



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**Formación de microtejidos 3D a partir de células troncales
mesenquimales derivadas de la pulpa dental por el método
de cultivo en levitación magnética**

Tesis

Que para optar por el grado de:

Doctor en ciencias

Presenta:

Mtro. en Ciencias Íñigo Gaitán Salvatella

Tutor:

Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez

Facultad de Odontología



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.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL**
(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado "Formación de microtejidos 3D a partir de células troncales mesenquimales derivadas de la pulpa dental por el método de cultivo en levitación magnética" que presenté para obtener el grado de Doctorado en Ciencias es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Iñigo Gaitán Salvatella

Número de cuenta: 518010810

Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez
Vo. Bo. Jefe principal

Agradecimientos

Agradezco enormemente el apoyo recibido durante estos años de estudio, en primer lugar, me gustaría agradecer a toda mi familia por ayudarme y brindarme apoyo durante estos años de doctorado, a mi padre, el Dr. Luis Alberto Gaitán, a mi madre, la Dra. María de los Ángeles Salvatella y sobre todo a mi hermana la Dra. Mar Gaitán apoyándome desde la distancia con bromas y memes.

Agradezco a todos aquellos que me han acompañado en los estudios previos a entrar a este doctorado:

Con mucho cariño al hombre que me ha hecho enamorarme de la biología, escoger dicha carrera y enseñarme lo básico desde el periodo de secundaria, el Dr. Joaquín Albesa. Con él se ha comenzado esta aventura.

Muchas gracias a todos mis profesores de los Salesianos Burriana, y a mi profesor de biología Eloy, el cual siguió dándome todos los conocimientos de la biología para seguir en este camino. Muchas Gracias a la Universitat de València, donde me he formado como biólogo y a los excelentes profesores que me han enseñado.

Agradezco enormemente a la UNAM, por ser mi casa durante toda esta etapa, sintiéndome parte de esta gran comunidad y hacer que me enamore de la investigación.

Este proyecto de investigación, estar en este programa y entrar a la UNAM, nunca hubiese sido posible sin el Dr. Marco Antonio Álvarez. Gracias por aceptarme como tutor, por apoyarme en los momentos complicados como en la pandemia o cuando perdía el FC Barcelona, por ser mi guía, mi asesor y un gran amigo.

Muchas gracias a todos mis compañeros del laboratorio de Bioingeniería de tejidos: La Dra. Febe Carolina, al Dr. Osmar Chanes, Lucy por siempre dar esa bondad que nadie más tiene, Mari, Eli con quien he compartido geniales momentos en este último tramo, Rafa, Rodrigo Osorio, David, Pamela, Fernanda, Christian, etc.

También agradezco de corazón a Diana, la cuál ha estado a mi lado durante todo este proceso y que, sin ella, difícilmente hubiera llegado hasta este momento.

Agradezco de igual manera a los demás amigos de posgrado y de fuera que de alguna manera siempre han compartido momentos conmigo, como Samuel, o en especial a Dani y Diana Rivera con quien he compartido varios momentos divertidos durante todo este tiempo.

Agradezco también a José Luis y Paola que desde el máster siempre me han acompañado y hemos vivido varias aventuras, tanto emocionantes como divertidas. Gracias por el apoyo brindado siempre.

Muchas gracias al apoyo del Dr. Fernando Suaste y la Dra. Patricia González. Gracias por compartir todos vuestros conocimientos.

Gracias también a todos mis amigos de España, siempre han estado a mi lado y sin ellos no podría nunca haber completado todo este proceso. Muchas gracias a Alejandro Pino, José Gil mis compañeros de conciertos y de tonterías, Angela, Sebas, Nico, Gema, Manuel, Irene, Marta, Martha, Ferrán, José Miguel, gracias por todo.

Agradezco de todo corazón a un amigo que siempre ha estado para mí en los momentos que lo he necesitado, y nos hemos ayudado mutuamente en los peores momentos. Mi compañero del Gym, de la Play, y de la vida, muchas gracias, Carlos Guillamón, desde hace 12 años que hemos compartido varios momentos nivel ESO.

Que decir de otro pilar fundamental en todo este tiempo. Agradezco de todo corazón a Yeray, el cual, si escribiera toda nuestra historia juntos, nunca acabaría y seguramente me la censurarían por todas las tonterías que hemos hecho. Siempre dispuesto a dar una respuesta “turgente”, y por esas noches donde nos hemos quedado jugando fins a les tres, quan fa res eren les nou.

