



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Papel de las vías de señalización de WNT/ $\beta$ -Catenina y TGF- $\beta$  en los procesos implicados en la diferenciación de células troncales mesenquimales derivadas de cresta neural hacia células tipo neurales.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

LUIS RAMON RAMIREZ GARCIA

DR. KARLEN GAZARIAN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

DRA. MARINA MACIAS SILVA, DR. JESUS CHIMAL MONROY

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

Ciudad de México. Julio, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

RESUMEN .....	4
1. CÉLULAS TRONCALES.....	6
1.1 CÉLULAS TRONCALES TEJIDO-ESPECÍFICO .....	6
1.2 ORIGEN DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES DE PULPA DENTAL Y CÉLULAS MESENQUIMALES DE LIGAMENTO PERIODONTAL.....	8
1.3 CÉLULAS TRONCALES DE LA CRESTA NEURAL.....	9
1.4 LAS VIAS DE SEÑALIZACION DE TGF $\beta$ Y WNT/ $\beta$ -CATENINA Y SU PAPEL EN LA ESPECIFICACION, MIGRACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA CRESTA NEURAL.....	10
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	14
3. JUSTIFICACION .....	15
4. HIPOTESIS .....	15
5. OBJETIVO .....	15
5.1 Objetivo general.....	15
5.2 Objetivos particulares.....	16
6. METODOLOGIA. ....	16
6.1 Aislamiento de células mesenquimales de pulpa dental y de ligamento periodontal.....	17
6.2 Cultivo de células mesenquimales de pulpa dental y de ligamento periodontal. ....	17
6.3 Caracterización de células mesenquimales de pulpa dental y de ligamento periodontal mediante citometría de flujo.....	18
6.4 Inmunofluorescencia.....	19
6.5 PCR punto final.....	19
6.6 PCR tiempo real.....	19
6.7 Enriquecimiento celular de la población CD271 por MACS y FACS.....	20
6.8 Medios de cultivo utilizados en el proceso de inducción neural. ....	20
7. Resultados .....	21
7.1 El cultivo con 2% de SFB fomenta la expresión del marcador CD271/P75 <sup>+</sup> en las células mesenquimales de pulpa dental.....	21
7.2 Las DPSC y las PDLSC cultivadas al 2% de SFB expresan genes relacionados con la cresta neural migratoria. .....	25
7.3 Las células mesenquimales de pulpa dental expresan marcadores neurales. ....	26
7.4 La expresión de SOX2 y MASH-1 en las células aisladas de pulpa dental hacia células tipo neurales, es mediada por la inhibición farmacológica de la vía de TGF $\beta$ .....	27

7.5 La Inhibición del receptor de TGFβ (ALK5) y BMP (ALK2/3) en el proceso de diferenciación de células mesenquimales hacia células tipo neurales favorece la expresión proteica de β3-Tubulina/TUJ1. ....	29
7.6 Las células mesenquimales cultivadas en los medios de compromiso e inducción neural se acumulan en la fase G1 del ciclo celular. ....	32
7.7 Las células mesenquimales de pulpa dental y de tejido periodontal expresan un mayor porcentaje de marcadores de cresta neural cuando son aisladas y cultivadas con 2.5ng/ml de TGFβ en comparación con 1% de SFB. ....	33
7.8 La expresión del marcador CD271/P75 <sup>+</sup> se regula negativamente mediante TGFβ y/o SFB. ....	36
7.9 Reversión de la transición de las células troncales de tejido bucal con el uso de WNT/β-Catenina e inhibición de TGFβ. ....	39
8. DISCUSION .....	43
8.1 Las DPSC y las PDLSC expresan marcadores de membrana de células mesenquimales y células de cresta neural los cuales varían en porcentaje de acuerdo a la concentración de SFB. ....	43
8.2. La expresión de los genes neurales SOX2 y MASH1 están involucrados en el compromiso y diferenciación neuronal de las células mesenquimales de pulpa dental. ....	44
8.3 La ausencia de TGFβ <i>in vitro</i> evita la pérdida del marcador CD271/P75 y disminuye la expresión de los marcadores mesenquimales CD73, CD105, CD90. ....	44
8.4. Las células aisladas sin SFB e inhibiendo la ruta de TGFβ mantiene altos porcentajes de marcadores de cresta neural y bajos marcadores mesenquimales. ....	45
8.5 Las células aisladas a bajas concentraciones de SFB pueden sufrir fenómenos de reversión o de adaptación mediante la inhibición de la ruta de TGFβ y la activación de la ruta canónica de WNT/β-Catenina. ....	45
9.CONCLUSION. ....	47
ANEXO 1-2 .....	48
REFERENCIAS. ....	49



## RESUMEN

Las células troncales de la cresta neural son células multipotentes que dan lugar a diversos linajes celulares como osteoblastos, condrocitos y adipocitos, así como células neuronales y gliales. Diversos estudios en modelo murino demuestran que las células troncales de la cresta neural se desprenden de la parte dorsal del tubo neural mediante una serie de eventos que desencadenan en la pérdida del marcador epitelial E-cadherina y posteriormente migran a lo largo del eje embrionario, donde participan en la formación de la región craneofacial y en la organogénesis dental. En comparación con el modelo murino, las células troncales de la cresta neural humana no pueden ser rastreadas hasta sus destinos finales debido a implicaciones bioéticas, debido a esto no se ha podido demostrar que la cresta neural esté involucrada en la formación de los tejidos orales humanos. A pesar de que las bases embriológicas entre vertebrados son similares y que las células troncales de la cresta neural pueden participar en la formación del tejido oral en el humano, las células mesenquimales aisladas de la pulpa dental y del tejido periodontal muestran una pequeña fracción (<1%) de los marcadores de superficie característicos de las células troncales de cresta neural como CD271/P75 y HNK-1, por lo que la falta de estos marcadores celulares y el bajo potencial de diferenciación a linajes neurales de las células mesenquimales ha generado controversias que han puesto en duda su potencial celular y origen.

Considerando lo anterior, nuestro grupo de investigación generó la hipótesis de que existen células troncales de la cresta neural que residen en el nicho oral, pero esta población de cresta neural CD271/P75<sup>+</sup> disminuye a niveles inferiores del 1% por el uso excesivo de suero fetal bovino. Por lo tanto, las condiciones de cultivo utilizadas para la diferenciación de las células troncales embrionarias humanas a células troncales de la cresta neural (Inhibición de la vía de TGFβ y la activación de la vía WNT/β-Catenina) podrían revelar o mantener esta población celular CD271/P75<sup>+</sup> en las células mesenquimales de pulpa dental y tejido periodontal, la cual mantiene el potencial de diferenciación a células neuronales.

Este estudio demostró que el suero fetal bovino (SFB) y específicamente el ligando TGFβ, regulan de manera negativa la expresión del marcador de cresta neural CD271/P75 y aumentan el marcador de superficie CD73 en las células mesenquimales de pulpa dental y tejido periodontal. El uso de inhibidores de la vía de TGFβ y activación de WNT/β-Catenina favorecen la autorrenovación de esta población, que se ve reflejada en el incremento de la población positiva para los marcadores CD271/P75, HNK-1 y E-cadherina. Estos resultados nos permitieron indagar sobre las condiciones requeridas para la diferenciación de células mesenquimales de pulpa dental a células neuronales. Observamos que los factores de transcripción SOX2-MASH1 son partícipes en el compromiso y diferenciación a células neuronales β3-Tubulina<sup>+</sup>, y se activan con el uso de inhibidores farmacológicos del receptor de BMP (posiblemente solo en la población CD271/P75<sup>+</sup>). Esto sugiere que la transición observada en la población CD271/P75<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> a la población CD271/P75<sup>+</sup>CD73<sup>-</sup> en respuesta a TGFβ o a SFB, puede estar disminuyendo el potencial neural de las células aisladas de pulpa dental y de tejido periodontal, de manera similar a lo observado en otro estudio *in vitro* en donde las células troncales de la cresta neural CD271/P75<sup>+</sup> que fueron expuestas a 10% de SFB dieron lugar a células mesenquimales CD73<sup>+</sup> y la eficiencia de diferenciación neuronal disminuyó diez veces.

Considerando estos resultados, proponemos que, del total de células mesenquimales provenientes de pulpa dental, solo la población positiva para el marcador de superficie CD271/P75<sup>+</sup> conserva el potencial de diferenciación hacia células neuronales  $\beta$ 3-Tubulina, y este potencial de diferenciación es mantenido por la activación de  $\beta$ -Catenina.

# 1. CÉLULAS TRONCALES

La célula troncal se define como una célula indiferenciada, con capacidad de autorrenovación y el potencial de generar uno o más tipos celulares especializados a través de divisiones celulares asimétricas [1], es decir, una célula troncal puede mantener su troncalidad mediante la autorrenovación o comprometerse a una vía de diferenciación celular [2];[3]. La vía de compromiso y diferenciación a diversos linajes celulares implica la producción de una serie de células precursoras y/o progenitoras que van disminuyendo su potencial de diferenciación y capacidad de autorrenovación antes de adquirir un compromiso celular y llegar a un estado de diferenciación final.

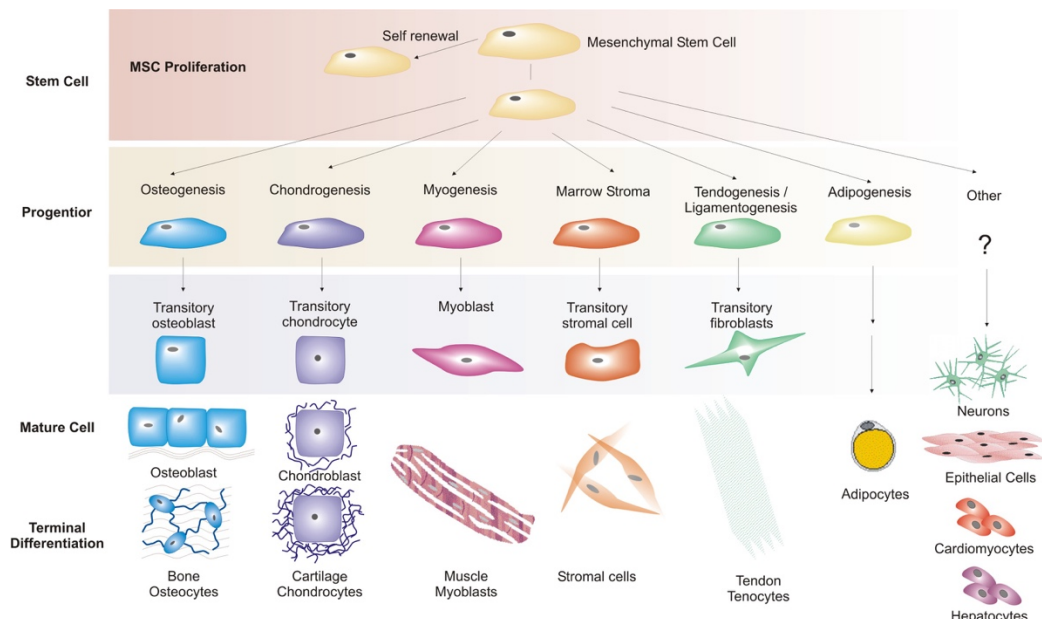
Las células troncales generan diversos linajes celulares que comprenden un órgano o tejido durante el desarrollo embrionario. Dependiendo de su potencial de generar distintos linajes celulares se han clasificado en tres tipos celulares: células troncales pluripotentes, si tienen el potencial de generar diversos linajes celulares de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo); células troncales multipotentes, si mantienen el potencial de generar más de un tipo de linaje celular de una misma capa germinal, y células troncales unipotentes, cuando ya se encuentran determinadas a diferenciarse a un solo linaje de una capa germinal.

## 1.1 CÉLULAS TRONCALES TEJIDO-ESPECÍFICO

La mayoría de los órganos en etapa postnatal están constituidos principalmente de células con un potencial de diferenciación restringido y comprometidas a linajes celulares específicos que regulan las propiedades de renovación y mantenimiento de ese órgano. Cualquier órgano o tejido con capacidad de renovación probablemente presente células troncales, las cuales se mantienen en un sitio anatómico específico (al que se le denomina “nicho”) interactuando con otros tipos celulares que las proveen de las señales de autorrenovación o diferenciación.

Una de las regiones más estudiadas y que ha servido como un modelo celular en el humano para el estudio de la troncalidad en células posnatales es la médula ósea, de donde se aislaron células hematopoyéticas y no-hematopoyéticas, estas últimas con morfología fibroblastoide, descritas por Friedenstein y colaboradores a finales de los 70 [4]. Friedenstein observó células con capacidad plástico-adherente y morfología fibroblastoide de aspirados de la médula ósea [4]. Más tarde describió que estas células aisladas de médula ósea formaban agrupaciones o clonas celulares a partir de células individuales, a las que denominó, unidad formadora de colonias de Fibroblastos (UFC-F), localizadas en el estroma de la médula ósea [5]. En estudios posteriores se describió su capacidad de diferenciación hacia múltiples linajes de índole mesenquimal como: osteocitos, condrocitos, mioblastos, fibroblastos y adipocitos, que son linajes celulares que comprenden los tejidos no-hematopoyéticos y a los que se les atribuye la regulación de los tejidos hematopoyéticos mediante el mantenimiento del nicho celular [6];[7];[8];[9];[10].

Estas células de médula ósea presentan propiedades clonogénicas, morfología fibroblastoide, capacidad plástico-adherente y potencial de diferenciación multilínea *in vitro*. A lo largo del estudio de sus propiedades y características se les han adjudicado otros términos: células estromales de médula ósea, células precursoras estromales y células troncales mesenquimales (MSC del inglés, *Mesenchymal Stem/Stromal Cells*) [7]. Actualmente la International Society for Cellular Therapy ha denotado que el uso del acrónimo “MSC” debe de utilizarse tanto para las células estromales mesenquimales multipotentes o células troncales mesenquimales, células de morfología fibroblastoide que cumplan con las siguientes características: células con morfología fibroblastoide y capacidad plástico-adherente en cultivo, expresión positiva de antígenos CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, expresión negativa de los antígenos hematopoyéticos CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, CD79<sup>-</sup> y HLA-DR<sup>-</sup> y potencial de diferenciación a tres linajes: osteoblastos, condroblastos y adipocitos, independientemente de su tejido de origen [11];[12] (Fig1).



**Figura 1- Esquema del potencial de diferenciación de las células estromales mesenquimales.** Las células estromales mesenquimales son células multipotenciales con capacidad de generar diversos linajes celulares como Osteoblastos, Condrocitos, Mioblastos y células del estroma como los fibroblastos y los adipocitos. Cierta evidencia sugiere la capacidad o plasticidad celular de las células mesenquimales a diferenciarse hacia linajes no-mesenquimales como las células neuronales. [13]

A pesar de sus características de troncalidad, las MSC han mostrado una capacidad limitada de autorrenovación y un potencial de diferenciación menor que las células troncales embrionarias humanas (hESC del inglés, *Human Embryonic Stem Cells*) o las células troncales pluripotentes inducidas (iPSC del inglés, *Induced Pluripotent Stem Cells*), las cuales presentan la habilidad de proliferar indefinidamente *in vitro* y de mantener el potencial de diferenciarse en diversos linajes celulares de las tres capas germinales [14];[15]. A pesar de que las MSC exhiben una autorrenovación limitada, son fácilmente aisladas, cultivadas y no presentan impedimentos

éticos relacionados con su uso, lo que les permite ser una fuente celular accesible para el estudio de las vías de señalización, potencial de diferenciación y plasticidad celular en células posnatales. Sus propiedades adherentes y antígenos específicos de membrana [16];[17] facilitan el aislamiento de células con características similares en diversos órganos o tejidos [14];[18] como: las células aisladas de la pulpa dental de dientes permanentes [19];[20];[21], dientes deciduos [22];[23] y los componentes adyacentes del tejido oral; Papilla apical [24], folículo dental [25], ligamento periodontal y tejido gingival [26];[27].

A pesar de que se han encontrado células en otros tejidos con características de las MSC inicialmente aisladas de médula ósea (marcadores de membrana CD90, CD105 y CD73, morfología fibroblastoide y potencial de diferenciación a tres linajes en distintos tejidos del organismo como: el tejido oral [19], tejido placentario, páncreas fetal [28] y piel [14];[18];[29];[30]), aún no se ha determinado si provienen de una misma capa germinal.

## 1.2 ORIGEN DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES DE PULPA DENTAL Y CÉLULAS MESENQUIMALES DE LIGAMENTO PERIODONTAL

Las células mesenquimales de la pulpa dental, (DPSCs del inglés, *Dental Pulp Stem Cells*) participan en la dentinogénesis [31] y, junto con las células mesenquimales de ligamento periodontal (PDLSCs del inglés, *Periodontal Ligament Stem Cells*) [32], forman la estructura dentaria y dan soporte de unión al hueso alveolar, respectivamente. Estas células son aisladas mediante el protocolo establecido para el aislamiento de las células mesenquimales de médula ósea, que se ha convertido en la condición de cultivo estándar, y comprende el uso de Suero Fetal Bovino (SFB) a una concentración igual o mayor de 10% [33];[34]. *In vitro* las DPSCs y las PDLSCs presentan características similares a las células mesenquimales aisladas de la médula ósea y tienen el potencial de diferenciación trilineal de las células mesenquimales (potencial de diferenciación hacia condrocitos, osteoblastos y adipocitos [35];[26]). Estas células mesenquimales del tejido oral, las DPSC y las PDLSC, se pueden aislar de la cámara interior de dientes primarios [22], de la cámara interior de los terceros molares [35] o del tejido conectivo adyacente al diente, y constituyen un grupo celular heterogéneo de apariencia fibroblastoide, positivo a los marcadores mesenquimales (CD90<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>) y negativo a los marcadores de linajes hematopoyéticos (CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, CD79<sup>-</sup> y HLA-DR<sup>-</sup>).

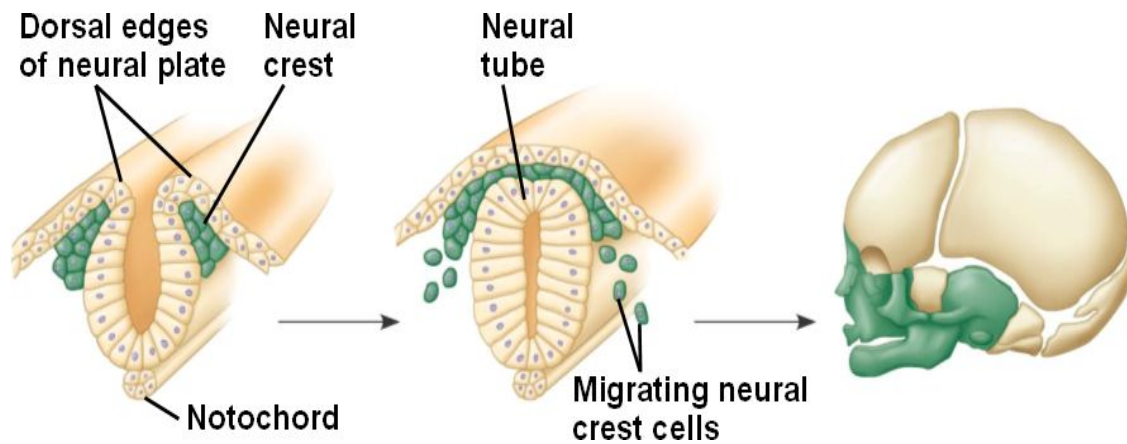
Además de compartir un perfil de expresión de antígenos de membrana similar a las células mesenquimales aisladas de médula ósea, las células mesenquimales aisladas del tejido oral (DPSCs y PDLSCs) expresan marcadores de progenitores neurales como: Nestina, la proteína ácida fibrilar glial (GFAP del inglés, *Glial fibrillary acidic protein*), la proteína asociada a microtúbulos tau (MAPT del inglés, *microtubule-associated protein tau*), la proteína de migración neuronal doblecortina [36], bajo condiciones de cultivo estándar. Diversos estudios *in vivo* demuestran que estas poblaciones mesenquimales tienen la capacidad de diferenciarse a neuronas cuando son trasplantadas en la región mesencefálica en el inicio de la neurulación de un embrión de pollo, conclusiones basadas en los resultados obtenidos en relación con la morfología celular, la expresión del marcador de diferenciación neuronal  $\beta$ 3-Tubulina y el potencial de acción generada por estas células; se concluye que bajo las condiciones adecuadas, las células mesenquimales mantienen el potencial de diferenciación neuronal [37].

