



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS
MESENQUIMALES GINGIVALES A CÉLULAS
TIPO SCHWANN

T E S I S

QUE PARA OTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

SINDY LAURA MENDOZA OLVERA

Director de Tesis: Dr. Karlen Gazarian
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Laboratorio de biología molecular y biotecnología

Asesora interna: M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez
Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción
Laboratorio de Biología del Desarrollo



Investigación realizada gracias al programa UNAM DGAPA-PAPIIT IN IT2003 13

Ciudad de México

AGOSTO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1. Células troncales	3
1.1 División asimétrica	4
1.2 Potencial de diferenciación	5
2. Cresta neural	6
2.1 Migración de las células de la cresta neural a la zona dental	12
3. Células mesenquimales	16
3.1 Células troncales mesenquimales de la zona dental	16
4. Trans-diferenciación celular	20
5. Epigenética	21
6. Sistema nervioso	23
6.1.1 Sistema nervioso periférico	23
6.1.2 Células del sistema nervioso periférico	24
6.1.3 Células glía	25
6.1.4 Células Schwann	26
7. Células Schwann y nervio periférico	27
7.1 Nervio óptico	29
7.2 Posible uso en regeneración	30
Justificación	32
Hipótesis	33
Objetivos	34
1.1 General.....	34
1.2 Particulares.....	34
Metodología	35
1. Células troncales mesenquimales de tejido gingival.....	35
2. Cultivo primario de células mesenquimales de tejido gingival.....	36
3. Cultivo de células troncales de tejido gingival.....	36
4. Purificación de ARN	36

5. Preparación del medio de cultivo para diferenciación a linaje glial.....	37
6. Caracterización de células tejido gingival	38
6.1 identificación de marcadores mesenquimales y neuronales por citometría de flujo	38
6.2 Identificación de marcadores gliales por inmunofluorescencia	38
Resultados.....	40
1. Morfología inicial.....	40
2. Purificación de ARN	40
3. Morfología antes y durante la diferenciación glial.....	41
4. Expresión de marcadores neurales y mesenquimales por citometría de flujo	42
CD271	42
CD73, CD44	43
CD105, SSEA4	44
5. Expresión de marcadores neurales por inmunofluorescencia	45
NGN3	46
GFAP	47
MASH.....	48
S100B.....	49
SOX2	50
SOX9	51
SOX10	52
6. Análisis de resultados.....	54
Conclusiones	56
Anexos.....	57
Bibliografía.....	67

AGRADECIMIENTOS

A mis padres María Teresa Olvera Castillo, José Cruz Mendoza Osorio y mi hermana Nancy Janeth Mendoza Olvera quienes han brindado de su incondicional compañía y apoyo en este proceso que se llama vida, sin duda la parte más importante. 

A la UNAM y en especial a la FES Zaragoza por mi desarrollo académico.

A mi director de tesis el Dr. Karlen Gazarian y al Instituto de Investigaciones Biomédicas por darme la oportunidad de realizar la investigación e incursionarme en la línea de células troncales.

A mi asesora interna M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez por guiarme durante el proceso de titulación.

Y a mis sinodales, la Dra. Juana Monroy Moreno, el M. en C Carlos Bautista Reyes y la M. en ES. María Cristina Alvarado Domínguez por su gran apoyo y consejos.

Y como lo menciona Newton en una frase: Si he visto más lejos, es porque estoy sentada sobre los hombros de gigantes.

“

La ciencia no sólo es una disciplina de la razón,
sino también del romance y de la pasión.”

”

Stephen Hawking

POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS
MESENQUIMALES GINGIVALES A CÉLULAS
TIPO SCHWANN

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Laboratorio de biología molecular y biotecnología



RESUMEN

Durante la tercera y cuarta semana del desarrollo embrionario, una población transitoria de células que se originan entre la placa neural y el ectodermo superficial migra hacia lugares específicos del embrión, donde se diferencian sus características epiteliales y adquieren características mesenquimatosas y forman diversos tejidos del soma, creando nichos compuestos de células diferenciadas que conservan su multipotencialidad que está presente en la etapa adulta y son capaces de diferenciarse *in vitro* a diversos linajes tanto mesenquimales como neuronales.

Las células de la cresta neural forman distintas estructuras cráneo-faciales y tejidos; incluyendo la formación de la papila dentaria, folículo dental, pulpa dental y la encía, donde perduran nichos de células troncales adultas que dan origen a diferentes tejidos mesenquimales como hueso, cartílago, tejido graso, tejido muscular y tejidos del sistema nervioso sensorial, simpático y parasimpático. Estos nichos tienen el potencial de diferenciarse *in vitro* de manera directa, sin necesidad de modificación genética, mediante la manipulación de vías de señalización con la exposición a factores de crecimiento en el medio de cultivo; las células de la cresta neural que migran a la formación del tejido gingival, expresan marcadores neurales y mesenquimales de acuerdo a su origen, por lo tanto, tendrían un gran potencial y capacidad de diferenciación hacia linaje glial.

Bajo esta hipótesis, se utilizaron células troncales de tejido gingival (células mesenquimales) colectadas de terceros molares de pacientes sanos para ser caracterizadas, antes y durante la diferenciación a destino glial, mediante las técnicas de citometría de flujo e inmunofluorescencia.

Por medio de la técnica de citometría de flujo se evaluó la expresión de marcadores neurales y mesenquimales (CD271, CD73, CD44, CD105, SSEA4) en presencia y ausencia de suero fetal bovino (FBS). La probabilidad de diferenciación a linaje mesenquimal incrementó al ser cultivadas en

presencia del FBS. En contraste, durante el cultivo libre de suero, fue mayor el porcentaje de diferenciación a linaje neural.

En la diferenciación a linaje glial se utilizó un medio de cultivo específico donde se manipularon las vías de señalización Shh y Wnt utilizando un pre-tratamiento y una exposición a factores de crecimiento. Esto provocó que SOX10 presente en el citoplasma de las células mesenquimales gingivales se expresara a nivel nuclear (característico de células gliales tipo Schwann), lo que hizo propicio e indujo la trans-diferenciación a linaje glial provocado por la epigenética de la célula mesenquimal derivada de la cresta neural.

Por otra parte, durante el cultivo y expansión de células gingivales se utilizó suero al 2% y durante la diferenciación a linaje glial 1% en el medio de cultivo, lo cual indicó, que aún con suero en baja concentración es propicio la diferenciación a linaje glial. Finalmente, se logró obtener una población altamente pura de células con las características morfológicas y expresión característica de marcadores de células gliales tipo Schwann por medio de células gingivales.

INTRODUCCIÓN

1. Células troncales

El desarrollo del organismo multicelular se inicia de una sola célula, el cigoto, y termina con alrededor de 200 tipos de células que forman tejidos y órganos del cuerpo. En la formación del soma participan células troncales (llamadas “células madre”) y células diferenciadas (Gazarian, 2013).

Las células troncales o *Stem cell* cumplen dos funciones: diferenciación a células del soma y producción de más células troncales (regeneración) (Gazarian, 2013).

Se definen como células primitivas capaces de auto-renovarse y diferenciarse hacia varios tipos celulares especializados. La auto-renovación de las células troncales se refiere a la capacidad, tras una división mitótica, de generar al menos una célula hija con las características fenotípicas y propiedades funcionales que la célula madre. Cuando la auto-renovación resulta en dos células hijas se dice que la célula troncal efectuó una auto-renovación simétrica. Cuando la auto-renovación resulta en una célula idéntica a la célula madre con propiedades más especializadas, se dice que la célula troncal efectuó una renovación asimétrica (Figura 1) (Morrison y Kimble, 2006).

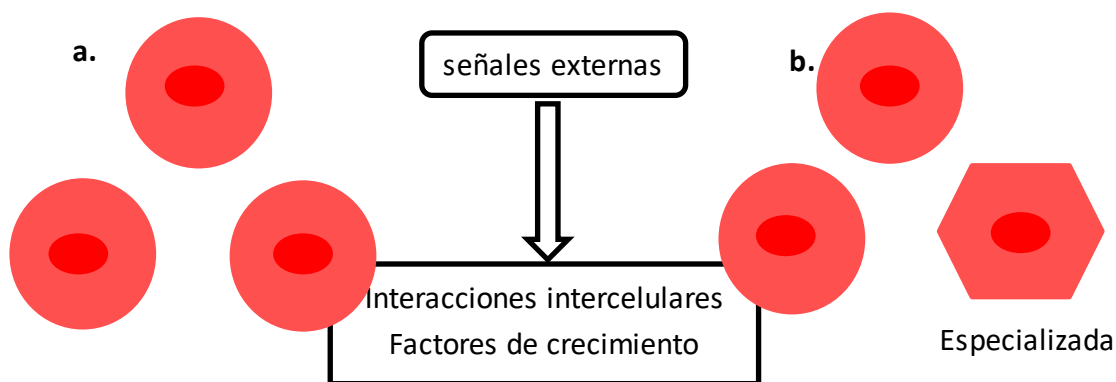


Figura 1. Auto-renovación de las células troncales. a) División simétrica, las dos células hijas con la identidad de la madre; b) División asimétrica, una célula hija con la identidad de la madre y la otra célula hija con propiedades más especializada.

La discriminación entre una división simétrica y una asimétrica en una célula troncal dependerá de señales externas como las interacciones intercelulares y la estimación de factores de crecimiento (Knoblich, 2008).

1.1 División asimétrica

Existen dos principales de mecanismos que gobiernan las divisiones celulares asimétricas. El primero se basa en la partición asimétrica de los componentes celulares que determinan el destino de la célula; también llamados “intrínsecos”. El segundo implica la ubicación asimétrica de las células hijas en relación con las señales externas; también llamados 'extrínsecos' (Morrison y Kimble, 2006).

En situaciones en las que la única diferencia entre las células hijas es su posición relativa al nicho de células madre, las células hijas pueden tener inicialmente un potencial de desarrollo equivalente, pero pueden adquirir destinos diferentes debido a la exposición a señales externas variables. De esta forma, la división es asimétrica con respecto al destino final de las células hijas a pesar de que la división es intrínsecamente simétrica, dando inicialmente dos células hijas con un potencial de desarrollo equivalente (Figura 2) (Morrison y Kimble, 2006).

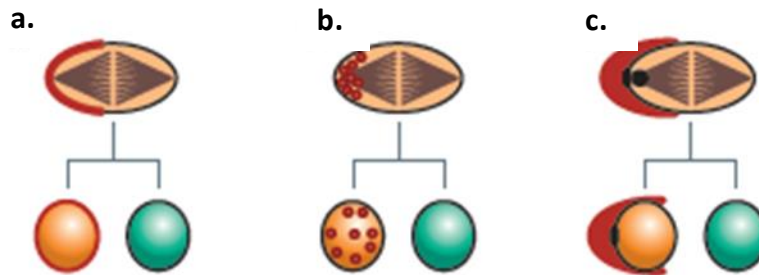


Figura 2. Controles de división asimétrica de células madre. Se muestran tres mecanismos simples, pero otros son plausibles: a) la localización asimétrica de los reguladores de polaridad celular (rojo) inicia la división asimétrica; b) los determinantes del destino celular (rojo) se pueden segregar al citoplasma de una célula hija, como se muestra aquí, o se pueden asociar con la membrana, el centrosoma u otro constituyente celular que se distribuye diferencialmente a las hijas; c) la orientación regulada del huso mitótico retiene solo una hija en el nicho de células madre (rojo), de modo que solo esa célula hija tiene acceso a señales extrínsecas necesarias para mantener la identidad de las células madre. Este mecanismo logra un resultado asimétrico, a pesar de que la división en sí es intrínsecamente simétrica. En un modelo alternativo pero similar, la célula hija situada lejos del nicho está expuesta a señales que inducen la diferenciación (tomada de Morrison y Kimble, 2006).

1.2 Potencial de diferenciación

Las células troncales se distinguen por tener diferente potencial para originar los distintos tipos de células diferenciadas (Gazarian, 2013). El potencial de diferenciación de las propiedades ha permitido clasificar a las células troncales en tres grupos: troncales totipotentes, pluripotentes y multipotentes (Figura 3). La potencialidad de las células troncales está basada en su capacidad para diferenciarse hacia diversos linajes celulares tomando en cuenta el desarrollo embrionario (Carlson, 2005).

- Totipotentes: aquellas que forman la mórula y pueden dar lugar a un organismo completo
- Pluripotentes: provienen de las totipotentes, integran el blastocisto y dan lugar a células de las tres capas embrionarias (mesodermo, endodermo y ectodermo)
- Multipotentes: se diferencian a tipos celulares de la misma familia (Gazarian, 2013).

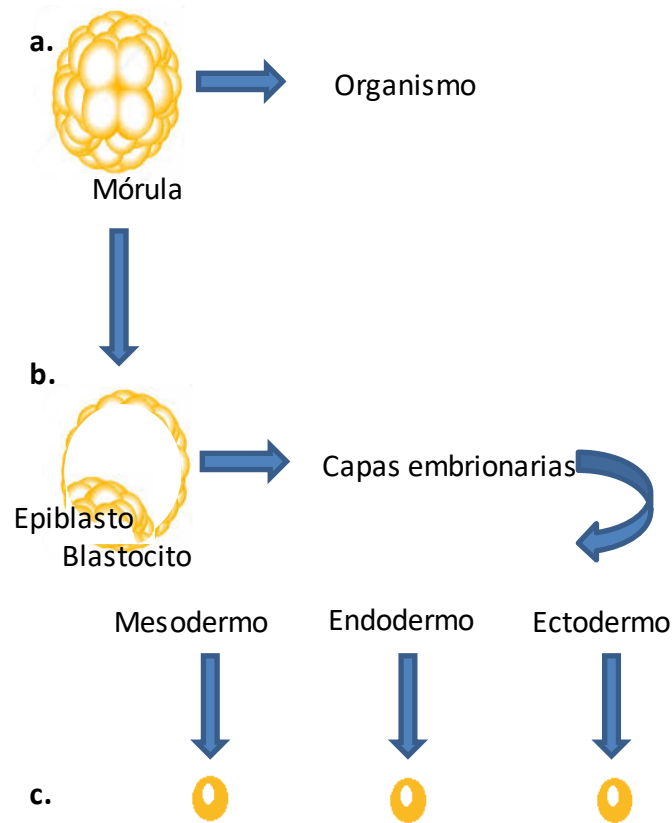


Figura 3. Clasificación de las células troncales de acuerdo a su potencial de diferenciación. a) Totipotentes; b) Pluripotentes; c) Multipotentes.

2. Cresta Neural

La cresta neural es una población de células troncales embrionarias multipotentes (NCSC) que genera una amplia gama de linajes celulares (Curchoe et al., 2010; Baggiolini et al., 2015).

En los vertebrados diversos tipos de células neurales o no neurales en son producidos por la cresta neural, estructura embrionaria transitoria que surge durante la neurulación en la parte dorsal del tubo neural (Figura 4) la cual los impregna con características únicas, como las mandíbulas y el sistema nervioso periférico (Le Douarin et al., 2008). La inducción del territorio de la cresta neural inicial depende en gran medida de la acción coordinada de un conjunto de moléculas de señalización y factores de transcripción durante las etapas de gastrulación y neurulación (Nikitina et al., 2009).

La placa neural se genera como un epitelio columnar y está sustentada por células mesodermo axiales de la notocorda y mesodermo paraxial (más tarde los somitas) y está flanqueada por ectodermo epidérmico. Durante la neurulación, la placa neural se dobla en su línea media para formar los pliegues neurales y se forma una placa de piso. El tubo neural se forma por fusión de las puntas dorsales de los pliegues neuronales, generando células de la placa del techo en su línea media dorsal y células de la cresta neural, que emigran del tubo neural dorsal (Figura 4) (Tanabe y Jessell, 1996).

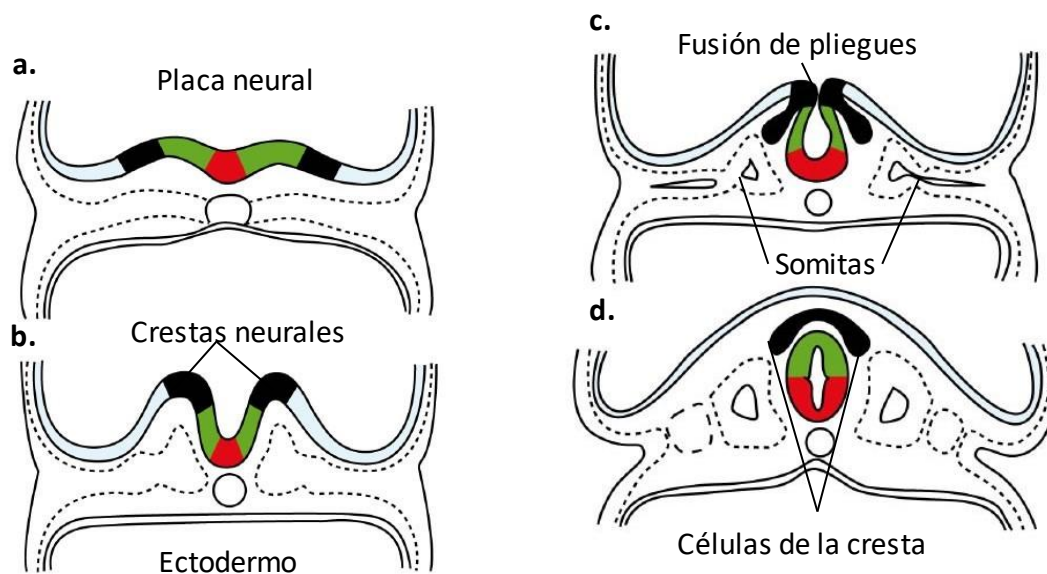


Figura 4. Neurulación. a) conformación de la placa neural por diferenciación del ectodermo a neuroectodermo inducido por la notocorda; b) proyección de las crestas neurales inducidas por las células de la cresta neural y conformación del surco neural; c) fusión de las crestas neurales en la línea media para formar el tubo neural; d) profundización del tubo neural en el mesodermo por debajo del ectodermo y migración dorsolateral de las células de la cresta neural (tomada de <http://teaching.thehumanbrain.info/neuroanatomie.php?kap=2> /).

Las células de la cresta neural experimentan una transición epitelial a mesenquimal y migran por todo para poblar numeroso derivados (Baggiolini et al., 2015). Es decir, se dispersan desde la superficie del tubo neural dorsal y migran a través del embrión, perdiendo su carácter epitelial y adquiriendo características mesenquimatosas, transformándose en células migratorias que contribuyen ampliamente para el desarrollo del embrión (Romer, 1972; Chai et al., 2000).

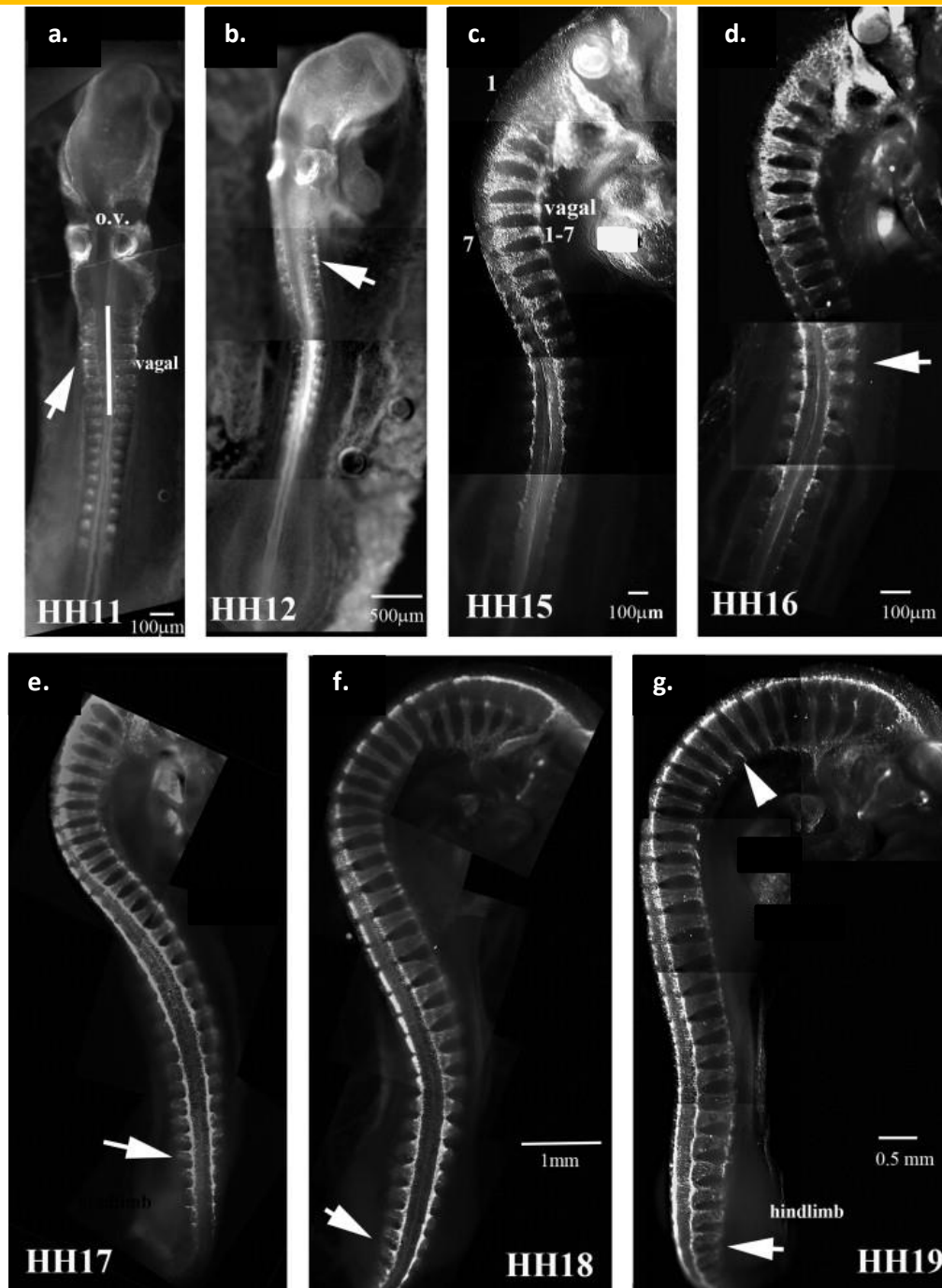


Figura 5. Tinción que muestra la migración de células de la cresta neural en embrión de pollo. Vistas completas de embriones en estadios HH11-19 con el marcador HNK1 (*nucleosomal histone kinase-1*). Las etiquetas HNK1 migran pobremente la cresta neural del tronco en HH11 y HH12 (a, b), pero fuertemente por HH15. c) La cresta vagal está indicada en (c). La flecha en (d) apunta a la somite 16. Flecha en (e-g) para migración de células de la cresta neural en cola. La punta de flecha en (g) señala el adelgazamiento de las transmisiones de las células de la cresta neural, lo que indica que están comenzando a condensarse. En (a) o.v. representa vesículas óticas (tomada de Dion et al., 2015).