En segundo de carrera he tenido la suerte de conocer a una de las personas más maravillosas que he conocido, desde una práctica en la asignatura de zoología, siempre ha sido y será mi compañera de laboratorio. Gracias de corazón a María Piñar, el cariño que te tengo nunca lo podré expresar en palabras, porque más que una “compi” de laboratorio, ahora siempre serás mi “compi” para toda la vida.

En cuanto a Hobbies gracias por todos los buenos momentos que me ha dado el equipo de mi alma el FC Barcelona, perquè dona igual els moments més roïns, VISCA EL BARÇA.

Agradezco el apoyo por parte del programa DGAPA-UNAM: PAPIIT In213821 que ha permitido la realización de esta investigación.

A CONACyT por el apoyo económico otorgado con número de becario 631072 para mis estudios de Maestría en el programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud.

Agradezco el apoyo por parte del CONACYT a través del proyecto A1-S-9178 del programa del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, que ha permitido la realización de esta investigación de tesis de Doctorado.

Índice:

Abreviaciones	7
Resumen	10
Abstract	12
1.-Antecedentes	14
1.1.-Campo de la regeneración de tejidos	15
1.2.-Diferenciación celular	16
1.2.1.-Diferenciación celular en bacterias	16
1.2.2.-Diferenciación celular en el reino protista	18
1.2.3.-Diferenciación celular en anfibios	19
1.3.-Células troncales mesenquimales	23
1.3.1.-Células troncales mesenquimales Derivadas de sangre menstrual (MenSC)	25
1.3.2.-Células troncales mesenquimales derivadas de la matriz del cordón umbilical (UMSC)	25
1.3.3.-Células troncales mesenquimales derivadas de ligamentos cruzados humanos (MSC derivadas – ACL/PCL)	26
1.3.4.-Células troncales mesenquimales derivadas del endometrio (eMSC)	26
1.3.5.-Células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea (BM-MS)	27
1.3.6.-Células troncales mesenquimales derivadas de la cavidad bucal	28
1.4.-Esferoides	31
2.-Metodología	35
2.1.-Pregunta de investigación	36
2.2.-Justificación	36
2.3.-Hipótesis	36
2.4.-Objetivo general y objetivos específicos	37
2.5.-Diseño experimental	37

2.5.1.-Tipo de estudio	37
2.5.2.-Universo de estudio	37
2.5.3.-Variables de estudio	37
3.-Osteogénesis	38
3.1.-Regeneración ósea	39
3.1.1.-Proceso de diferenciación ósea	39
3.1.2.-Marcadores de la osteoblastogénesis	41
3.2.-Material y métodos	44
3.2.1.- Formación de los esferoides por levitación magnética	44
3.2.2.- Ensayos de proliferación, viabilidad y morfología	44
3.2.3.- medición de la osteogénesis	45
3.2.4: Potencial de colonización de los esferoides en una membrana de PLA	46
3.2.5: Análisis estadístico	47
3.3.-Resultados y discusión	47
4.-Neurogénesis	56
4.1.-Regeneración neuronal	57
4.1.1.-Diferenciación neuronal	58
4.1.2.-Marcadores de la diferenciación neuronal	60
4.2.-Material y métodos	61
4.2.1.-Formacion de los esferoides por levitación magnética	61
4.2.2.- Ensayos de proliferación, viabilidad y morfología	61
4.2.3.-Inmunofluorescencia	62
4.2.4.-qRT-PCR	62
3.2.5.-Análisis estadísticos	63
4.5.-Resultados y discusión	63
5.-Conclusiones	71
6.-Bibliografía	72

Abreviaciones

DP-MSC: Células troncales mesenquimales derivadas de la pulpa dental.

LM: Levitación Magnética.

NPM: Nanopartículas Magnéticas.

ALP: Fosfatasa Alcalina.

ALZ: Alizarina Roja.

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real.

qRT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real Cuantitativa.

UPEC: E. coli uropatogénica.

IBCs: Comunidades Bacterianas Intracelulares.

cAMP: Adenosín Monofosfato Cíclico.

SNC: Sistema Nervioso Central.

BMP: Proteínas morfogénicas óseas.

iPSC: Células pluripotentes inducidas.

ESC: Células troncales embrionarias.

MSC: Células troncales mesenquimales.

GMSC: Células troncales mesenquimales derivadas de encía.

MCAM: Molécula de adhesión de las células del melanoma.

BMMSC: Células troncales mesenquimales derivadas de la médula ósea.

PGE2: Prostaglandina E2.

IDO: Indoleamina 2,3-dioxigenasa.

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β .

MenSC: Células troncales mesenquimales derivadas de sangre menstrual.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

BDNF: Factor de crecimiento derivado del cerebro.

NT-3: Neurotrofina-3.