Paralelamente, otros estudios en las células mesenquimales de médula ósea, demuestran que estas células responden a condiciones de inducción neuronal *in vitro*, adquiriendo morfología parecida a neuronas y expresan marcadores neurales como NESTINA y GFAP. A pesar de que estos procesos de diferenciación *in vitro* no han sido explorados a fondo y existe controversia sobre si los marcadores neurales como GFAP o  $\beta$ 3-Tubulina (los cuales tienen una naturaleza reversible) que se expresan por efecto de las condiciones de cultivo, son artefactos propios del cultivo o un proceso real de diferenciación [38];[39]. Sin embargo, las diferencias entre el perfil de expresión de marcadores de superficie entre las células mesenquimales de pulpa dental y las células mesenquimales de médula ósea ponen en duda si estos resultados en el proceso de diferenciación reflejan un potencial de diferenciación propio de las células o un proceso de transdiferenciación mediado por las condiciones de cultivo.

Inicialmente se propuso que las DPSC y las PDLSC son de origen mesodérmico, sin embargo, el hecho de que la cresta neural contribuya a la formación de la mayoría de los tipos celulares de la región craneofacial, [40] llevó a plantear la hipótesis de que esta región del tejido oral contiene células troncales migratorias provenientes de la cresta neural. Esta hipótesis se basa en estudios de vertebrados en donde se describe a esta población celular como células multipotentes con capacidad migratoria, expresión de marcadores relacionados con las células troncales de la cresta neural como *CD271/P75*, *HNK-1*, *Sox10*, *Ap2* y la expresión de genes promotores de migración como *Snail*, *Slug*, *Zeb1* [41];[42]. Otros estudios en modelo murino sustentan esta hipótesis, ya que células troncales de la cresta neural que fueron marcadas con  $\beta$ -Gal, se rastrearon hasta la pulpa dental, confirmando su origen y participación en la formación de las raíces dentales [40].

### 1.3 CÉLULAS TRONCALES DE LA CRESTA NEURAL

Las células troncales de la cresta neural (NCSC del inglés, *Neural Crest Stem Cells*) derivan del neuroectodermo y tienen el potencial de diferenciarse en una variedad de fenotipos celulares, donde participan en la formación de diferentes regiones a lo largo del eje embrionario. Las células troncales de cresta neural se originan mediante las interacciones celulares entre la placa neural y el ectodermo superficial, estas interacciones *in vivo* están mediadas por citocinas segregadas entre los tejidos adyacentes [43] y culminan en la especificación de la cresta neural, delaminación y su posterior migración a diversas regiones embrionarias, mediante un evento al que se le denomina transición epitelio-mesénquima (Fig2).



**Figura 2. Inducción de la cresta neural, delaminación, migración y su participación en la formación de la región craneofacial.**

Las células troncales de la cresta neural se originan entre el tubo neural y el ectodermo superficial, estas interacciones culminan en la delaminación y migración de las células troncales de la cresta neural, hacia diversas regiones a lo largo del eje embrionario entre ellos los arcos branquiales, donde posteriormente participan en la formación de la región craneofacial. Imagen tomada de Campbell 7th Edition.ca [44].

Existen ciertas fracciones de la cresta neural que se originan de cuatro grandes segmentos del tubo neural: cresta neural craneal, vagal, cardíaca y troncal. El segmento que corresponde a la cresta neural craneal da lugar a la mayoría de las estructuras faciales, generando diversos tipos de linajes celulares como: las células del hueso intramembranoso, cartílago, músculo (potencial mesenquimal), ganglios nerviosos y otros derivados neurales (potencial neural) [45];[46];[47];[48];[49]. Esta segregación y migración de la cresta neural es necesaria para la organización y estructuración de la región craneofacial mediada por las células del ectomesénquima, las cuales se consideran como células progenitoras mesenquimales que derivan de la cresta neural y que contribuyen ampliamente a la mayoría de los tejidos dentales [40];[50].

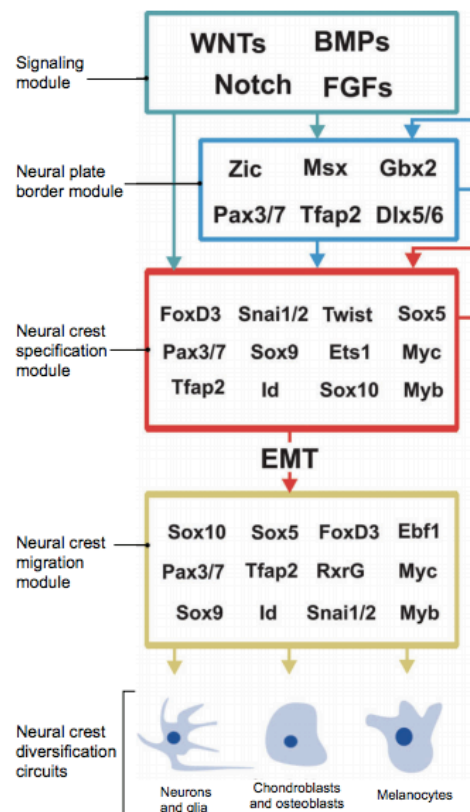
#### **1.4 LAS VIAS DE SEÑALIZACIÓN DE TGF $\beta$ Y WNT/ $\beta$ -CATENINA Y SU PAPEL EN LA ESPECIFICACION, MIGRACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA CRESTA NEURAL.**

Durante el desarrollo embrionario se expresa una serie de factores encargados de la regulación de las células troncales, los cuales mantienen a las células en un estado indiferenciado o permiten la adquisición de un compromiso o diferenciación hacia a un linaje celular específico. Este proceso altamente regulado mediante señales extracelulares implica la generación de un grupo de células que van disminuyendo su potencial de diferenciación gradualmente antes de adquirir un estado de diferenciación final. Dentro de estas señales extracelulares, se genera una fuerte intercomunicación entre distintas vías de señalización (moduladas por diversos ligandos), entre ellas, las pertenecientes a la superfamilia de TGF $\beta$  y la vía de señalización WNT/ $\beta$ -Catenina, denominadas como vías o rutas “maestras” de la regulación de las células troncales.

La inducción de las células de la Cresta Neural (CN), así como de otros linajes celulares de las distintas capas embrionarias, se originan mediante la participación de diversas vías de señalización que mantienen en comunicación a un grupo de células de un nicho en particular. En el caso de la CN, el gradiente de ligandos se

origina entre la placa neural y las células adyacentes [51];[52];[53];[54]. Diversos estudios en embriones de pollo, anfibios y pez cebra, han identificado algunos de los ligandos involucrados en la inducción de la cresta neural, por ejemplo: BMPs, WNTs, Notch y bFGF [55];[56], los cuales forman parte de la activación de diversas vías de señalización. Este proceso conocido como especificación de la cresta neural, concluye en la expresión de los factores de transcripción: *Foxd3*, *Snail1*, *Snail2* y *Sox 8/9/10*. Una vez que la cresta neural se ha especificado, se originan diversos cambios regulatorios que culminan en la migración de las células de la cresta neural tanto de manera ventral, cercano al tubo neural, o de manera dorso-lateral en proximidad con el ectodermo superficial, en donde ocurre el proceso de transición epitelio-mesenquima (EM) [57];[58].

Varios análisis tanto *in vitro* como *in vivo* en vertebrados han identificado algunos de los factores de transcripción y vías de señalización involucradas durante la transición EM, que sirven para dar inicio al proceso de delaminación y migración de la cresta neural. La transición EM de la cresta neural es iniciada por la integración de diversas señales extracelulares generadas por acción de ligandos de las familias de TGF $\beta$ , WNT y FGF. El inicio de este evento es necesario para convertir células premigratorias de la cresta neural en células con capacidad migratoria a través de la activación de varios reguladores transcripcionales como *Snail1* y *Slug*, los cuales son factores de transcripción críticos que coordinan los cambios celulares que ocurren durante la transición EM (Fig3).



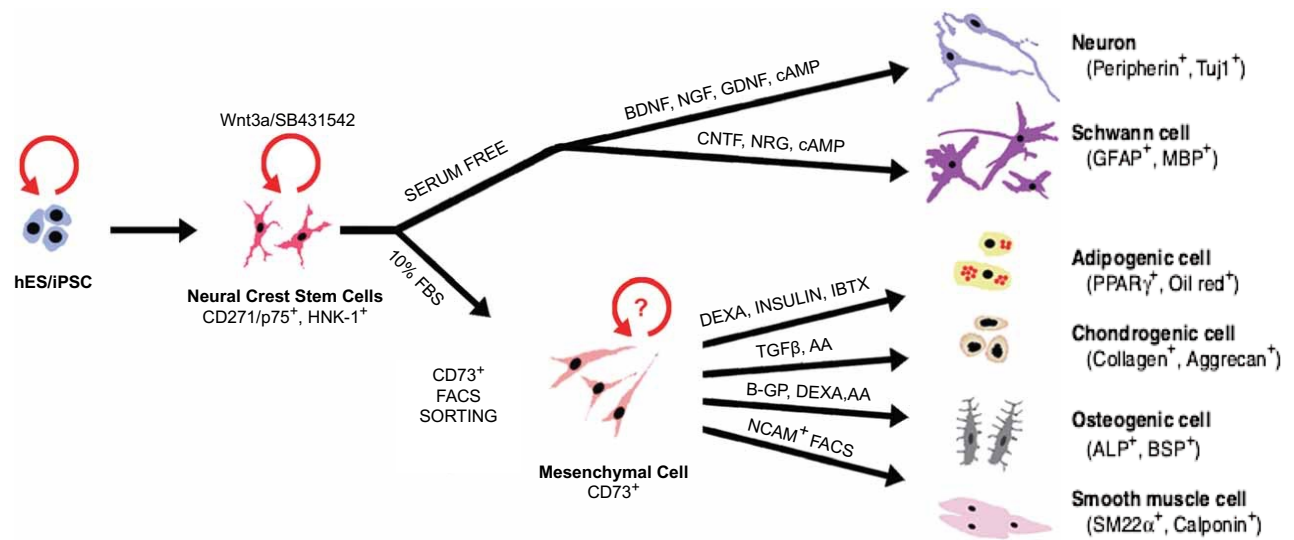
**Figura 3. Factores de transcripción involucrados en la inducción y regulación de la cresta neural migratoria.**



Factores de transcripción inducidos por acción de los ligandos WNT, BMP, NOTCH y FGF que participan en el proceso de especificación de los bordes laterales de la placa neural a cresta neural en la regulación de la transición al estado migratorio de la cresta neural mediante el proceso denominado transición epitelio-mesenquima, y en el potencial de diferenciación de las células troncales de la cresta neural migratoria a diversos linajes celulares como: células neuronales, gliales, melanocitos y linajes mesenquimales. Imagen tomada de la referencia [59].

La transición EM es un proceso que induce la capacidad de migración de las células de la cresta neural, la cual inicia con la pérdida de la polaridad apico-basal, y posteriormente se disuelve el complejo de adhesiones intercelulares, que se requieren para mantener sus propiedades epiteliales. Esta pérdida del complejo de adhesión intercelular involucra a diversas proteínas miembros de la familia de las cadherinas, donde la expresión de la proteína E-cadherina está asociada con la formación del epitelio celular y su fenotipo celular no migratorio. Por lo tanto, estas proteínas deben regularse negativamente por represores transcripcionales como *Snail* y *Slug* para completar la transición de un epitelio sedentario a un fenotipo migratorio tipo mesenquimal [60];[61];[62];[63]. Posteriormente de este evento, que resulta en un comportamiento migratorio de la cresta neural, las células progenitoras de esta región se diferencian mediante diversos estímulos ambientales a distintos linajes celulares durante su migración a lo largo del eje embrionario, antes de alcanzar sus diversos destinos finales, donde interaccionan con otras poblaciones celulares para la formación de diferentes órganos y tejidos.

Estudios en vertebrados sobre la especificación de la cresta neural han culminado en la generación *in vitro* de células con características de cresta neural, a partir de células embrionarias humanas (hES) y de células troncales pluripotentes inducidas (iPSC). Estos protocolos utilizan el ligando WNT3a o inhibidores farmacológicos de GSK3 $\beta$ , como la molécula CHIR99021, para activar la ruta canónica de WNT/ $\beta$ -Catenina, así como inhibidores farmacológicos de la vía de TGF $\beta$ , como la molécula SB431542 o REPSON, que son inhibidores del receptor TGF- $\beta$ RI/ALK5 [64]. El uso de estas condiciones definidas da lugar a células que presentan los marcadores de membrana de las células troncales de cresta neural CD271/P75<sup>+</sup> y HNK-1<sup>+</sup>, y que expresan el factor de transcripción regulatorio de la cresta neural SOX10 [65];[42], las cuales tienen el potencial de diferenciarse a células neuronales Tuj1<sup>+</sup> mediante el uso de factores definidos como BDNF, NGF, GDNF y CTNF o en células que expresan los marcadores mesenquimales (CD73,CD105 y CD90) y adquieren morfología fibroblastoide cuando se cultivan por cuatro días a 10% de SFB [66];[67] (Fig4).



**Figura 4. Generación de células troncales de la cresta neural (CD271/P75<sup>+</sup>, HNK-1<sup>+</sup>) a partir de las hESC mediante el uso de factores definidos.**

Aislamiento de las células troncales de cresta neural (NCSC) mediante el marcador de membrana CD271/P75<sup>+</sup> y el papel del SFB en la adquisición de un compromiso mesenquimal. Las condiciones de cultivo libres de SFB permiten la diferenciación de las NCSC hacia linajes neurales, como las células Schwann y células neuronales  $\beta$ 3-Tubulin/TUJ1<sup>+</sup>, mientras que la exposición con SFB lleva a la especificación de las NCSC a células mesenquimales CD73<sup>+</sup>. Imagen modificada de la referencia [64].

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A lo largo de la vida de un organismo las células troncales continúan residiendo en varios órganos y tejidos, promoviendo la renovación tisular mediante el recambio celular. Uno de los nichos que albergan estas células con capacidad troncal es el tejido oral, principalmente la pulpa dental y el tejido circundante a esta estructura, entre ellos el tejido periodontal. Estos son tejidos de los cuales se pueden aislar y expandir células *in vitro* para su posterior análisis, estudio de sus marcadores y potencial de diferenciación. Los métodos actuales de expansión recurren a utilizar suero fetal bovino en concentraciones altas (10%), y los procedimientos de aislamiento pueden alterar el estado en el cual se presentan estas células *in vivo*, disminuyendo su potencial de diferenciación y/o alterando su identidad celular.

Como se mencionó previamente, existen estudios embriológicos en modelos murinos donde se confirma la participación de las células de cresta neural en la formación de la pulpa dental y tejido oral mediante el rastreo de células de cresta neural; sin embargo, pocos estudios en embriones humanos muestran la presencia de células con características similares a las de la cresta neural [68];[69] y dado que el estudio de migración celular en embriones humanos hasta el estadio adulto no es posible, dicha aseveración no se puede atribuir a la formación del tejido oral humano. Considerando que el origen embrionario es el mismo, es probable que las células de la cresta neural también migren hacia los arcos branquiales del embrión humano, participando en la formación de la región craneofacial y dando lugar a las células de la pulpa dental y del tejido periodontal, pero hasta la fecha no hay evidencia que confirme esto.

A pesar del considerable interés en las células mesenquimales de tejido oral y de médula ósea para fines terapéuticos, aún no existe un procedimiento para su aislamiento en condiciones libres de suero fetal bovino. Por lo que no se conocen del todo las propiedades y características inherentes con las que residen *in vivo*, específicamente, el potencial de diferenciación de estos cultivos heterogéneos. Este tipo de procedimientos de aislamiento libre de SFB con el uso de mitógenos como bFGF, EGF e Insulina nos permitirá evaluar el estado basal y la regulación de los genes y marcadores de la cresta neural en las células mesenquimales de tejido oral por acción de ligandos de las vías de señalización de TGF $\beta$  y WNT/ $\beta$ -Catenina y dilucidar si estas vías de señalización específicas pueden estar regulando el potencial de diferenciación en estas poblaciones celulares. De igual manera mediante el cultivo celular con el uso de factores definidos nos permitirá determinar su potencial de diferenciación neuronal en un contexto celular específico. En la actualidad se conoce poco de sus características inmunofenotípicas o su potencial de diferenciación *in vivo*, lo que no permite resolver la incógnita de su naturaleza e identidad celular, la cual se ha conceptualizado a clasificarse como células mesenquimales de origen mesodérmico.

Considerando que un cierto porcentaje de células mesenquimales provenientes de tejido oral expresan marcadores neurales, así como un porcentaje de marcadores de la cresta neural, el estudio de estas células del

tejido oral representa una buena alternativa experimental para la diferenciación hacia células neuronales y gliales, además de ser una fuente accesible de células, por lo que se le considera una fuente alterna a las células troncales embrionarias humanas y un modelo útil para el estudio *in vitro* de las vías de señalización en células troncales.

### 3. JUSTIFICACION

Desde su descripción en médula ósea, las células mesenquimales se han utilizado ampliamente en el estudio de la biología de las células troncales [17];[70]. A partir del descubrimiento de las células mesenquimales en médula ósea por Friedenstein, y por Gronthos y cols [19] en la pulpa dental y el tejido periodontal se han definido a estas poblaciones celulares de origen mesodérmico. Sin embargo, existe evidencia en vertebrados que sugiere que el origen de las células mesenquimales de la pulpa dental y las células mesenquimales del tejido periodontal proviene a partir de las células troncales de cresta neural que llegan a poblar los arcos branquiales y contribuyen a la formación de la región craneofacial. A pesar de ello, se desconoce si estas células *in vivo* mantienen cierta identidad de la cresta neural o tienen características propias para desarrollar células tipo neurales que puedan replicarse *in vitro*. Por lo tanto, no se ha descrito si las vías de señalización de TGF $\beta$  y WNT/ $\beta$ -Catenina pueden mantener el potencial de diferenciación hacia un linaje neural en las células mesenquimales de tejido oral, propio de la competencia de las células troncales cresta neural CD271/P75<sup>+</sup>. Considerando lo anterior, indagar sobre las vías de señalización involucradas en el mantenimiento de las células de la cresta neural migratoria, usando como modelo las células mesenquimales humanas provenientes de tejido oral, nos permitirá entender los mecanismos involucrados en el mantenimiento de la cresta neural y su potencial de diferenciación neural, y evaluar de qué manera esta población CD271/P75<sup>+</sup> se ven afectadas por el uso de SFB.

### 4. HIPOTESIS

La inhibición de la vía de TGF $\beta$  y la activación de la vía WNT/ $\beta$ -Catenina regular de manera positiva el marcador de cresta neural CD271/P75, aumentando el potencial de diferenciación de las células mesenquimales aisladas de tejido oral humano hacia células tipo neurales.

### 5. OBJETIVO

#### 5.1 Objetivo general.

Dilucidar el papel de acción de las vías de señalización de TGF- $\beta$  y WNT/ $\beta$ -Catenina en aumento del potencial de diferenciación de las células mesenquimales de pulpa dental y tejido periodontal hacia células tipo neurales.