En la región de la cabeza, las células de la cresta neural abandonan su ubicación antes de la fusión de los pliegues del tubo neural, es decir del cierre del tubo neural, mientras que en la región del tronco las células de la cresta neural se delaminan de la región dorsal del tubo neural una vez que este se ha cerrado (Figura 6) (Le Douarin, 1982).

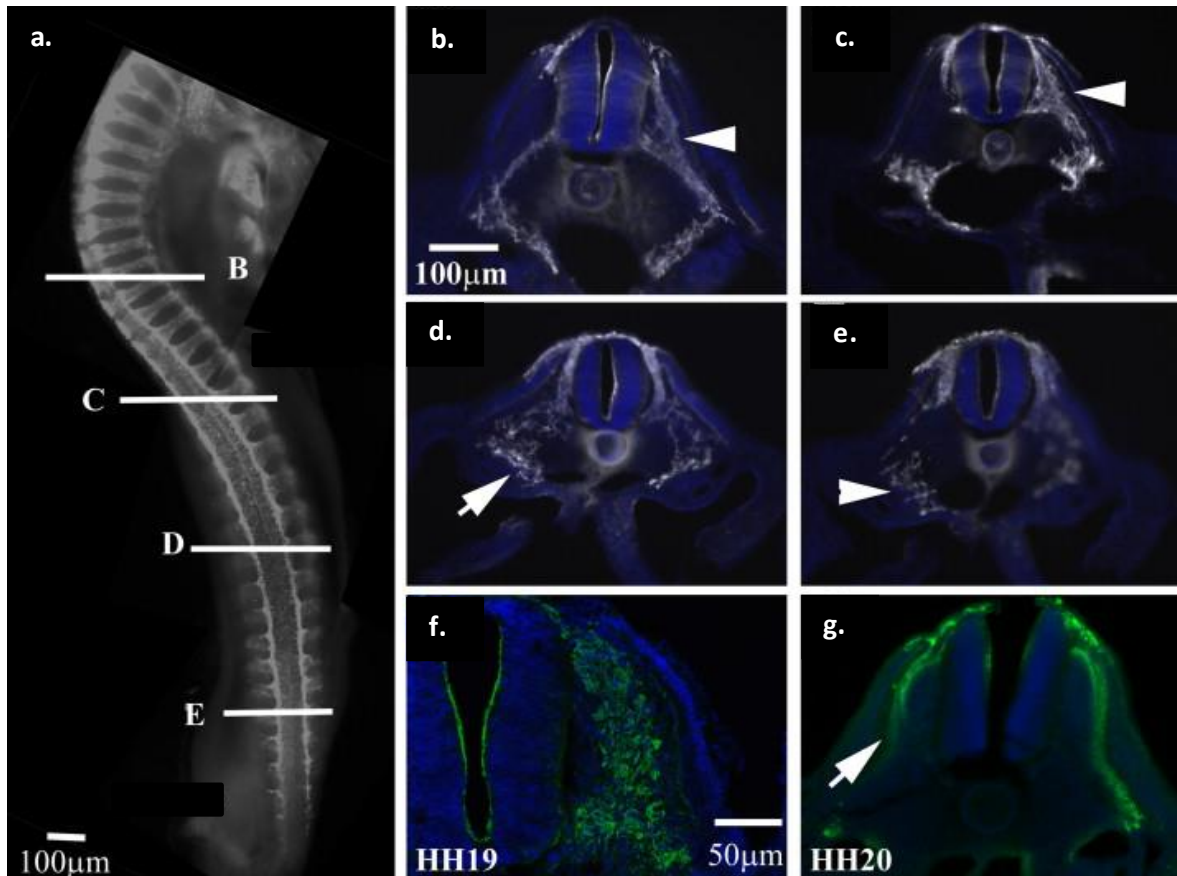
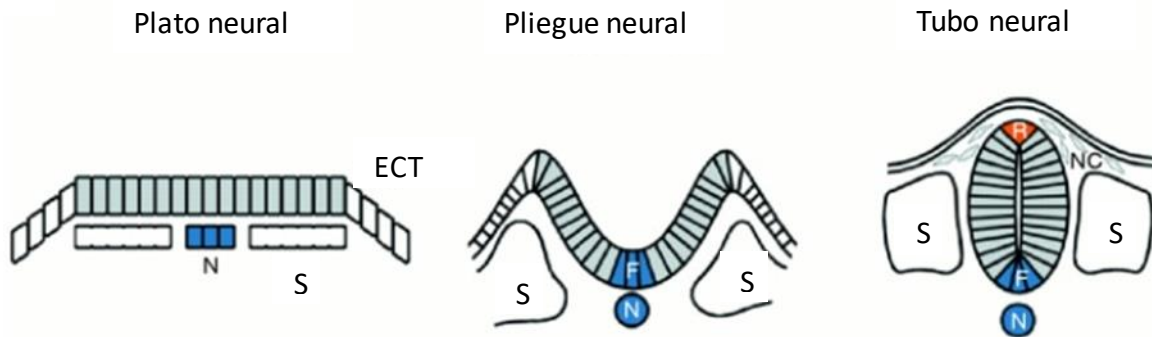


Figura 6. Vistas completas del embrión de pollo en estadio HH17 con HNK1. a) Todo el embrión con HNK1 muestra muchas más células que migran a lo largo del tronco. (b-e) Secciones apuntadas en embriones enteros. f) Una sección del segmento medio en el estadio HH19 y (g) del embrión HH20 para resaltar la reducción de la migración celular por estas etapas. Las flechas en (b-e) apuntan a las corrientes de migración de troncales, mientras que en (g) la falta de ellas (tomada de Dion et al., 2015).

Las células de la cresta neural alcanzan distancias considerables y siguen vías regionalmente definidas a sitios de diferenciación para generar diversos tipos celulares como las células neuronales y gliales del sistema nervioso sensorial, simpático y parasimpático, células de la glándula suprarrenal, las leptomeninges y melanocitos (Hall, 2008), el tejido cartilaginoso, óseo y conectivo del esqueleto craneofacial, neuroendocrino cefálico órganos y algunos vasos cardíacos (Curchoe et al., 2010) donde crean nichos de células troncales.

Las señales inductivas ventralizadoras son Sonic Hedgehog y BMPs en etapas secuenciales del desarrollo de la médula espinal. Sonic Hedgehog se expresa inicialmente en el mesodermo axial y las BMP se originan en el ectodermo epidérmico que flanquea los bordes laterales de la placa neural. En las etapas del pliegue neuronal, Sonic Hedgehog comienza a expresarse mediante células de la placa del piso en la línea media de la placa neural y BMP por las células en las puntas dorsales de los pliegues neuronales. Después del cierre del tubo neural, la expresión de BMP se pierde del ectodermo epidérmico, excepto en la línea media dorsal, pero las BMP ahora se expresan en la placa del techo y en el tubo neural dorsal adyacente. En el inicio de la diferenciación neuronal, la expresión de BMP persiste en el tubo neural dorsal, y la expresión de Sonic Hedgehog se mantiene en la placa del piso (Figura 7) (Tanabe y Jessell, 1996).

a. Estados de desarrollo



b. Señales inductivas

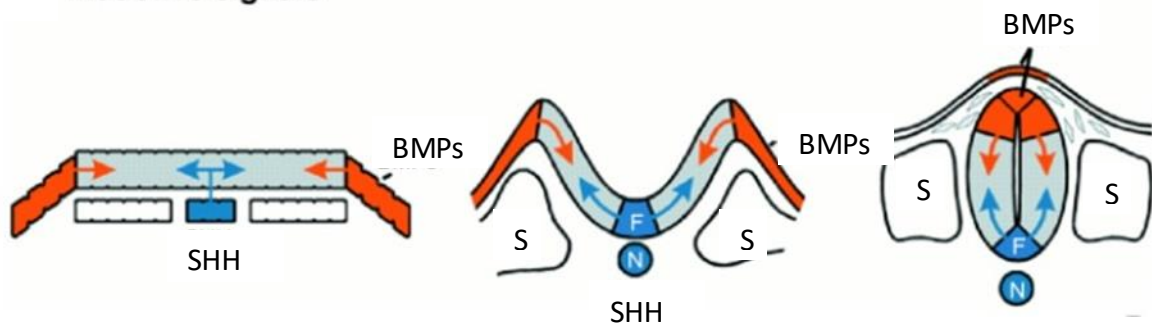


Figura 7. Fuentes polarizadas de señales inductivas durante el desarrollo de la médula espinal: a) etapas en el desarrollo embrionario de la médula espinal. (N) Notocorda. (S) Somitas. (ECT) Ectodermo epidérmico. (F) Placa de piso. b) El diagrama muestra la fuente de las señales inductivas ventralizadoras [Sonic Hedgehog (Shh), blue] y dorsalizadoras (BMPs, naranja) en etapas secuenciales del desarrollo de la médula espinal (tomada de Tanabe y Jessell, 1996).

A pesar de que la cresta neural es un derivado ectodérmico, se ha propuesto considerarla como la cuarta capa germinativa debido a su capacidad para originar los diferentes tipos celulares mencionados anteriormente y reunir características de una capa germinal (Hall, 2008).

2.1 Migración de células de la cresta neural a la zona cráneo-facial, dental

Las células de la cresta neural que migran a la zona cráneo-facial contribuyen a la formación y condensado de los dientes y encía. El diente se deriva del ecto-mesénquima de la cresta neural y del epitelio ectodérmico (Koussoulakou et al., 2009). Como se ha mencionado, la cresta neural-ecto-mesénquima contribuye a la formación de condensado dental en la fase de germen y el principio de formación del diente y después a la formación de papila dental mesénquima, preodontoblasto, matriz de odontoblastos, dentina, pulpa, cemento y el ligamento periodontal (Figura 8) (Chai et al., 2000).



Figura 8. Esquema general de la formación de los dientes. a) Migración de las células a zona cráneo-facial; b) Señal inductiva inicial para la formación de los dientes que reside en el epitelio oral; c) Las interacciones recíprocas entre el epitelio y mesénquima contribuyen a diversos derivados del diente y encía (modificada de Koussoulakou et al., 2009).

Factores de crecimiento como BMP y de transcripción FOXD3 y WNT6 han sido asociados con la señalización epitelio-mesénquima durante la morfogénesis de diente (Figura 9) (Thesleff y Sharpe., 1997).

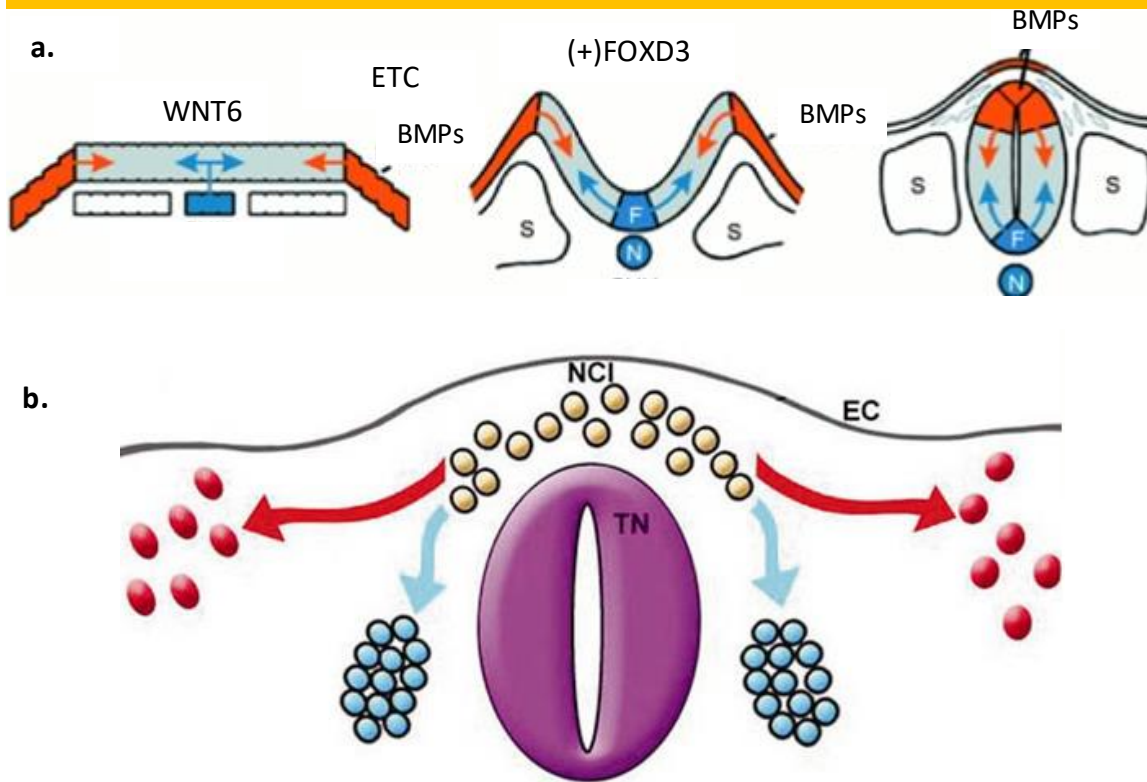


Figura 9. Factores de transcripción involucrados en la formación de los dientes. A) Proteínas de señalización WNT6, BMP y gen FOXD3; b) Células indiferenciadas de la cresta neural (NCI), vías migratorias: una dorsolateral, (flecha en rojo) ventral (en celeste) (modificada de Tanabe y Jessell, 1996; Montiel-Eulefi y Montiel, 2012).

El epitelio dental interactúa con las células de la cresta neural craneal para formar dientes a medida que se forma el tubo neural. a) el ectodermo dorsal sintetiza la proteína de señalización WNT6; mientras que, en la placa neural, se producen miembros de la familia BMP. Cuando estos dos tejidos embrionarios se cruzan, la multiplicación celular activa ocurre tanto en el ectodermo como en el neurodermo. Estas células multiplicadoras expresan el gen FOXD3 que ordena a estas células formar dos hileras longitudinales dorsal de ectomesénquima en ambos lados del tubo neural para crear una población transitoria de células altamente nómadas, las células de la cresta neural. b) Las células indiferenciadas de la cresta neural (NCI) se segregan tempranamente de su entorno celular y abandonan el tubo neural para adoptar dos vías migratorias: una dorsolateral, (flecha en rojo) ventral (en celeste) (Montiel-Eulefi y Montiel, 2012).

Durante el desarrollo embrionario, el archenteron participa en la formación del arco faríngeo. Los arcos faríngeos contienen un vaso sanguíneo central, el arco aórtico, rodeado de mesodermo paraxial. Este núcleo está envuelto por una hoja de células de la cresta neural; estas células, a su vez, están cubiertas por hojas continuas de ectodermo epidérmico y endodermo interno. El primer arco faríngeo forma las mandíbulas superior e inferior. Las capas masivas del epitelio orofaríngeo (estomodeo) migran y se superponen a los arcos faríngeos; las células odontogénicas de la cresta neural ya han emigrado y poblado la región en este momento. Aunque los dientes orales se cree que surgen exclusivamente del ectodermo, los dientes faríngeos también pueden derivarse del epitelio endodermo ([Imai et al., 1998](#); [Zerina y Smith, 2005](#); [Soukup et al., 2008](#)).

Algunas de las células de la cresta neural en la región del cerebro anterior migran ventralmente (Figuras 6 y 9b) entre el ectodermo superficial y el mesodermo local y establecen la prominencia frontonasal, donde se forman los incisivos superiores. Las células de la cresta neural del mesencéfalo y los tres primeros rombomeres pueblan el primer arco faríngeo, donde todos los demás dientes se desarrollan en el resto del maxilar y toda la mandíbula. ([Grigoriou et al., 1998](#)).

Allí, las células de la cresta neural se multiplican activamente para producir el cuerpo principal del arco faríngeo. A la llegada y disposición de las células de la cresta neural, los dientes se desarrollan por interacciones moleculares múltiples, recíprocas e inductivas entre el epitelio dental (tal vez con mesodermo paraxial craneal y también endodermo) y el ectomesénquimo subyacente en el maxilar y la mandíbula ([Grigoriou et al., 1998](#)).

Las células de la cresta neural dan lugar, un poco después, a diversos tipos de células dentales (odontoblastos: que producen dentina, cementoblasto: que secretan cemento para cubrir la dentina de la raíz, osteoblastos: que participan en la formación de alvéolos dentales y fibroblastos: que sintetizan colágeno para el ligamento periodontal). Las células del epitelio oral

permanecen y se diferencian localmente en ameloblastos productores de esmalte (Figura 10) (Slavkin, 1974).

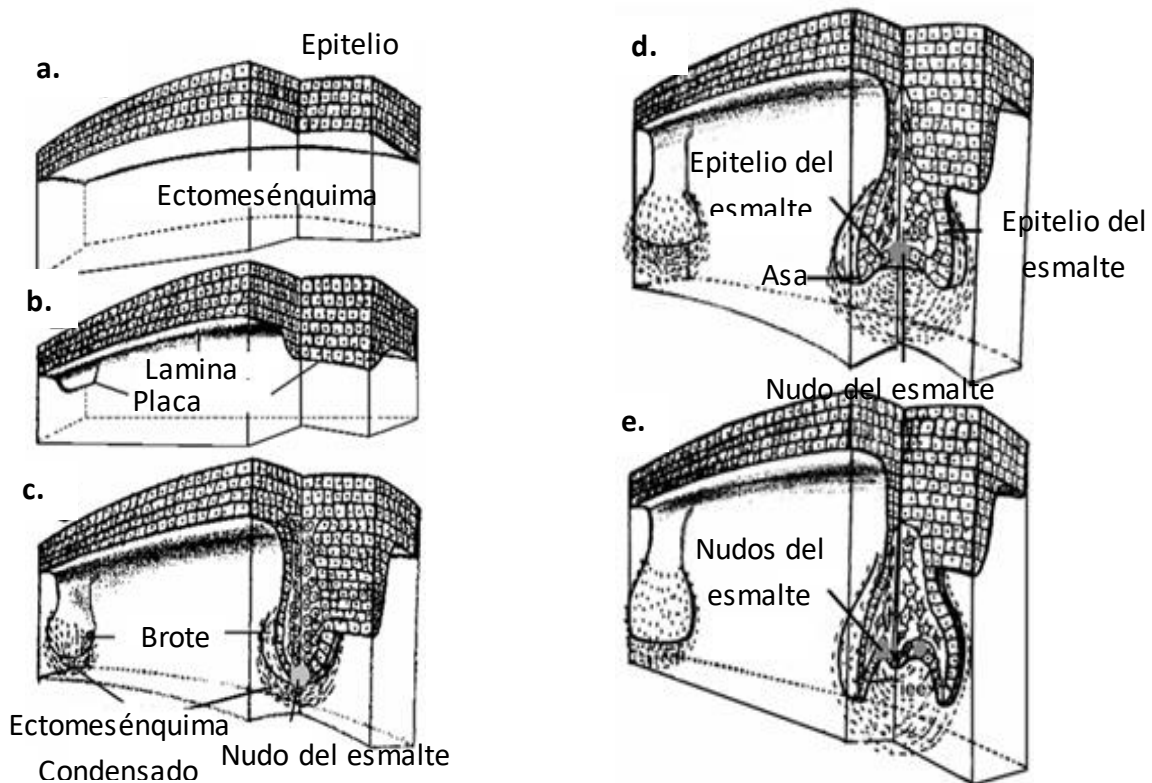


Figura 11. Etapas en el desarrollo de los dientes: a) el ectodermo oral pre-estampado está en estrecho contacto con el ecto-mesénquima de la cresta neural craneal. En esta etapa, el potencial odontogénico reside en el epitelio. b) Las células epiteliales secretan señales específicas en diferentes áreas, proliferan y forman una banda de tejido epitelial, la lámina dental y los placodos dentales. c) En los sitios de los placodos dentales, las células epiteliales proliferan e invaden el mesénquima formando los brotes de los dientes. En esta etapa de desarrollo, el potencial odontogénico se pierde del epitelio y se le concede al ectomesénquima. d) El brote se pliega y adquiere inicialmente la forma de una tapa invertida y más tarde se forma una campana. e) Nudo del esmalte (tomada de Koussoulakou et al., 2009).

Las células de la cresta neural, aunque de origen ectodérmico, se someten a "mesenquimización", un proceso que justifica su designación como células ecto-mesenquimatosas (Wada y Makabe, 2006).

3. Células troncales mesenquimales

Las células troncales mesenquimales (MSC) son células multipotentes y “adultas” (Arévalo et al., 2004) y que se identifican por su capacidad de formar colonias morfológicamente parecidas a fibroblastos cuando se cultivan en presencia de factores de crecimiento mitogénico o suero (Friedenstein et al., 1968). Se caracterizan por ser capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico (Caplan, 1991) (dentina, hueso, ligamento periodontal, etc.). No obstante, recientemente se ha observado que se pueden transdiferenciar (se les puede inducir pluripotencialidad) (Baksh et al., 2004) es decir, que pueden dar lugar a tejidos mesenquimáticos y no mesenquimatosos *in vitro* e *in vivo* (da Silva Meirelles et al., 2006).

