* ha permitido que actualmente también se puedan obtener células con características de cresta neural. La diferenciación de células pluripotentes hacia cresta neural se ha realizado previamente y se ha demostrado que las células obtenidas tienen la posibilidad de diferenciarse hacia los diferentes tipos

de tejidos relacionados a cresta neural (Menendez et al., 2011). Utilizando este enfoque en este trabajo se analiza el inicio de expresión de la proteína TAU durante la diferenciación de iPSCs hacia linaje mesenquimal, comenzando con la diferenciación hacia células de cresta neural, en analogía al proceso de diferenciación que se lleva a cabo durante el desarrollo de células de pulpa dental. A pesar de que las células de cresta neural obtenidas expresaron marcadores (SOX 10, HNK1 y p75) y morfología característica de este tipo de células, los resultados aquí obtenidos muestran que la expresión de la proteína TAU no está presente aún después de 15 días. Nuestros datos sugieren que la expresión de la proteína TAU observada en células de pulpa dental, está asociada a la adquisición de características mesenquimales, lo cual pudo observarse al cuarto día de la diferenciación de células de cresta neural hacia linaje mesenquimal los resultados demuestran que al menos cuatro sitios de fosforilación están presentes en células mesenquimales de distinto origen.

Las células de pulpa dental expresan la proteína TAU por lo que son una alternativa favorable para el estudio de la proteína *in vitro*, dentro de las ventajas de usar estas células es que pueden mantenerse en cultivo durante mucho tiempo ya que pueden ser expandidas durante varios pases, además son de fácil obtención y manipulación, y pueden ser criopreservadas para usos futuros. Aunque las células mesenquimales humanas pueden ser obtenidas de diversas fuentes, las células mesenquimales de pulpa dental tienen una ventaja en cuanto a la obtención ya que no requiere métodos altamente invasivos a diferencia de otras fuentes. Actualmente la capacidad de diferenciación neuronal de las células de pulpa dental es de amplio interés en la investigación biomédica, lo cual podría permitir el análisis de la proteína TAU en una situación mitótica y postmitótica (neuronas) y pueden servir para aplicar diferentes tipos de inductores del ciclo celular e investigar los roles de ciclinas y cinasas involucradas y el efecto de inhibidores de cinasas en el rescate de células de la apoptosis así como para entender el proceso de agregación patológica de tau.

8 CONCLUSIONES

1. Este estudio revela por primera vez la presencia de la proteína TAU en células de pulpa dental mediante la inmunodetección de 12 anticuerpos contra TAU utilizados previamente en estudios de la proteína en neuronas de personas con la enfermedad de Alzheimer, otras taupatías y en algunas células de linaje distinto al neural. Resultados positivos para la presencia de TAU fueron identificados por inmunodetección de tres anticuerpos dirigidos contra la proteína independientemente de su fosforilación (T46, DA9 y TAU5) y siete anticuerpos (pSer202, pSer214, pThr231, pSer235, pSer396, pSer404 y pSer422) que dependen de fosforilación para reconocimiento de su epítipo.
2. El cambio conformacional del epítipo del anticuerpo TG3 está relacionado al proceso mitótico en estas células y el cambio conformacional detectado por el anticuerpo AT100, que se considera un anticuerpo diagnóstico de la enfermedad Alzheimer, está confinado principalmente al núcleo en las células analizadas.
3. En la diferenciación de células iPSCs hacia cresta neural y linaje mesenquimal la presencia de la proteína TAU no se detecta en cresta neural y se detecta en células mesenquimales, tanto células mesenquimales provenientes de iPSCs como células mesenquimales de pulpa dental presentan fosforilación de la proteína TAU en los sitios pSer214, pThr231, pSer396 y pSer404.
4. El estudio de células de pulpa dental permite una exploración extensa de funciones de TAU en condiciones fisiológicamente normales tanto en citoplasma como en el núcleo celular. Por este motivo representan un modelo para la exploración de condiciones y factores que provocan la agregación patológica de la proteína TAU observada en taupatías.