## 5.2 Objetivos particulares.

- Aislar y cultivar células mesenquimales de pulpa dental y tejido periodontal, previo consentimiento del paciente.
- Caracterizar a las células mesenquimales expandidas según sus características inmunofenotípicas.
- Evaluar el papel de TGF $\beta$  en la regulación de los marcadores de cresta neural CD271/P75<sup>+</sup>
- Evaluar el papel de WNT/ $\beta$ -Catenina en la regulación de los marcadores de cresta neural CD271/P75<sup>+</sup>
- Evaluar el papel de la vía de TGF $\beta$  en la diferenciación de células mesenquimales de pulpa dental y tejido periodontal hacia células tipo neurales.

## 6. METODOLOGIA.

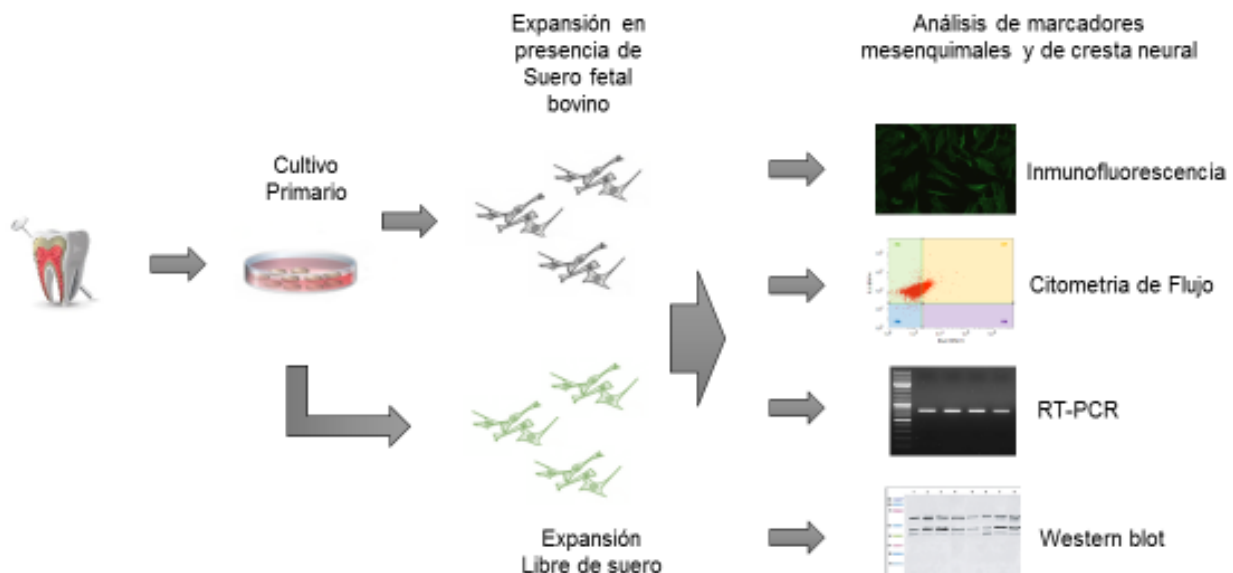


Figura 5. Esquema de las metodologías utilizadas para caracterizar a las células mesenquimales de pulpa dental y de tejido periodontal en condiciones libres de suero fetal bovino, a diferentes concentraciones de suero o con el uso de factores definidos.

## 6.1 Aislamiento de células mesenquimales de pulpa dental y de ligamento periodontal.

Para el aislamiento de células mesenquimales de pulpa dental y tejido periodontal se colectaron dientes deciduos de pacientes sanos, bajo carta de consentimiento y aprobación del Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM). Los dientes fueron colocados en la solución de HBSS (Hank's Balanced Solution Saline; Invitrogen Cat: 14025) estéril y suplementada con antibiótico al 1X (Anti-Anti 100X; Invitrogen Cat: 15240062). Se separó para su proceso posterior el tejido periodontal y se desinfectó la superficie del diente sumergiéndola en una solución oral antiséptica de 70% de etanol por 30 segundos. Se trituró el diente para exponer la pulpa utilizando una gubia leksell previamente esterilizada. Utilizando pinzas estériles, se retiró la pulpa y se le sumergió en medio DMEM/F12 (Invitrogen Cat: 12500096) suplementado con antibiótico al 1X (Anti-Anti 100X; Invitrogen Cat: 15240062), posteriormente se trituro la pulpa utilizando un bisturí. Los trozos de pulpa dental y ligamento periodontal previamente triturados si digirieron parcialmente por tratamiento enzimático con colagenasa (Sigma Cat: C1639) a 3mg/mL hasta un volumen de 2 mL durante 30 minutos a 37°C. Luego de la digestión enzimática se adicionó DMEM/F12 suplementado con 10% FBS, o un medio DMEM/F12 basal suplementado con 1x N2 supplement (Invitrogen), 100 µg/mL L-Ascorbic acid-2-phosphate, 50 µM β-mercaptoethanol, 1x Glutamax (Thermo Fisher Scientific), MEM Amino Acids Solution 1x (Invitrogen), 2.5 ng/mL bFGF (basic Fibroblast Growth Factor, Thermo Fisher Scientific), 10 ng/mL IGF-1 (Insulin Growth Factor, Thermo Fisher Scientific), 10 ng/mL EGF (Epidermal Growth Factor, Thermo Fisher. Las partes digeridas fueron sembradas de manera independiente en los medio antes mencionado (con SFB o libre de suero, dependiendo de los ensayos) y fueron mantenidas dentro de una incubadora a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>. El medio fue cambiado cada 48 Horas.

## 6.2 Cultivo de células mesenquimales de pulpa dental y de ligamento periodontal.

Para diferentes propósitos de cultivo y análisis, las células aisladas se cultivaron en condiciones libres de suero fetal bovino (adicionando con TGFβ 2.5ng/ml cuando se indica), o con 1%, 2% o 10% de SFB. Las células cultivadas en condiciones libres de suero se mantuvieron en suspensión por 48 horas, posteriormente fueron transferidas a placas de cultivo tratadas previamente con fibronectina para promover la adherencia. Una vez que las células mesenquimales cultivadas con SFB migraron fuera del conglomerado de células y empezaron a dividirse y aumentar la confluencia en la placa, fueron levantadas por tratamiento con 1mL de dispasa 1mg/mL (Stem Cell Technologies Cat: 07913) durante 10 minutos a 37°C. Las células fueron desprendidas y se mantuvieron en suspensión aforando a 5mL de medio completo; posteriormente fueron centrifugadas a 1500 RPM y el botón celular fue resuspendido en 2 mL de medio de cultivo. A este cultivo se le denominó "pasaje 1". Luego de la siembra en pasaje 1 se cambió el medio cada segundo día y se esperó a que las células alcanzaran una confluencia aproximadamente del 70%. En ese momento las células fueron levantadas nuevamente por tratamiento con dispasa y fueron resembradas a una densidad de  $2 \times 10^6$  células en placas de 100mm o utilizadas para su caracterización en determinado pasaje por análisis inmunocitoquímicos o análisis funcionales. Cabe señalar que las células utilizadas en este trabajo fueron dentro del pasaje 1 al 5.

### 6.3 Caracterización de células mesenquimales de pulpa dental y de ligamento periodontal mediante citometría de flujo.

Una vez alcanzada la confluencia al 70%, las células de pulpa dental o de ligamento periodontal se levantaron con tratamiento de tripsina 0.4% en PBS durante 3 min. a 37 °; posteriormente fueron recuperadas y centrifugadas durante 7 min a 1500 RPM. El sobrenadante se desechó y las células se lavaron con PBS 0.2% BSA, centrifugadas de nueva cuenta 7 min a 1500 RPM, se resuspendieron en el amortiguador Citofix fixation (Becton Dickinson) y se incubaron de manera independiente o en grupos con diferentes anticuerpos por 10 minutos. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron nuevamente en las rpm antes mencionadas. El análisis de marcadores de membrana fue realizado por citometría de flujo, las células fueron desprendidas de la placa de cultivo en los primeros pasajes utilizando la enzima Accutase (Thermo Fisher Scientific) y posteriormente fueron lavadas con PBS (suplementado con 2mM de EDTA y 0.5% de BSA). Las células fueron centrifugadas a 1500 rpm por 4°C y resuspendidas en amortiguador con anticuerpo para su posterior incubación con los anticuerpos conjugados: Anti- CD90-PE, Anti-CD105-APC, Anti-CD73-PE, Anti-CD271/p75-APC, Anti-HNK-1-FITC, Anti-E-CADHERINA/CDH1-APC, Anti-GFAP-A647, Anti-PSA-NCAM-APC, Anti-MAP2- A647, Anti-NESTIN-PE, Anti-IgG1-FITC, Anti-IgG1-PE, Anti-IgG1-APC (todos de Miltenyi Biotec), DAPI (BD Biosciences), y Anti-Ki67-PE (BD Biosciences). Cada ensayo se resuspendió en 100uL de buffer PBS + 2mM EDTA + 0.5% BSA. El número de células y la dilución de los anticuerpos se realizaron bajo las condiciones de incubación por recomendación de la hoja técnica de cada anticuerpo (10ul de anticuerpo por cada  $1 \times 10^7$  células en 100uL de Buffer). La adquisición de las muestras y sus análisis fueron realizadas utilizando el citometro de flujo Attune™ flow cytometer (Thermo Fisher Scientific) y el software FlowJ, respectivamente, en la unidad de citofluorometría del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Anticuerpos Miltenyi	Diluciones
Anti- CD90-PE	10uL cada $10^7$ Células
Anti-CD105-APC	10uL cada $10^7$ Células
Anti-CD73-PE	10uL cada $10^7$ Células
Anti-CD271/p75-APC	10uL cada $10^7$ Células
Anti-HNK-1-FITC	10uL cada $10^7$ Células
Anti-E-CADHERINA-APC	10uL cada $10^7$ Células
Anti-GFAP-A647	10uL cada $10^7$ Células
Anti-PSA-NCAM-APC	10uL cada $10^7$ Células
Anti-MAP2- A647	10uL cada $10^7$ Células
Anti-NESTIN-PE	10uL cada $10^7$ Células
Anti-TUJ1-PE	10uL cada $10^7$ Células
Anti-CD15-APC	10uL cada $10^7$ Células

Anti-DCX-PE	10uL cada 10 <sup>7</sup> Células
Anti-CD24-FITC	10uL cada 10 <sup>7</sup> Células
Anti-IgG1-FITC	10uL cada 10 <sup>7</sup> Células
Anti-IgG1-PE	10uL cada 10 <sup>7</sup> Células
Anti-IgG1-APC	10uL cada 10 <sup>7</sup> Células

#### 6.4 Inmunofluorescencia.

Las células mesenquimales de pulpa dental, las células mesenquimales de ligamento periodontal y las células embrionarias humanas (ESI-BIO, EE. UU.) se sembraron en portaobjetos (Thermo Scientific™ Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide) y se cultivaron hasta que alcanzaron un 80% de confluencia. Las células se fijaron con 4% paraformaldheido (PFA) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA), posteriormente fueron lavadas con PBS, luego se permeabilizaron con TritonX-100 al 0.1% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se bloqueó con BSA al 1% (BSA, MP Biomedicals) en PBS durante 2 horas a TA. Los principales anticuerpos utilizados fueron: anti-SOX2 (Genetex), anti-MASH-1 (Abcam), anti-SOX10 (Abcam). Los anticuerpos se diluyeron en amortiguador de bloqueo, la placa fue lavada posteriormente tres veces con PBS, y se incubaron con las células a 4° C, la placa fue lavada posteriormente tres veces con PBS y se agregaron los anticuerpos secundarios Alexa488 o Alexa568, dependiendo el diseño del anticuerpo primario. El anticuerpo anti-β3-Tubulina-AlexaFluor555 (BD Biosciences) y el marcador de ADN Hoescht 33342 (Invitrogen), se utilizaron de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Se utilizó de manera de control células incubadas solamente con el anticuerpo secundario para comprobar inespecificidad. Las células fueron analizadas utilizando microscopio de fluorescencia (Olympus IX71) y microscopio confocal (Zeiss LSM5 Pascal).

#### 6.5 PCR punto final.

El ARN fue obtenido utilizando Trizol (Thermo Fisher Scientific), posteriormente fue tratado con DNAsa (Thermo Fisher Scientific) y una columna de afinidad de ARN RNeasy Mini Kit (Qiagen). La expresión de genes fue analizada utilizando el kit de amplificación de RT-PCR One-Step RT-PCR Kit (Qiagen) y los oligos (Anexo1-2). El gen beta actina ACTB o GADPH fueron incluidos como controles constitutivos y el RT(-) como control negativo.

#### 6.6 PCR tiempo real.

El análisis por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-qPCR) se realizó utilizando el kit KAPA SYBR FAST (Kappa BioSystems) y el termociclador Rotor-Gene6000 (Qiagen). La expresión relativa a los genes fue determinada utilizando el método de cuantificación relativa de Pfaffl's.



### 6.7 Enriquecimiento celular de la población CD271 por MACS y FACS.

Las células fueron enriquecidas por el método de enriquecimiento por columna MACS o el método de enriquecimiento por citometría de flujo (FACS), utilizando el anticuerpo humano anti-CD271/P75 del kit (MicroBead kit APC) o el anticuerpo anti-CD271/P75-APC, respectivamente como recomienda el proveedor (Miltenyi Biotec).

### 6.8 Medios de cultivo utilizados en el proceso de inducción neural.

Las células fueron sembradas a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en placas tratadas previamente con Matrigel (BD Biosciences).

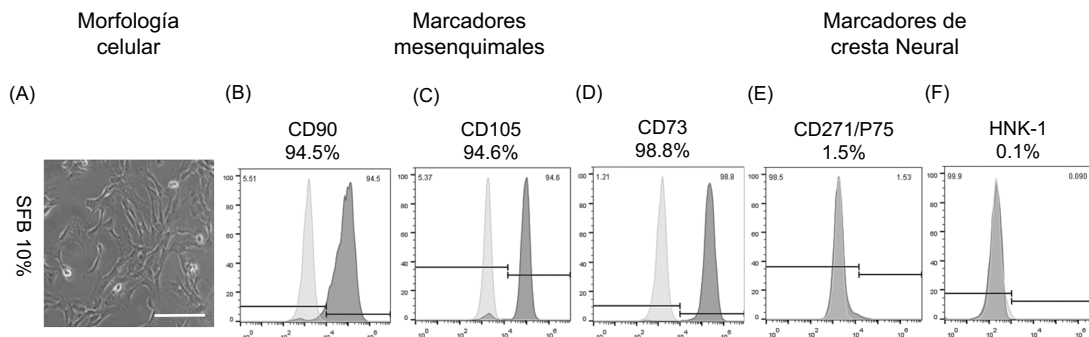
El medio de cultivo de compromiso neural contiene: medio Optimem, 20 ng/mL bFGF2, 20 ng/mL EGF, 2 μM SB43152, 1 μM LDN-193189 (Sigma), 1× suplemento N2, 1× suplemento B27 y 10 ng/mL Leukemia Inhibitory Factor (LIF; Peprotech).

El medio de cultivo de diferenciación neural contiene: medio Neurobasal-A (Thermo Fisher Scientific) suplementado con 1× N2 (Thermo Fisher Scientific), 20 ng/mL bFGF2, 10 ng/mL Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF, Peprotech), 10 ng/mL Glial-Derived Neurotrophic Factor (GDNF, Peprotech), 10 ng/mL Nerve growth factor (NGF, Peprotech), 10 ng/ mL Neurotrophin-3 (NT-3, Gibco), 200 μM ascorbic acid (Sigma-Aldrich), 10 μM forskolin (Sigma-Aldrich), 250 μM 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, Sigma-Aldrich), 2 μM SB43152 (Sigma-Aldrich) y 1 μM LDN-193189 (Sigma-Aldrich).

## 7. Resultados

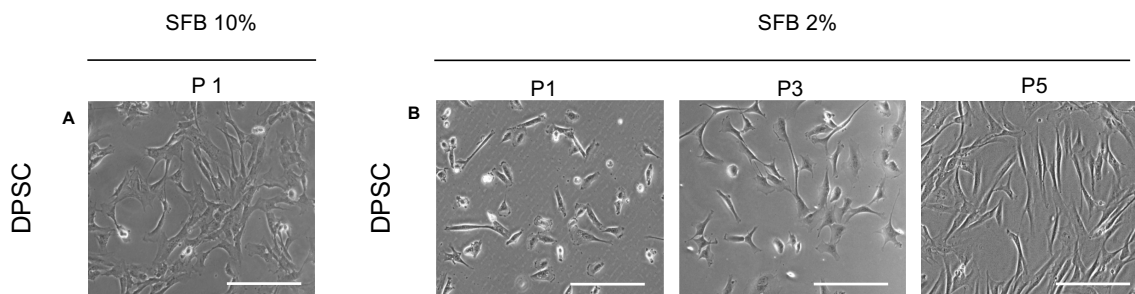
### 7.1 El cultivo con 2% de SFB fomenta la expresión del marcador CD271/P75<sup>+</sup> en las células mesenquimales de pulpa dental.

Las células mesenquimales de pulpa dental (DPSCs) presentaron las características mínimas para definir a las células mesenquimales al ser aisladas a 10% de SFB (células fibroblastoides con capacidad de plástico-adherente, expresión de antígenos específicos de membrana como CD90, CD105, CD73 (Fig6), características que definen a las células que tienen un potencial de diferenciación mesenquimal [35]). Este método de aislamiento que se utiliza de manera estándar para el cultivo de las células mesenquimales el cual comprende el uso de altas concentraciones de SFB (10-20%) puede afectar el fenotipo de las células mesenquimales por efecto de la presencia de ligandos como TGF $\beta$  o BMP que se encuentran en el SFB [71];[72]. A partir de este planteamiento se aislaron células mesenquimales de pulpa dental a diferentes concentraciones de SFB (2% y 10%) que nos permitiera comparar la expresión de marcadores de membrana (Fig7)(Tabla 1).



**Figura 6. Las células mesenquimales de pulpa dental aisladas con 10% de SFB cumplen con el fenotipo de las MSC (morfología fibroblastoide y los marcadores mesenquimales CD90, CD105, CD73) utilizado para definir a las células estromales mesenquimales.** Imagen de campo claro de la morfología típica fibroblastoide de las células mesenquimales (A). Caracterización por citometría de flujo de los marcadores mesenquimales (B-D) CD90, CD105, CD73 y marcadores de cresta neural (E-F) CD271/P75, HNK-1, en células aisladas y cultivadas con 10% de suero fetal bovino. Las poblaciones positivas se muestran en gris oscuro y las negativas en gris claro. Imagen representativa de n=8. Escala=50um.

El aislamiento y cultivo de las células de tejido oral con una concentración de 10% de SFB mostró al microscopio células con un fenotipo fibroblastoide y con una morfología típica de células mesenquimales desde el primer pasaje de expansión (Fig7A). En cambio en las células cultivadas a 2% de SFB se apreciaban células pequeñas y refringentes de apariencia tipo epitelial, las cuales progresivamente perdieron este fenotipo y adquirieron la morfología típica fibroblastoide a sucesivos pasajes o subcultivos (Fig7B).



**Figura 7. Las células aisladas de pulpa dental aisladas a 2% de SFB presentan células con morfología tipo epitelial en pasajes tempranos, las cuales adquieren morfología fibroblastoide de manera progresiva en pasajes posteriores.**

Imagen de campo claro de las células mesenquimales de pulpa dental. En comparación con las células mesenquimales de pulpa dental (A) aisladas con 10% de SFB, en las células mesenquimales aisladas con 2% de SFB (B) se aprecia un mayor número de células con morfología tipo epitelial a nivel de campo claro, las cuales independientemente de su aislamiento en menor cantidad de SFB, aumenta en número de células fibroblastoides de manera progresiva hasta disminuir casi es su totalidad al pasaje 5. Escala=50um.