Las células mesenquimales, como se ha mencionado, ocupan nichos en los tejidos del estroma y son la fuentes de células troncales de derivados especializados durante el crecimiento y la reparación (Keating, 2012).

3.1 Células troncales mesenquimales del área dental

Los estudios actuales sobre células madre reportan que se han aislado a partir de varios tejidos adultos, incluyendo médula ósea, tejido neural, músculo, piel, retina y folículos pilosos (Batouli et al., 2003). Con referencia al área dental existen estudios incipientes donde las células madre aisladas son a partir de extractos de ligamento periodontal y de pulpas de órganos dentarios exfoliados (Miura et al., 2003; Chen et al., 2006).

Las células madre derivadas del tejido dental son aisladas de tejido con capacidades potentes de diferenciarse en células odontogénicas. Sin embargo, también tienen la capacidad de dar origen a otros linajes celulares similares (Huang et al., 2009).

Hasta la fecha, se han aislado y caracterizado diferentes tipos de células troncales dentales humanas (Figura 12) (Rodas et al., 2017).

- Células madre mesenquimales derivadas de médula ósea alveolar (ABMSC)
- Células progenitoras del folículo dental (DFPC)
- Células madre de la pulpa dental (DPSCs)
- Células madre derivadas del tallo gingival (GMSC)
- Células madre del ligamento periodontal (PDLSCs)
- Células madre de la papila apical (SCAP)
- Células madre de dientes deciduos humanos exfoliados (SHED)
- Células progenitoras del germen del diente (TGPC)

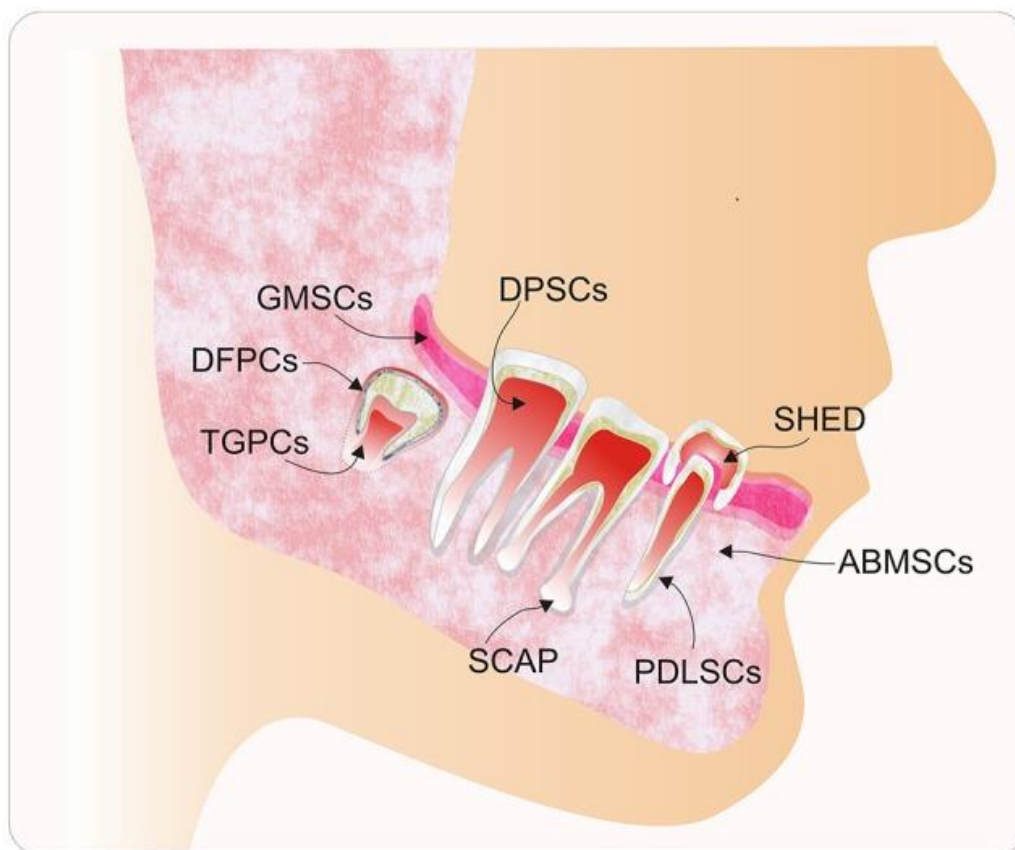


Figura 12. Diagrama de las principales fuentes de células madre mesenquimales derivadas del tejido dental humano (hDT-MSCs) (tomada de Rodas et al., 2017).

Estas poblaciones contienen células tanto diferenciadas como no diferenciadas, es decir, nichos celulares, poseen dos cualidades; la capacidad de auto-renovarse y el potencial de diferenciarse en diferentes linajes tanto neural como mesenquimal, con respecto a su origen.

Las células troncales mesenquimales derivadas de la médula son capaces de dar lugar a diversos linajes de células tales como células osteogénicas, condrogénicas, adipogénicas, miogénicas y neurogénicas. Las células madre derivadas del tejido dental son aisladas desde tejido especializado con capacidades potentes de diferenciarse en células odontogénicas (Huang et al., 2009). Sin embargo, tienen la capacidad de diferenciarse en condiciones apropiadas en diferentes tipos de células somáticas de las tres capas germinales. (Figura 13) (Rodas et al., 2017).

Los estudios con células troncales enfocadas al área dental han mostrado que el trasplante subcutáneo en ratones inmunocomprometidos puede formar estructuras que asemejan a complejos pulpa-dentina y ligamento periodontal-cemento radicular (Shi et al., 2005) o participan en procesos de reparación periodontal en defectos creados en roedores (Seo et al., 2004). Asimismo, las células madre de dientes deciduos humanos exfoliados son capaces de estimular la nueva formación de hueso, creando células diferenciadas para la regeneración del complejo dentina durante la vida del individuo, por lo que tienen posible aplicación en regeneración ósea craneofacial (Gronthos et al., 2002; Risbud y Shapiro, 2005).

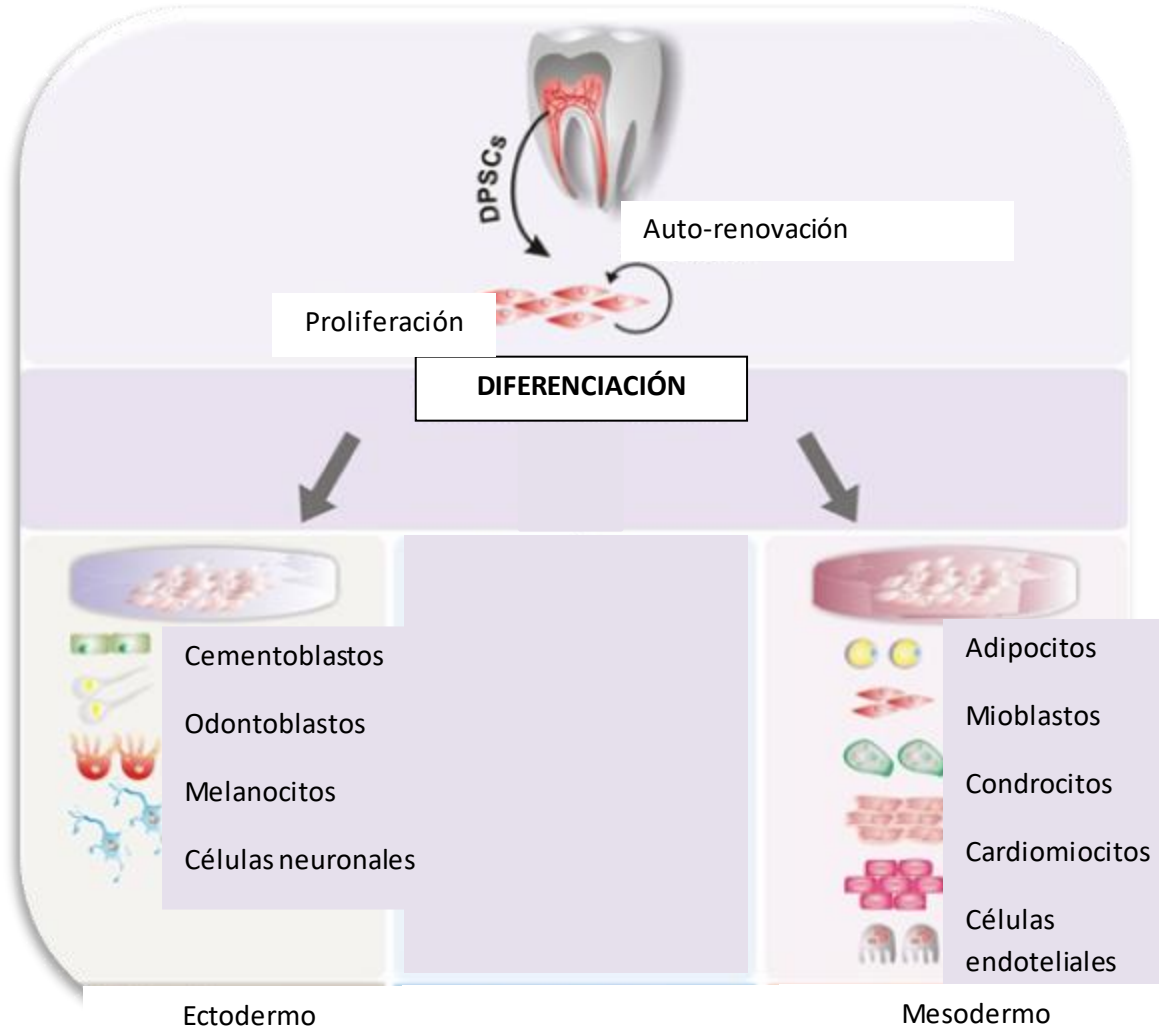


Figura 13. Potencial de diferenciación de células troncales mesenquimales. Potencial multilínea de células madre dentales (Tomado de Rodas et al., 2017).

Las células dentales tienen el potencial para lograr la regeneración de tejidos dentarios humanos *in vivo*, sin embargo, no se conocen las señales necesarias para la diferenciación a un fenotipo celular específico, por lo que la investigación actual está encaminada a demostrar cuáles son los mecanismos moleculares involucrados en el tránsito de una población celular progenitora con característica de célula madre a una población comprometida hacia un linaje dental o célula diferenciada (Shi et al., 2001). Por esta razón el área dental ofrece un excelente modelo para diferenciar hacia diversos linajes celulares y su uso como regeneración de tejidos.

4. Trans-diferenciación celular

Las células troncales adultas (ASCs) son capaces de auto-renovarse y diferenciarse en varios tipos de células especializadas de acuerdo a su origen (Rodas et al., 2017). Sin embargo, se ha mostrado que las células troncales adultas poseen la capacidad de generar tipos celulares especializados, diferentes al de su origen embrionario, entre ellas células gliales y neuronas, sugiriendo que estas células tienen una gran plasticidad (Trans-diferenciación) (Beltran et al., 2005).

La trans-diferenciación implica la conversión de una célula a otro tipo celular de un linaje distinto, acompañada de la pérdida de marcadores específicos y de la función del tipo celular original y de la adquisición de marcadores y función de otro tipo celular (Tosh y Slack, 2002; Wagers y Weissman, 2004) que ocurre con o sin la intervención de la división celular (Tosh y Slack, 2002).

Los estudios sugieren que las ASCs tienen la capacidad de trans-diferenciarse (Beltran et al., 2005) y por la activación directa de un programa de diferenciación que altere la especificidad del linaje original (Wagers y Weissman, 2004), o a través de un proceso de pérdida de la diferenciación (de-diferenciación) de una célula de un tejido específico a un estado más primitivo, seguido de la re-diferenciación hacia un nuevo linaje celular (Song y Tuan, 2004; Wagers y Weissman, 2004).

Es posible que el microambiente al que están expuestas las células ASCs induzca una reprogramación genética por la exposición a factores inductores (Song y Tuan, 2004).

La fuente principal de ASCs es la médula ósea, pero una buena población proviene de la población mesenquimal (MSC) (Jiang et al., 2002) derivada de la cresta neural.

Se conoce que las MSCs están constituidas por poblaciones heterogéneas y no por poblaciones originadas a partir de clones individuales. Teniendo en cuenta esta heterogeneidad, se ha cuestionado la plasticidad de las MSCs

(Verfaillie, 2002). Y se plantea que existen diversos tipos de ASCs en la médula ósea, que dan origen a tipos celulares ectodérmicos, mesodérmicos y endodérmicos (McKinney-Feeman et al., 2002).

5. Epigenética

Las células madre mesenquimales y su alta plasticidad para el desarrollo en linajes celulares distintos son moduladas por mecanismos epigenéticos (Rodas et al., 2017). Tales mecanismos epigenéticos están conformados por modificaciones de histonas postraduccionales, metilación del ADN y ARN no codificante, que convergen para modular la estructura de la cromatina (la remodelación o remodelaje de la cromatina dependiente de ATP) permitiendo o impidiendo el acceso de la maquinaria transcripcional a la información genómica y (Recillas y Escamilla, 2004). Por lo tanto, estos mecanismos garantizan que las células genéticamente idénticas muestran una gran variedad de fenotipos con funciones definidas (Van der Meulen et al., 2014; Zhang et al. al., 2015).

La gran mayoría de los procesos biológicos que ocurren durante la vida de una célula requieren de una estricta interdependencia entre procesos genéticos y epigenéticos, para así coordinar las acciones del genotipo con el epigenotipo, y viceversa (Delgado, 2011).

La metilación del ADN es fundamental para señalar qué genes deben encenderse o apagarse de manera definitiva en momentos específicos del desarrollo, o para procesos como la inactivación del cromosoma X, impronta genética, recombinación y mantenimiento de la estabilidad genómica. La modificación de histonas o marcas epigenéticas ocurren en residuos específicos del extremo amino-terminal de las histonas, o en regiones internas de las mismas. Los mecanismos de metilación de ADN e histonas se interrelacionan a través del llamado “cross talk”, y potencian eventos de represión epigenética. Un ejemplo es que ocurra metilación de un promotor determinado y alteraciones en la cromatina por acetilación o desacetilación de histonas. La lisina se acetila en la cromatina que contiene ADN en transcripción activa, y se desacetila para reprimir la transcripción. Después

de la desacetilación, las histonas son metiladas, lo que conduce al reclutamiento de metiltransferasas de ADN, que metilan, provocando una hipermetilación del promotor y el silencio transcripcional del gen.

Las cimas y valles representadas por regiones con alta y baja concentración de marcas epigenéticas en el paisaje epigenético, describen las opciones que una célula en un embrión sigue en puntos clave del desarrollo, y se dirige hacia un punto u otro por acción de factores inductores embrionarios o genes homeóticos (aquellos que producen cambios en las rutas del desarrollo y ocasionan defectos fenotípicos conocidos como transformaciones homeóticas [\(Delgado, 2011; Slack, 2002\)](#)).

En la actualidad, el término epigenética se entiende como la regulación génica mediada por modificaciones de la estructura de la cromatina (material genético empaquetado alrededor de proteínas) como los cambios heredables en la expresión genética que son independientes de la secuencia de nucleótidos, es decir, que ocurren sin cambios en la secuencia del ADN. Una generalización útil es que, a mayor tamaño del genoma, mayor complejidad tendrá la regulación epigenética [\(Mager y Bartolomei, 2005\)](#).

Estudios recientes sugieren que la homeostasis entre la auto-renovación de células madre adultas y su transición a células más especializadas está regulada por modificaciones epigenéticas [\(Deng et al., 2015; Rinaldi y Benitah, 2015\)](#). Cada célula madre contiene modificadores epigenéticos únicos como proteínas y ARNs (Metiltransferasas de ADN, proteínas modificadoras de histonas, chaperonas intercambiadoras de histonas, proteínas delimitadoras, complejos modificadores de la cromatina y transcritos no codificantes) [\(Mager y Bartolomei, 2005\)](#), mientras que otros modificadores se expresan de manera ubicua como la exposición a factores de crecimiento [\(Rodas et al., 2017\)](#).

Los tejidos dentales humanos, incluida la pulpa dental, el folículo dental, el ligamento periodontal y la médula ósea se han identificado como una fuente prometedora de MSC que, en condiciones adecuadas, pueden diferenciarse en múltiples tipos de células, como las células neuronales, osteocitos y

condrocitos. Estas MSC podrían usarse para tratamientos terapéuticos y esta capacidad representa una nueva forma de reparar o regenerar los tejidos dañados, y este prometedor campo de estudio podría ayudar a resolver algunas cuestiones no resueltas sobre la reprogramación del destino celular a través de la epigenética (Rodas et al., 2017).

En los últimos años, los mecanismos epigenéticos han sido un tema creciente en la búsqueda de la comprensión de la función de células madre mesenquimales y la plasticidad celular. Sin embargo, para la regeneración de tipos celulares específicos de la enfermedad aún se requiere investigación adicional para comprender los programas de diferenciación y el verdadero potencial regenerativo de las células madre dentales (Rodas et al., 2017).

6. Sistema Nervioso

El sistema nervioso está formado por un conjunto de estructuras constituidas por tejido nervioso que controla las funciones del organismo.

El sistema nervioso se divide en dos partes: sistema nervioso central, compuesto por el encéfalo y la médula espinal, y el sistema nervioso periférico, formado por ganglios y nervios periféricos situados en el exterior de la médula espinal y del encéfalo (Kandel et al., 1999).

La ontogenia del sistema nervioso depende de procesos como la proliferación, diferenciación y migración neuronal, entre otros. Las estructuras y células nerviosas derivan del ectodermo, la notocorda induce la formación de la placa neural y posteriormente la placa neural se convierte en surco y tubo neurales. Una vez que el tubo neural está formado, las células neuroepiteliales (CNE), futuras neuronas y glía, en la zona subventricular migran masivamente para constituir la corteza cerebral y otras estructuras. Las CNE, al ser células gliales, expresan múltiples marcadores como BLBP, GLAST, vimentin, tenascin, S100B, SOX10 y en primates GFAP (Flores y Escobar, 2011).

6.1.1 Sistema nervioso periférico

El sistema nervioso periférico está compuesto por los nervios craneanos, raquídeos y periféricos que conducen impulsos desde el sistema nervioso central (nervios eferentes o motores) y hacia éste (nervios aferentes o sensitivos), conjuntos de cuerpos neuronales fuera del sistema nervioso central llamados ganglios y por terminaciones nerviosas especializadas (tanto motoras como sensitivas) (Figura 14).

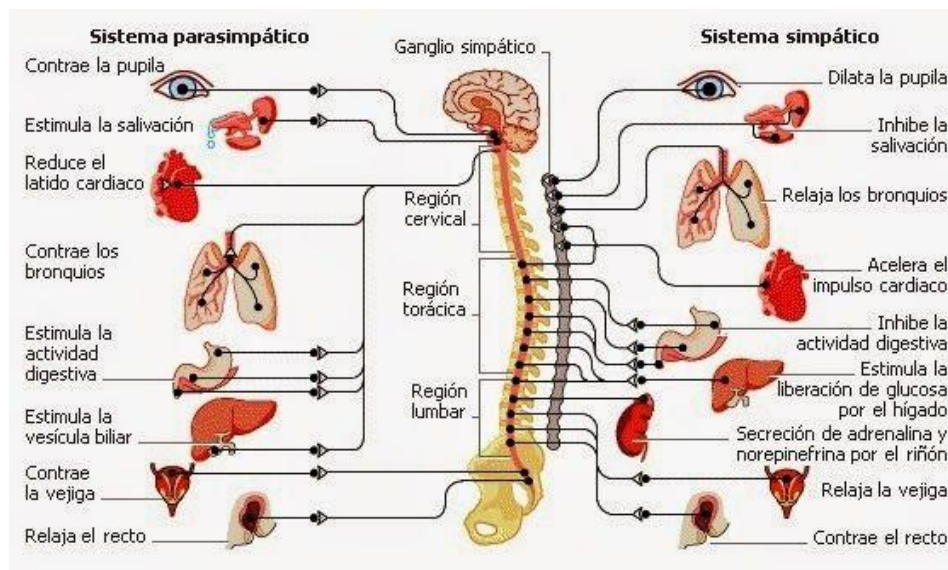


Figura 14. Esquema representativo del sistema nervioso (tomada de <https://www.pinterest.es/pin/458663543290625401/>).

6.1.2 Células del Sistema nervioso periférico

El SNP está formado por las neuronas y prolongaciones neuronales que se encuentran fuera del encéfalo y de la médula espinal, más las células gliales, tanto las que envuelven a los axones, como la glía periférica, que forman parte de los ganglios. La función principal es conectar los estímulos que recibe el cuerpo: externos e internos con el sistema nervioso central, y a éste a su vez con los órganos, aparatos o sistemas del organismo, a los cuales tienen que regular (Megías et al., 2016).

6.1.3 Células glía

La glía es un grupo heterogéneo de células nerviosas que cumplen funciones diversas en la fisiología del cerebro. Con base en su morfología, fisiología y localización en el cerebro se identifican los tipos: microglía, oligodendroglía, glía NG2 y astroglia (Figura 15) (Reyes-Haro et al., 2004).

La microglía representa el sistema inmunitario del cerebro. Los oligodendrocitos producen la mielina que envuelve a los axones para permitir una comunicación neuronal eficiente. Los astrocitos contactan a los vasos sanguíneos y las sinapsis detectan la actividad neuronal y liberan gliotransmisores para modular la actividad cerebral (Reyes-Haro et al., 2004).

Las neuronas tienen la habilidad de comunicarse entre sí de manera rápida y eficiente mediante señales eléctricas o químicas que se traducen en forma de potenciales de acción. Todas las células nerviosas que no producen potenciales de acción están agrupadas en lo que se conoce como glía (del griego glía, “unión o pegamento”) (Reyes-Haro et al., 2004).