UMSC: Células troncales mesenquimales derivadas de la matriz del cordón umbilical.

ACL/PCL-MSC: Células troncales mesenquimales derivadas de ligamentos cruzados humanos.

eMSC: Células troncales mesenquimales derivadas del endometrio.

HSC: Células Troncales Hematopoyéticas.

PTH: hormona paratiroidea.

Runx2: Factor de transcripción relacionado a Runt 2.

Osx: Osterix.

Dlx5: Gen homeobox menos distal 5.

DFPC: Células dentales foliculares progenitoras.

PDL-MSc: Células troncales mesenquimales derivadas de tejido periodontal (PDL-MSc).

SCAP: Células troncales de la papila apical.

TGSC: Células troncales germinales del diente.

SHED: Células troncales de dientes temporales exfoliados.

HH: Hedgehog.

PTHrP: Proteína relacionada a la hormona paratiroidea.

Wnt: Wingless e int-1.

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico.

ROR: Receptores huérfanos tipo tirosina quinasa.

FZD: Frizzled.

Dsh: Disheveled.

OPG: Osteoprotegerina.

JNK: Quinasa Jun.

BSP: Sialoproteína ósea.

ALP: Fosfatasa Alcalina.

OCN: Osteocalcina.

Cbfa: (núcleo de unión del factor alfa).

OPN: Osteopontina.

hFOB: Osteoblastos fetales humanos.

SFB: Suero Fetal Bovino.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro

bFGF: factor de crecimiento fibroblástico básico

PIP3: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

DAG: Diacilglicerol

PKC: Proteína cinasa C

ERK: señales extracelulares reclutadas por cinasas

MAPK: proteínas cinasas activadoras de mitógenos

FZ: Frizzled

CaMK: Quinasa dependiente de calmodulina

MAP: Proteína asociada a microtúbulos

SNP: Sistema Nervioso Periférico

NeuN: proteína nuclear neuronal

nDP-MSD: Neuroesferas formadas por DP-MSD

Resumen

El campo de la regeneración de tejidos ha ido avanzando de manera significativa a lo largo de estos últimos años. Sin embargo, la gran mayoría de estrategias para la regeneración tisular implican un alto porcentaje de diferenciación celular. Es por ello, que se han aumentado los esfuerzos para encontrar sustitutos celulares que, además de ser de fácil obtención, posean una capacidad de diferenciación suficiente para realizar una regeneración de tejidos óseos y neuronales.

Las células mesenquimales derivadas de la pulpa dental (DP-MSC) poseen una capacidad de diferenciación hacia tejidos óseos y neuronales, y teniendo en cuenta la facilidad para su obtención, hacen de estas células unas candidatas ideales para analizar la capacidad de diferenciación celular y capacidad de regeneración en un ambiente tridimensional (3D).

Teniendo en cuenta las ventajas que poseen el cultivo 3D a la hora de maximizar el potencial de diferenciación y de proliferación celular, en este trabajo de investigación se utilizó la técnica de cultivo 3D basado en levitación magnética (LM).

La LM es una técnica sencilla que se basa en la utilización de nanopartículas magnéticas (NPM) de óxido de hierro magnético o magnetita para que, con la presencia de un imán, las células se encuentren levitando en el medio de cultivo. Al adherirse entre las propias células y la imposibilidad de adherirse al plato de cultivo, las células forman un agregado denominado esferoide.

En esta tesis doctoral se utilizó la LM para formar esferoides de DP-MSC que se llevaron a una diferenciación del linaje óseo y neuronal usando medios inductores osteogénico y neurogénico. Una vez realizada la inducción se evaluó la proliferación celular, la viabilidad y dependiendo el linaje varios ensayos como: para el linaje osteogénico el análisis de la actividad de la enzima de la fosfatasa alcalina (ALP), la capacidad de formación de los nódulos de calcio por el ensayo de alizarina roja (ALZ) y el análisis de expresión génica por la técnica de reacción

en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). Para el linaje neurogénico se realizaron los análisis de expresión génica asociada a los tejidos neuronales por RT-PCR.

Los resultados logrados indican que los esferoides poseen una capacidad de diferenciación mayor al de los cultivos realizados en monocapa, y además poseen una mayor expresión génica de moléculas asociadas al linaje óseo que los propios esferoides realizados a partir de osteoblastos fetales humanos (hFOB). Asimismo, los esferoides inducidos a al linaje neuronal mostraron una clara capacidad de diferenciación hacia dicho tejido y abriendo la posibilidad de su potencial uso como modelo de regeneración del tejido neuronal.