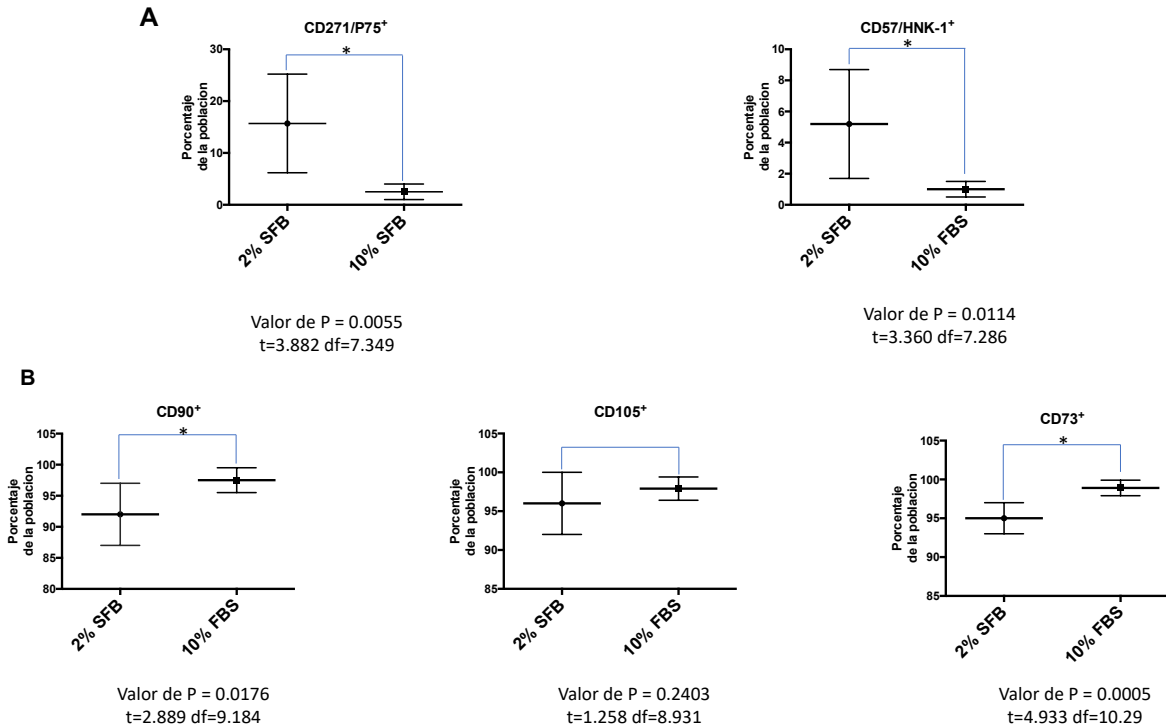
De manera similar a lo observado con las células mesenquimales cultivadas con 10% de SFB (Fig6), las células aisladas con 2% de SFB cumplieron con las características propuestas por Caplan y colaboradores [7] para definir a las células mesenquimales: células fibroblastoides con capacidad de plástico-adherente, expresión de antígenos específicos de membrana (Fig7) (Tabla 1), así como potencial de diferenciación hacia linajes mesenquimales como Osteocitos y Adipocitos (Anexo1-2).

El porcentaje de las poblaciones celulares positivas a los marcadores mesenquimales y de cresta neural entre ambas condiciones de cultivo (2% y 10% de SFB) se evaluó mediante citometría de flujo en las DPSC, ambas condiciones mostraron la presencia de marcadores mesenquimales y marcadores de cresta neural. En las células aisladas y cultivadas a una concentración del 10% de SFB el porcentaje de células que expresaron los marcadores mesenquimales fue aproximadamente un 95% en los tres marcadores, mientras que, en los marcador de cresta neural se expresaron en un 2.5% de las células para CD271/P75 y un 1% de las células para HNK-1 (Tabla 1). Por otra parte, las células que se aislaron a una concentración de 2% SFB mantuvieron la misma media de porcentaje de células expresando los marcadores mesenquimales CD90, CD105, CD73; en cambio expresaron niveles variables del marcador de cresta neural CD271/P75 (5% al 25% de las células) y del marcador HNK-1 (2.5% a 8% de las células) (Tabla-1).

MARCADORES DE MEMBRANA EN LAS DPSC				
SFB	MARCADORES MESENQUIMALES		MARCADORES DE CRESTA NEURAL	
10%	CD73	98.9 (1.0)	CD271/P75	2.5 (1.5)
	CD90	97.5 (2.0)	HNK-1	1.0 (0.5)
	CD105	97.9 (1.5)		
2%	CD73	95.0 (2.0)	CD271/P75	15.7 (9.5)
	CD90	92.0 (5.0)	HNK-1	5.2 (3.5)
	CD105	96.0 (4.0)		

**Tabla 1. Las células mesenquimales de pulpa dental aisladas y cultivadas con 10% y 2% de SFB, expresan distintos niveles en el porcentaje de expresión del marcador de cresta neural CD271/P75.**

Porcentaje de células positivas en las células mesenquimales de pulpa dental de los marcadores de membrana analizados por citometría de flujo con el uso de anticuerpos específicos para marcadores: mesenquimales (CD73, CD90, CD105) y de cresta neural (CD271/P75 Y HNK-1), aisladas y cultivadas a una concentración de 10% y 2% de SFB. El porcentaje de la población que expresa el marcador de cresta neural CD271/P75<sup>+</sup> en las células mesenquimales de pulpa dental es similar a los resultados reportados por otros grupos de investigación en las DPSC (<1%), mientras que el uso de las condiciones de aislamiento y cultivo con 2% de SFB nos muestra una media de 15.7% en el porcentaje de células expresando el mismo marcador de cresta neural. DPSC=células mesenquimales de pulpa dental. n=8



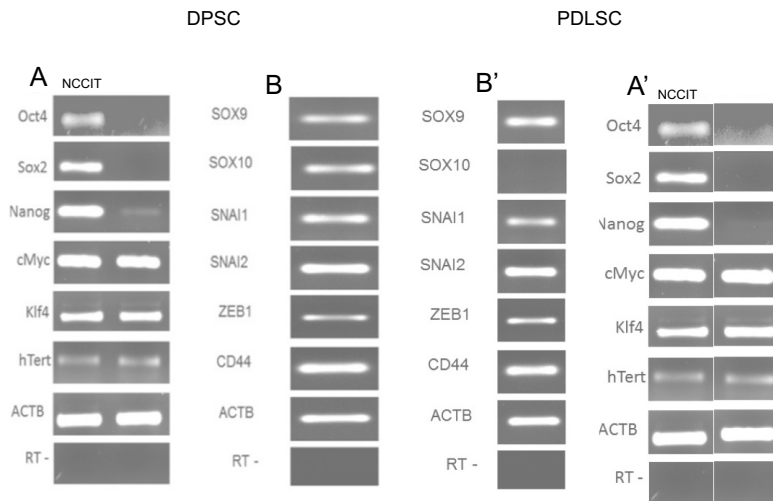
**Gráfica 1. Las células mesenquimales de pulpa dental presentaron un mayor porcentaje de células CD271/P75 y CD57/HNK-1 y menor porcentaje de células CD90 y CD73 a 2% de SFB en comparación con el cultivo con 10% de SFB.**

El efecto es causado por la disminución a 2% de SFB en el aislamiento y cultivo de las DPSC mostrando un papel dual del SFB en la regulación de estos marcadores. Por un lado, dando lugar a un mayor porcentaje de células que expresan los marcadores de cresta neural (A) CD271/P75 (P = 0.005) y CD57/HNK-1 (P = 0.0114) y por el otro, una disminución en el porcentaje de los marcadores mesenquimales CD90 (P = 0.0176) y CD73 (P = 0.0005). El marcador mesenquimal CD105 (P = 0.2403) no presentó cambios estadísticamente significativos. La significancia estadística se evaluó con el uso de la prueba para muestras no paramétricas U de Mann Whitney y fue establecida para un  $P < 0.05^*$ , representación grafica de la media y desviación estándar. n=8.

Estos resultados sugieren que a 2% de SFB se aíslan y mantienen un mayor número de células positivas a los marcadores de membrana asociados a las células troncales de cresta neural, lo que puede estar relacionado con células con morfología de apariencia epitelial (Fig7B). El porcentaje de células que expresaron el marcador de cresta neural CD271/P75 ronda el 2.5% con 10% SFB, mientras que, cuando las células son aisladas y cultivadas a una concentración de SFB al 2% (algo no habitual en los protocolos de aislamiento y cultivo de células mesenquimales), la media de células positivas al marcador de cresta neural CD271/P75 fue de 15.17%. El análisis estadístico con la prueba no paramétrica U Mann Whitney mostró significancia estadística entre ambas condiciones de cultivo con una  $P < 0.05$  para los marcadores de cresta neural y los marcadores mesenquimales (excepto para el marcador mesenquimal CD105) (Gráfica 1).

## 7.2 Las DPSC y las PDLSC cultivadas al 2% de SFB expresan genes relacionados con la cresta neural migratoria.

Dado que los análisis por citometría de flujo mostraron que en el aislamiento al 2% de SFB las células mesenquimales de pulpa dental presentan un mayor porcentaje de células que expresan el marcador de cresta neural CD271/P75, se optó por evaluar mediante RT-PCR la expresión génica de algunos genes regulatorios de la cresta neural migratoria como *SOX9*, *SOX10*, *SNAI1* (*Snail*), *SNAI2* (*Slug*), *ZEB1* y *CD44*, así como los genes del circuito regulatorio de la pluripotencia *OCT4* y *SOX2*, que nos permitiera definir qué genes están regulando a estas células mesenquimales. Considerando lo anterior se analizaron dos tipos celulares de tejido oral (DPSC y PDLSC) aislados a una concentración de SFB (2%). Los resultados muestran la ausencia de expresión de genes del circuito de pluripotencia *OCT4* y *SOX2* en ambos tipos celulares, mientras que la expresión de los genes de la cresta neural migratoria *SNAI1*, *SNAI2*, *ZEB1* y los genes de la cresta neural *SOX9*, *SOX10*, *CD44* sí se expresaron. (Fig8).



**Figura 8. Las células mesenquimales de pulpa dental y las células mesenquimales de tejido periodontal expresan genes asociados a las células migratorias de la cresta neural.**

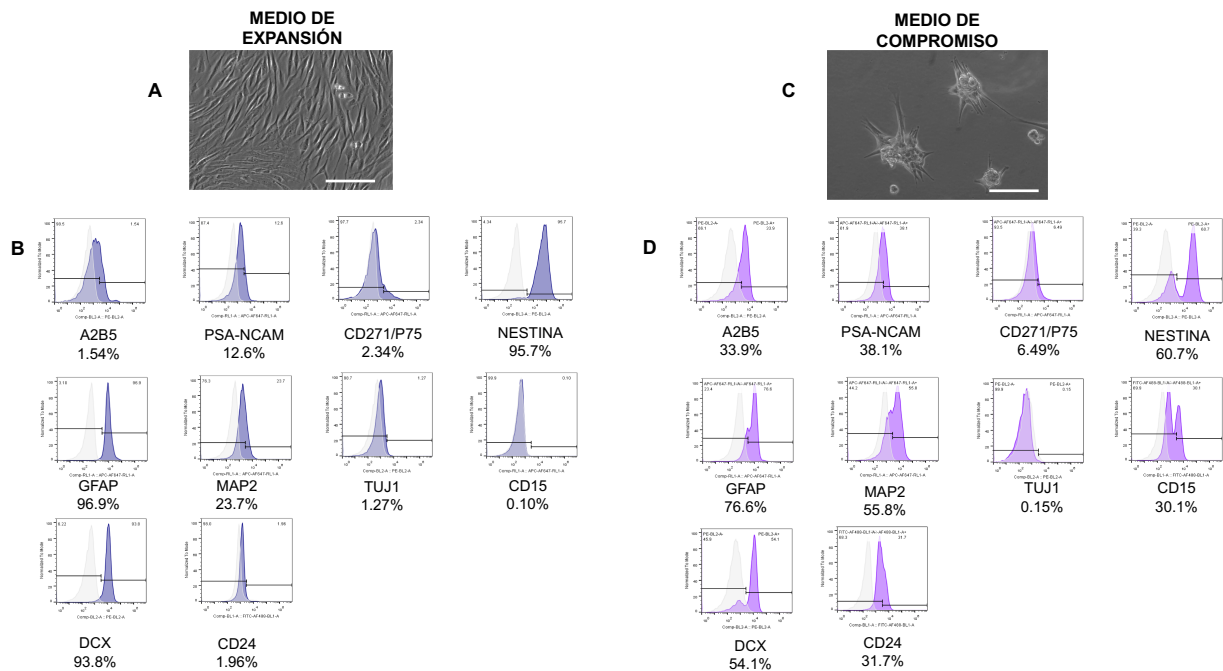
Análisis de genes de pluripotencia de las células mesenquimales aisladas de pulpa dental y tejido periodontal, *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *CMYC*, *KLF4*, *hTERT* (A) y (A'), marcadores de cresta neural, *SOX9*, *SOX10*, y genes involucrados en transición epitelio-mesénquima identificados en las células de la cresta neural migratoria *CD44*, *ZEB1*, *SNAI1*, *SNAI2* (B) y (B'), mediante RT-PCR. Se utilizó la línea NCCIT (teratorcarinoma pluripotente) como control de los genes de pluripotencia. Se amplificó el gen *ACTB* como control interno y una amplificación del mismo gen sin retrotranscriptasa (RT-) como control negativo.

Los resultados mostraron que las células mesenquimales aisladas del tejido oral y cultivadas en condiciones de cultivo al 2% de SFB presentan marcadores similares a la cresta neural migratoria (Fig8), aunado a la expresión de marcadores de membrana antes descritos (Tabla 1) para las DPSC y para las PDLSC [26]. La presencia de marcadores de la cresta neural migratoria (Tabla 1) y los genes regulatorios de la cresta neural como *SOX10* (Fig8) indican que esta población celular presenta un fenotipo similar a las células post-migratorias de la cresta neural,

algo similar a lo observado recientemente en células humanas en una pequeña población de médula ósea [73] y anteriormente descrito en tejido adiposo [74].

### 7.3 Las células mesenquimales de pulpa dental expresan marcadores neurales.

Con base en los resultados anteriores decidimos analizar y caracterizar mediante citometría de flujo algunos marcadores neurales: A2B5, PSA-NCAM, GFAP, MAP2, DCX, CD24, CD27, NESTINA, TUJ1 y CD15, con dos condiciones diferentes de cultivo. Una condición usada para la expansión de células mesenquimales que comprende principalmente 2% de SFB a la que denominamos “medio de expansión” mesenquimal y otra condición que nos permitiera generar un compromiso neural, un medio de cultivo sin SFB y mitógenos como bFGF, EGF, Insulina e inhibidores farmacológicos de los receptores de TGF $\beta$  (ALK5) y BMP (ALK2/3) como SB-431532 y LDN-193189 respectivamente, involucrados en el mantenimiento y autorrenovación de las células troncales neurales [75], al que denominamos “medio de compromiso” neural.



**Figura 9. Las células mesenquimales de pulpa dental expresan un perfil de marcadores de membrana asociado a progenitores neurales y adquieren morfología epitelial al ser cultivadas con inhibidores farmacológicos de la vía de TGF $\beta$ .**

Morfología celular (A y C) y marcadores de progenitores neurales en las DPSC (B y D) al ser cultivadas con el medio de compromiso neural el cual contiene inhibidores farmacológicos para TGF $\beta$  (ALK5) y BMP (ALK2/3) en comparación al medio de expansión con presencia de SFB. La expresión de los marcadores de membrana asociados a progenitores neurales como: A2B5, PSA-NCAM, GFAP, MAP2, DCX, CD24, CD271/P75, NESTINA, TUJ1 y CD15, presentan una distribución heterogénea. Las poblaciones positivas se encuentran en morado o lila y las negativas en gris. Escala=50um.

Los resultados por citometría de flujo de estos marcadores mostraron la presencia de ciertas proteínas relacionadas con la adquisición de un compromiso y un proceso de diferenciación neural, como es el caso de las proteínas: DCX, MAP2, CD15 y PSA-NCAM, asociadas a células progenitoras neurales y la proteína A2B5 y GFAP, marcadores asociados a compromiso glial así como la disminución de los marcadores de células troncales neurales (NSC del inglés, *Neural Stem Cells*) encontradas en el cerebro adulto como son la proteína GFAP y NESTINA (Fig9BD).

Estos resultados indican que las DPSC varían su expresión de marcadores neurales mediante la presencia de ligandos como: bFGF, EGF e inhibidores farmacológicos de TGF $\beta$  (ALK5) y BMP (ALK2/3) (condiciones de cultivo que se utiliza para la expansión de las NSC), marcadores neurales ya presentes en las condiciones de cultivo con SFB (Fig9B).

Esta variación de marcadores neurales podría ser una de las características intrínsecas de las células mesenquimales de pulpa dental y que podría dar lugar a diversos linajes neurales como es el caso de neuronas y glías.

#### **7.4 La expresión de SOX2 y MASH-1 en las células aisladas de pulpa dental hacia células tipo neurales, es mediada por la inhibición farmacológica de la vía de TGF $\beta$ .**

Aunque existen diversos grupos de investigación que han descrito los marcadores neurales como NESTINA y GFAP en células mesenquimales de pulpa dental, así como en células mesenquimales de médula ósea [76], no hay estudios donde se evalúe precisamente los factores de transcripción implicados en la diferenciación neuronal, principalmente los factores de transcripción neurales *SOX2* y *MASH-1*. Por lo tanto, decidimos buscar la presencia de estos factores de transcripción en células mesenquimales de pulpa dental cultivadas en los medios antes mencionados: el medio de expansión celular, el medio de compromiso neural (que nos señalara un inicio de compromiso neuronal) y posteriormente el uso de un medio de cultivo el cual contiene neurotrofinas como: NT3, NGF, GDNF y BDNF, mientras se mantiene la inhibición de la vía de TGF $\beta$  (Fig10), al que denominamos “medio de diferenciación neural”.





Figura 10. Esquema de los componentes principales de los medios de cultivo utilizados para caracterizar el proceso de inducción neural en las células mesenquimales de pulpa dental.

Mediante el análisis por inmunofluorescencia y el uso de un microscopio confocal se buscó la expresión de la proteína SOX2 (Fig11) en el medio de expansión celular y resultó negativa (Fig11), posiblemente por la presencia de el ligando BMP presente en el SFB, el cual está descrito que participa como un regulador negativo de SOX2 [77]. De la misma manera, en “el medio de expansión celular” con el uso de un microscopio de epifluorescencia se buscó la expresión proteica del factor de transcripción MASH-1 (Fig12A), y resultó negativa, mientras que en el medio de compromiso neural se mostros la expresión del factor de transcripción SOX2 mediante RT-PCR y se visualizó la presencia de la proteína en el microscopio confocal (Fig11). Paralelamente se mostró la expresión proteica del factor de transcripción MASH-1 mediante inmunofluorescencia (Fig12B-C), el cual es regulado de manera positiva por el factor de transcripción SOX2 por unión a su promotor.