9 ANEXOS

ANEXO I. Marcadores neurales analizados en células de pulpa dental

Abreviación	Nombre de la proteína	Descripción
GFAP	Proteína gliofibrilar ácida	Forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto en particular de células gliales como astrocitos y células de Schwann
NESTINA	Acrónimo inglés; neuroectodermal stem cell marker	Forma parte de filamentos intermedios y se expresa principalmente en células nerviosas. La proteína suele utilizarse como marcador y está vinculada al crecimiento axonal.
DCX	Doblecortina	Es una proteína asociada a microtúbulo expresada por precursores neurales y neuronas inmaduras en embriones y algunas células adultas.
MAP2	Proteína asociada al microtúbulo 2	Proteína asociada a microtúbulo involucrada en la estabilización de microtúbulos en neuronas permitiendo la formación de neuritas durante el desarrollo neuronal
PSA-NCAM	Molécula de adhesión neuronal polisialilada (Polysialylated neuronal cell adhesion molecule)	Considerada un marcador de neuronas en desarrollo, migrantes y marcador de sinaptogénesis en el sistema nervioso central inmaduro de vertebrados
CD271	Receptor del factor de crecimiento Nervioso (NGF; Acrónimo inglés: Nerve Growth Factor)	Receptor para el factor de crecimiento nervioso que esta involucrado en el desarrollo neuronal
CD24		Sialoglicoproteína de superficie expresada en neuroblastos.
A2B5	Gangliósido A2B5	Es un gangliósido detectado en la mayoría de neuronas en etapas embrionarias o posnatales tempranas.
βIII TUBULINA	βIII TUBULINA	Proteína de ensamblaje para la formación de microtubulos prncialmente detectado en células neuronales
CD15	3-fucosyl-N-acetyl-lactosamina	Carbohidrato que suele ser utilizado como marcador de NSC (Acrónimo inglés de Neural Stem cell)

ANEXO II. Análisis de proliferación en células de pulpa dental

Análisis de proliferación por el método de Ki67 y DAPI en células mesenquimales de pulpa dental realizado por Luis Ramírez (en el mismo laboratorio donde fue realizado este trabajo; Jefe de Grupo Dr. Karlen Gazarian). La proteína Ki67 es un marcador de proliferación celular. La proteína Ki67 está presente en todas las fases activas del ciclo celular pero ausente en células en G0.

Se observa que la mayoría de las células de pulpa dental analizadas se encuentran en etapa G1 del ciclo celular a diferencia de los bajos porcentajes en mitosis y G0.

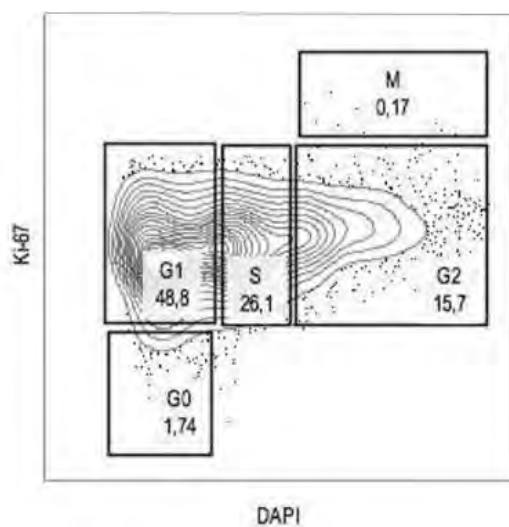


Figura 20. Análisis de proliferación en células mesenquimales de pulpa dental mediante citometría de flujo se muestran los porcentajes de las diferentes etapas del ciclo celular

10 REFERENCIAS

- Arendt, T., Stieler, J., Strijkstra, A. M., Hut, R. a, et al. (2003). Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(18), 6972–81.
- Arthur, A., Rychkov, G., Shi, S., Koblar, S. A., et al. (2008). Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(7), 1787–95.
- Augustinack, J. C., Schneider, A., Mandelkow, E. M., & Hyman, B. T. (2002). Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 103(1), 26–35.
- Bhatt, S., Diaz, R., Trainor, P. a, Wu, D. K., et al. (2013). Signals and Switches in Mammalian Neural Crest Cell Differentiation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1–20.
- Bussiere, T., & Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms , phosphorylation and role in neurodegenerative, 33, 95–130.
- Caplan, A. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 9(5), 641–50.
- Cevallos, R. (2013). Generación de células troncales pluripotentes inducidas (iPS) a partir de células mesenquimales de pulpa dental humana con el uso de un vector lentiviral policistrónico. *Tesis de Maestría UNAM*.
- Chai, Y., Jiang, X., Ito, Y., & Bringas, P. (2000). Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*, 1679, 1671–1679. Retrieved from <http://dev.biologists.org/content/develop/127/8/1671.full.pdf>
- Chambers, S. M., Fasano, C. a, Papapetrou, E. P., Tomishima, M., et al. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and IPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *October*, 27(3), 275–280.
- Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N. J., & Hirokawa, N. (1992). Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature*, 360(6405), 674–677.
- Cordero, D. R., Brugmann, S., Chu, Y., Bajpai, R., et al. (2012). Cranial neural crest cells on the move: their roles in craniofacial development. *Am J Med Genet A*, 155(2), 270–279.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–7.
- Elie, A., Prezel, E., Guérin, C., Denarier, E., et al. (2014). Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks. *Scientific Reports*, 5, 1–10.
- Eslaminejad, B., Vahabi, S., Shariati, M., & Nazarian, H. (2010). In vitro Growth and Characterization of Stem Cells from Human Dental Pulp of Deciduous Versus Permanent Teeth. *Journal of Dentistry*, 7(4), 185–195. Retrieved from <http://jdt.tums.ac.ir/index.php/jdt/article/viewArticle/228>
- Foudah, D., Monfrini, M., Donzelli, E., Niada, S., et al. (2014). Expression of neural markers by