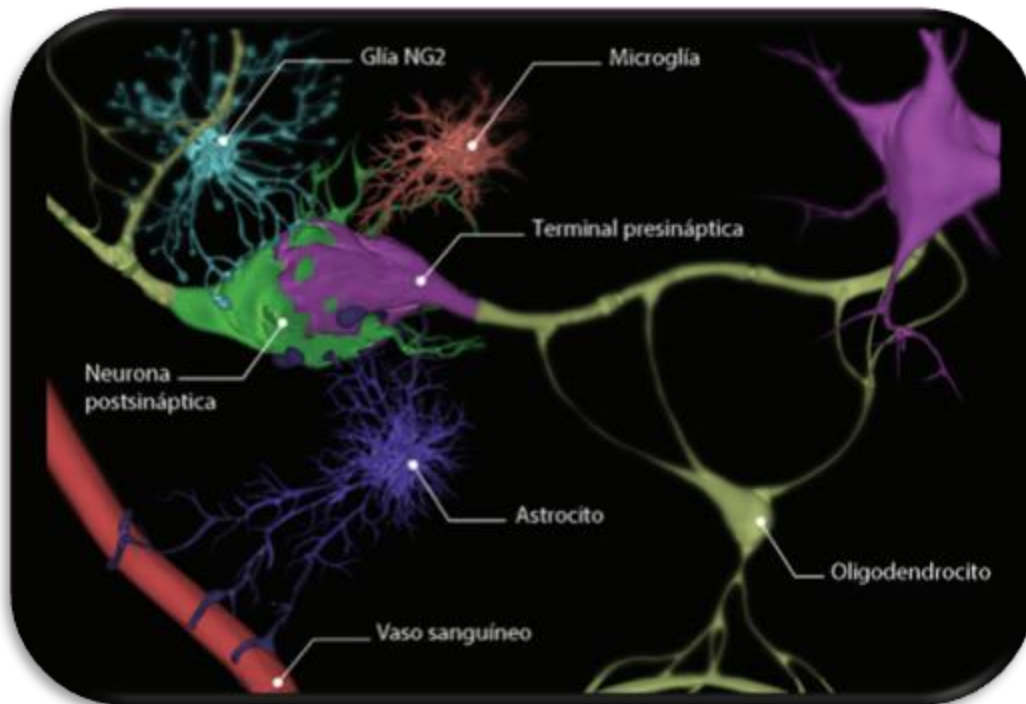


Figura 15. Células glía del sistema nervioso (tomada de Reyes-Haro et al., 2004).

La oligodendroglía comprende a los oligodendrocitos que se ubican en el SNC y las células de Schwann (Figura 16) que están presentes en el SNP; que son como los representantes de la oligodendroglía en los nervios periféricos. El papel fundamental de este tipo de glía es facilitar la comunicación eléctrica entre las neuronas (Reyes-Haro et al., 2004).

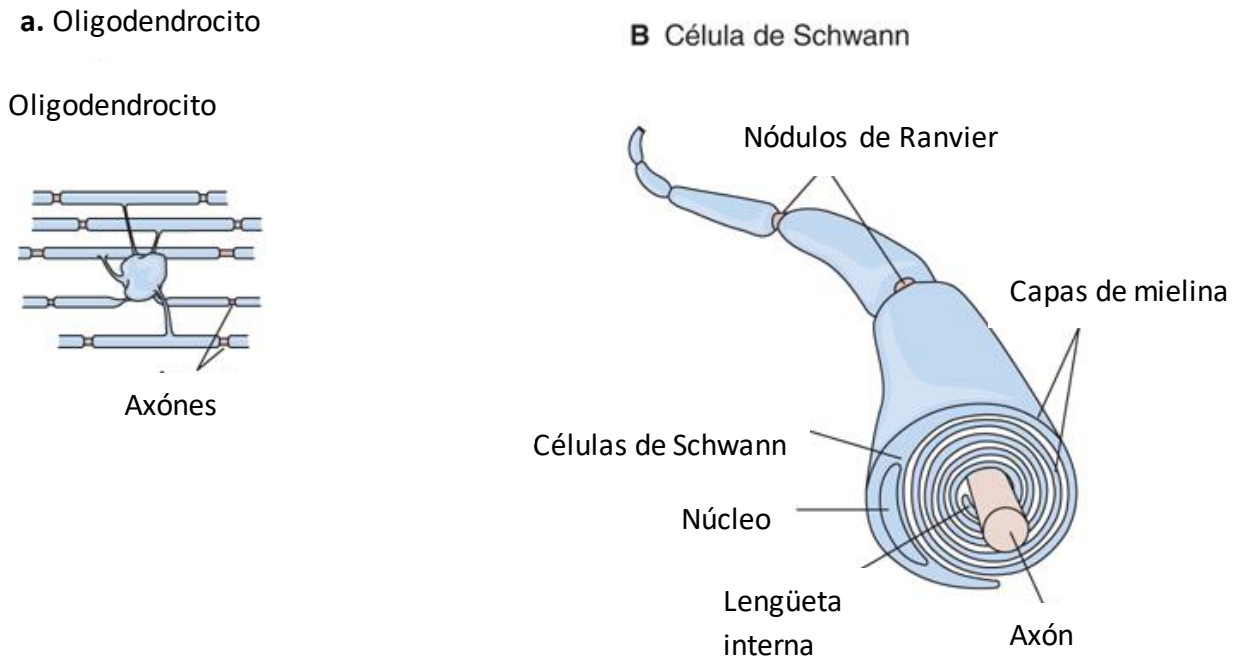


Figura 16. Comunicación eléctrica. a) oligodendrocitos del sistema nervioso central y b) las células de Schwann que están presentes en el sistema nervioso periférico (tomada de Barrett et al., 2017).

6.1.4 Células Schwann

En el embrión de vertebrados las células gliales de Schwann que recubren los nervios periféricos se deriva del ectodermo temprano y la cresta neural (Dupin, 2011).

Las células Schwann con base en su morfología se clasifican en formadoras de mielina que envuelven solamente axones de más de 1 μm de diámetro, células no mielinizantes que rodean múltiples axones pequeños, células satélites (Figura 17) que rodean los pericariones neuronales en los ganglios y

agregados tubulares de células de Schwann (bandas de Büngner) en los segmentos distales de los nervios seccionados (Terzis y Smith, 1990).

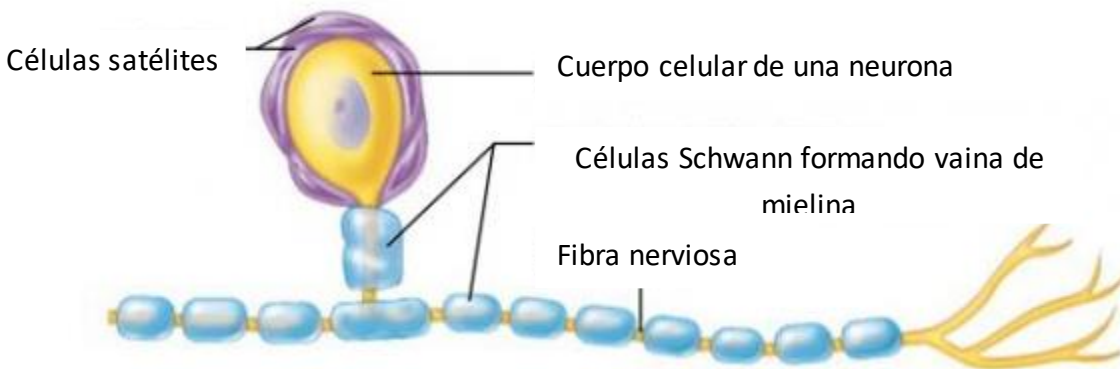


Figura 17. Esquema representativo de células satélite (tomada de <https://es.slideshare.net/gustavotoledo/fundamentos-del-sistema-nervioso-y-del-tejido-nervioso-2013>).

7. Células Schwann y el nervio periférico

En los nervios periféricos, las fibras nerviosas se unen en haces. Los nervios están constituidos por fibras nerviosas, rodeadas de mielina o no (Figura 18), reunidas en haces. El tejido conjuntivo de los nervios se distribuye en las fibras nerviosas, en el interior de cada haz, luego en torno a cada haz y por fin entre ellos para mantenerlos reunidos y constituir al nervio mismo (Poirier, 2004).

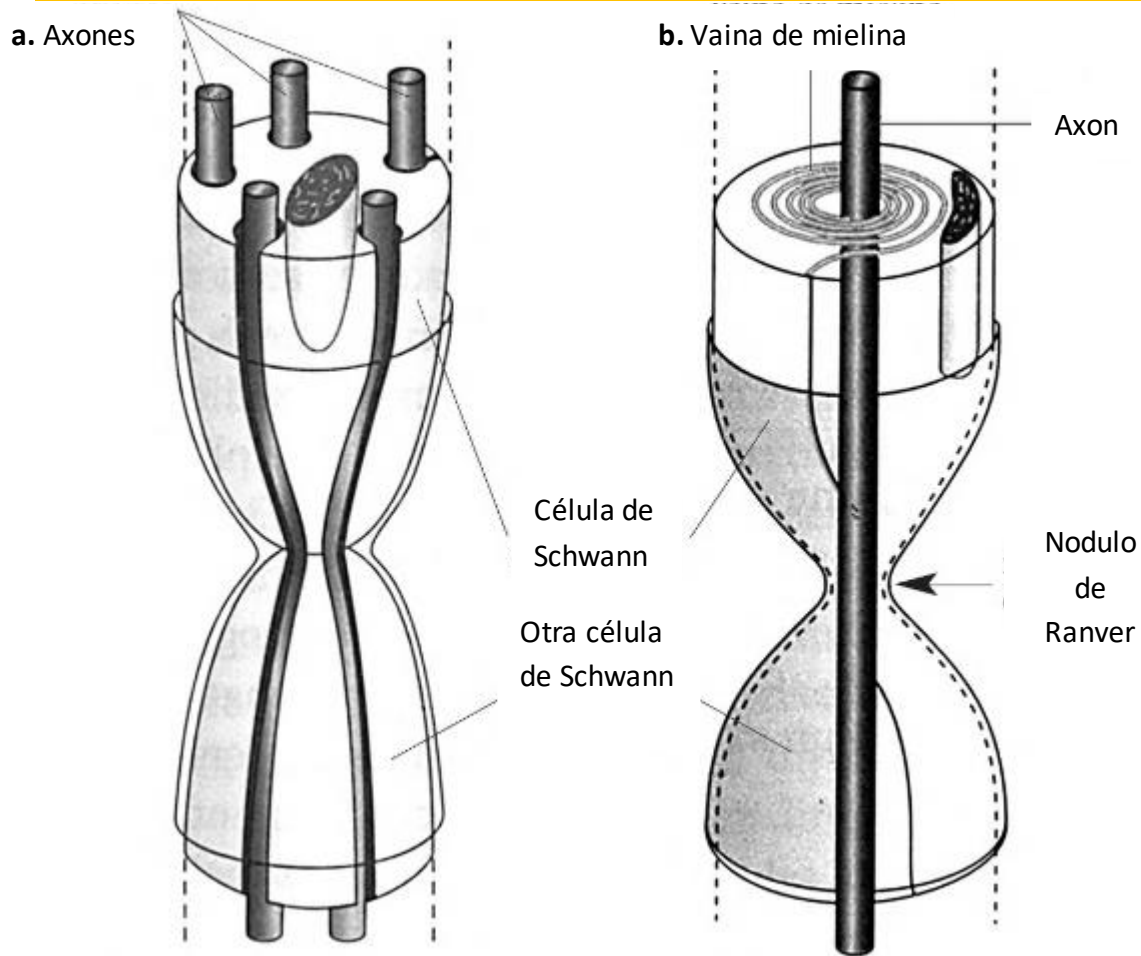


Figura 18. Fibras nerviosas: a) Reconstrucción tridimensional de una fibra nerviosa periférica amielínica, b) Reconstrucción tridimensional de una fibra nerviosa periférica mielínica (tomada de Poirier, 2004).

Por lo tanto, los nervios son haces de axones, cada uno de los cuales está envuelto por células de Schwann y por tejido conectivo. Cuando una célula de Schwann rodea a varios axones a la vez, la fibra nerviosa se denomina amielínica. Sin embargo, en la mayor parte de los casos, cada célula de Schwann rodea con múltiples envueltas de su membrana plasmática a un único axón y forma entonces fibras nerviosas mielínicas. Cada una de las fibras nerviosas, mielínica o amielínica, está rodeada de una pequeña capa de tejido conectivo llamado endoneuro. Grupos de fibras se agrupan en pequeños fascículos y se rodean de un tejido conectivo denominado perineuro. Finalmente, una tercera capa de tejido conectivo denso, el

epineuro, une y rodea los fascículos para formar el nervio (Figura 19) (Megías et al., 2016).

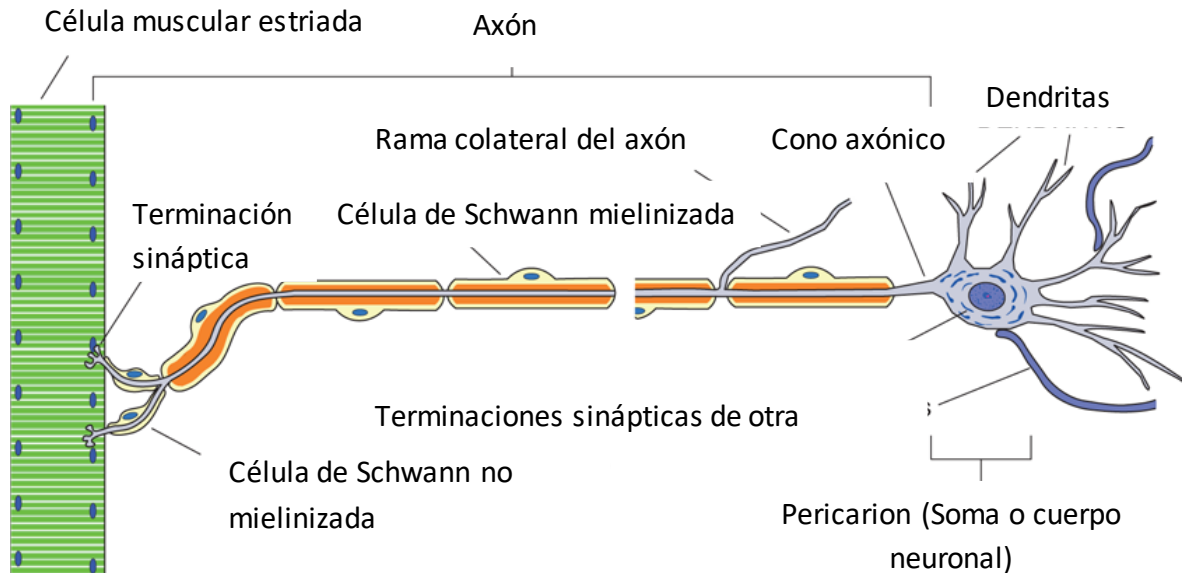


Figura 19. Esquema representativo de la unión neuromuscular. Fibra nerviosa periférica. El nervio periférico normal con su axón, rodeado de la capa de mielina producida por las células de Schwann (tomada de Paniagua et al., 2017).

7.1 Nervio óptico

El nervio óptico o segundo par craneal es el encargado de la transmisión del estímulo visual que, generado en la retina, ha de llegar a la corteza cerebral occipital para su procedimiento sensorial. Este nervio puede verse afectado por diferentes procesos patológicos. El más frecuente de ellos es el glaucoma, enfermedad relacionada con la presión intraocular donde se genera un daño al nervio óptico (Figura 20) (Gutiérrez-Ortiz y Teus, 2010).

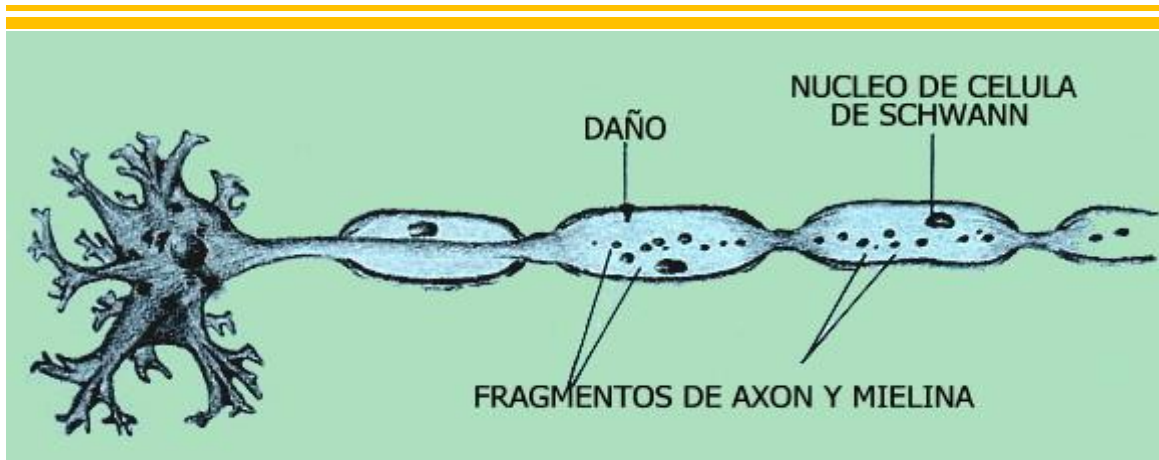


Figura 20. Daño celular en los nervios. Más allá del sitio del daño (flecha) el axón y la mielina degeneran. Sin embargo, las células de Schwann y la membrana basal sobreviven formando un tubo continuo. El cuerpo celular experimenta muchos cambios, tales como aumento de la síntesis de ciertas proteínas, las que pueden ser importantes para ayudar al axón a recrecer

(tomada de

<http://www.creces.cl/new/index.asp?tc=3&nc=6&imat=%20%20%3E%20%2040%20%20%3E%20%20Fotos%20&art=253>).

7.2 Posible uso en regeneración

Las células de Schwann son células gliales derivadas de la cresta neural que apoyan los axones de los nervios periféricos. Las lesiones de los nervios periféricos son comunes y pueden ser debidas a neuropatías, lesión traumática, cirugía relacionada con el tumor o la compresión repetitiva (Evans, 2001; Pfister et al., 2011; Griffin et al., 2014). En general, la lesión del nervio periférico lleva a un alto costo para los sistemas de salud (Noble et al., 1998; Rosberg et al., 2005).

Después de la lesión del nervio periférico, el muñón proximal del nervio es capaz de regeneración (Figura 21) y reinervación. La reparación quirúrgica para la reconstrucción del nervio implica menor anastomosis directa de extremo a extremo (Griffin et al., 2014). En lesiones de los nervios importantes, la reparación del nervio requiere cerrar la brecha y la introducción de las células de Schwann, junto con factores de crecimiento derivados de las células de Schwann y una matriz extracelular para guiar axonal extensión y el nervio de regeneración (Shirosaki et al., 2014).

Los axones se regeneran a lo largo de las células de Schwann alineadas llamadas bandas de Büngner, que forman un ambiente permisivo (Allodi et al., 2012). En la actualidad, los autoinjertos de los nervios sensoriales se utilizan típicamente para reparar gran daño nervioso periférico. Los autoinjertos tienen varias desventajas, sin embargo, incluyendo daño en el nervio donante causada por la biopsia. Las células de Schwann también han demostrado ser útiles para el tratamiento de lesiones de la médula espinal (Bunge, 2008; Williams y Bunge, 2012).

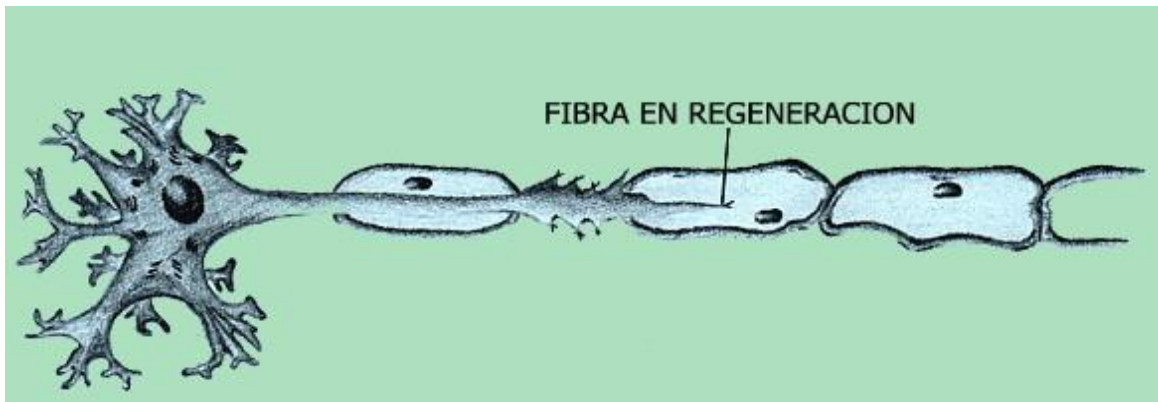


Figura 21. Fibra nerviosa en regeneración. El cono de crecimiento que se desarrolla en la punta del muñón axónico emite ramificaciones que buscan señales que lo guíen en su crecimiento.

Cuando localiza la capa de células del Schwann, el axón empieza a crecer a lo largo de ella

(tomada de

<http://www.creces.cl/new/index.asp?tc=3&nc=6&imat=%20%203E%20%2040%20%203E%20%20Fotos%20&art=253>).

En lesiones de nervios importantes, la reparación del nervio requiere cerrar la brecha e introducir las células de Schwann, junto con factores de crecimiento derivados de las células de Schwann y una matriz extracelular para guiar axonal extensión y el nervio de regeneración (Shirosaki et al., 2014).

Dado que existen numerosas enfermedades del sistema nervioso periférico que involucran la falta de comunicación en nervios dañados por ausencia de mielina, la disponibilidad de un gran número de células de Schwann humanas para uso autólogo es indispensable.