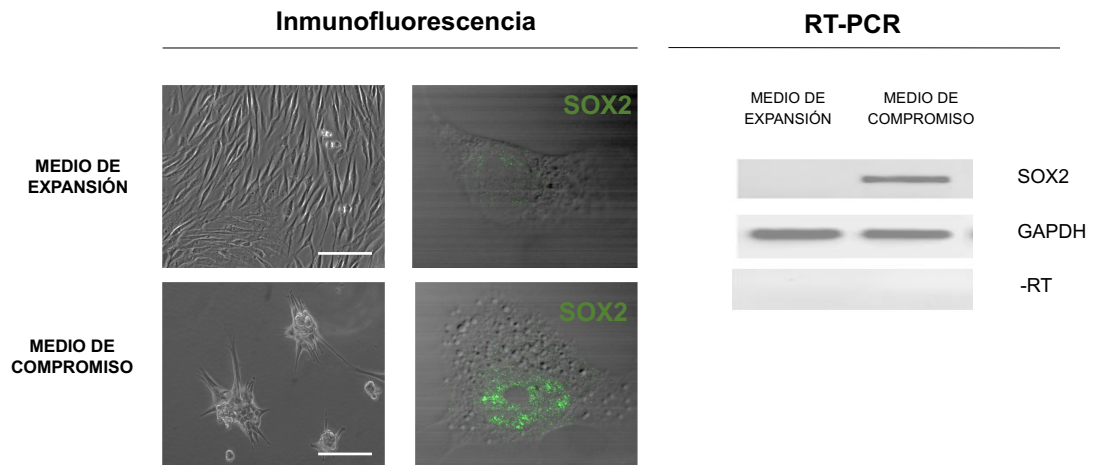
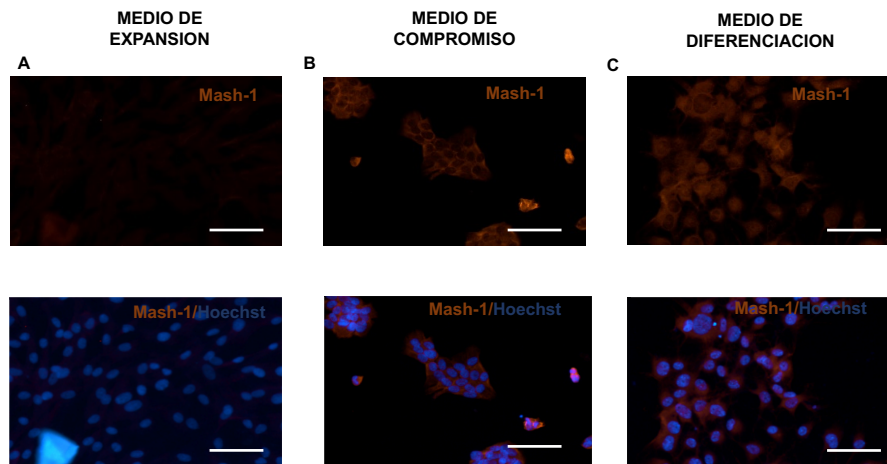


Figura 11. Las células mesenquimales de pulpa dental expresan el factor de transcripción de SOX2 por efecto de la inhibición del receptor de BMP (ALK2/3).

Análisis por RT-PCR e inmunofluorescencia del factor de transcripción SOX2 mediante la inhibición de la vía de TGF $\beta$  con el uso de inhibidores farmacológicos del receptor de BMP. En el medio de expansión mesenquimal las cuales contiene SFB la expresión del gen SOX2 fue negativa, en cambio con las condiciones de cultivo del medio de compromiso neural ( que contiene los inhibidores farmacológicos LDN-193189 para ALK2/3 y SB-431532 para ALK5) fue positiva la expresión . Se amplificó el gen *GADPH* como control interno y una amplificación del mismo gen sin retrotranscriptasa (RT-) como control negativo. Imagen representativa n=4. Escala=50um.



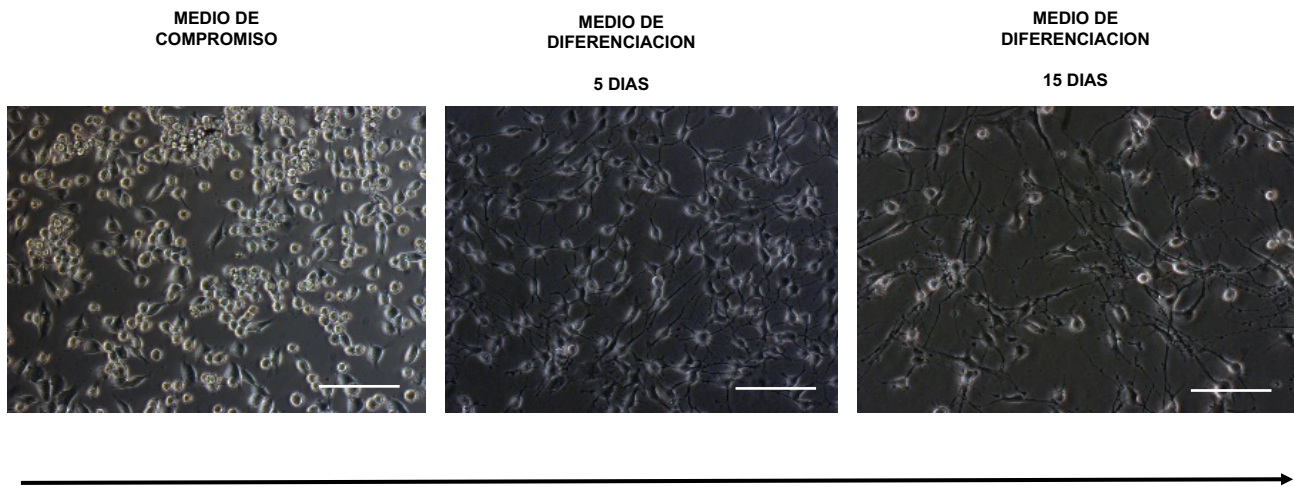
**Figura 12. Las células mesenquimales de pulpa dental expresan el factor de transcripción bajo de SOX2 MASH-1 en el medio de compromiso neural por efecto de la inhibición del receptor de BMP'S ALK2/3.**

El factor de transcripción MASH-1 involucrado en el compromiso hacia células neurales, se expresa por acción del factor de transcripción SOX2, el cual se une al promotor de MASH-1 regulando de manera positiva su expresión e iniciando el programa de diferenciación neuronal. La expresión proteica analizada por inmunofluorescencia es negativa en el medio de proliferación el cual contiene 2% de SFB (A) e inicia su expresión en el medio de compromiso neural el cual contiene los inhibidores farmacológicos para TGF $\beta$  y BMP (B), mientras que en el medio de diferenciación celular se aprecia la translocación al núcleo la cual se visualiza por colocalización de la proteína MASH-1 y el marcador de ADN Hoescht 33342 en color morado (C). Escala=50um.

Estos resultados ponen en evidencia que el proceso de señalización involucrado en la diferenciación neuronal de las células mesenquimales de pulpa dental es similar a lo descrito en células troncales de cresta neural humana (NCSC del inglés, *Neural Crest Stem Cells*) [78], en la que factor de transcripción SOX2 se une al promotor de *MASH1* promoviendo su expresión e iniciando el compromiso neuronal, similar a lo descrito en células precursoras de cresta neural de murino [79], en las cuales observaron la expresión de SOX2 en células de cresta neural aisladas de piel, en el inicio de reparación tisular.

### 7.5 La Inhibición del receptor de TGF $\beta$ (ALK5) y BMP (ALK2/3) en el proceso de diferenciación de células mesenquimales hacia células tipo neurales favorece la expresión proteica de $\beta$ 3-Tubulina/TUJ1.

A partir de los resultados en los cuales el “medio de compromiso neural” indujo la expresión de los factores de transcripción específicos hacia un linaje neuronal *SOX2-MASH1*, se optó por utilizar el tercer medio el cual fue denominado “medio de diferenciación neural”, para evaluar si es posible la generación de neuritas típicas de células neuronales e inducir la proteína  $\beta$ 3-Tubulina/Tuj1, indicativa de determinación celular, que se expresa en fases iniciales de maduración neuronal. Para lograr lo anterior se utilizó un medio similar al de Menéndez y colaboradores que se usa para diferenciar células troncales de cresta neural CD271/P75<sup>+</sup> hacia células neuronales [80].

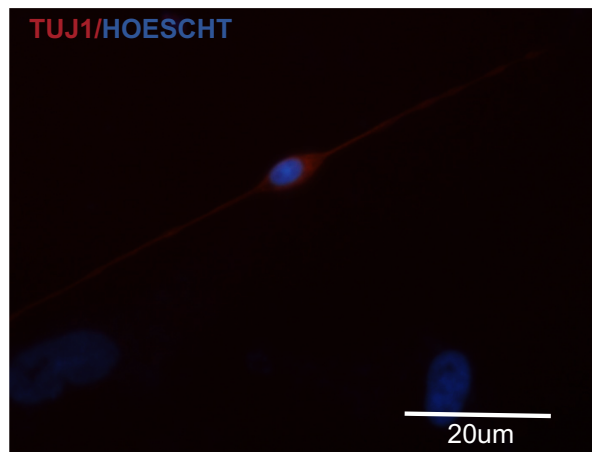


**Figura 13. Las células mesenquimales de pulpa dental generan cambios morfológicos típicos de las células neuronales a 15 días del proceso de inducción neural.**

El proceso de diferenciación de las células mesenquimales de pulpa dental adquiere diversas morfologías celulares, desde la compactación celular asemejando a células epiteliales en la etapa del medio de compromiso neural, hasta la adquisición de neuritas y morfología neuronal a los 15 días de cultivo. Escala=50um.

MEDIO DE  
DIFERENCIACION

15 DIAS



**Figura 14. Las células mesenquimales de pulpa dental expresan el marcador  $\beta$ 3-Tubulina/TUJ1 a los 15 días de exposición al medio de inducción neural.**

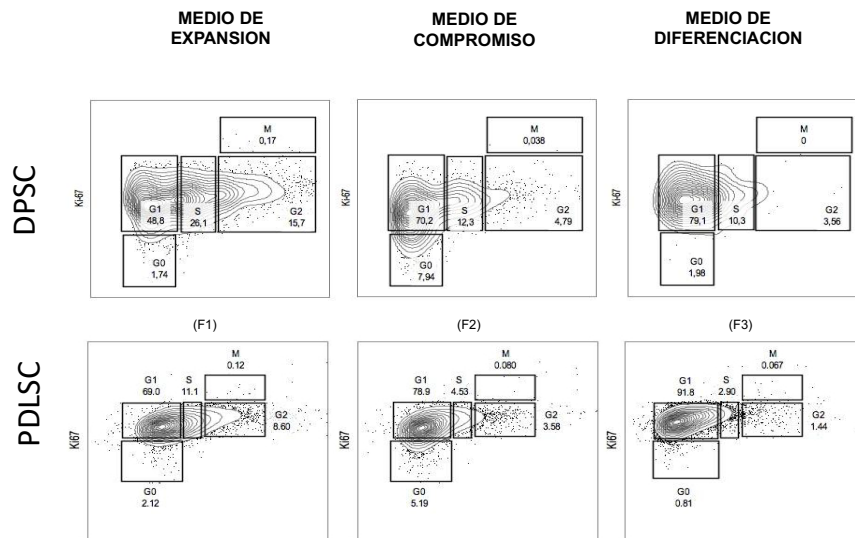
Ejemplo de una célula mesenquimal de pulpa dental que expresó  $\beta$ 3-Tubulina/TUJ1 a los 15 días del proceso de inducción neuronal, morfología bipolar en rojo. La cantidad de células que expresaron el marcador de diferenciación neural fue alrededor de un 5%, a pesar de que la mayoría de células presentaban una morfología con neuritas. En la imagen se observa una célula negativa a  $\beta$ 3-Tubulina en la que se aprecia un núcleo del doble de tamaño de la célula bipolar, la cual podría indicar una célula mesenquimal no diferenciada o una célula tipo glial. Imagen representativa n=8 Escala 20um.

Después de 15 días de cultivo en el medio de diferenciación neuronal las células desarrollaron neuritas (Fig13), y las pocas células que fueron reactivas al anticuerpo anti- $\beta$ 3-Tubulina/TUJ1 (menos de 5%) mostraron un núcleo pequeño y apariencia bipolar (Fig14), similar a la morfología observada por Kim en la diferenciación de NCSC humanas a células neuronales [81]. Los resultados anteriores nos llevaron a preguntarnos si la heterogeneidad en el porcentaje de células positivas para el marcador CD271/P75 (Tabla 1) influyó en el potencial de diferenciación neural en esta población, específicamente si los progenitores de cresta neural CD271/P75 positivos mantenían la capacidad de diferenciarse a neuronas, y si aquellas poblaciones que se aislaban con alta concentración de suero, el cual llevaba a la pérdida progresiva del marcador de cresta neural CD271/P75, perdía consecutivamente la capacidad o el potencial de generar células tipo neuronales, y por lo tanto optaba por un compromiso mesenquimal, similar a lo reportado por Curchoe y colaboradores, en donde cultivaron NCSC humanas con 10% de SFB y la población troncal con potencial neural CD271<sup>+</sup> disminuía, generando una población mesenquimal CD73<sup>+</sup> y disminuyendo la eficiencia de diferenciación neuronal 10 veces [82].

**7.6 Las células mesenquimales cultivadas en los medios de compromiso e inducción neural se acumulan en la fase G1 del ciclo celular.**

Después de una serie de divisiones celulares y antes de llegar a un proceso de diferenciación final, las células neuronales se mantienen en un estado de diferenciación terminal sin poder re-entrar al ciclo celular y regresar a un estado de proliferación. El arresto en el ciclo celular es uno de los eventos iniciales en el proceso de maduración neuronal. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las células progenitoras neurales entran a la fase G1 del ciclo celular de manera prolongada antes de llegar a un estado de maduración y arresto celular [83];[84].

Una de las incógnitas sobre el procedimiento de inducción utilizado y la eficiencia neuronal en las células mesenquimales, era conocer si el empleo de esas moléculas inductoras antes descritas y utilizadas en protocolos de diferenciación a partir de progenitores neurales, favorecía realmente un proceso de diferenciación y no de un evento en el cual la expresión de estas proteínas neurales del citoesqueleto o proteínas membranales fuera de manera transitoria, descrito como un suceso previamente cuestionado en el proceso de “diferenciación” de células mesenquimales de médula ósea [39], por lo que se planteó evaluar las fases del ciclo celular en las diferentes etapas de inducción neuronal.



**Figura 15. Las células mesenquimales de pulpa dental y de tejido periodontal, se detienen en la fase de G1, por efecto de la inducción neural.**

Cambios en los porcentajes de las fases del ciclo celular en el proceso de inducción neuronal, en las etapas de diferenciación de las DPSC que inicia con el medio de expansión/proliferación (G1/G0 48.8%, S 26.1%, G2 15.7%), medio de compromiso (G1/G0 70.2%, S 12.3%, G2

4.79%) y medio de diferenciación (G1/G0, 79.1%, S 10.3%, G2 3.56%) y en las PDLSC que inicia con medio de expansión (G1/G0 69.0%, S 11.1%, G2 8.60%), medio de compromiso (G1/G0 78.9%, S 4.53%, G2 3.58%) y medio de diferenciación (G1/G0, 91.8% S 2.90%, G2 1.44%). Imagen representativa. N=2

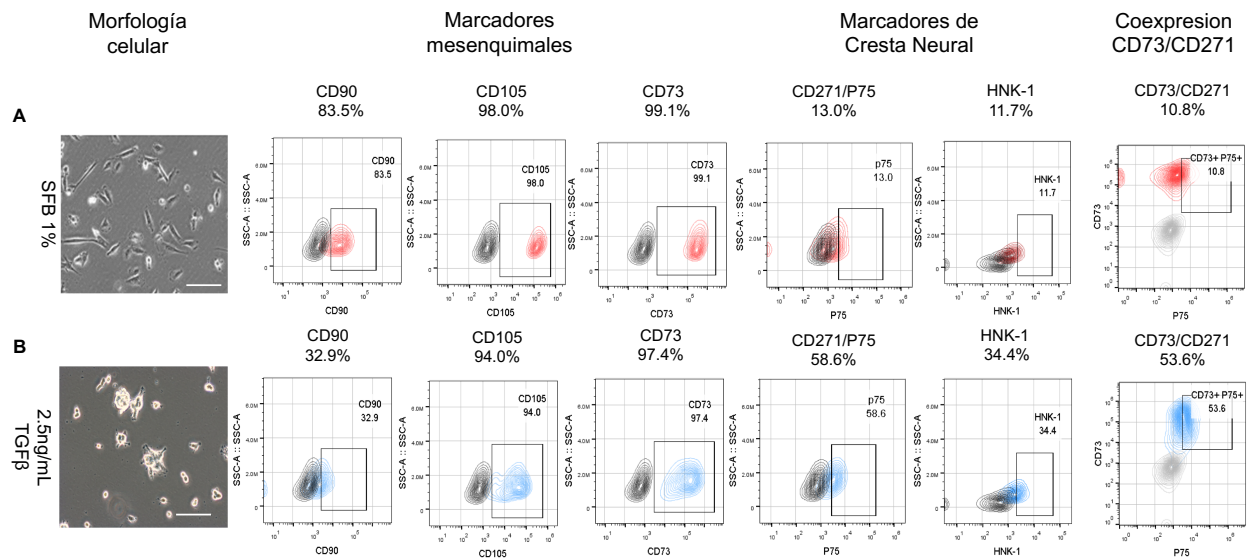
Mediante citometría de flujo se analizaron las fases en las que se encontraba el ciclo celular durante las etapas de diferenciación neuronal: proliferación, compromiso y diferenciación (Fig15). Después del proceso de inducción neuronal a los 15 días se observó un arresto celular o una pausa en la fase G1 del ciclo celular, observado en células con morfología tipo neuronal (Fig13). De acuerdo a nuestros datos, se podría sugerir un evento similar en la diferenciación de células progenitoras neurales en comparación con el proceso de diferenciación neuronal de las células mesenquimales de pulpa dental. El arresto o estadio prolongado en G1 y la presencia del marcador  $\beta$ 3-Tubulina/TUJ1 (Fig14), podría ser indicativo de un proceso de diferenciación terminal. Otros análisis son necesarios para determinar si es posible una reversión y si son capaces de re-entrar al ciclo celular, en estas poblaciones celulares.

### **7.7 Las células mesenquimales de pulpa dental y de tejido periodontal expresan un mayor porcentaje de marcadores de cresta neural cuando son aisladas y cultivadas con 2.5ng/ml de TGF $\beta$ en comparación con 1% de SFB.**

A partir de los datos descritos, se planteó analizar si el aumento en el porcentaje de células positivas a marcadores de cresta neural observado con concentraciones menores de SFB podría ser similar en células cultivadas en ausencia de suero fetal bovino, lo que nos permitiera elucidar que ligando es el responsable de estas variaciones entre ambos marcadores de cresta neural (CD271/P75 y HNK-1), y a la par, nos permitiera obtener un mayor porcentaje de eficiencia de diferenciación neuronal.