Abstract:

The tissue regeneration field has been advancing significantly over recent years. However, most strategies for tissue regeneration involve a high percentage of cell differentiation. That is why efforts have been increased to find cell substitutes that, in addition to being easy to obtain, have a sufficient differentiation capacity to perform a regeneration of bone and neuronal tissues.

Mesenchymal stem cells derived from dental pulp (DP-MSc) have a potential capacity for differentiation into bone and neuronal tissues, and the source is considered as ease of obtaining and make as an ideal candidate for analyzing the capacity of cell differentiation and regeneration for used in three-dimensional (3D) environment.

Considering the advantages of 3D culture when maximizing the potential for differentiation and cell proliferation, in this research we used the 3D culture technique of magnetic levitation (ML).

ML technique is based on the use of magnetic nanoparticles (NPM) of magnetic iron oxide or magnetite that binds directly to the membrane of cells that in the presence of a magnetic field by magnet, the cells start levitating in the culture medium by inducing to sticking between the cells and unable to adhere to the bottom of the cell culture dish, finalizing with an aggregation called the spheroid. In this thesis, we formed DP-MSc spheroids under the ML technique and subjected to bone and neuronal differentiation using an inductive media for osteogenic and neurogenic lineage. Once induced to the specific lineage we performed several analyses to the spheroids in terms of their cell proliferation and viability, and for the osteogenic lineage the alkaline phosphatase assay (ALP), nodule formation by alizarin red assay, gene expression analysis by the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for molecules involved in the bone formation. For the neuronal differentiation we only performed the analysis of gene expression associated with neuronal tissues by RT-PCR.

Our results indicated that spheroids have a greater differentiation capacity than monolayer culture and have an up-regulation of genes associated with bone lineage in comparison with control spheroids from fetal human osteoblasts (hFOB). Furthermore, the spheroids led to a neuronal differentiation showed the presence of genes related to the lineage and showing the potential use of the 3D model for neuronal tissue engineering applications.

Capítulo 1:
Antecedentes

1.1.- Campo de la regeneración de tejidos:

Desde el principio del siglo XXI, los avances en el mundo de la investigación nos han acercado más a una denominada medicina personalizada, la cual se trata de que, a partir de un cúmulo de factores como el genoma, proteoma, microbioma, metaboloma o la calidad de vida del paciente (Torre-Bouscoulet, 2015) permite un enfoque más personalizado a la hora de tratar enfermedades de los pacientes.

Uno de los pilares fundamentales de la medicina personalizada, es la regeneración tisular, la cual es el proceso natural para reemplazar o reparar células o los propios tejidos (Instituto Nacional de Ciencias Médicas Generales, 2020), de tal manera que en el futuro se podría tener capacidad para regenerar el tejido dañado del paciente, en relación con su defecto.

El campo encargado de la regeneración de tejidos y aquel en el que se basan los esfuerzos para dar lugar a dicho objetivo, es el campo de la ingeniería de tejidos. Este campo avanzó desde el campo de los biomateriales para obtener un enfoque más dirigido hacia una regeneración tisular más personalizada dependiendo del tejido a regenerar (Cecilia Fabres, 2010).

La historia de la ingeniería de tejidos data de alrededor del siglo XVII cuando en Ámsterdam se añadieron injertos para reparar hueso (de Boer, 1988). Teniendo en cuenta que el principal objetivo de este campo es mimetizar el tejido *in vivo*, en la actualidad, la mayor parte de los esfuerzos se han dirigido al estudio de las células que posean la capacidad de diferenciarse a las células promotoras del tejido (Tonelli *et al.*, 2017).

Una de las características principales que deben poseer las células utilizadas para la regeneración tisular, es la capacidad de diferenciación celular hacia el tejido objetivo (Tonelli *et al.*, 2017). Un ejemplo visual de la base de la regeneración tisular es la presentada en la figura 1, donde se propone un ejemplo para el tejido neuronal. Para que la regeneración tisular dé lugar, se recalca la importancia de las células a partir de las cuales comenzará el proceso de diferenciación. Las células utilizadas en este proceso pueden ir desde células embrionarias, hasta células ya diferenciadas (Caneparo *et al.*, 2021).