JUSTIFICACIÓN

Las células Schwann se generan de la cresta neural durante el desarrollo embrionario y son indispensables en la protección nervios y axones. La obtención de una población “pura” para tratar patologías del sistema nervioso periférico es deseable dado que no se regenera, por ello es importante obtener vías alternativas de células Schwann en el organismo adulto.

HIPÓTESIS

Las células troncales de tejido gingival expresan marcadores de cresta neural por lo que se diferencian a linaje glial o células Schwann.

OBJETIVOS

1. General

Caracterizar los marcadores de cresta neural de células del tejido gingival humano para evaluar el potencial de diferenciación hacia linaje glial representado por células Schwann.

2. Particulares

- Cultivar células de tejido gingival utilizando medio de cultivo que permita su expansión in-vitro.
- Inducir la diferenciación hacia linaje glial.
- Evaluar los cambios morfológicos de las células gingivales antes, durante y después de su diferenciación a células tipo Schwann.
- Caracterizar marcadores de cresta neural en las células gingivales (CD271, SSEA4).
- Caracterizar células gingivales en las etapas de formación de células tipo Schwann con marcadores gliales tipo Schwann (NGN3, SOX9, SOX2, S100B, SOX10, MASH, GFAP) mediante inmunocitoquímica.

METODOLOGÍA

1. Células troncales mesenquimales de tejido gingival

Se utilizaron células mesenquimales de tejido gingival colectadas de biopsias de terceros molares de individuos sanos de edades comprendidas entre 5 y 11 años, bajo carta de consentimiento y con la aprobación del Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM).

2. Cultivo primario de células de tejido gingival

Los dientes fueron colocados en una solución de PBS suplementada con antibiótico y antimicótico (Anti-Anti; Invitrogen 1:100 μ L). Se separó el tejido gingival y se sumergió en medio OptiMEM (Gibco) suplementado con Anti-Anti. Después de la digestión se adicionó medio OptiMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 1%. La suspensión se centrifugó a 1500 rpm por 7 min. El precipitado fue re-suspendido en medio de cultivo suplementado con SFB al 1%, EGF 10 ng/mL (Peprotech), FGF 20 ng/mL (Peprotech) y Anti-anti; cada digestión y las resiembras posteriores fueron sembradas en una caja petri en el mismo medio y fueron mantenidas dentro de una incubadora a 37 °C con 5% de CO₂. Se cambió el medio cada dos días (48 horas). Las células que se adhirieron al plato se mantuvieron en las mismas condiciones y se expandieron durante 10 días hasta alcanzar 80% de confluencia. Las células obtenidas se recuperaron con tratamiento de tripsina 0.4% en PBS durante 5 min. a 37 °C y centrifugadas a 1500 rpm por 15 min que fueron utilizadas para ensayos de marcadores mesenquimales y neuronales.

3. Cultivo de células mesenquimales de tejido gingival

Una vez que se realizó el cultivo primario de células de tejido gingival, las células fueron sembradas en cajas petri con 3 mL de medio de cultivo y SFB al 2%. Luego de la siembra se cambió el medio de cultivo cada 48 horas hasta alcanzar confluencia de un 70% (aprox. 2×10^6 células).

Las células fueron levantadas nuevamente con dispasa y fueron resembradas a una densidad de 2×10^5 células por caja, para ensayos de citometría de flujo e inmunocitoquímica.

4. Purificación de ARN

Una vez que las células se resembraron y se tuvo la densidad adecuada se levantaron con tripsina y se centrifugó a 1,500 rpm durante 15 min. Se retiró el sobrenadante, se tomó el pellet de células y se agregó 2 mL de Trizol, se dividieron en dos tubos de ensayo (aprox. 1 mL c/u) se esperó 5 minutos y se agregó 200 μ L de cloroformo. Se esperó 3 min y se centrifugó a temperatura ambiente a 10,000 rpm durante 10 minutos. Se tomó 400 μ L de la primera fase y se agregó isopropanol (300 μ L) esperando 10 min. Se centrifugó a -4°C a 14,000 rpm durante 10 min, repitiendo el paso y centrifugando a 14,000 rpm por 15 minutos. Se eliminó el etanol y se centrifugó por 1 minuto, eliminando por capilaridad el exceso de etanol X2. Se agregó 85 μ L de agua libre de RNA para realizar la primera cuantificación. Posteriormente, se agregó 10 μ L de DNase I Buffer, 10 μ L de DNASE se dejó reposar 15 min a temperatura ambiente y se agregó 10 μ L de EDTA, colocando la muestra en el termociclador a 65° por 10 min y se volvió a cuantificar.

5. Preparación del medio de cultivo para diferenciación a linaje glial

Se realizaron modificaciones del medio de cultivo basado en Sakaue (2015) para diferenciación hacia linaje glial tipo Scwhann. El diseño de medio de cultivo constó de 3 fases (día -3, día 0, día 3) con un pretratamiento y exposición a factores de crecimiento. Se utilizó un pre-tratamiento de las células gingivales con Recombinante Humano Sonic Hedgehog (rhSHH), un inhibidor selectivo de la enzima glucógeno sintasa quinasa 3 (CHIR99021), y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) durante 48 horas (día 3 a día 1: D-3 a D-1). A partir del día 0 (D0) las células gingivales se cultivaron con un inhibidor de factor de crecimiento transformante beta quinasas (SB431542), activina (ALK), ácido retinoico (RA) y β -mercaptoetanol (BME) por 24 horas. Después con suero fetal bovino (FBS) al 10% por 72 horas sustituyéndolo por FBS al 1% en los siguientes días. Enseguida se añadieron al medio de cultivo los factores FGF2, PDGF-BB, Neurogulin-1 (NRG1) y Forkolin (Figura 20). Las células fueron cultivadas durante toda la diferenciación en Medio Opti-MEM, solución anti-crecimiento bacteriano y ácido ascórbico. El medio de cultivo se cambió en fresco cada 48 horas.

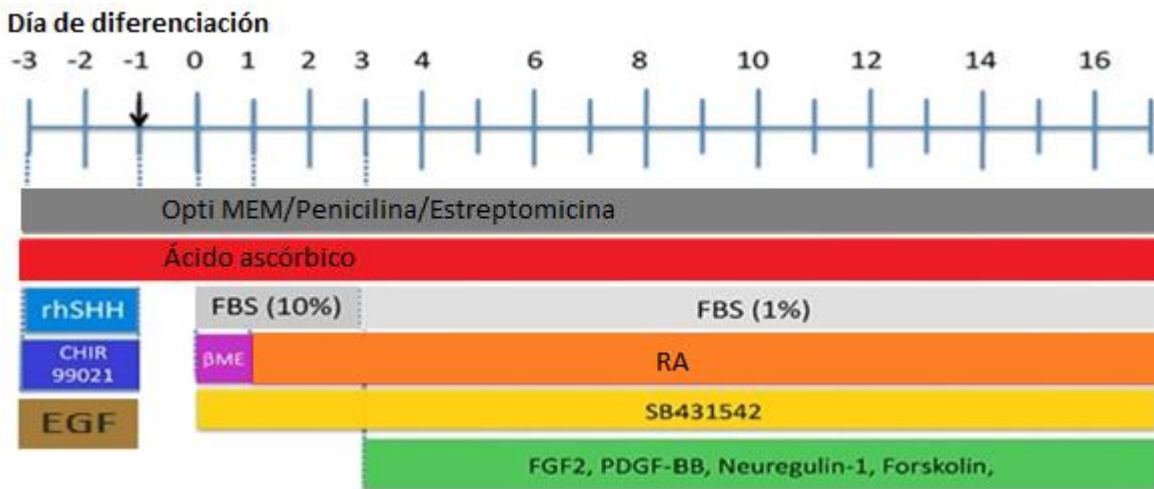


Figura 22. Diseño experimental para medio de cultivo en la diferenciación glial (modificado de Sakaue et al., 2015).

6. Caracterización de las células gingivales

Por las técnicas de inmunofluorescencia y citometría de flujo mediante la expresión de marcadores mesenquimales, neuronales y gliales.

6.1 identificación de marcadores mesenquimales y neuronales por citometría de flujo

El marcaje para citometría de flujo se basó en el protocolo adjunto de cada anticuerpo. En resumen, las células fueron llevadas a suspensión homogénea y se resuspendieron 5×10^5 células en 100 μL de buffer para citometría, el cual consiste en PBS suplementado con EDTA 2 mM y albúmina sérica bovina (BSA) al 0.5%. Inmediatamente se adicionaron 2 μL de anticuerpo marcado, se mezcló suavemente por pipeteo y se incubó a 4°C durante 15 minutos. Posteriormente se adicionaron 2 mL de buffer y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado células en 500 μL de PBS suplementado con EDTA 2 mM y 100 μL de paraformaldehído al 4%. La suspensión celular fue analizada inmediatamente por citometría de flujo, todas las mediciones de células se realizaron utilizando el *Attune acoustic focusing cytometer*.

6.2 Identificación de marcadores gliales por inmunofluorescencia

Las células gingivales fueron colocadas en una caja de 96 pozos (aproximadamente 5×10^3 células en cada pozo) una vez que se adhirieron a los pozos fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 min. se lavó con 100 μL de PBS (3 veces) y posteriormente se permeabilizó con buffer de permeabilización (Suero 5%, PBS 1X, 0.3% Tritón) durante 10 min, se lavó por tres ocasiones más y se agregó el anticuerpo primario en PBS suplementado con buffer para anticuerpo primario (0.1% suero, PBS 1X, 0.15% Tritón). Finalmente se incubó a 4°C durante la noche (aproximadamente 12 horas) y se lavó por tres veces con PBS.

Después de la incubación, se diluyó el anticuerpo secundario a 1:1500 en buffer para anticuerpo secundario (PBS 1X, 5% suero) agregando el volumen necesario para adicionar 100 μ L a cada pozo. Se incubó a temperatura ambiente durante una hora fuera del alcance de la luz y luego se lavó tres veces PBS. Se adicionaron 200 μ L de solución DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 100 mM y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. fuera del alcance de la luz. La señal de fluorescencia fue analizada utilizando un microscopio de fluorescencia invertido (*Olympus modelo IX71*).

RESULTADOS

1. Morfología inicial

Luego de cultivar las células de tejido gingival en medio de cultivo con suero al 2%, las células gingivales conservaron su morfología alargada fibroblastoide adhiriéndose a las cajas petri característica de mesenquimales como se observa en la Figura 23.

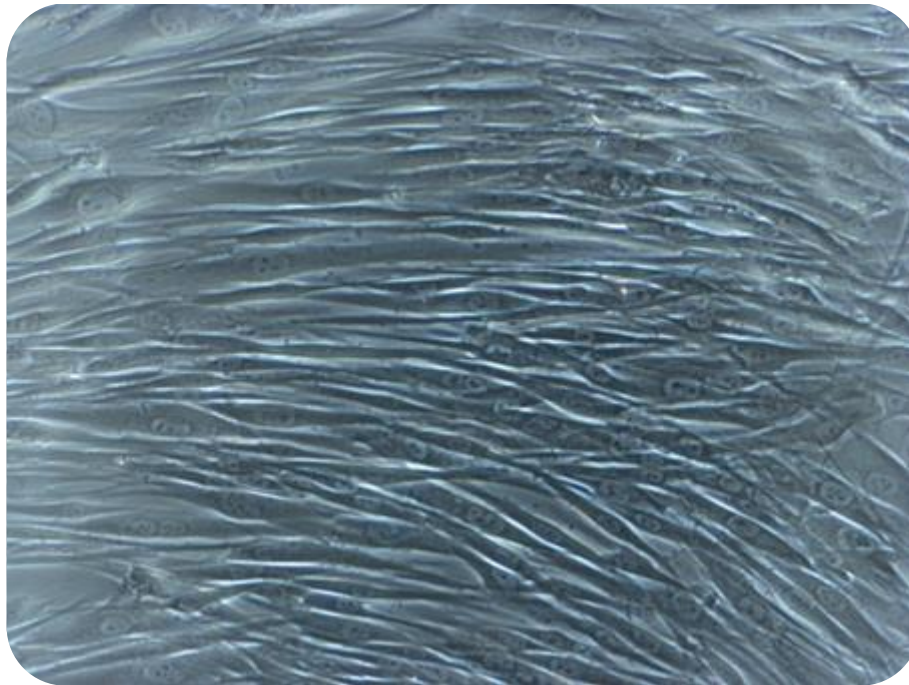


Figura 23. Células fusiformes de tipo mesenquimal. Aisladas de tejido Gingival en cultivo con FBS al 2% con morfología fibroblastoide.

2. Electroforesis en gel. Purificación de ARN

El análisis reportó un grado de pureza promedio 2,086 260/280 en células mesenquimales de tejido gingival, como se muestra en la cuadro 1 de la derecha.

Cuadro 1. ARN Gingival

Muestra 1	Muestra 2	
0,24	0,24	260
0,115	0,115	280
2,085	2,088	260/280
191,744	192,098	ng/ μ L

3. Morfología antes y durante la diferenciación gingival a glial

Se observó la transición de células gingivales a células gliales maduras a partir de D0 después del tratamiento con rhSHH, CHIR99021 y EGF las células continuaron sin cambios conservando la morfología alargada fibroblastoide característica de mesenquimales de las células gingivales. Después de realizar la manipulación de vías de señalización WNT y SHH, las células se cultivaron con SB431542, ALK, RA y BME y continuaron proliferando hasta D3. A partir de D3 se agregaron los factores de inducción glial FGF2, PDGF-BB, Neurogulin-1 (NRG1) y Forkolin al cultivo. Las células comenzaron a cambiar de morfología D5 estrellada, en D8 comenzaron a observarse prolongaciones, D15 la morfología continuo tipo estrellada característica de células gliales hasta D21 donde se alcanzó la maduración.

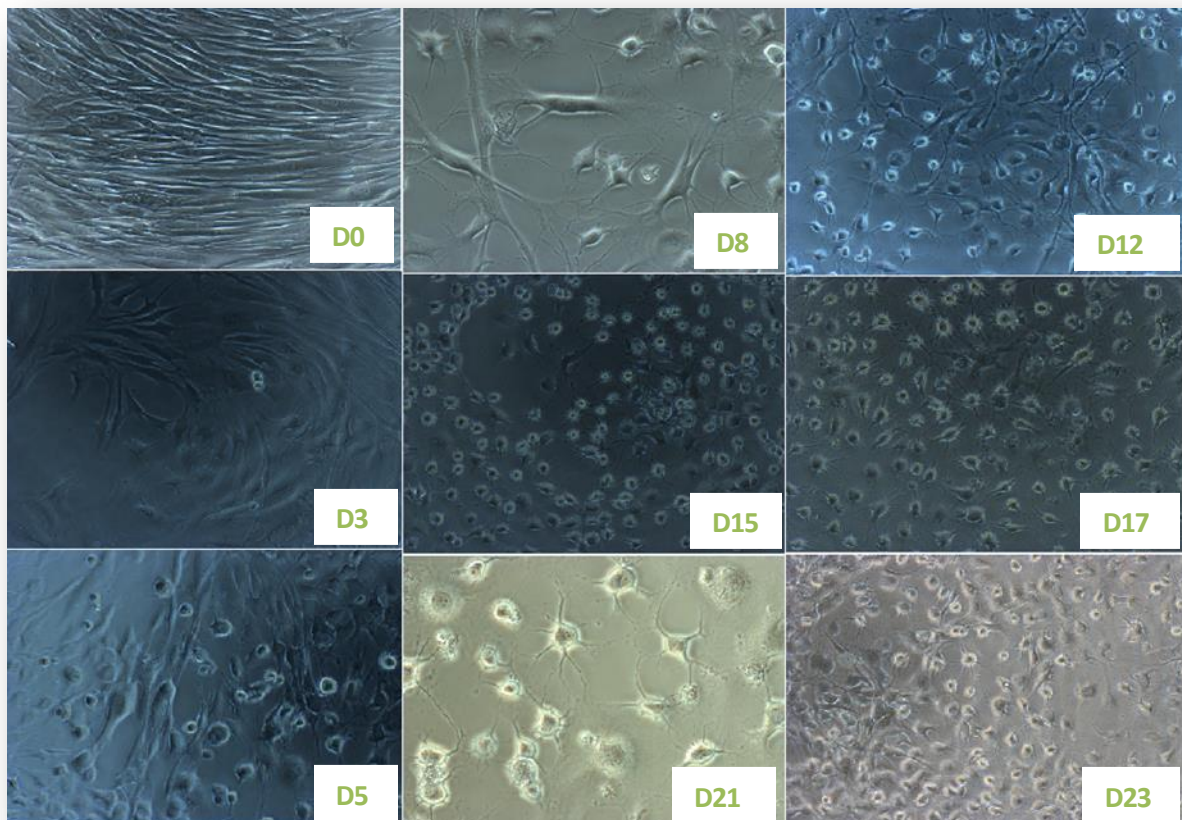


Figura 24. Morfología celular antes y durante la diferenciación a linaje glial.

4. Expresión de marcadores neurales y mesenquimales por citometría de flujo

Se observa la expresión del marcador de cresta neural (CD271) mayor en cultivo de células gingivales libres de FBS con 50.4% sobre 45.6% con FBS en la Figura 25 y cuadro 2, mientras que la expresión de los marcadores mesenquimales (CD73, CD44, CD105 y SSEA4) es mayor en porcentaje en los cultivos de células gingivales con FBS (Figuras 26-27 y Cuadro 2) que libres de FBS.

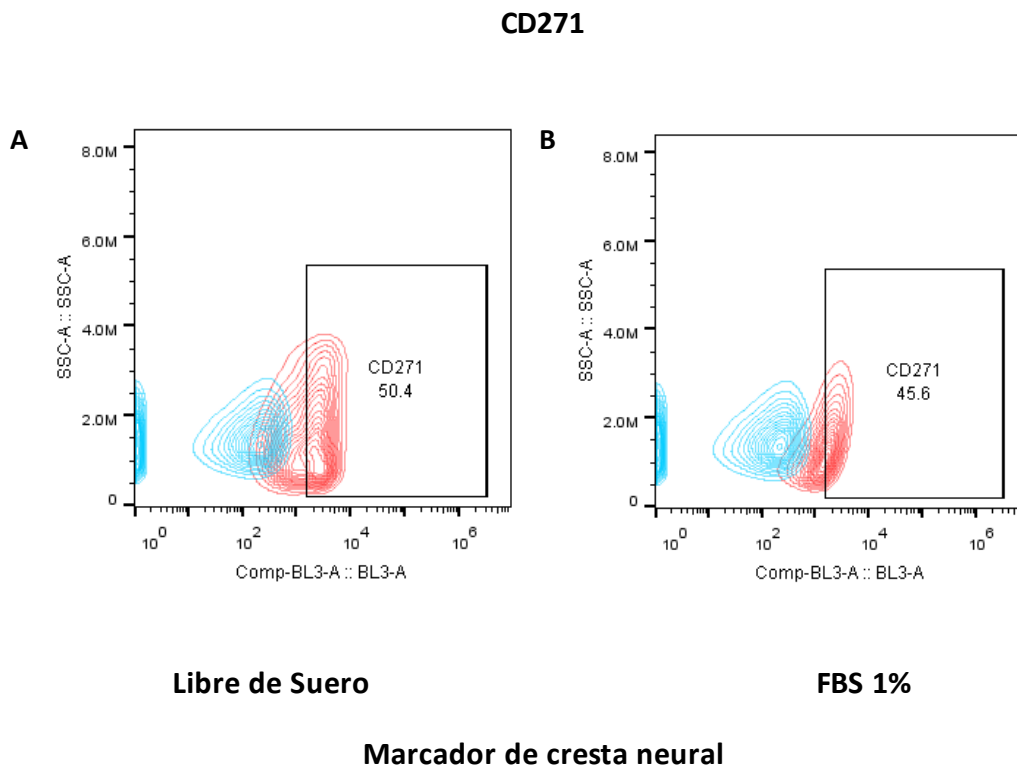


Figura 25. Expresión del marcador de cresta neural CD271 (A) en cultivo de células gingivales libre de FBS o en presencia de FBS (B)

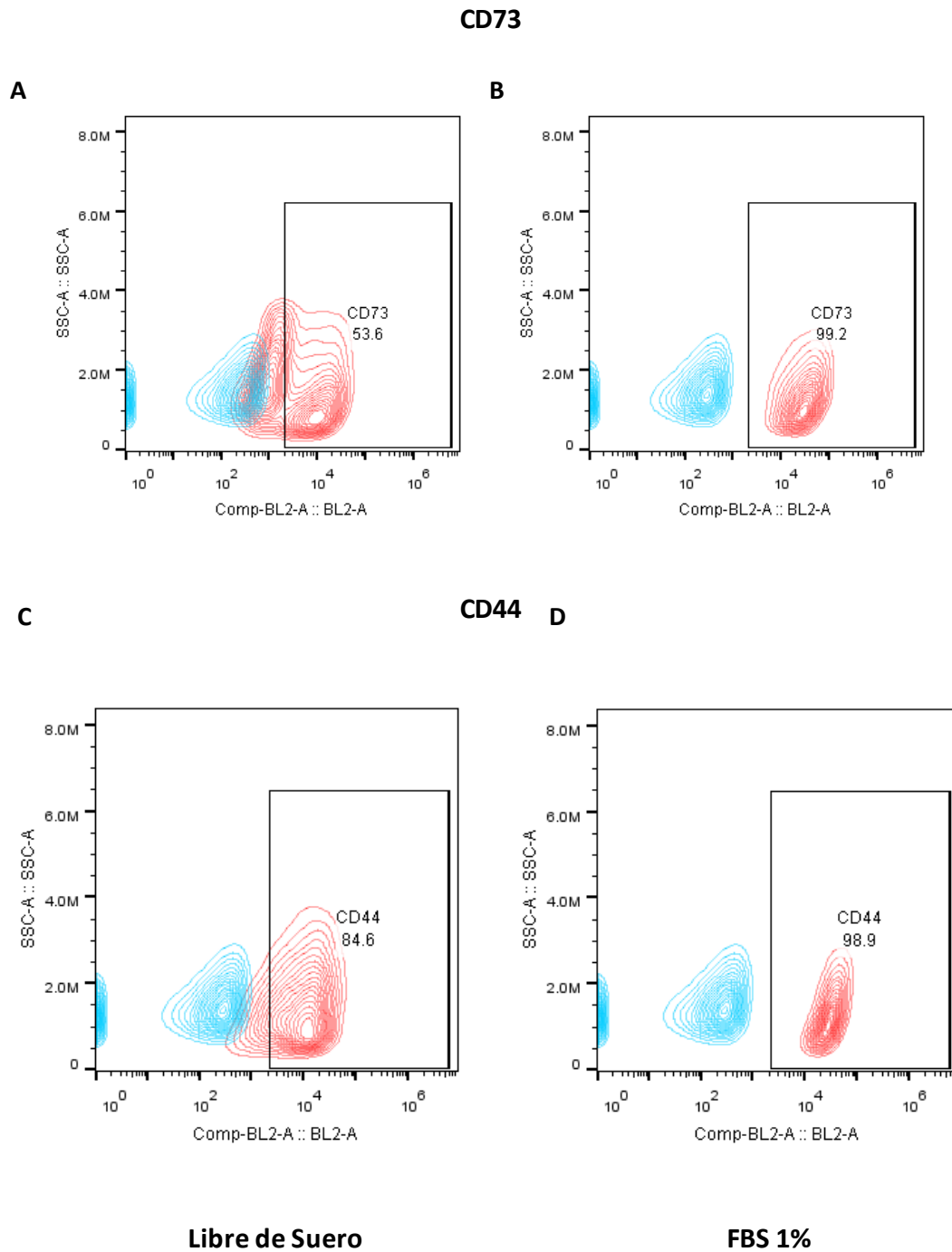


Figura 26. Expresión de marcadores mesenquimales CD73 y CD44 en cultivo de células gingivales libres de FBS (A y C) o en presencia de FBS (B y D).