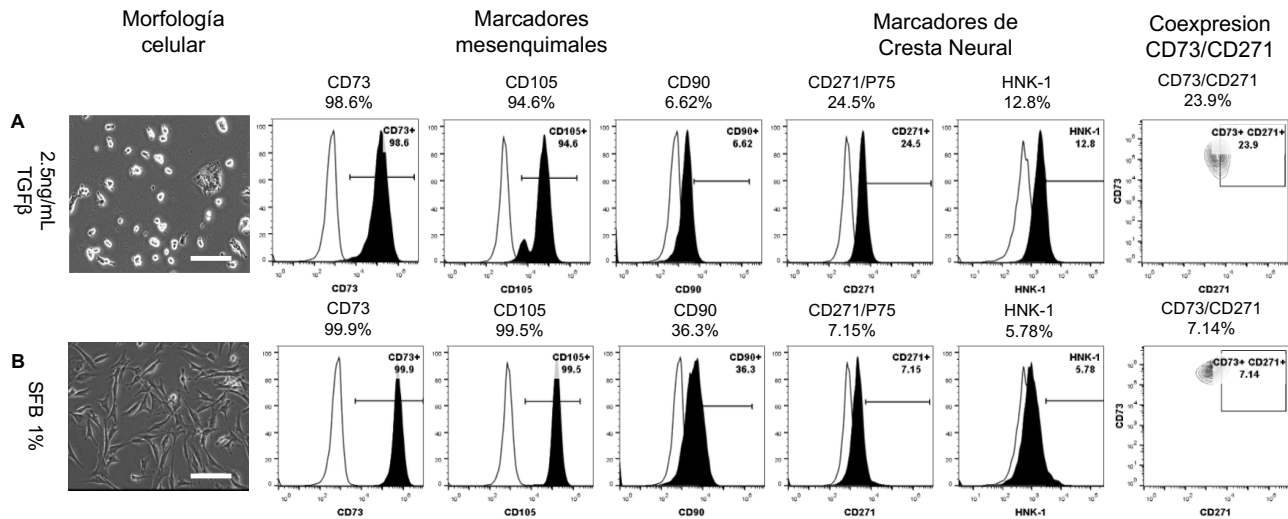
Para esto se optó por diseñar un método de aislamiento en condiciones libres de SFB mediante el uso de factores definidos, los cuales incluyeron de manera principal los factores de crecimiento bFGF, EGF y TGF $\beta$ . Las células se aislaron de la pulpa dental o del tejido periodontal en suspensión con los factores de crecimiento y posteriormente a los 5 días se trasladaron a placas de cultivo tratadas con fibronectina.

Las DPSC (Fig16) y las PDLSC (Fig17) se cultivaron bajo dos condiciones distintas de manera paralela, por un lado, con 1% de SFB, y por el otro, en presencia del ligando TGF $\beta$ , posteriormente a los 5 días de cultivo se resuspendieron y se analizaron mediante citometría de flujo los marcadores mesenquimales CD90, CD105, CD73 y los marcadores de cresta neural CD271/P75 y HNK-1.



**Figura 16. La coexpresión de los marcadores CD73<sup>+</sup>/CD271<sup>+</sup> en las células mesenquimales de pulpa dental es mayor en las células cultivadas con 2.5ng/mL de TGFβ.**

Morfología celular y expresión de marcadores mesenquimales y marcadores de cresta neural mediante citometría de flujo en células aisladas de pulpa dental a 1% de SFB(A) y a 2.5ng/mL de TGFβ (B). En ausencia de suero fetal bovino las células cultivadas con 2.5ng/ml de TGFβ muestra morfología tipo epitelial y menor porcentaje de expresión proteica de los marcadores mesenquimales, contrariamente a lo que se muestra en las células cultivadas a 1% de SFB. En cuanto a la coexpresión del marcador mesenquimal CD73 y el marcador de cresta neural CD271/P75, en las células cultivadas con 1% de SFB(A) existe una menor coexpresión (10.8% CD73/CD271) en comparación al medio donde se utiliza 2.5ng/ml de TGFβ (53.6% CD73/CD271) . Escala=50um.



**Figura 17. La coexpresión de los marcadores CD73<sup>+</sup>/CD271<sup>+</sup> en las células mesenquimales de ligamento periodontal es mayor en las células cultivadas con 2.5mL de TGFβ.**

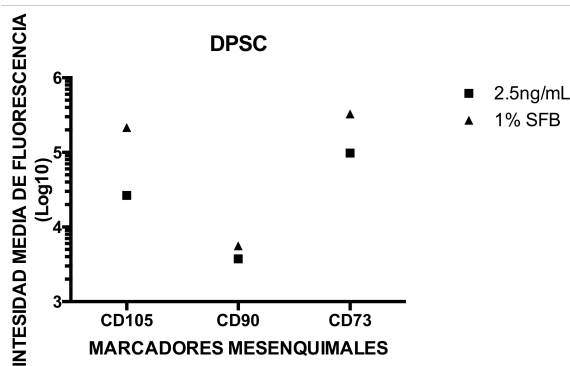
Morfología celular y expresión de marcadores mesenquimales y marcadores de cresta neural mediante citometría de flujo en células aisladas de pulpa dental a 1% de SFB(B) y a 2.5ng/mL de TGFβ (A). En ausencia de suero fetal bovino las células cultivadas a 2.5ng/ml de TGFβ muestra morfología tipo epitelial y menor porcentaje de expresión proteica de los marcadores mesenquimales contrariamente a lo que se muestra en las células cultivadas a 1% de SFB. En cuanto a la coexpresión del marcador mesenquimal CD73 y el marcador de cresta neural CD271/P75, en las células cultivadas con 1% de SFB (B) existe una menor coexpresión (7.14% CD73/CD271) en comparación al medio donde se utiliza 2.5ng/ml de TGFβ (23.9% CD73/CD271) Escala=50um.

Ambos cultivos celulares de pulpa dental y tejido periodontal, mostraron similitudes en cuanto a la expresión de marcadores de membrana inherentes de la cresta neural en las células tratadas con el ligando TGFβ. Las células mesenquimales que no fueron cultivadas en SFB y se cultivaron con TGFβ fueron positivas al marcador de membrana CD271/P75 en un 58.6% para las DPSC y un 24.5% para las PDLSC (Fig16B, Fig17B), así como un 11.7% y 18.8% del marcador de cresta neural HNK-1/CD57 (Fig16A, y Fig17A) respectivamente.

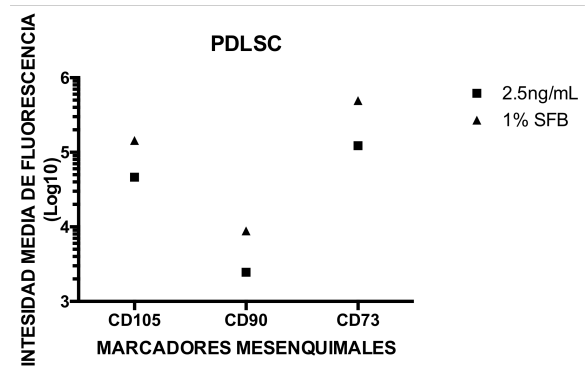
El análisis por citometría de flujo de las dos condiciones diferentes de cultivo con TGFβ o con SFB, permitió identificar y cuantificar el nivel proteico de los marcadores mesenquimales: CD90, CD105 y CD73. Las células cultivadas al 1% de SFB tuvieron una mayor intensidad media de fluorescencia de los marcadores mesenquimales (bright) en comparación con las células cultivadas con el ligando TGFβ (dim) (Grafica 2) a pesar del porcentaje de expresión similar de los marcadores mesenquimales (Fig15, Fig16).



A



B



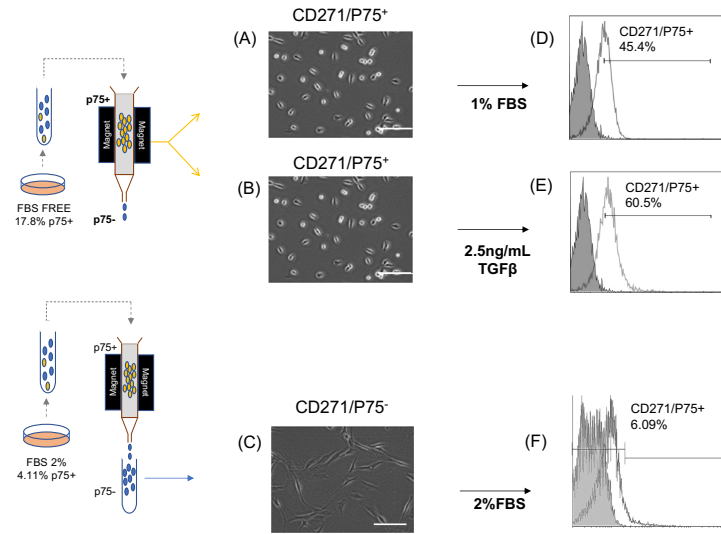
**Gráfica 2. Las DPSC y PDLSC expresan menor intensidad media de fluorescencia de los marcadores mesenquimales CD105, CD90 y CD73 al ser cultivadas con 2.5ng/mL TGF $\beta$ .**

Diferencia en la intensidad media de fluorescencia de los marcadores mesenquimales: CD105, CD90 y CD73, entre los grupos de células mesenquimales cultivadas con 2.5ng/mL y las cultivadas con 1% de SFB de las DPSC (A) y las PDLSC (B). Cabe señalar que el porcentaje de los marcadores CD105 y CD73 en ambas poblaciones celulares es arriba del 90% en el porcentaje de expresión. Comparación con base en los resultados de la Fig16 y Fig17.

Estos resultados son similares a otros estudios donde se cultivan células mesenquimales y se describe el porcentaje de células que expresan los marcadores mesenquimales (mayor a 95%); a pesar de las similitudes, nuestros resultados mostraron que existe una variación en la intensidad media de fluorescencia (Gráfica 2) en ambas condiciones de cultivo y hace suponer que la expresión de los marcadores mesenquimales y de los marcadores de cresta neural se reprimen e inducen, respectivamente, por la mínima presencia de SFB (1%), y como responsable principal el ligando TGF $\beta$  (Fig16, Fig17).

### 7.8 La expresión del marcador CD271/P75<sup>+</sup> se regula negativamente mediante TGF $\beta$ y/o SFB.

Posteriormente, para estudiar la regulación del marcador de cresta neural CD271/P75 en respuesta a la presencia de suero fetal bovino, específicamente de TGF $\beta$ , se estudió el efecto que este generaba en una población CD271/P75<sup>+</sup> y que nos permitiera conocer a qué nivel es dependiente de la concentración de SFB o TGF $\beta$ , por lo cual se separaron mediante dos técnicas de enriquecimiento celular: Magnetic-activated cell sorting (MACS), la cual se usó para las DPSC (Fig18), y Fluorescence-activated cell sorting (FACS) para las PDLSC (Fig19), ambas con el uso del anticuerpo monoclonal anti-CD271/P75.



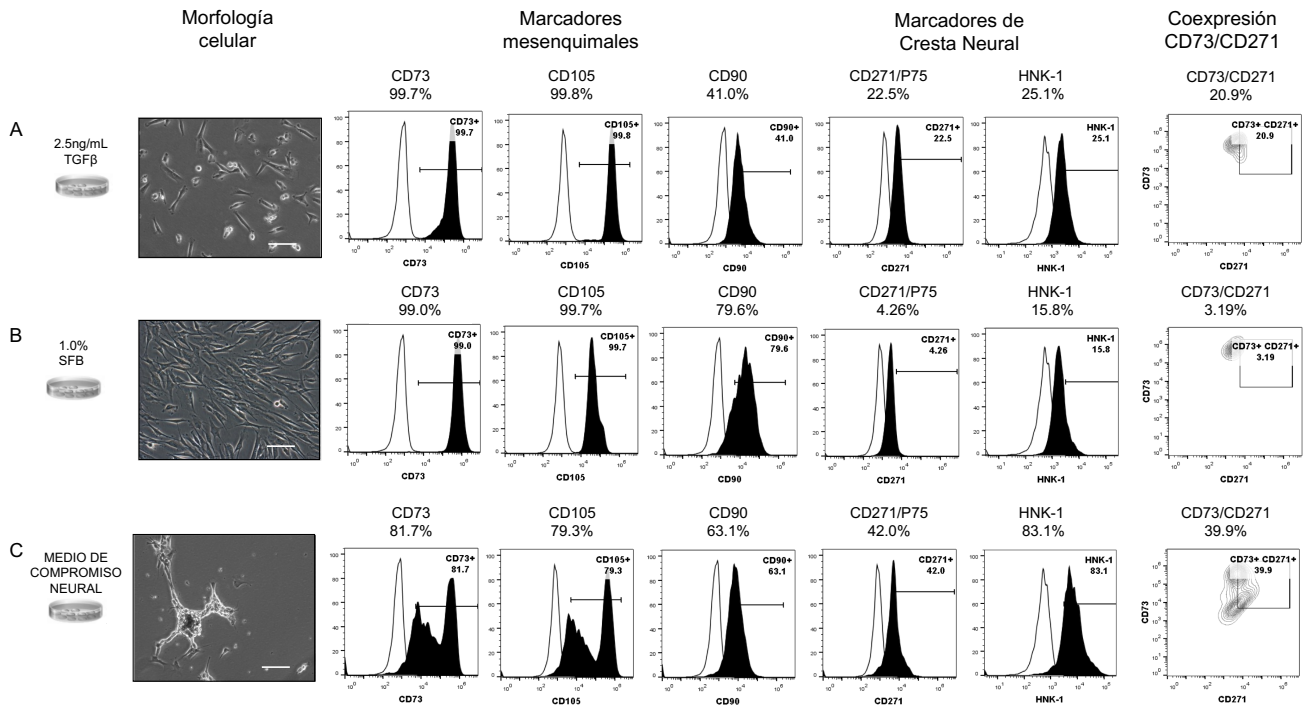
**Figura 18. El TGFβ y el SFB regulan de manera negativa la expresión del marcador de cresta neural CD271/P75 en células mesenquimales de pulpa dental CD271/P75<sup>+</sup> enriquecidas mediante columna magnética (MACS).**

Las células mesenquimales de pulpa dental se aislaron y enriquecieron mediante columna magnética usando el anticuerpo anti-CD271/P75. La población enriquecida con el marcador de cresta neural CD271/P75<sup>+</sup> se cultivó por cinco días en dos condiciones de cultivo distintas, una con SFB al 1% (A) y otra con 2.5ng/mL de TGFβ (B). Posteriormente se evaluó el cambio en la expresión del marcador CD271/P75<sup>+</sup> (D y E) en cada condición. De manera similar se empleó una población CD271/P75<sup>-</sup>, y se cultivó con 2% de SFB, para evaluar si existen cambios en la expresión del marcador CD271/P75. Imagen representativa n=4 Escala=50um.

En la primera parte experimental, las DPSC se aislaron con medio libre de suero fetal bovino denominado FBS-FREE y se enriquecieron mediante MACS, previo a este enriquecimiento las células fueron analizadas por citometría de flujo para conocer el porcentaje inicial de células positivas a CD271/P75. La población enriquecida se distribuyó en dos placas de cultivo con dos condiciones distintas, una con SFB al 1% (Fig18A) y otra con 2.5ng/mL de TGFβ (Fig18B). Después de cinco días de cultivo se volvieron a analizar mediante citometría de flujo para conocer los cambios generados en la expresión del marcador de cresta neural, en la condición con SFB al 1% el porcentaje de CD271 disminuyó un 55% (Fig18D) aproximadamente, mientras que en la condición en presencia de TGFβ, el porcentaje disminuyó un 39.5% (Fig18E).

En la segunda parte experimental, se aislaron células mesenquimales al 2% de SFB y se separó la fracción CD271/P75<sup>-</sup> y se cultivó en la misma condición de cultivo inicial de 2% SFB, a los cinco días se analizaron mediante citometría de flujo (Fig18C).

De manera interesante, la fracción negativa al marcador CD271/P75 que fue enriquecida, aumento un 6% del marcador CD271/p75 (Fig18F), lo cual pudo ser una regulación de manera paracrina entre las heterogeneidad poblacional.



**Figura 19. La inhibición farmacología del receptor de TGFβ (ALK5) y BMP (ALK2/3) disminuye la regulación negativa del marcador de cresta neural CD271/P75 por efecto del ligando de TGFβ y SFB en las células mesenquimales de ligamento periodontal CD271/P75<sup>+</sup> enriquecidas por citometría de flujo (FACS).**

Las células mesenquimales de ligamento periodontal se aislaron y enriquecieron mediante citometría de flujo usando el anticuerpo anti-CD271/P75, la población enriquecida con el marcador de cresta neural CD271/P75<sup>+</sup>, se cultivó por cinco días en tres condiciones de cultivo distintas: con 2.5ng/mL de TGFβ (A), con 1% de SFB (B) y una tercera condición usando inhibidores farmacológicos de la vía de TGFβ como SB431542 (ALK5) y LDN-193189 (C) posteriormente se evaluó el cambio en la expresión de los marcadores mesenquimales (CD73, CD105, CD90), los marcadores de cresta neural CD271/P75 y HNK-1 y la coexpresión CD73/CD271<sup>+</sup> en cada condición.

El experimento que se planteó para las PDLSC (Fig19) fue similar al utilizado con las DPSC. Las células se aislaron con medio libre de suero fetal bovino y la población CD271/p75 se enriqueció mediante FACS. La población enriquecida se distribuyó en dos placas de cultivo a dos condiciones distintas, una con SFB al 1% y otra con 2.5ng/mL de TGFβ. Después de 5 días de cultivo se analizaron mediante citometría de flujo los marcadores mesenquimales CD90, CD105, CD73 y los marcadores de cresta neural CD271/p75 Y HNK-1. El análisis mediante citometría mostró una tendencia similar en cuanto al cambio de expresión de porcentajes del marcador CD271/P75 entre las poblaciones tratadas con 1% de SFB y 2.5ng/mL de TGFβ. Como ya se había observado en la población de las células dentales (Fig18), solo 1% de SFB fue suficiente para disminuir drásticamente la expresión del marcador CD271/P75.

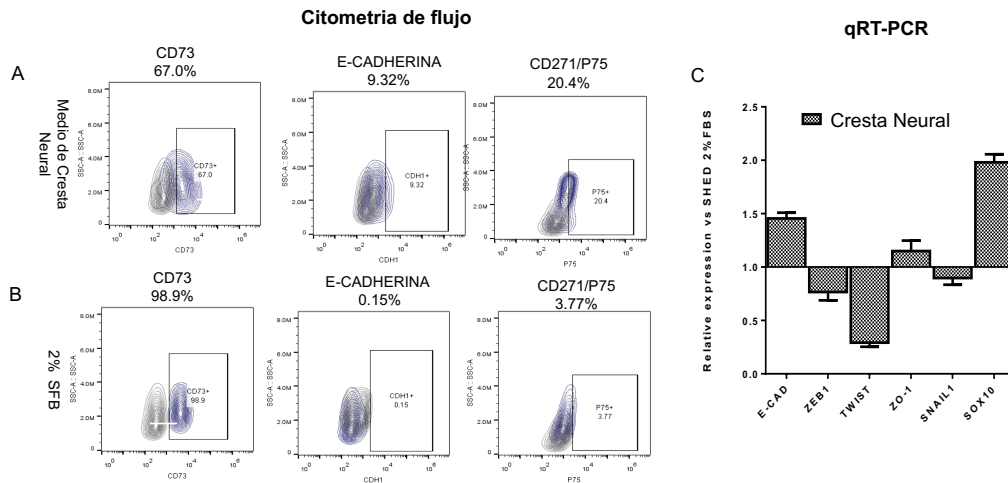
Otra condición utilizada en la población enriquecida CD271/P75<sup>+</sup> además del SFB de TGF $\beta$ , fue el “medio de compromiso neural”, que cuenta con inhibidores farmacológicos de la vía de TGF $\beta$  y los mitógenos bFGF y EGF. Los datos obtenidos por citometría de flujo mostraron una disminución de los marcadores mesenquimales y un aumento de los marcadores de cresta neural, significativamente superiores a los observados en ausencia de SFB o con TGF $\beta$  (Fig19C).

Estos resultados se asocian directamente a la participación de TGF $\beta$  en la disminución de los marcadores de cresta neural, demostrando que la mínima presencia SFB suele ser responsable de la generación de poblaciones con un alto compromiso mesenquimal y pérdida del potencial neural, y que el aislamiento de estas células de tejido oral, mediante las técnicas de aislamiento típicas usadas para expansión de las células mesenquimales aisladas de diferentes tejidos que corresponde a altas concentraciones de suero fetal bovino (10-20%), no equivale a lo presente en el nicho antes del aislamiento y no corresponde al potencial inicial de las células troncales obtenidas del tejido oral.