- undifferentiated mesenchymal-like stem cells from different sources. *Journal of Immunology Research*, 2014.
- Friedenstein A. (1989). Stromal-Hematopoietic Interrelationships : Maximov's Ideas and Modern Models. *Gameleya Institute for Epidemiology and Morphology*, 159–167.
- Gazarian, K. G., & Ramírez-García, L. R. (2017). Human Deciduous Teeth Stem Cells (SHED) Display Neural Crest Signature Characters. *Plos One*, 12(1), e0170321.
- Goedert, M., & Jakes, R. (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *The EMBO Journal*, 9(13), 4225–4230. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc552204/>
- Goedert, M., Wischik, C. M., Crowther, R. A., Walker, J. E., et al. (1988). Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(11), 4051–4055.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., et al. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13625–30.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., et al. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(13), 4913–7.
- Guillozet-Bongaarts, A. L., Cahill, M. E., Cryns, V. L., Reynolds, M. R., et al. (2006). Pseudophosphorylation of tau at serine 422 inhibits caspase cleavage: In vitro evidence and implications for tangle formation in vivo. *Journal of Neurochemistry*, 97(4), 1005–1014.
- Hanger, D. P., Anderton, B. H., & Noble, W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends in Molecular Medicine*, 15(3), 112–119.
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 9(1), 12.
- Hoover, B. R., Reed, M. N., Su, J., Penrod, R. D., et al. (2010). Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron*, 9(1), 19–22.
- Hutton, M. (1998). Association of missense and 5[prime]-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*.
- Hyman, B. T., Augustinack, J. C., & Ingelsson, M. (2005). Transcriptional and conformational changes of the tau molecule in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1739(2), 150–157.
- Inoue, H., Hiradate, Y., Shirakata, Y., Kanai, K., et al. (2014). Site-specific phosphorylation of Tau protein is associated with deacetylation of microtubules in mouse spermatogenic cells during meiosis. *FEBS Letters*, 588(11), 2003–2008.
- Iovino, M., Patani, R., Watts, C., Chandran, S., et al. (2010). Human stem cell-derived neurons: a system to study human tau function and dysfunction. *PloS One*, 5(11), e13947.
- Jicha, G. A., Lane, E., Vincent, I., Otvos, L., et al. (1997). A conformation- and phosphorylation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Journal of*

Neurochemistry, 69(5), 2087–2095.

- Kadavath, H., Hofele, R. V., Biernat, J., Kumar, S., et al. (2015). Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(24), 7501–7506.
- Kanemaru, K., Takio, K., Miura, R., Titani, K., et al. (1992). Fetal-Type Phosphorylation of the tau in Paired Helical Filaments. *Journal of Neurochemistry*, 58(5), 1667–1675.
- Karaöz, E., Demircan, P. C., Sağlam, O., Aksoy, A., et al. (2011). Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochemistry and Cell Biology*, 136(4), 455–73.
- King, K., & Cidlowski, J. (1995). Cell cycle and apoptosis: Common pathways to life and death. *J Cell Biochemistry*, 175–180.
- Kosik, K. S., Joachim, C. L., & Selkoe, D. J. (1986). Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(11), 4044–8.
- Lee, G., Cowan, N., & Kirschner, M. (1988). The Primary Structure and Heterogeneity of Tau Protein from Mouse Brain. *Science*, 239, 285–288.
- Lee, G., Kim, H., Elkabetz, Y., Al Shamy, G., et al. (2007). Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 25(12), 1468–75.
- LoPresti, P., Szuchet, S., Pappasozomenos, S. C., Zinkowski, R. P., et al. (1995). Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(22), 10369–73.
- Lu, P. J., Wulf, G., Zhou, X. Z., Davies, P., et al. (1999). The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature*, 399(6738), 784–788.
- Luna-Muñoz, J., Chávez-Macías, L., Garcia-sierra, F., & Raúl Mena. (2007). Earliest Stages of Tau Conformational Changes are Related to the Appearance of a Sequence of Specific Phospho-Dependent Tau Epitopes in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 365–375.
- Majumdar, D., Kanafi, M., Bhonde, R., Gupta, P., et al. (2016). Differential Neuronal Plasticity of Dental Pulp Stem Cells From Exfoliated Deciduous and Permanent Teeth Towards Dopaminergic Neurons. *Journal of Cellular Physiology*, 231(9), 2048–2063.
- Martin, L., Latypova, X., & Terro, F. (2011a). Post-translational modifications of tau protein: Implications for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 58(4), 458–471.
- Martin, L., Latypova, X., & Terro, F. (2011b). Post-translational modifications of tau protein: Implications for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, 58(4), 458–471.
- Mazanetz, M. P., & Fischer, P. M. (2007). Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 6(6), 464–79.
- Menendez, L., Antin, P. B., Dalton, S., & Yatskevych, T. A. (2011). Wnt signaling and a Smad pathway blockade direct the differentiation of human pluripotent stem cells to multipotent neural crest cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(23), 9220–9220.
- Mertens J., Stuber K., P. D., & J., D. (2013). Embryonic Stem CellBased Modeling of Tau Pathology