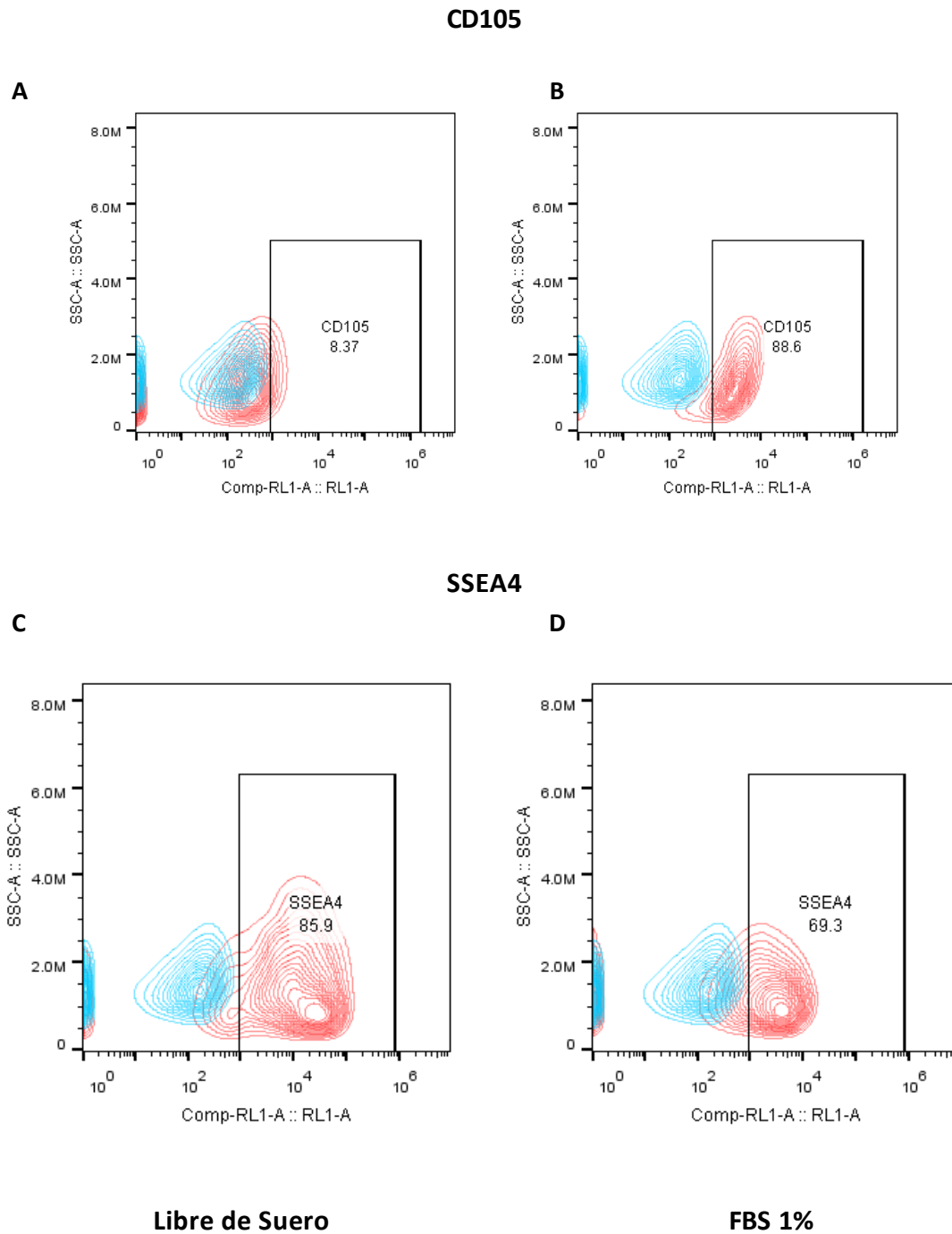


Figura 27. Expresión de marcador mesenquimales CD105 y SSEA4 en cultivo de células gingivales libres de FBS (A y C) o en presencia de FBS (B y D).

Cuadro 2. Porcentaje de los marcadores en presencia y ausencia de FBS por medio de citometría de flujo.

Marcador	Libre de suero	FBS 1%
CD271	50.4	45.6
CD73	53.6	99.2
CD44	84.6	98.9
CD105	8.37	88.6
SSEA4	85.9	69.3

* Expresadas en porcentaje (%)

5. Expresión de marcadores NGN3, SOX9, SOX2, S100B, SOX10, MASH y GFAP mediante Inmunofluorescencia

La expresión de los marcadores NGN3, SOX9, SOX2, S100B, SOX10, MASH y GFAP antes (D-3), durante (D0) y después (D3) del tratamiento con CHIR, SHH y EGF de la diferenciación de las células gingivales a células gliales, en las que es notorio el contraste del núcleo (DAPI). Se observa la expresión de NGN3 Y MASH a nivel nuclear y SOX9, S100B, SOX 10 en citoplasma de células gingivales antes del tratamiento, SOX2 se expresó en citoplasma justo después del tratamiento, desapareció NGN3 a nivel nuclear y SOX10 se localizó ahora a nivel nuclear. Una vez agregados los factores de diferenciación SB431542, activina, FGF2, PDGF-BB, Neurogulin-1 y Forkolin se expresó también GFAP y SOX2 y MASH a nivel nuclear.

Expresión de NGN3

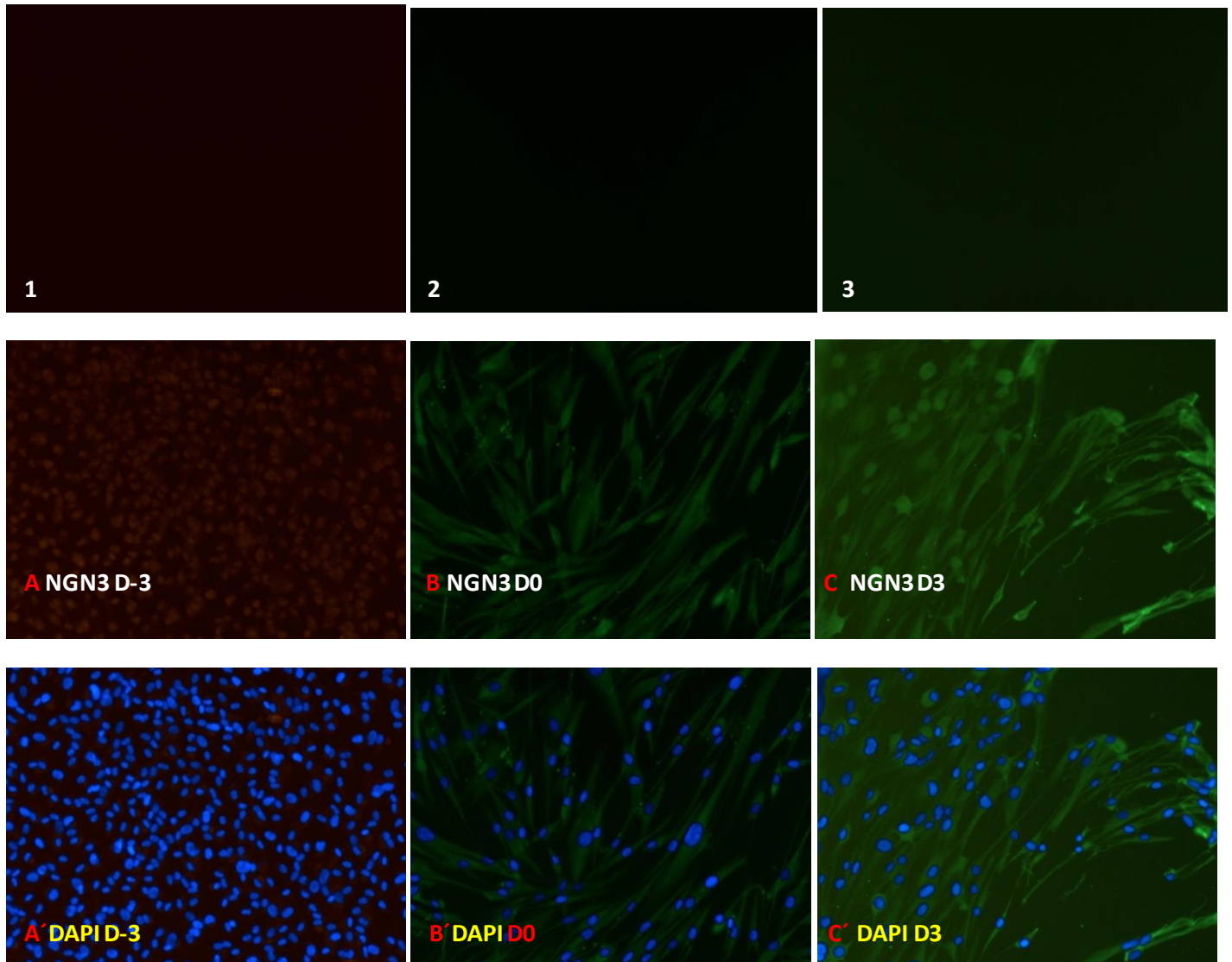


Figura 26. Expresión de NGN3 durante la diferenciación gingival a glial. Todas las células presentan inmunofluorescencia de NGN3. A (D-3) células gingivales, B (D0) células pretratadas con SHH y CHIR99021. C (D3). A'B'C' tinción del núcleo celular. 1, 2 y 3 grupos control negativos.

Expresión de GFAP

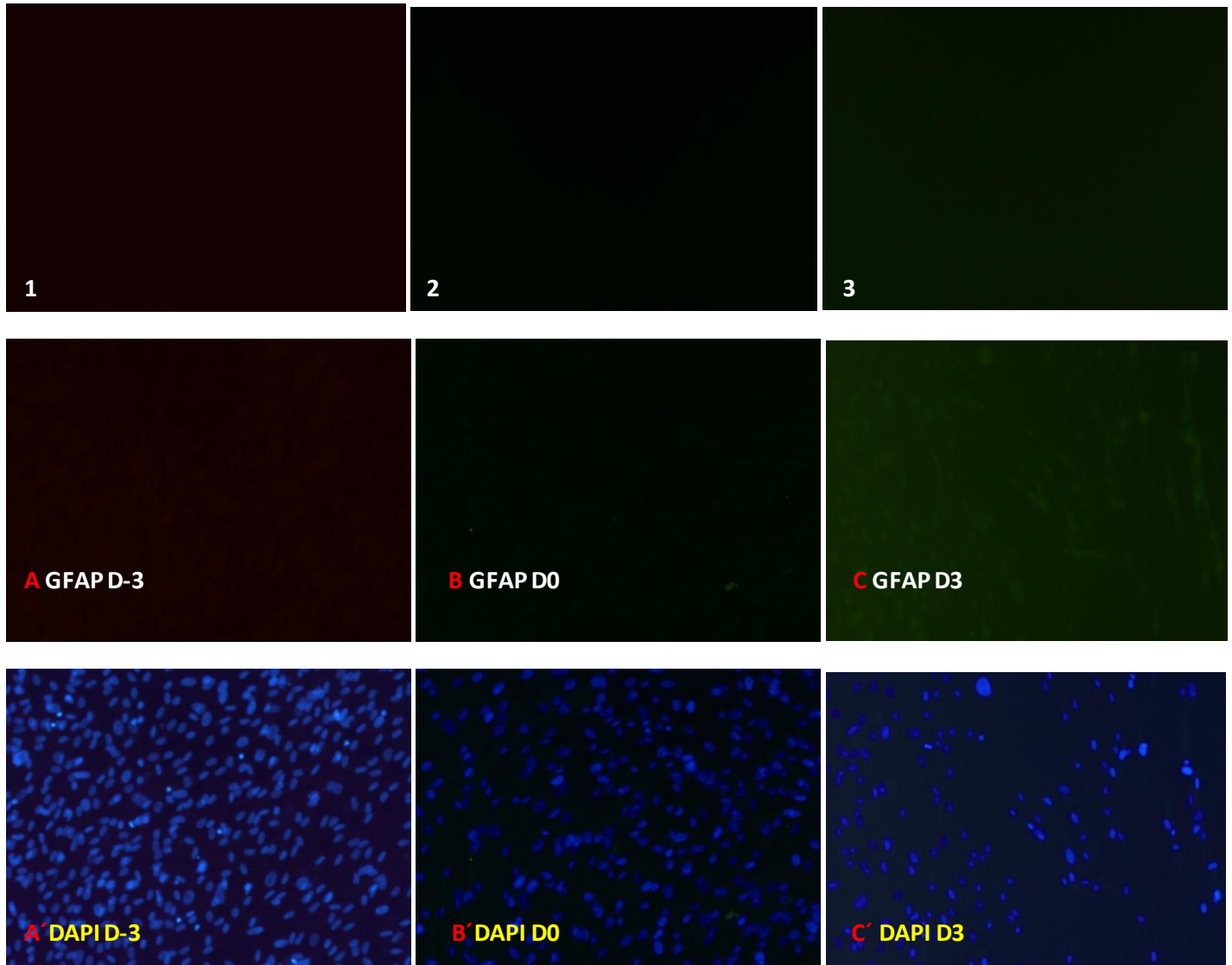


Figura 27. Expresión de GFAP durante la diferenciación gingival a glial. La inmunofluorescencia de GFAP se presenta a partir de D3. A (D-3) células gingivales, B (D0) células tratadas con SHH y CHIR99021. C (D3). A'B'C' tinción del núcleo celular. 1, 2 y 3 grupos control negativos.

Expresión de MASH

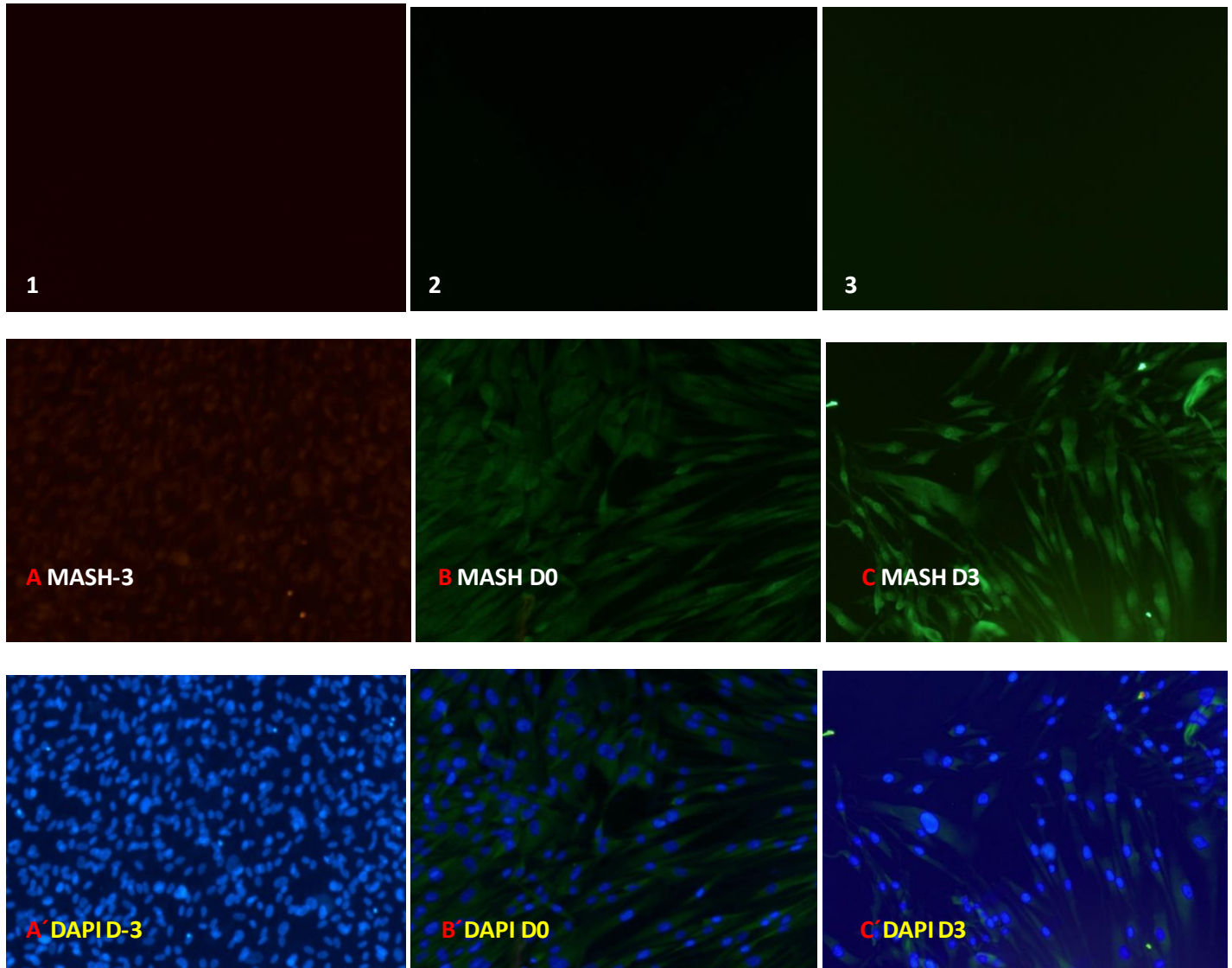


Figura 28. Expresión de MASH durante la diferenciación gingival a glial. Todas las células presentan inmunofluorescencia de MASH, A y C situándose en núcleo celular. A (D-3) células gingivales, B (D0) células tratadas con SHH y CHIR99021. C (D3). A'B'C' tinción del núcleo celular. 1, 2 y 3 grupos control negativos.

Expresión de S100B

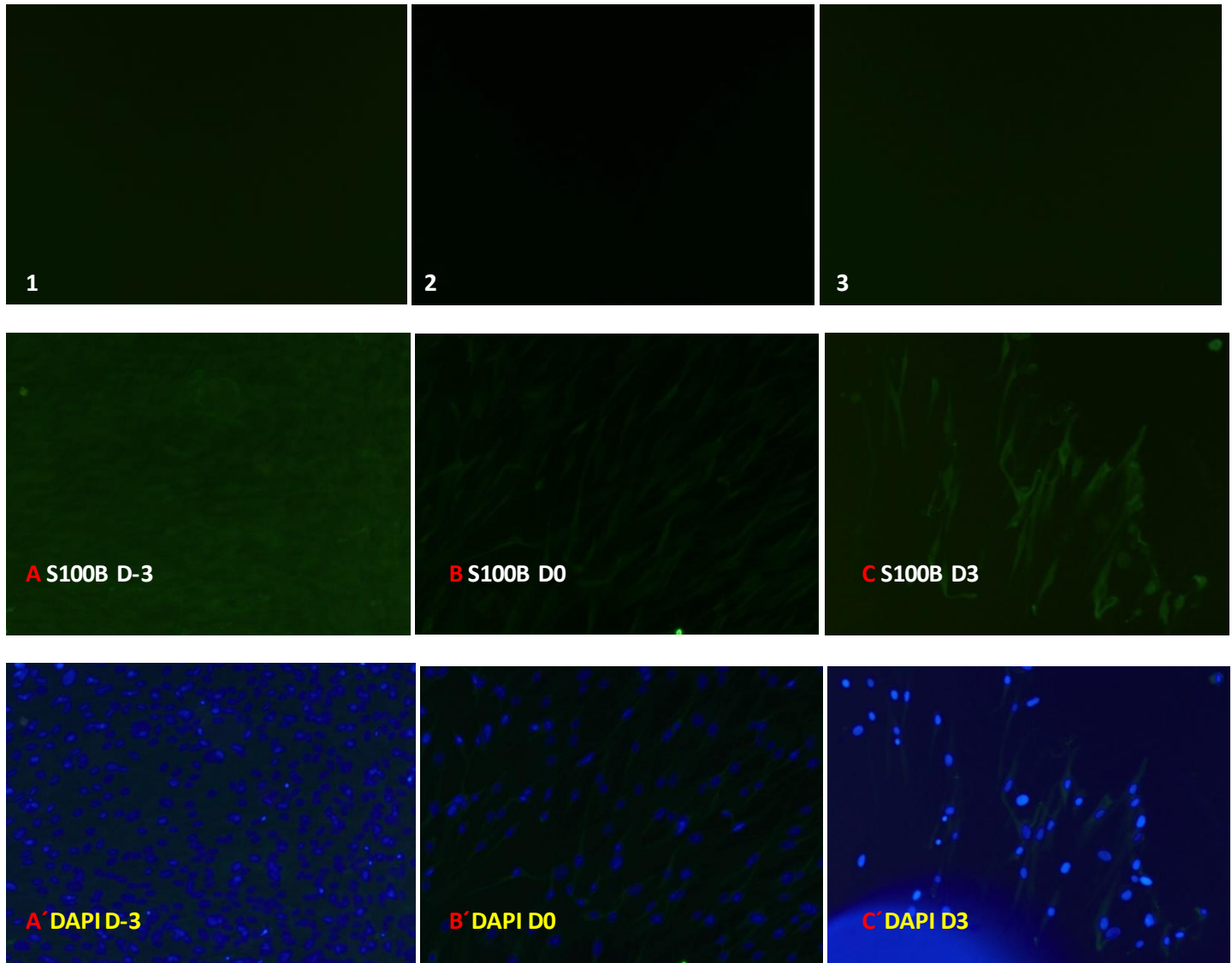


Figura 29. Expresión de S100B durante la diferenciación gingival a glial. Todas las células presentan inmunofluorescencia de N3. A (D-3) células gingivales, B (D0) células tratadas con SHH y CHIR99021. C (D3). A'B'C' tinción del núcleo celular. 1, 2 y 3 grupos control negativos.