Los resultados anteriores nos llevaron a pensar que el proceso de transición epitelio mesénquima mediado por TGF $\beta$  [85] tiene un papel crucial en la migración de las células de la cresta neural hacia el tejido oral y tiene un papel inhibitorio fundamental en la expresión de los genes CD271/P75 Y HNK-1 en las DPSC y PDLSC, lo que propicia un aumento del compromiso hacia linajes mesenquimales mediante el aumento en la expresión de los marcadores de membrana CD105, CD73, CD90 y la inhibición en el potencial de diferenciación neuronal. Esto es similar a lo reportado por Curchoe et al [82], en donde se aisló mediante FACS una población del marcador mesenquimal CD73<sup>+</sup> y analizaron la eficiencia de diferenciación neuronal mediante la presencia del marcador neural MAP2, y descubrieron que era 10 veces menor que en células CD73<sup>-</sup>, indicando de manera indirecta una ventaja selectiva hacia linajes mesenquimales.

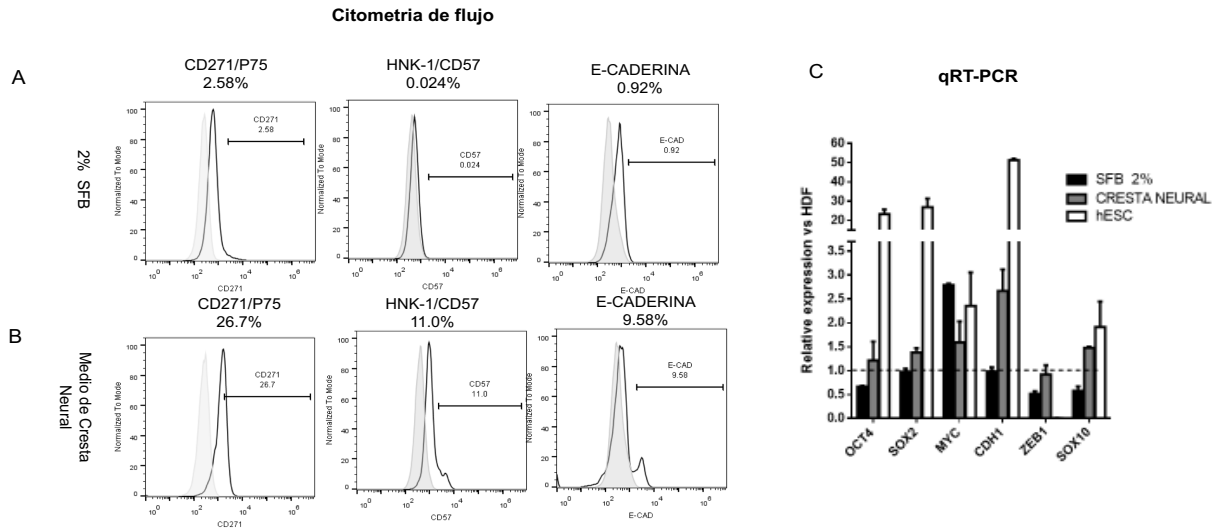
## **7.9 Reversión de la transición de las células troncales de tejido bucal con el uso de WNT/ $\beta$ -Catenina e inhibición de TGF $\beta$ .**

Una de las incógnitas por resolver, era conocer si la regulación del marcador CD271/P75 de cresta neural y los marcadores de transición epitelio-mesénquima (CDH1, ZEB, TWIST, ZO-1, SNAIL) era reversible mediante estímulos exógenos con moléculas que permitieran la activación de la vía WNT y la translocación al núcleo de su corregulador  $\beta$ -Catenina, y el bloqueo de la vía de TGF $\beta$  a través de la inhibición del receptor tipo 1, contexto celular que se conoce en la regulación y mantenimiento de la cresta neural mediante el gen del circuito regulatorio de la cresta neural SOX10. Para comprobarlo, se realizaron dos experimentos en células mesenquimales de pulpa dental y células mesenquimales de tejido periodontal; por una parte, se mantuvo en condiciones con suero fetal bovino 2% SFB en la cual había mostrado una expresión de 3.77% para las DPSC y 11% para las PDLSC del marcador de cresta neural CD271/P75 mediante citometría de flujo, y por otro lado en condiciones similares a la expansión de cresta neural.



**Figura 20. La inhibición de la vía de TGF $\beta$  y la activación de la vía WNT/ $\beta$ -Catenina aumenta la expresión del marcador de cresta neural CD271/P75 y del marcador epitelial E-cadherina en las células mesenquimales de pulpa dental.**

La gráfica representa los cambios en la expresión de los marcadores CD73, E-cadherina y CD271/P75 los cuales aumenta en condiciones de cresta neural para el marcador epitelial (E-cadherina) y para el marcador de cresta neural (CD271/P75) y disminuye en el marcador mesenquimal (CD73) (A) en comparación con el cultivo con 2% de SFB (B). El análisis por qRT-PCR muestra el cambio en la expresión relativa de los genes *E-CAD*, *ZEB1*, *TWIST*, *ZO-1*, *SNAIL1* y *SOX10* (C) en las condiciones descritas y se muestra una disminución en la expresión relativa de los genes involucrados con la transición epitelio-mesenquima como *ZEB1*, *TWIST* y *SNAIL1* por efecto de las condiciones de cresta neural. Imagen representativa n=3.



**Figura 21.** La inhibición de la vía de TGF $\beta$  y la activación de la vía WNT/ $\beta$ -Catenina aumenta la expresión de los marcadores de cresta neural CD271/P75, HNK-1/CD57 y del marcador epitelial E-cadherina en las células mesenquimales de ligamento periodontal.

La gráfica representa la expresión de los marcadores de cresta neural CD271/P75, HNK-1 y E-cadherina en dos condiciones distintas de cultivo, en condiciones de cresta neural que contiene los inhibidores farmacológicos SB431542/BIO para inhibir la vía de TGF- $\beta$  y activar la vía de WNT/ $\beta$ -Catenina, respectivamente (B) y en el medio de expansión que comprende 2% de SFB (A) en las células mesenquimales aisladas de ligamento periodontal. El análisis del cambio en la expresión relativa por qRT-PCR de los genes *OCT4*, *SOX2*, *MYC*, *E-cadherina/CDH1*, *ZEB1* y *SOX10* (C) en las condiciones descritas. Imagen representativa n=3.

Se trataron a las células mesenquimales de pulpa dental (Fig20) y a las células mesenquimales de ligamento periodontal (Fig21) aisladas y cultivadas con 2% de SFB con un medio de cultivo denominado “Cresta Neural”, que tiene el inhibidor farmacológico del receptor TGF- $\beta$  (ALK5) RepSox para evitar la fosforilación de las proteínas SMAD2/3 y, junto con un inhibidor de la cinasa GSK3 $\beta$  (BIO) evitar la fosforilación y posterior ubiquitinación de la proteína  $\beta$ -Catenina, promoviendo su translocación y activando de manera indirecta la vía canónica de WNT/ $\beta$ -Catenina.

Se analizaron en las células mesenquimales de pulpa dental (Fig20) mediante citometría de flujo las proteínas CD73, E-cadherina y CD271/P75 y por qRT-PCR los genes *ECAD*, *ZEB1*, *TWIST*, *ZO-1*, *SNAIL* y *SOX10* después de 5 días de tratamiento con el medio de cresta neural (Fig20A) en comparación con el medio de cultivo con 2% de SFB (Fig20B). De manera similar, se analizó en las PDLSC (Fig21) mediante citometría de flujo, la expresión de las proteínas CD271/P75, HNK-1/CD57 y E-cadherina y por qRT-PCR los genes *OCT4*, *SOX2*, *MYC*, *E-cadherina/CDH1*, *ZEB1* y *SOX10* y se evaluaron los cambios de expresión en ambas condiciones de cultivo.

Los resultados en el experimento de las DPSC (Fig20) mostraron una disminución en el porcentaje del marcador mesenquimal CD73 de 98.9% para las condiciones de cultivo con 2% de SFB a 63.0% en las condiciones de cresta neural, un aumento del marcador CD271/P75 de 3.77% en las condiciones de cultivo con 2% a 20.4% en las condiciones de cresta neural, un aumento del marcador epitelial E-cadherina de 0.092% para las condiciones

de cultivo con 2% de SFB a 9.58% en las condiciones de cresta neural. El análisis de la expresión relativa por qRT-PCR mostró un aumento en el gen de cresta neural *SOX10* en comparación con el medio de cultivo con 2% de SFB (Fig20C).

En el experimento similar con las PDLSC las condiciones de cresta neural (Fig21B) mostraron por citometría de flujo un aumento en el porcentaje de células con el marcador de cresta neural (CD271/P75 Y HNK-1) y el marcador epitelial (E-cadherina), y un aumento en la expresión de los genes involucradas en la transición epitelio-mesenquima (*ZEB1* y *CDH1*) por qRT-PCR(Fig21C). Los genes del circuito de pluripotencia (*OCT4*, *SOX2*) no tuvieron cambios notorios entre ambas condiciones, por lo que posiblemente no actúen como reguladores de las células troncales de cresta neural ni de las células mesenquimales de pulpa dental (Fig21C).

Estos resultados demuestran que la pérdida de morfología epitelial y marcadores de cresta neural es mediada por el TGF $\beta$  presente en el SFB, y puede ser reversible a cierto nivel mediante la inhibición de la ruta de TGF $\beta$  y la activación de la ruta canónica de WNT/ $\beta$ -Catenina. Probablemente, se genere mediante selección de una cierta fracción existente entre la heterogeneidad de la población, y este cambio de morfología se encuentra mediado por factores de transcripción involucrados en la transición epitelio-mesenquima como *SNAIL* y *TWIST* lo que favorece un compromiso y potencial mesenquimal.

## 8. DISCUSION

### 8.1 Las DPSC y las PDLSC expresan marcadores de membrana de células mesenquimales y células de cresta neural los cuales varían en porcentaje de acuerdo a la concentración de SFB.

Las DPSC y las PDLSC fueron descritas por Gronthos y colaboradores en el año 2000 y 2002 respectivamente. En ese trabajo las células fueron aisladas y cultivadas en presencia de altas concentraciones de SFB (20%) y se catalogaron como células mesenquimales en concordancia al criterio mínimo para definir a las MSC: células adherentes, presencia de marcadores específicos de membrana como CD90, CD105, CD73 y ausencia de marcadores hematopoyéticos y endoteliales como CD34 Y CD45.

En este trabajo se aislaron ambos tipos celulares del tejido oral bajo condiciones distintas a las que se utilizan de manera estándar, que comprende el uso de medio de cultivo al 2% de SFB. Nuestros resultados mostraron que existe una población heterogénea morfológicamente, células fibroblastoides y células refringentes de apariencia epitelial, estas últimas con tendencia a desaparecer en pasajes posteriores. Estas células aisladas de tejido oral presentan los marcadores mesenquimales para definir a las células mesenquimales, expresan genes relacionados con células migratorias de la cresta neural como *SOX10*, *SOX9*, *SNAIL1*, *SNAIL2*, *TWIST* (Fig8) y marcadores de membrana de células troncales de cresta neural como CD271/P75 y HNK-1. A pesar de que estos marcadores podrían ayudar para catalogarlas como células troncales derivadas de la cresta neural, los porcentajes de estos marcadores presenta un rango entre el 1.0 y 2.5% (Tabla 1), datos similares a lo reportados en las condiciones de aislamiento y cultivo utilizadas por Gronthos y cols. en el 2000 y 2002, y de igual manera a lo reportado en trabajos posteriormente descritos en las que la población celular CD271/P75<sup>+</sup> es del 1.0% [86].

Nuestra hipótesis plantea que el uso de SFB, específicamente el ligando TGFβ, es responsable del compromiso mesenquimal y actúa como uno de los principales causantes del bajo porcentaje de los marcadores de membrana asociados a cresta neural como CD271/P75, por lo que el uso de SFB actúa como un regulador negativo del marcador CD271/P75. Corroboramos la hipótesis al aislar las células del tejido oral a una concentración de SFB al 2%. Este cambio en las condiciones de cultivo generó un porcentaje mayor de células con que expresaban el marcador de cresta neural CD271/P75 y la presencia de pocas células con morfología tipo epitelial observadas en diversos campos en el microscopio (Fig7) (Tabla 1).

Este rango de expresión de 2.5% a 25% del marcador CD271/P75 que observamos con el aislamiento y cultivo con 2% de SFB es mayor a el rango observado con el aislamiento y cultivo con 10% de SFB (Tabla1) y sugiere que el ligando TGFβ presente en el suero fetal bovino es responsable del inmunofenotipo de las células mesenquimales y las condiciones actuales de cultivo que sirven para aislar y mantener células mesenquimales, son una forma de manipulación *in vitro* que fomenta que se pierdan progresivamente los marcadores de las células troncales de cresta neural, adquiriendo prioritariamente un compromiso y potencial mesenquimal.



Esto es similar a lo observado en células de cresta neural derivadas de células troncales pluripotentes al ser expuestas a SFB [64];[80], protocolo establecido para obtener células mesenquimales CD73<sup>+</sup> a partir de las células troncales de cresta neural CD271/P75<sup>+</sup> derivadas de células embrionarias humanas.

## 8.2. La expresión de los genes neurales SOX2 y MASH1 están involucrados en el compromiso y diferenciación neuronal de las células mesenquimales de pulpa dental.

Aunque el rango de expresión del marcador CD271/P75 era amplio en las células aisladas al 2% de SFB, y ambos tipos celulares analizados en este estudio presentaron otros marcadores de membrana relacionados con las células progenitoras neurales como: NESTIN, GFAP, DCX, MAP2, PSA-NCAM (Fig9), nos enfocamos en analizar los factores de transcripción SOX2 y MASH1 involucrados en la diferenciación de células troncales de cresta neural hacia células tipo neuronales [78];[79] algo no descrito anteriormente en células aisladas de pulpa dental. Bajo condiciones específicas de cultivo que correspondían a la inhibición de la vía de señalización de TGFβ mediante inhibidores farmacológicos de los receptores de TGFβ-ALK5 (SB-431542) y de BMP-ALK2/3 (LDN-193139) indujeron la expresión del gen neural SOX2 y su gen corriente abajo *MASH1*, dando inicio al proceso de diferenciación de células tipo neural, e induciendo en fases avanzadas de diferenciación la expresión del marcador neuronal β3-Tubulina/TUJ1, así como una morfología bipolar.

## 8.3 La ausencia de TGFβ *in vitro* evita la pérdida del marcador CD271/P75 y disminuye la expresión de los marcadores mesenquimales CD73, CD105, CD90.

Para evaluar si precisamente el ligando TGFβ (citocina presente en el SFB) induce una regulación del marcador CD271/P75 en las células aisladas de tejido oral, se optó por aislar las células en suspensión en ausencia de SFB y en presencia de los factores de crecimiento bFGF y EGF, para cultivarlas en dos condiciones de cultivo, una condición con 1% de SFB y otra condición con 2.5ng/mL del ligando TGFβ (Fig16, Fig17). Los porcentajes obtenidos posterior a los cinco días de cultivo en ambos grupos celulares mostraron que las células que tenían solamente el ligando TGFβ habían mantenido una expresión mayor del marcador CD271/P75 (58% para las DPSC y 24% para las PDLSC), en contraparte a la condición de cultivo de 1% de SFB donde se encontró un 13% para las DPSC y 11% para las PDLSC del marcador CD271/P75 (Fig16). Se observó algo similar en el análisis de coexpresión de los marcadores CD271 y CD73, en el que existía una disminución en el porcentaje de la población CD73<sup>+</sup>/CD271<sup>+</sup> y la prevalencia del marcador mesenquimal CD73<sup>+</sup>/CD271<sup>-</sup>, sugiriendo que la transición de un estado con potencial neural CD271<sup>+</sup> a un estado con potencial mesenquimal CD271<sup>-</sup> en las células troncales de cresta neural aisladas de tejido oral se regula mediante el SFB o TGFβ, y da lugar a una población transitoria CD271<sup>+</sup>/CD73<sup>+</sup> y posteriormente a la población mesenquimal CD271<sup>-</sup>/CD73<sup>+</sup>.

El análisis por citometría de flujo de las diferentes condiciones: con el ligando TGF $\beta$  o con SFB (1%), permitió identificar el porcentaje y la intensidad media de fluorescencia de los marcadores mesenquimales: CD90, CD105 y CD73. Por un lado el porcentaje de la población de marcador CD271/P75 es mayor en las células cultivadas con 2.5ng/mL del ligando TGF $\beta$  en comparación a las células cultivadas con 1% de SFB, pero por otro lado, las células cultivadas con 1% tuvieron un mayor nivel de intensidad media de fluorescencia de los marcadores mesenquimales lo que evalúa de manera relativa una mayor expresión proteica (bright) en comparación con las células cultivadas con 2.5ng/mL de TGF $\beta$  (dim) (Grafica2).

Para reforzar el papel de TGF $\beta$ , se reevaluó la expresión de CD271/P75 mediante citometría de flujo en células aisladas en ausencia SFB, y enriquecidas con el uso del marcador de cresta neural CD271/P75. Se encontró la misma tendencia de pérdida del marcador CD271/P75 en condiciones que se encontraba presente la vía de señalización de TGF $\beta$  mediante el uso de SFB o del ligando TGF $\beta$  (Fig18,19). Uno de los resultados obtenidos muestra que una población CD271<sup>-</sup> obtenida mediante columna aumentó hasta un 6% del marcador CD271<sup>+</sup> a los cinco días de cultivo con 2% de SFB, los que nos hizo cuestionar si estas células expresan ligandos, que actúan de forma paracrina, relacionados con el mantenimiento de una población progenitora encargada de mantener una pequeña proporción de células CD271<sup>+</sup> que regulen y mantengan a estas poblaciones heterogéneas *in vivo* (Fig18F).

#### **8.4. Las células aisladas sin SFB e inhibiendo la ruta de TGF $\beta$ mantiene altos porcentajes de marcadores de cresta neural y bajos marcadores mesenquimales.**

Similar a lo descrito, en cuanto a la presencia de ligandos endógenos en estas poblaciones heterogéneas que permitieran regular de manera positiva o negativa los marcadores de membrana de acuerdo a las condiciones específicas de cultivo, se trataron células de ligamento periodontal enriquecidas mediante FACS, en condiciones de cultivos pro neurales con la presencia de inhibidores farmacológicos de TGF $\beta$  y BMP's. Esto propició una pérdida significativa del porcentaje de los marcadores mesenquimales, aproximadamente de un 10%, y ganancia de los marcadores de cresta neural CD271/P75 Y CD57/HNK-1, en comparación con las células tratadas con el ligando TGF $\beta$  y el SFB en esta población celular. Esto sugiere que una expresión endógeno de WNT actúa de forma paracrina en algunas células y que en las condiciones adecuadas, la inhibición de la vía de TGF $\beta$  y la activación de la ruta canónica WNT/ $\beta$ -Catenina podrían aumentar el porcentaje de células de cresta neural CD271/P75, aumentando el potencial neural e inhibir el potencial mesenquimal.

#### **8.5 Las células aisladas a bajas concentraciones de SFB pueden sufrir fenómenos de reversión o de adaptación mediante la inhibición de la ruta de TGF $\beta$ y la activación de la ruta canónica de WNT/ $\beta$ -Catenina.**

Diversos estudios han demostrado que para el mantenimiento *in vitro* de las células troncales de la cresta neural es necesaria la activación de la vía canónica de WNT/ $\beta$ -Catenina y la inhibición de la ruta canónica de TGF $\beta$  [66]. El hecho de que las células de tejido oral obtenidas a una concentración de 10% de SFB hayan mostrado un bajo porcentaje de marcadores de cresta neural puede deberse a que el SFB posee un porcentaje alto de ligandos que activan la vía de señalización de TGF $\beta$  [71], induciendo un compromiso hacia linajes mesenquimales y la subsecuente pérdida de marcadores de la cresta neural, algo ya observado en células de cresta neural derivadas de células troncales embrionarias, lo que adicionalmente propicia en éstas, la pérdida o disminución del potencial de diferenciación neural [82], característica que puede revertirse de manera parcial mediante ciertas condiciones de cultivo específicos, o evitar la pérdida de las características de cresta neural mediante el aislamiento en suspensión en ausencia de suero fetal bovino y/o del ligando TGF $\beta$ .