in Human Neurons.

- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., et al. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 5807–12.
- Nuti, N., Corallo, C., Chan, B. M. F., Ferrari, M., et al. (2016). Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell Reviews and Reports*, 1–13.
- Osathanon, T., Sawangmake, C., Nowwarote, N., & Pavasant, P. (2014). Neurogenic differentiation of human dental pulp stem cells using different induction protocols. *Oral Diseases*, 20(4), 352–8.
- Paolo Bianco, P. G. R. and P. J. S. (2009). NIH Public Access. *Cell*, 2(4), 313–319.
- Park, Y. J., Cha, S., & Park, Y. S. (2016). Regenerative applications using tooth derived stem cells in other than tooth regeneration: A literature review. *Stem Cells International*, 2016.
- Pei, J.-J., Braak, H., Gong, C.-X., Grundke-Iqbal, I., et al. (2002). Up-regulation of cell division cycle (cdc) 2 kinase in neurons with early stage Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration. *Acta Neuropathologica*, 104(4), 369–76.
- Planel, E., Richter, K. E. G., Nolan, C. E., Finley, J. E., et al. (2007). Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(12), 3090–3097.
- Rossi, G., Dalprà, L., Crosti, F., Lissoni, S., Sciacca, F. L., et al. (2008). A new function of microtubule-associated protein tau: Involvement in chromosome stability. *Cell Cycle*, 7(12), 1788–1794.
- Rossi, G., Dalprà, L., Crosti, F., Lissoni, S., Francesca, L., et al. (2008). tau : Involvement in chromosome stability Involvement in chromosome stability ND SC RIB, 4101(October 2016).
- Sadler, T. W. (2011). *Langman Medical embryology* (11th ed.).
- Santa-Maria, I., Hernández, F., Del Rio, J., Moreno, F. J., et al. (2007). Tramiprosate, a drug of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease, promotes an abnormal aggregation of tau. *Molecular Neurodegeneration*, 2(February 2017), 17.
- Scholz, T., & Mandelkow, E. (2014). Transport and diffusion of Tau protein in neurons. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(16), 3139–3150.
- Sigala, J., Jumeau, F., Caillet-Boudin, M.-L., Sergeant, N., et al. (2014). Immunodetection of Tau microtubule-associated protein in human sperm and testis. *Asian Journal of Andrology*, 16(6), 927–8.
- Spicakova, T., O'Brien, M. M., Duran, G. E., Sweet-Cordero, A., et al. (2010). Expression and silencing of the microtubule-associated protein Tau in breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(11), 2970–81.
- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E., et al. (2002). Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *Journal of Cell Biology*, 156(6), 1051–1063.
- Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Bégard, S., et al. (2011). Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(6), 4566–75.

- Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Loyens, A., et al. (2011). Nuclear Tau , a Key Player in Neuronal DNA Protection, *286*(6), 4566–4575.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., et al. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, *131*(5), 861–72.
- Thomson, J. A., Itskovitz-eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., et al. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts, *282*(November), 1145–1148.
- Vincent, I., Rosado, M., & Davies, P. (1996). Mitotic mechanisms in Alzheimer’s disease? *Journal of Cell Biology*, *132*(3), 413–425.
- Violet, M., Delattre, L., Tardivel, M., Sultan, A., et al. (2014). A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(March), 84.
- Weaver, C., Espinoza, M., Kress, Y., & Davies, P. (2000). Conformational change as one of the earliest alterations of tau in Alzheimer’s disease. *Neurobiology of Aging*, 719–727. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197458000001573>
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S., & Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule formation, *72*(5), 1858–1862.
- Yu, Y., Run, X., Liang, Z., Li, Y., et al. (2009). Developmental regulation of tau phosphorylation, tau kinases, and tau phosphatases. *Journal of Neurochemistry*, *108*(6), 1480–94.
- Yuan, A., Kumar, A., Peterhoff, C., Duff, K., et al. (2008). Axonal transport rates in vivo are unaffected by tau deletion or overexpression in mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(7), 1682–7.