Expresión de SOX2

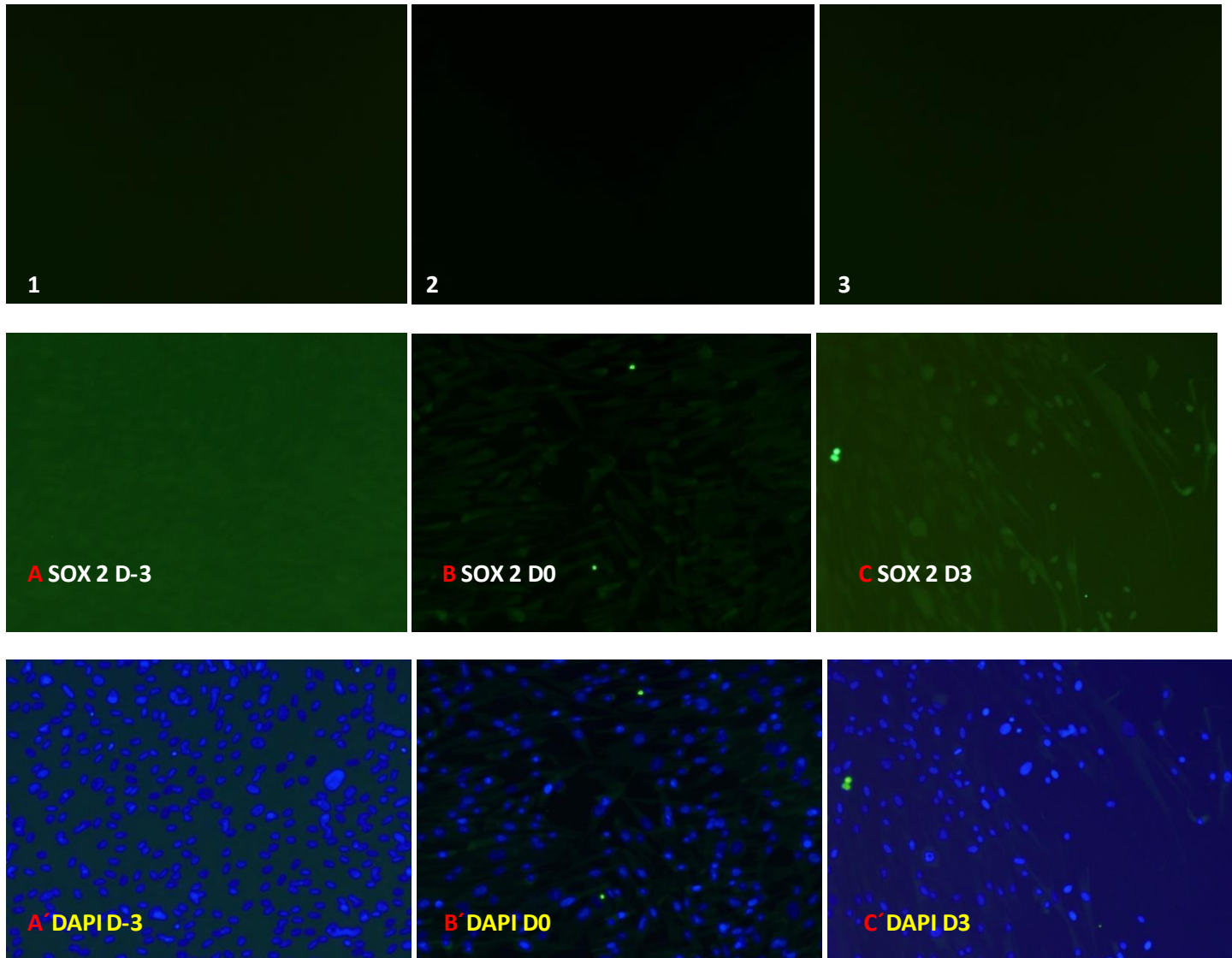


Figura 30. Expresión de SOX 2 durante la diferenciación Gingival a Glial. A (D-3) células gingivales, B (D0) células tratadas con SHH y CHIR99021. C (D3). A' B' C' tinción del núcleo celular. 1, 2 y 3 grupos control negativos.

Expresión de SOX9

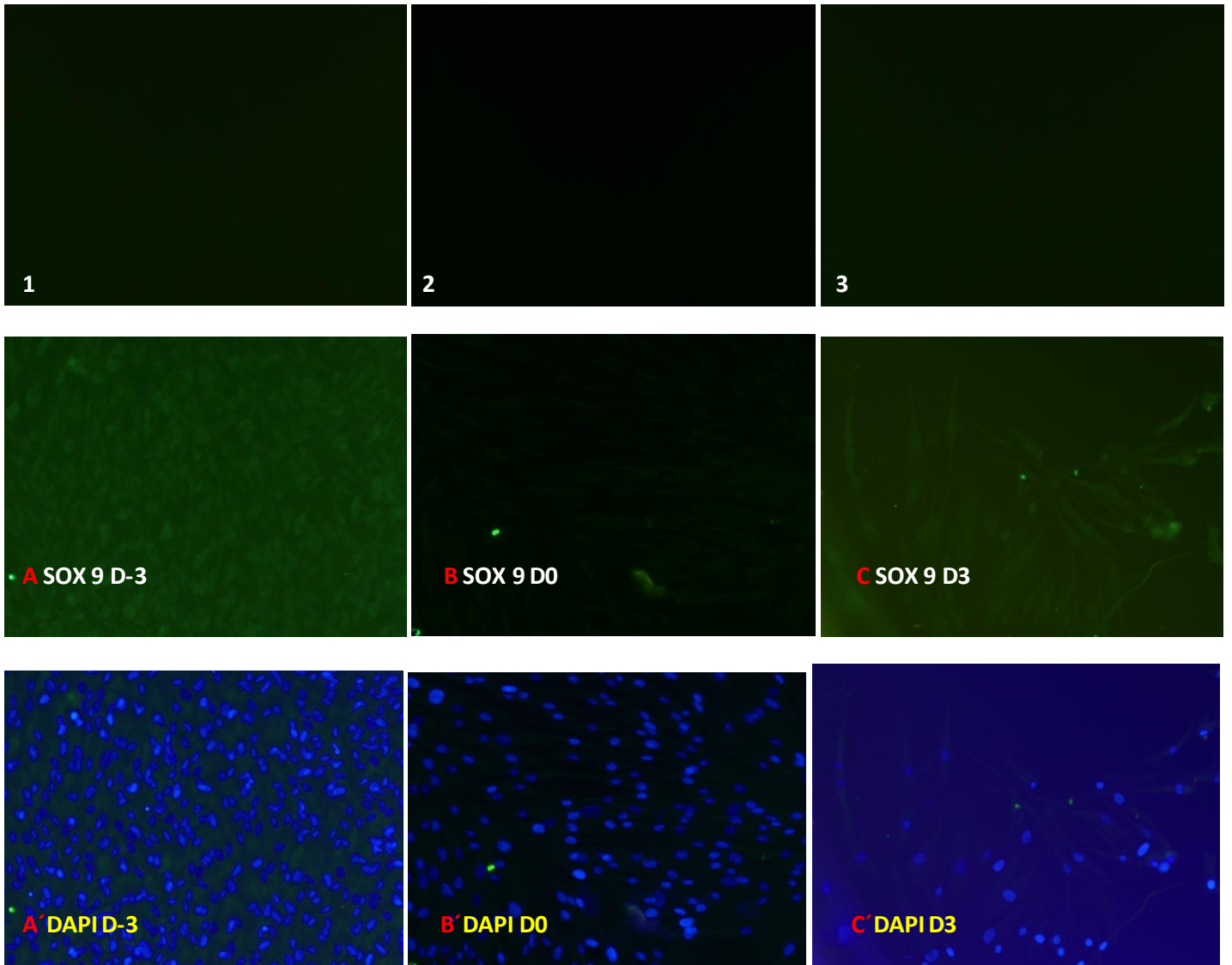


Figura 31. Expresión de SOX 9 durante la diferenciación gingival glial. A (D-3) células Gingivales, B (D0) células tratadas con SHH y CHIR99021. C (D3). A'B'C' tinción del núcleo celular. 1, 2 y 3 grupos control negativos.

Expresión de SOX10

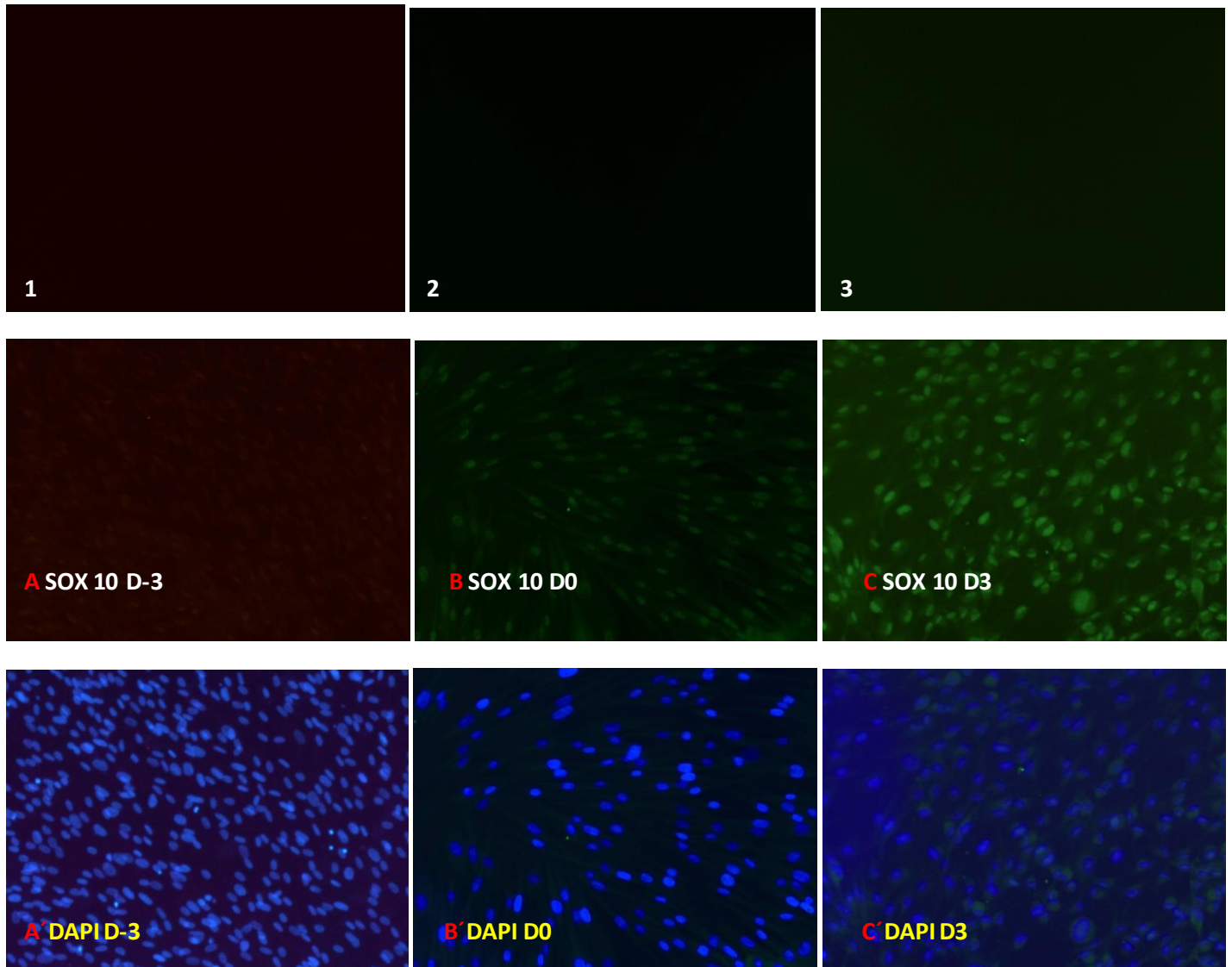


Figura 32. Expresión de SOX 10 durante la diferenciación gingival a glial. A (D-3) células gingivales, B (D0) células tratadas con SHH y CHIR99021. C (D3). A'B'C' tinción del núcleo celular. 1, 2 y 3 son grupos control negativos.

Cuadro 3. Expresión de marcadores por medio de inmunofluorescencia.

Marcador	Día -3	Día 0	Día 3
NGN3	+	+	+
SOX9	+	+	+
SOX2	-----	+	+
S100B	+	+	+
SOX10	+	+	+
MASH	+	+	+
GFAP	-----	-----	+

*(+) positivo

*(-) negativo

Cuadro 4. Sitio de expresión de marcadores analizados por Inmunofluorescencia

Marcador	Día -3	Día 0	Día 3
NGN3	C, N	C	C
SOX9	C	C	C
SOX2	-----	C	C, N
S100B	C	C	C
SOX10	C	C, N	C, N
MASH	C, N	C	C, N
GFAP	-----	-----	C

*C=citoplasma

*N=Núcleo

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los tejidos dentales humanos son fuentes de células madre multipotentes de origen de cresta neural cuyo potencial regenerativo es un foco de amplios estudios. El medio de expansión que contenía un 2% de FBS permitió obtener una población GMSC epitelial/mesenquimal que muestra una gran proliferación, capacidad de diferenciación clonogénica y de múltiples linajes.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que los requisitos específicos de las células de la cresta neural, la señalización WNT activa y TGF, son necesarios para la actividad de los caracteres de la cresta neural en las células gingivales para diferenciarse a tipo glial, lo cual se ve expresado en el cambio de morfología celular durante el tratamiento y hasta la maduración, iniciando con la morfología epitelial/mesenquimal fibroblastoide de células mesenquimales a morfología estrellada típica de células gliales.

Al utilizar suero durante el cultivo de células, hay una mayor expresión de marcadores mesenquimales, lo que nos dice que con presencia de suero eleva la probabilidad de diferenciación a linaje mesenquimal. En contraste, utilizando un medio de cultivo libre de suero la expresión de marcadores durante el cultivo de células gingivales (expansión) es mejor en cuanto porcentaje para tomar el linaje neural.

La concentración de suero bovino fetal (FBS) usada en las células gingivales de entre el 10% y el 2% en el medio de cultivo para la diferenciación y expansión ([Gazarian y Ramirez-Garcia, 2017](#)) no impidió la toma de linaje neural sobre el mesenquimal mediante un tratamiento de neuroinducción, que consiste en EGF y bFGF, el cual induce una célula de tipo neural ([Fortino et al., 2014](#)) lo que permite la diferenciación de un subconjunto de células gliales y la expresión de un gen clave para la toma de destino a linaje glial, SOX10, mediante la manipulación de WNT por con un tratamiento de forma transitoria con SHH y CHIR99021 y exposición de las células a factores de

crecimiento. El SOX10 desempeña un papel central en la toma de Schwann destino celular y la diferenciación (Kelsh, 2006).

SOX10 también está implicado en la regulación de la expresión de las proteínas de la mielina P0 y MBP y es de origen nuclear *in vivo* en los nervios maduros y en muñones distales después de transección del nervio (Reiprich et al., 2010).

La diferenciación de células de Schwann se observó con la presencia continua de SB431542 (inhibidor selectivo y potente de ALK4, 5 y 7 (ACVR1B, TGFBR1 y ACVR1C) (Sakaue, 2015). La inclusión de SB431542 también fue necesaria para guiar células madre lejos del linaje de células neuronales, para inhibir la apoptosis relacionada con el TGF temprano en la diferenciación de células de Schwann y para evitar la inhibición de la SOX10 y la expresión de la proteína de mielina P0 por la señalización de TGF (Morgan et al., 1994; Jessen y Mirsky, 2005; Kelsh, 2006).

La expresión de SOX10 localizado a nivel nuclear en el D0 con el tratamiento con CHIR99021, SHH y EGF hace propicio la toma de linaje glial, indicada por la aparición de MASH y posteriormente con los factores de diferenciación SB431542, activina, FGF2, PDGF-BB, Neurogulin-1 y Forkolin se expresaron GFAP, S100B y SOX2 marcadores de células gliales tipo Scwhann.

El fenotipo observado y la inestabilidad de la expresión génica refleja la plasticidad y el potencial del linaje derivado de la cresta neural (GMSC) en las células Schwann. La identificación futura de los factores que inducen EMT y MET permitirá emplearlos para modular genes de identidad de cresta neural y evaluar su papel en aplicaciones regenerativas de células dentales. (Gazarian y Ramirez-Garcia, 2017)

CONCLUSIONES

- ▶ El cultivo de células gingivales en medio con FBS activa los marcadores mesenquimales CD73, CD105, CD90 y no expresa marcadores de cresta neural.
- ▶ La inhibición de TGF β y activación de la ruta WNT con inhibidor de GSK3 y en presencia de SHH y factores de crecimiento FGF2 en el medio de cultivo sin suero activa la expresión de marcadores de cresta neural CD271 y SOX10 en las células gingivales.
- ▶ Se obtuvo una población de células con marcadores gliales tipo Schwann a partir de células gingivales.

ANEXO 1. PROTOCOLOS

PURIFICACIÓN DE ARN

El aislamiento de ADN a partir de cualquier muestra biológica se realiza a partir de un extracto en el que se solubiliza y del que posteriormente se eliminan todo tipo de moléculas biológicas acompañantes, glúcidos, lípidos y proteínas al eliminarlas forzando su desnaturalización y por medio de incubaciones con proteasas para que se degraden a péptidos y aminoácidos libres que serán fácilmente eliminados con posterioridad. Las etapas finales de la purificación siempre se basan en la precipitación del ADN, lo que se consigue fácilmente con disoluciones alcohólicas en presencia de sales que produzcan una fuerza iónica adecuada.

Extracción y cuantificación de ARN

1. Tomar el pellet de células
2. Agregar 2 ml de Trizol
3. Dividir en 2 tubos (1mL cada uno)
4. Esperar 5 minutos
5. Agregar 200ul de cloroformo y vortexear
6. Esperar 3 min
7. Centrifugar a 10,000 rpm 10 minutos
8. Tomar 400ul de la primera fase
9. Agregar isopropanol (300 µL) y agitar
10. Esperar 10 min
11. Centrifugar a -4 a 14,000 rpm durante 10 min
12. Repetir el paso
13. Centrifugar a 14,000 rpm 15 minutos
14. Eliminar el etanol
15. Centrifugar por 1 minuto
16. Eliminar con una punta y por capilaridad el exceso de etanol X2
17. Agregar 85 µl de Agua libre de RNA
18. Cuantificar

19. Agregar 10 μ L de DNase I Buffer
20. Agregar 10 μ L de DNASE
21. Reposar 15 min Temp Ambiente
22. Agregar 10 μ L de EDTA
23. Colocar en el termociclador a 65° 10 min
24. Volver a cuantificar.

PROTOCOLOS

DIFERENCIACIÓN GLIAL

Medio de cultivo (día -3) pretratamiento

- OptiMEM (6mL)
- rhSHH 500 ng/mL –5,000x
- CHIR99021 500nM
- EGF 100 ng/mL
- Anti-Anti 500 µl/50mL
- Ac. Asc 42 µl/50mL

Medio de cultivo (día 0)

- OptiMEM
- FBS 10%
- BME 1mM
- SB931542 10 µM
- Anti-Anti 500 µl/50mL
- Ac. Asc 42 µl/50mL

Medio de cultivo (día 1 y 2)

- OptiMEM 10%
- SB431542 10 µM
- RA 35ng/mL
- Anti-Anti 500 µl/50mL
- Ac.asc 42 µl /50mL

Medio de cultivo (día 3)

- OptiMEM
- FBS 1% 60 µL
- rhFGF2 10 ng/mL
- rhPDGF-BB 5 ng/mL
- Forskolin 5 µM
- rhNRG1 200 ng/mL
- RA 35ng/mL
- Anti-Anti 500 µl/mL
- Ac. Asc 42 µl /50mL

PROTOSCOLOS

CITOMETRÍA DE FLUJO

La Citometría de flujo se basa en medir características de cada elemento particulado en suspensión (principalmente celular), cuando se le incide un rayo de luz. La técnica necesita de un equipamiento sofisticado y relativamente complejo que combina un sistema lumínico (rayo de luz de tipo láser y combinación de espejos, filtros y cristales que llevan la señal luminosa hasta receptores fotomultiplicadores), un sistema fluídico (las células en suspensión e individualizadas, es decir, sin que se agrupen, se llevan por un circuito líquido a una cámara de flujo en la que se define un flujo laminar por el que una célula se sitúa de manera precisa y estable frente al rayo lumínico) y un sistema electrónico/informático (recoge, maneja y permite representar y cuantificar todos los parámetros recogidos) para la evaluación de los distintos parámetros lumínicos (Otero y González-Navarro, 2014).