## 9.CONCLUSION.

Este estudio demuestra la relación directa entre la pérdida de marcadores de cresta neural en las células aisladas de tejido oral mediada por la vía de señalización de TGF $\beta$  específicamente por el ligando TGF $\beta$  presente en el SFB, el cual participa como regulador negativo del marcador de cresta neural CD271/P75, esto podría ocasionar la disminución del potencial neural de las células DPSC y PDLSC, similar a lo observado en las células troncales de cresta neural derivadas de hESC.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, se puede concluir que las células mesenquimales de tejido oral (DPSC y PDLSC) pierden paulatinamente sus características intrínsecas de cresta neural al ser expuestas a diferentes concentraciones de suero fetal bovino, propiedades que pueden ser revertidas parcialmente con el uso de inhibidores farmacológicos de la vía de TGF $\beta$  o enriquecidas de una pequeña población existente mediante las condiciones de cultivo que necesitan las células troncales de cresta neural para mantener la autorrenovación y potencial de diferenciación neural, como es la inhibición del receptor de TGF $\beta$ -ALK5 y la activación de la ruta canónica de WNT/ $\beta$ -Catenina.

Las conclusiones son:

- 1) El porcentaje de las poblaciones CD271/P75<sup>+</sup> y HNK-1<sup>+</sup> en las células mesenquimales de tejido oral se regulan de manera negativa en presencia del ligando TGF $\beta$ .
- 2) La expresión de genes neurales *SOX2* y *MASH1* se inducen mediante la inhibición farmacológica de la vía de TGF $\beta$ , específicamente de los receptores de BMP.
- 3) La eficiencia de diferenciación neural de las células mesenquimales aisladas de tejido oral probablemente dependan del porcentaje de la población CD271<sup>+</sup>, la cual se pierde al ser expuesta a suero fetal bovino.
- 4) Las células mesenquimales de pulpa dental y tejido periodontal CD73<sup>+</sup> se derivan de un progenitor de cresta neural CD271/P75<sup>+</sup>.
- 5) Al ser cultivada mediante las condiciones que promueven la autorrenovación de las células de cresta neural, las células mesenquimales aumentan la expresión del marcador de cresta neural CD271/P75, aumenta la expresión del marcador epitelial E-cadherina y disminuye expresión del marcador CD73.
- 6) La relación entre el marcador CD271<sup>+</sup>, la inhibición de la vía de TGF $\beta$ , la activación de la vía WNT/ $\beta$ -Catenina y los niveles de E-cadherina podrían estar relacionados con el potencial de diferenciación de esta población migratoria de la cresta neural, y la posibilidad de una transición entre un estado mesenquimal a un estado epitelial que se mantiene posteriormente de una transición epitelio a mesénquima de manera parcial, para efectos de migración, generación de un nicho y posterior diferenciación.

## **ANEXO 1-2**

Ramírez-García L, Cevallos R, Gazarian K. **Unveiling and initial characterization of neural crest-like cells in mesenchymal populations from the human periodontal ligament.** J Periodont Res 2017; 52: 609–616.

Gazarian KG, Ramírez-García LR (2017) **Human Deciduous Teeth Stem Cells (SHED) Display Neural Crest Signature Characters.** PLoS ONE 12(1): e0170321

## REFERENCIAS.

- [1] S. J. Morrison, N. M. Shah, and D. J. Anderson, "Regulatory mechanisms in stem cell biology," *Cell*, vol. 88, no. 3. pp. 287–298, 1997.
- [2] M. Ramalho-Santos, S. Yoon, Y. Matsuzaki, R. C. Mulligan, and D. A. Melton, "'Stemness': transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells.," *Science*, vol. 298, no. 5593, pp. 597–600, 2002.
- [3] N. B. Ivanova, J. T. Dimos, C. Schaniel, J. A. Hackney, K. A. Moore, and I. R. Lemischka, "A stem cell molecular signature.," *Science*, vol. 298, no. 5593, pp. 601–4, 2002.
- [4] A. J. Friedenstein, K. V Petrakova, A. I. Kurolesova, and G. P. Frolova, "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues.," *Transplantation*, vol. 6, no. 2, pp. 230–247, 1968.
- [5] S. A. Wexler, C. Donaldson, P. Denning-Kendall, C. Rice, B. Bradley, and J. M. Hows, "Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not," *Br.J.Haematol.*, vol. 121, no. 2, pp. 368–374, 2003.
- [6] D. J. Prockop, "Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues," *Science (80-. )*, vol. 276, no. 5309, pp. 71–74, 1997.
- [7] A. Caplan, "Mesenchymal stem cells.," *J. Orthop. Res.*, vol. 9, no. 5, pp. 641–50, 1991.
- [8] J. N. Beresford, J. H. Bennett, C. Devlin, P. S. Leboy, and M. E. Owen, "Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures.," *J. Cell Sci.*, vol. 102 ( Pt 2, pp. 341–51, 1992.
- [9] B. Johnstone, T. M. Hering, A. I. Caplan, V. M. Goldberg, and J. U. Yoo, "In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells.," *Exp. Cell Res.*, vol. 238, no. 1, pp. 265–72, 1998.
- [10] M. Owen and A. J. Friedenstein, "Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors.," *Ciba Found. Symp.*, vol. 136, pp. 42–60, 1988.
- [11] E. M. Horwitz *et al.*, "Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement.," *Cytotherapy*, vol. 7, no. 5, pp. 393–5, 2005.
- [12] M. Dominici *et al.*, "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.," *Cytotherapy*, vol. 8, no. 4, pp. 315–7, 2006.
- [13] A. I. Caplan and S. P. Bruder, "Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century.," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 7, no. 6. pp. 259–264, 2001.
- [14] L. da Silva Meirelles, P. C. Chagastelles, and N. B. Nardi, "Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues.," *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. Pt 11, pp. 2204–13, 2006.
- [15] M. Krampera, G. Pizzolo, G. Aprili, and M. Franchini, "Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair," *Bone*, vol. 39, no. 4. pp. 678–683, 2006.
- [16] J. E. Dennis, A. Merriam, A. Awadallah, J. U. Yoo, B. Johnstone, and A. I. Caplan, "A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 14, no. 5, pp. 700–9, 1999.

- [17] M. F. Pittenger, "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells," *Science (80-. )*, vol. 284, no. 5411, pp. 143–147, 1999.
- [18] D. T. Covas, J. L. C. Siufi, a R. L. Silva, and M. D. Orellana, "Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells.," *Braz. J. Med. Biol. Res.*, vol. 36, no. 9, pp. 1179–83, 2003.
- [19] S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahim, P. G. Robey, and S. Shi, "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 25, pp. 13625–30, 2000.
- [20] S. Gronthos *et al.*, "Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells," *J. Dent. Res.*, vol. 81, no. 8, pp. 531–535, 2002.
- [21] S. Gronthos, A. Arthur, P. M. Bartold, and S. Shi, "A method to isolate and culture expand human dental pulp stem cells.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 698, pp. 107–121, 2011.
- [22] M. Miura *et al.*, "SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 10, pp. 5807–12, 2003.
- [23] I. Kerkis and A. I. Caplan, "Stem cells in dental pulp of deciduous teeth.," *Tissue Eng. Part B. Rev.*, vol. 18, no. 2, pp. 129–38, 2012.
- [24] W. Sonoyama *et al.*, "Characterization of the Apical Papilla and Its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth: A Pilot Study," *J. Endod.*, vol. 34, no. 2, pp. 166–171, 2008.
- [25] C. Morsczeck *et al.*, "Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth," *Matrix Biol.*, vol. 24, no. 2, pp. 155–165, 2005.
- [26] B.-M. Seo *et al.*, "Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament.," *Lancet*, vol. 364, no. 9429, pp. 149–155, 2004.
- [27] S. Ivanovski, S. Gronthos, S. Shi, and P. M. Bartold, "Stem cells in the periodontal ligament," *Oral Diseases*, vol. 12, no. 4, pp. 358–363, 2006.
- [28] Y. Hu *et al.*, "Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas," *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 141, no. 5, pp. 342–349, 2003.
- [29] B. Roson-Burgo, F. Sanchez-Guijo, C. Del Cañizo, and J. De Las Rivas, "Transcriptomic portrait of human Mesenchymal Stromal/Stem Cells isolated from bone marrow and placenta.," *BMC Genomics*, vol. 15, p. 910, 2014.
- [30] A.-M. Rodriguez, C. Elabd, E.-Z. Amri, G. Ailhaud, and C. Dani, "The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.," *Biochimie*, vol. 87, no. 1, pp. 125–8, 2005.
- [31] I. V Nosrat, J. Widenfalk, L. Olson, and C. A. Nosrat, "Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury.," *Dev. Biol.*, vol. 238, no. 1, pp. 120–132, 2001.
- [32] A. Nanci, "en cate: oral histology : development, structure and function," in *Nanci A, Ten Cate A. Ten cate: oral histology : development, structure and function Missouri: Mosby; 2013*, 2013, pp. 122–164.
- [33] W. Zhu and M. Liang, "Periodontal ligament stem cells: Current status, concerns, and future prospects," *Stem Cells International*, vol. 2015, 2015.
- [34] G. T.-J. Huang, S. Gronthos, and S. Shi, "Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine.," *J. Dent. Res.*, vol. 88, no. 9, pp. 792–

806, Sep. 2009.

- [35] S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahim, P. G. Robey, and S. Shi, "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 25, pp. 13625–30, Dec. 2000.
- [36] K. Sakai *et al.*, "Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms," *J. Clin. Invest.*, vol. 122, no. 1, pp. 80–90, 2012.
- [37] A. Arthur, G. Rychkov, S. Shi, S. A. Koblar, and S. Gronthos, "Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues.," *Stem Cells*, vol. 26, no. 7, pp. 1787–1795, 2008.
- [38] C. Krabbe, J. Zimmer, and M. Meyer, "Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells--a critical review.," *APMIS*, vol. 113, no. 11–12, pp. 831–44, 2005.
- [39] D. G. Phinney and D. J. Prockop, "Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views.," *Stem Cells*, vol. 25, no. 11, pp. 2896–2902, 2007.
- [40] Y. Chai *et al.*, "Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis.," *Development*, vol. 127, no. 8, pp. 1671–1679, 2000.
- [41] E. Dupin and J. M. Coelho-Aguiar, "Isolation and differentiation properties of neural crest stem cells," *Cytometry Part A*, vol. 83 A, no. 1, pp. 38–47, 2013.
- [42] A. Baggiolini *et al.*, "Premigratory and migratory neural crest cells are multipotent in vivo," *Cell Stem Cell*, vol. 16, no. 3, pp. 314–322, 2015.
- [43] J. Rollhäuser-ter Horst, "Artificial neural induction in amphibia - I. Sandwich explants," *Anat. Embryol. (Berl)*., vol. 151, no. 3, pp. 309–316, 1977.
- [44] N. A. Campbell and J. Reece, *Biology*. 2007.
- [45] S. Creuzet, G. Couly, and N. M. Le Douarin, "Patterning the neural crest derivatives during development of the vertebrate head: insights from avian studies," *J. Anat*, vol. 207, pp. 447–459, 2005.
- [46] D. M. Noden and P. A. Trainor, "Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations.," *J. Anat.*, vol. 207, no. 5, pp. 575–601, 2005.
- [47] N. M. Le Douarin and E. Dupin, "Multipotentiality of the neural crest," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 13, no. 5, pp. 529–536, 2003.
- [48] D. M. Noden, "Interactions and fates of avian craniofacial mesenchyme," *Development*, vol. 103 Suppl, pp. 121–140, 1988.
- [49] G. F. Couly, P. M. Coltey, and N. M. Le Douarin, "The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras.," *Development*, vol. 117, no. 2, pp. 409–429, 1993.
- [50] I. Miletich and P. T. Sharpe, "Neural crest contribution to mammalian tooth formation," *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, vol. 72, no. 2, pp. 200–212, 2004.
- [51] R. Mayor, R. Morgan, and M. G. Sargent, "Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*," *Development*, vol. 121, no. 3, pp. 767–77, 1995.



- [52] M. a Selleck and M. Bronner-Fraser, "Origins of the avian neural crest: the role of neural plate-epidermal interactions.," *Development*, vol. 121, no. 2, pp. 525–538, 1995.
- [53] B. Albers, "Competence as the Main Factor Determining the Size of the Neural Plate. (neural induction/competence/neural plate/*Ambystoma mexicanum*)," *Dev. Growth Differ.*, vol. 29, no. 5, pp. 535–545, 1987.
- [54] J. D. Moury and A. G. Jacobson, "The origins of neural crest cells in the axolotl," *Dev. Biol.*, vol. 141, no. 2, pp. 243–253, 1990.
- [55] M. L. Basch, M. I. García-Castro, and M. Bronner-Fraser, "Molecular mechanisms of neural crest induction," *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, vol. 72, no. 2, pp. 109–123, 2004.
- [56] B. Steventon, C. Carmona-Fontaine, and R. Mayor, "Genetic network during neural crest induction: from cell specification to cell survival.," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 16, no. 6, pp. 647–54, 2005.
- [57] J. A. Weston, "A radioautographic analysis of the migration and localization of trunk neural crest cells in the chick," *Dev. Biol.*, vol. 6, no. 3, pp. 279–310, 1963.
- [58] C. a Erickson, "From the crest to the periphery: control of pigment cell migration and lineage segregation.," *Pigment Cell Res.*, vol. 6, no. 5, pp. 336–47, 1993.
- [59] M. Simoes-Costa and M. E. Bronner, "Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe," *Development*, vol. 142, no. 2, pp. 242–257, 2015.
- [60] B. Obrink, "Epithelial cell adhesion molecules," *Exp Cell Res*, vol. 163, no. 1, pp. 1–21, 1986.
- [61] a Cano *et al.*, "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 2, no. 2, pp. 76–83, 2000.
- [62] H. Peinado, M. Quintanilla, and A. Cano, "Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 23, pp. 21113–23, 2003.
- [63] J. Ikenouchi, M. Matsuda, M. Furuse, and S. Tsukita, "Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail.," *J. Cell Sci.*, vol. 116, no. Pt 10, pp. 1959–67, 2003.
- [64] G. Lee *et al.*, "Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 25, no. 12, pp. 1468–1475, 2007.
- [65] P. Noisa, C. Lund, K. Kanduri, R. Lund, and H. La, "Notch signaling regulates the differentiation of neural crest from human pluripotent stem cells," *J. Cell Sci.*, vol. 127, pp. 2083–2094, 2014.
- [66] L. Menendez, T. a. Yatskievych, P. B. Antin, and S. Dalton, "Wnt signaling and a Smad pathway blockade direct the differentiation of human pluripotent stem cells to multipotent neural crest cells," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 48, pp. 19240–19245, 2011.
- [67] M. Fukuta *et al.*, "Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media," *PLoS One*, vol. 9, no. 12, 2014.
- [68] R. O'Rahilly and F. Müller, "The development of the neural crest in the human," *J. Anat.*, vol. 211, no. 3, pp. 335–351, 2007.
- [69] E. Betters, Y. Liu, A. Kjaeldgaard, E. Sundstr??m, and M. I. Garc??a-Castro, "Analysis of early human

neural crest development," *Dev. Biol.*, vol. 344, no. 2, pp. 578–592, 2010.

- [70] F.-J. Lv, R. S. Tuan, K. M. C. Cheung, and V. Y. L. Leung, "Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells," *Stem Cells*, vol. 32, no. 6, pp. 1408–1419, 2014.
- [71] D. D. Briana *et al.*, "Fetal concentrations of the growth factors TGF- $\beta$  and TGF- $\beta$ 1 in relation to normal and restricted fetal growth at term," *Cytokine*, vol. 60, no. 1, pp. 157–161, 2012.
- [72] B. Herrera and G. J. Inman, "A rapid and sensitive bioassay for the simultaneous measurement of multiple bone morphogenetic proteins. Identification and quantification of BMP4, BMP6 and BMP9 in bovine and human serum," *BMC Cell Biol.*, vol. 10, no. 1, p. 20, 2009.
- [73] C. Coste *et al.*, "Like human adipose tissue and dermis, human bone marrow harbors cells with neural crest-associated characteristics," *Under Rev. PLoS ONE*, pp. 1–26, 2017.
- [74] I. R. Cordeiro, D. V. Lopes, J. G. Abreu, K. Carneiro, M. I. D. Rossi, and J. M. Brito, "Chick embryo xenograft model reveals a novel perineural niche for human adipose-derived stromal cells.," *Biol. Open*, vol. 4, no. 9, pp. 1180–93, 2015.
- [75] T. Ostenfeld, "Requirement for Neurogenesis to Proceed through the Division of Neuronal Progenitors following Differentiation of Epidermal Growth Factor and Fibroblast Growth Factor-2-Responsive Human Neural Stem Cells," *Stem Cells*, vol. 22, no. 5, pp. 798–811, 2004.
- [76] M. Z. Ratajczak, M. Kucia, R. Reca, M. Majka, a Janowska-Wieczorek, and J. Ratajczak, "Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow.," *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K.*, vol. 18, pp. 29–40, 2004.
- [77] C. Linker, "Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists," *Development*, vol. 131, no. 22, pp. 5671–5681, 2004.
- [78] F. Cimadamore *et al.*, "Human ESC-derived neural crest model reveals a key role for SOX2 in sensory neurogenesis," *Cell Stem Cell*, vol. 8, no. 5, pp. 538–551, 2011.
- [79] A. P. W. Johnston, S. Naska, K. Jones, H. Jinno, D. R. Kaplan, and F. D. Miller, "Sox2-mediated regulation of adult neural crest precursors and skin repair," *Stem Cell Reports*, vol. 1, no. 1, pp. 38–45, 2013.
- [80] L. Menendez *et al.*, "Directed differentiation of human pluripotent cells to neural crest stem cells," *Nat. Protoc.*, vol. 8, no. 1, pp. 203–212, 2013.
- [81] Y. J. Kim *et al.*, "Generation of multipotent induced neural crest by direct reprogramming of human postnatal fibroblasts with a single transcription factor," *Cell Stem Cell*, vol. 15, no. 4, pp. 497–506, 2014.
- [82] C. L. Curchoe *et al.*, "Early acquisition of neural crest competence during hESCs neuralization.," *PLoS One*, vol. 5, no. 11, p. e13890, Jan. 2010.
- [83] F. Calegari, "Selective Lengthening of the Cell Cycle in the Neurogenic Subpopulation of Neural Progenitor Cells during Mouse Brain Development," *J. Neurosci.*, vol. 25, no. 28, pp. 6533–6538, 2005.
- [84] A. Lukaszewicz, P. Savatier, V. Cortay, H. Kennedy, and C. Dehay, "Contrasting effects of basic fibroblast growth factor and neurotrophin 3 on cell cycle kinetics of mouse cortical stem cells.," *J. Neurosci.*, vol. 22, no. 15, pp. 6610–6622, 2002.
- [85] S. Lamouille, J. Xu, and R. Derynck, "Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 3, pp. 178–196, 2014.

- [86] Y. Mikami *et al.*, “CD271/p75(NTR) inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages.,” *Stem Cells Dev.*, vol. 20, no. 5, pp. 901–13, 2011.