Los parámetros que típicamente se miden de forma simultánea por cada célula son:

1. Dispersión frontal de la luz a 2º (forward scatter), valor proporcional al tamaño celular.
2. Dispersión de la luz ortogonal (side scatter), proporcional a la cantidad de estructuras granulares o complejidad de la célula.
3. Intensidades de fluorescencia a diferentes longitudes de onda.

Preparación para citometría de flujo

1. Levantar células con triple express
2. Centrifugar
3. Eliminar el exceso
4. Ajustar a 1mL con PBS 1X
5. Realizar el conteo en la cámara de Neubauer
6. Volver a centrifugar
7. Eliminar el exceso
8. Agregar 500 μ L de paraformaldehído al 4% por 15 min para fijar
9. Agregar 5 mL de PBS 1X
10. Centrifugar para lavar
11. Eliminar el exceso
12. Agregar 750 μ L PBS + BSA 0.5X y pipetear
13. Repartir en tubos de 100 μ L
14. Etiquetar los tubos y control
15. Tomar tubos y agregar 100 μ L de PBS + BSA y 2 μ L de anticuerpo
16. Colocar 50 μ L de ARN
17. Anticuerpo + PBS BSA en los tubos con células
18. Incubar 20 min
19. Agregar PBS 1X+ BSA 0.1 % 1mL
20. 500ul de PBS +BSA + PE, FITC APC (2 μ L) en tubos
21. Colocar muestras en hielera con tapa
22. Realizar la lectura

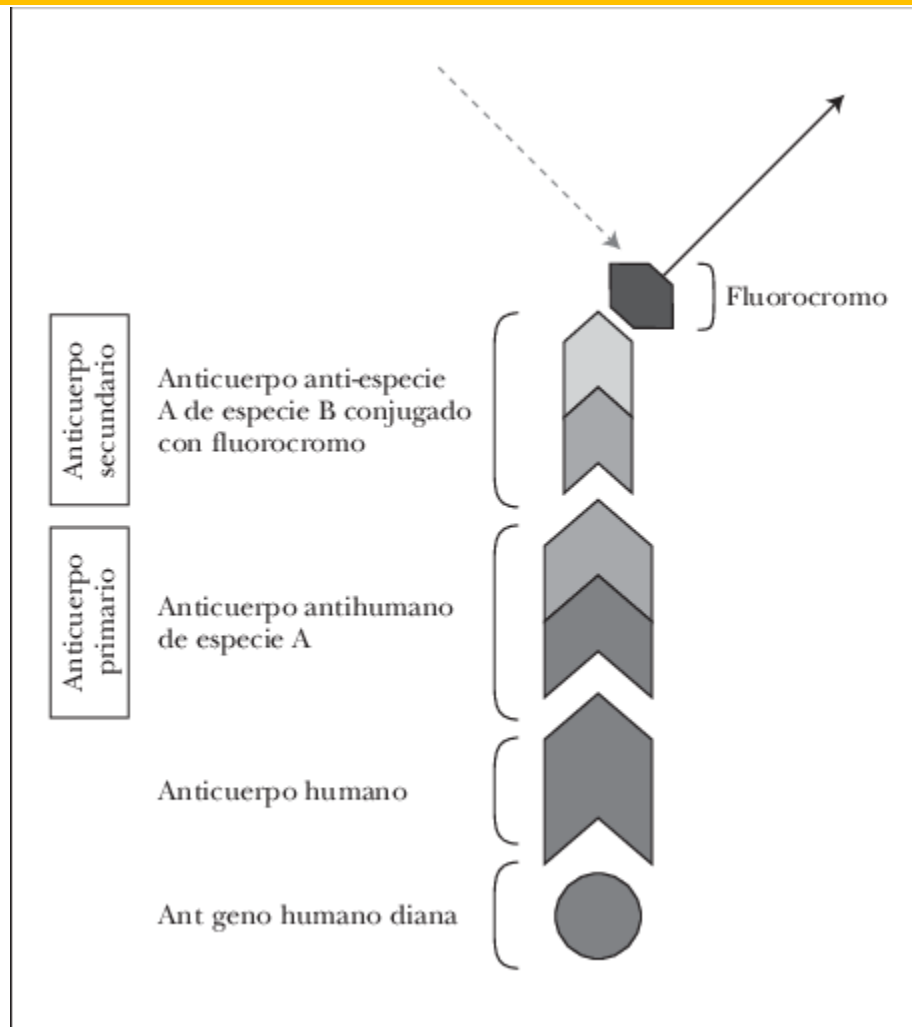
PROTOSCOLOS

INMUNOFLOURESCENCIA

La inmunofluorescencia es un conjunto de técnicas en donde se emplean anticuerpos para detectar y localizar, antígenos específicos en células y/o tejidos por medio de la propiedad de una sustancia de emitir luz cuando es expuesta a radiaciones de baja longitud de onda y alta energía (Fluorescencia). Las radiaciones absorbidas (invisibles al ojo), son transformadas en luz visible, o sea de una longitud de onda mayor a la incidente. La absorción de luz por parte de la molécula de fluorocromo la cual eleva a un estado de excitación en el que contiene mayor energía, la molécula permanece en el estado de excitación por un período de tiempo muy corto. La fluorescencia se produce por el retorno a un nivel de energía menor el cual es acompañado por emisión de luz.

La expresión de proteínas de una célula es dinámica. Esto depende de los estímulos que reciban, los requerimientos energéticos y como ésta interprete los mismos manifestará cambios en la expresión y distribución de las proteínas de su repertorio genético. Los anticuerpos son proteínas que tienen la capacidad reconocer específicamente y unirse con alta afinidad a otras moléculas (antígenos). La molécula que es reconocida por los anticuerpos se denomina antígeno. Cada antígeno tiene al menos un epítipo o región reconocida por un anticuerpo. El antígeno es reconocido por la región variable del anticuerpo parte del antígeno reconocida se denomina epítipo. Cada antígeno suele presentar varios determinantes antigénicos o epítopes

<http://www.iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2017/BioCel/1504124326.pdf>.



(Tomado de <https://www.researchgate.net/figure/Fundamento-de-la-inmunofluorescencia-Tecnica-de-marcaje-indirecto-para-in-fig3-301342809>).

Preparación para inmunofluorescencia

1. Levantar las células con TriPLE express o Tripsina
2. Centrifugar
3. Tomar el pellet y ajustarlo a 1mL
4. Realizar el conteo de células en la cámara de Neubauer
5. Ajustar a 50,000 células en cada pozo (placa de 96 pozos)
6. Añadir Medio de cultivo para expansión
7. Esperar a que se adhieran a la placa

Fijación

1. Eliminar el medio de cultivo de los pozos
2. Hacer 2 lavados con 100 μ L de PBS 1X
3. Agregar 100 μ L de formaldehído al 4% a cada pozo
4. Retirar el paraformaldehído al 4%
5. Colocar 100 μ L de PBS 1X

Permeabilización

- 1) Preparar el buffer de permeabilización (Suero 5%, PBS 1X, 0.3% Tritón)
- 2) Retirar el PBS de los pozos
- 3) Agregar 100 μ L de buffer de permeabilización
- 4) Incubar a temperatura ambiente por 1 hora

Anticuerpo primario

- 1) Preparar el buffer para anticuerpo primario (0.1% suero, PBS 1X, 0.15% Triton)
- 2) Colocar 250 μ L del buffer en tubos de 600 μ L
- 3) Agregar el anticuerpo primario 0.5 μ L al buffer
- 4) Pipetear
- 5) Colocar 100 μ L en cada pozo correspondiente
- 6) Dejar pozos de control
- 7) Sellar con papel parafilm
- 8) Incubar toda la noche a 4°C
- 9) Cambiar a PBS 1X

Anticuerpo secundario

- 1) Preparar el buffer para anticuerpo secundario (PBS 1X, 5% suero)
- 2) Proporción con el anticuerpo 1:1500
- 3) Colocar en los pozos correspondientes al anticuerpo primario
- 4) Incubar 1 hora a temperatura ambiente
- 5) Lavar 2 veces con PBS 1X
- 6) Dejar en PBS
- 7) Observar al microscopio

Observación al microscopio de fluorescencia

- 1) Lavar dos veces con PBS 1X cada pozo
- 2) Añadir 100 μ L de colorante para tinción nuclear
- 3) Observar al microscopio de fluorescencia

ANEXO 2. ANTICUERPOS UTILIZADOS

Cuadro 5. Anticuerpos utilizados en la detección de NGN3, GFAP, MASH, S100B, SOX2, SOX9 y SOX10.

Primario	Secundario	Dilución
Neurogenina 3	Rabbit	1:1250
GFAP	Rabbit	1:1250
MASH	Rabbit	1:1250
S100B	Mouse	1:1500
SOX 2	Mouse	1:1500
SOX 9	Mouse	1:1500
SOX 10	Rabbit	1:1250

- ▶ Anticuerpo secundario
- ▶ Mouse Alexa flour 488 Donkey anti-Mouse
- ▶ Alexa flour 546 goat anti-Rabbit IgG

BIBLIOGRAFÍA

Allodi I, Udina E, Navarro X. (2012). Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog Neurobiol*, 98(1), 16-37.

Arévalo JA, Páez DM, Rodríguez VM. (2004). Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. Publicación científica en Ciencias Biomédicas, 5(8), 101-212.

Baggiolini A, Varum S, Mateos JM, Bettosini D, John N, Bonalli M, Ziegler U, Dimou L, Clevers H, Furrer R, Sommer L. (2015). Premigratory and migratory neural crest cells are multipotent in vivo. *Cell Stem Cell*, 16(3), 314–322.

Baksh D, Song L, Tuan RS. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cel Mol Med*, 8(3), 301-316.

Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Heddwon L. (2017). *Fisiología médica*. México, DF: McGraw-Hill Education, Pp.25.

Batouli S, Miura M, Brahim J. (2003). Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*, 82(12), 976-981.

Beltrán O, Osmarla L, Chaparro O. (2005). Plasticidad y transdiferenciación en células “stem” adultas-revisión. *Med*, 13(1), 10-16.

Bunge MB. (2008). Novel combination strategies to repair the injured mammalian spinal cord. *J. Spinal Cord Med*, 31(3), 262-269.

Caplan AI. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Ortho Res*, 9(5), 641-650.

Carlson BM. (2005). *Embriología humana y biología del desarrollo*. 3a ed. Madrid, España: Elsevier. Pp 393.

Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P, Han J, Rowith DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. (2000). Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*, 127(8), 1671-1679.

Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. (2006). Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodont Res*, 41(6), 547-553.

Curchoe CL, Maurer J, McKeown SJ, Cattarossi G, Cimadamore F, Nilbratt M, Snyder EY, Bronner-Fraser M, Terskikh AV. (2010). Early acquisition of neural crest competence during hESCs neuralization. *Plos One*, 5(11), e13890.

Deng P, Chen QM, Hong C, Wang CY. (2015). Histone methyltransferases and demethylases: regulators in balancing osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Int J Oral Sci*, 7(4), 197-204.

Delgado BA. (2011). ¿Qué es la epigenética? *Ciencia*, 73-82.

Dupin E. (2011). Phenotypic plasticity of neural crest-derived melanocytes and Schwann cells. *Biol Aujourd'hui*, 205(1), 53-61.

Evans GR. (2001). Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *Anat. Rec*, 263(4), 396-404.

Flores CMG, Escobar A. (2011). Normal neuronal migration. *Salud Mental*, 34(1), 61-66.

Fortino VR, Chen RS, Pelaez D, Cheung HS. (2014). Neurogenesis of neural crest derived periodontal ligament stem cells by EGF and bFGF. *J Cell Physiol*, 229(4), 479-488.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6(2), 230-247.

Gazarian K. (2013). Células troncales pluripotenciales inducidas: herramienta para terapia celular y lucha contra el cáncer. *Ciencia*, 66-67.

Gazarian K, Ramírez-García LR. (2017). Human deciduous teeth stem cells (SHED) display neural crest signature characters. *Plos One*, 12(1): e0170321.

Giovannone D, Ortega B, Reyes M, El-Ghali N, Rabadi M, Sao S, Bellard M. (2015). Chicken trunk neural crest migration visualized with HNK1. 117(3), 255-266.

Grigoriou M, Tucker AS, Sharpe PT, Pachnis V. (1998). Expression and regulation of Lhx6 and Lhx7, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. *Development*, 125(11), 2063-2074.

Griffin MF, Malahias M, Hindocha S, Kahn WS. (2014). Peripheral nerve injury: principles for repair and regeneration. *Open Orthop. J*, 8, 199-203.

Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten AP, Robey PG, Shi S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, 81(8), 531-535.

Gutiérrez-Ortiz C, Teus MA. (2010). Patología del nervio óptico
Servicio de Oftalmología. Hospital Universitario Príncipe de Asturias. Madrid, 59-68.

Hall BK. (2008). The neural crest and neural crest cells: discovery and significance for theories of embryonic organization. *J. Biosci*, 33(5), 781-793.

Huang GT, Gronthos S, Shi S. (2009). Mesenchymal stem cell derived from dental tissues vs. Those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*, 88(9), 792-806.

Imai H, Osumi N, Eto K. (1998). Contribution of foregut endoderm to tooth initiation of mandibular incisor in rat embryos. *Eur J Oral Sci*, 106(S1), 19-23.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418(6893), 41-49.

Jessen KR, Mirsky R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci*, 6(9), 671-682.

Kadereit S, Zimmer, van Thriel C, Hengstler JG, Leist M. (2012). Compound selection for in vitro modeling of developmental neurotoxicity. *Front Biosci*, 1(17), 2442-2460.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. (1999). *Neurociencia y conducta*. Madrid, España: Prentice Hall. Pp 812.

Keating A. (2012). Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*, 10(6), 709-716.

Kelsh RN. (2006). Sorting out Sox10 functions in neural crest development. *Bioessays*, 28(8), 788-798.

Knoblich JA. (2008). Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*, 132(4), 583-597.

Koch WE. (1967). In vitro differentiation of tooth rudiments of embryonic mice. I. Transfilter interaction of embryonic incisor tissues. *J Exp Zool*, 165(2), 155-170.

Kollar EJ, Baird GR. (1969). The influence of the dental papilla on the development of tooth shape in embryonic mouse tooth germs. *J Embryol Exp Morph*, 21(1), 131-148.

Kollar EJ, Lumsden AG. (1979). Tooth morphogenesis: the role of the innervation during induction and pattern formation. *J Biol Buccale*, 7(1), 49-60.

Koussoulakou, D. S., Margaritis, L. H. & Koussoulakos, S. L. (2009). A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. *Int J Biol Sci*, 5(3), 226-243.

Le Douarin NM. (1982). *The neural crest*. London, Cambridge University Press.

Le Douarin NM, Calloni GW, Dupin E. (2008). The stem cells of the neural crest. *Cell Cycle*, 7(8), 1013-1019.

Lumsden AG. (1988). Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth. *Development*, 103 Supplement, 55-169.

Mager J, Bartolomei MS. (2005). Strategies for dissecting epigenetic mechanisms in the mouse. *Nat Genet*, 37(11), 1194-1200.

McKinney-Feeman SL, Jackson KA, camargo FD, Ferrari G, Mavilio F. Goodell MA. (2002). Muscle-derived hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(3), 1314-1316.

Mina M, Kollar EJ. (1987). The induction of odontogenesis in nondental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol*, 32(2), 123-127.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(10), 5807-5812.

Megías M, Molist P, Pombal MA. (2016). Atlas de histología vegetal y animal. Publicación científica de la Universidad de Vigo. 4-13.

Montiel-Eulefi E, Montiel JF. (2012). Origen y Migración de Células Troncales. *Int J Morphol*, 30(4), 1332-1337.

Morrison JS, Kimble J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, 441(7097), 1068-1074.

Morgan L, Jessen KR, Mirsky R. (1994). Negative regulation of the P0 gene in Schwann cells: suppression of P0 mRNA and protein induction in cultured Schwann cells by FGF2 and TGFb1, TGFb2 and TGFb3. *Development*, 120(6), 1399-1409.

Nikitina N, Sauka-Spengler T, Bronner-Fraser M. (2009). Chapter 1. Gene regulatory networks in neural crest development and evolution. *Curr Top Dev Biol*, 86(1), 1-14.

Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. (1998). Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma*, 45, 116-122.

Otero MJ, González-Navarro EA. (2014). Aplicaciones clínicas de la citometría de flujo. *Cont Lab Clín*, 17(1), 62-70.

Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Alvarez-Uría M, Fraile B, Anandón R, Saéz .FJ. (2017) *Biología celular y molecular*. 4a ed. México, DF: McGraw-Hill Education.

Pfister BJ, Gordon T, Loverde JR, Kochar AS, Mackinnon SE, Cullen D.K. (2011). Biomedical engineering strategies for peripheral nerve repair: surgical applications, state of the art, and future challenges. *Crit Rev Biomed Eng*, 39(2), 81-124.

Poirier J. (2004). *El sistema nervioso*. 1 ed, SIGLO XXI, México. DF: Editores México.

Recillas TF y Escamilla M. (2004). Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. *Mensaje bioquímico*, 28, 173-201.

Reiprich S, Kriesch J, Schreiner S, Wegner M. (2010). Activation of Krox20 gene expression by Sox10 in myelinating Schwann cells. *J Neurochem*, 112(3), 744-754.

Reyes-Haro D, Bulavina L y Pivneva T. (2014). La glía, el pegamento de las ideas. *Ciencia*, 12-18.

Rinaldi L, Benitah SA. (2015). Epigenetic regulation of adult stem cell function. *FEBS J*, 282(9), 1589-1604.

Risbud MV, Shapiro IM. (2005). Stem cell craniofacial and dental tissue engineering. *Orthod Craniofacial Res*, 8(2), 54-59.

Rodas BA, Canul M, Rojas RA, De la Peña C, Nic GI. (2017). Stem cells from dental pulp: what epigenetics can do with your tooth. *Front Physiol*, 8, 999.

Romer AS. (1972). The vertebrate as a dual animal-somatic and visceral. *Evolutionary Biology*, 6, 121-156.

Rosberg HE, Carlsson KS, Höjgård S, Lindgren B, Lundborg G, Dahlin LB. (2005). Injury to the human median and ulnar nerves in the forearm--analysis of costs for treatment and rehabilitation of 69 patients in southern Sweden. *J Hand Surg Br*, 30, 35-39.

Sakaue M, Sieber-Blum M. (2015). Human epidermal neural crest stem cells as a source of Schwann cells. *Development*, 142(18), 3188-3197.

Seo B, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Gehron-Robey P, Wang C, Shi S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364(9429), 149-155.

da Silva Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*, 119(Pt11), 2204-2213.

Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. (2005). The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res*, 8(3), 191-199.

Shirosaki Y, Hayakawa S, Osaka A, Lopes MA, Santos JD, Geuna S, Mauricio AC. (2014). Challenges for nerve repair using chitosan-siloxane hybrid porous scaffolds. *Biomed Res Int*, 10, 1155.

Slack JM. (2002). Conrad hal waddington: the last renaissance biologist?". *Nat Rev Genet*, 3(11), 889-895.

Slavkin HC. (1974). Embryonic tooth formation. A tool for developmental biology. *Oral Sci Rev*, 4(0), 7-136.

Song L, Tuan RS. (2005). Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J*, 18(9), 980-982.

Soukup V, Epperlein HH, Horáček I, Cerny R. (2008). Dual epithelial origin of vertebrate oral teeth. *Nature*, 455(7214), 795-798.

Tanabe Y, Jessell TM. (1996). Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science*, 274(5290), 1115-1123.

Terzis JK, Smith KL. (1990). The Peripheral Nerve: structure function and reconstruction. New York. Raven Press.

Thesleff I, Sharpe P. (1997). Signaling networks regulating dental development. *Mech. Dev.* 67(2), 111-123.

Tosh D, Slack JM. (2002). How cell change their phenotype. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(3), 187-194.

Tucker AS, Matthews KL, Sharpe PT. (1998). Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signaling. *Science*, 282(5391), 1136-1138.

Van der Meulen J, Speleman F, Van Vlierberghe P. (2014). The H3K27me3 demethylase UTX in normal development and disease. *Epigenetics*, 9(5), 658-668.

Verfaillie CM. (2002). Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol*, 12(11), 502-508.

Wada H, Makabe K. (2006). Genome duplications of early vertebrates as a possible chronicle of the evolutionary history of the neural crest. *Int J Biol Sci*, 2(3), 133-141.

Wagers AJ, Weissman IL. (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell*, 116(5), 639-648.

Williams RR, Bunge MB. (2012). Schwann cell transplantation: a repair strategy for spinal cord injury? *Prog Brain Res*, 201, 295-312.

Zhang D, Li Q, Rao L, Yi B, Xu Q. (2015). Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod*, 41(5), 640–645.

Zerina J, Smith MM. (2005). Origin and evolution of gnathostome dentitions: a question of teeth and pharyngeal denticles in placoderms. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 80(2), 303-345.

<http://www.creces.cl/new/index.asp?tc=3&nc=6&imat=%20%20%3E%20%2040%20%20%3E%20%20Fotos%20&art=253>.

<https://es.slideshare.net/gustavotoledo/fundamentos-del-sistema-nervioso-y-del-tejido-nervioso-2013>.

<http://teaching.thehumanbrain.info/neuroanatomie.php?kap=2> /.

<https://www.pinterest.es/pin/458663543290625401/>.

https://www.researchgate.net/figure/Fundamento-de-la-inmunofluorescencia-Tecnica-de-marcaje-indirecto-para-in_fig3_301342809.

<http://www.iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2017/BioCel/1504124326.pdf>.