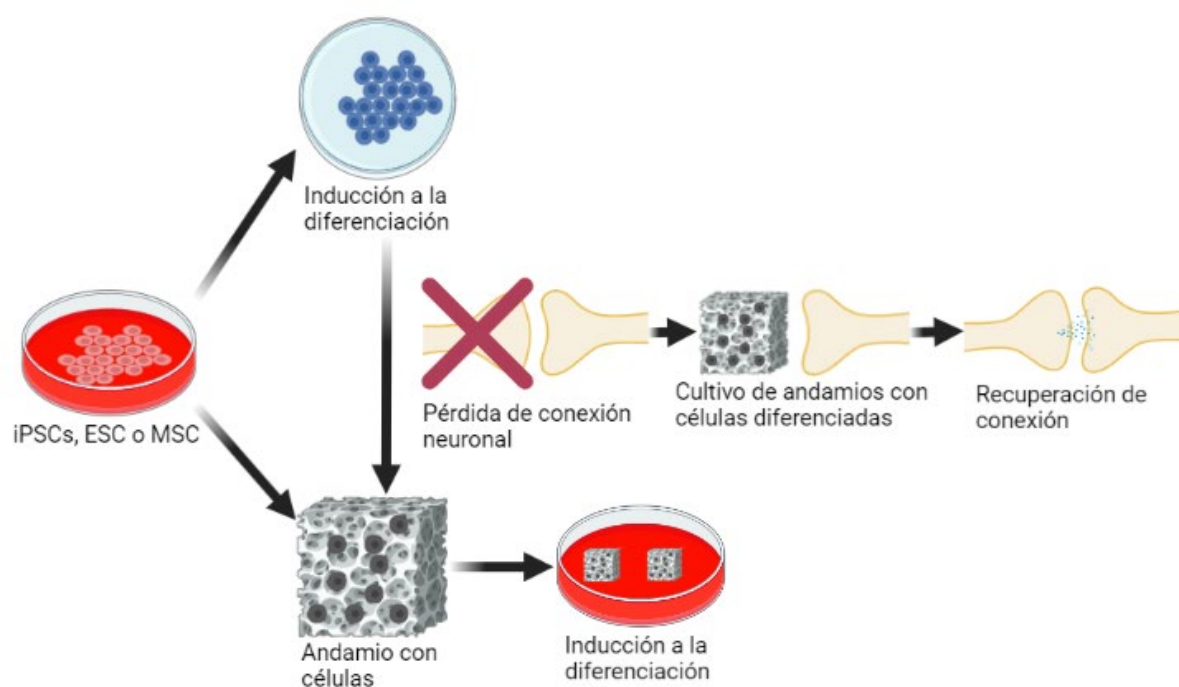


Figura 1: Esquema que resume a grandes rasgos, un proceso de creación de un andamio y su posterior aplicación a un tejido neuronal. Imagen creada en BioRender.com.

1.2.- Diferenciación Celular:

1.2.1.- Diferenciación celular en bacterias.

Tal y como se ha dicho anteriormente, con el fin de dar lugar a la regeneración tisular, las células deben poseer un potencial de diferenciación celular. La capacidad de regulación genética de las células es la base del entendimiento de la diferenciación celular, un proceso que no es más que una capacidad de adaptación de una célula para la supervivencia del organismo completo o de organismos unicelulares (Trager, 1963).

En general el proceso de diferenciación celular que ocurre en organismos pluricelulares es la base de una especialización celular que permite una comunicación entre las células y posteriormente la creación de una estructura en conjunto que dará lugar a la formación de una estructura celular superior como tejidos, órganos, aparatos, etc. (Sánchez Alvarado and Yamanaka, 2014). Sin embargo, en el caso de los organismos unicelulares, la finalidad principal de la diferenciación celular es un mecanismo básico para la adaptación en el entorno para conseguir una supervivencia, la cual provoca cambios tanto morfológicos como bioquímicos que darán lugar a lo largo del ciclo celular (Shapiro, Agabian-Keshishian and Bendis, 1971).

De igual manera, (Shapiro, Agabian-Keshishian and Bendis, 1971) proponían una caracterización para que el modelo de bacterias fuera estudiado, las cuales incluían que:

- Las bacterias deberían tener un patrón simple y bien definido de diferenciación y que este, fuera observable de manera sincrónica con el resto de las poblaciones.
- La capacidad de crecimiento en medios de cultivo celulares que permitiera la realización de un estudio de correlación entre los cambios bioquímicos del medio y los cambios morfológicos de las poblaciones.
- La habilidad de las bacterias mutantes y la existencia de un sistema para el intercambio de material genético.

La mayor parte de los estudios de diferenciación celular a partir de los 70s fueron dirigidos a un modelo de *Caulobacter*, llegando hasta la actualidad. Esto es debido a que este modelo posee un ciclo de vida dimórfico donde, por una parte, se da lugar a una célula de enjambre (“swarmer cells”) móviles que carecen de potencial reproductivo y, por otra parte, una célula pedunculada no móvil que sí posee potencial reproductivo (Snyder *et al.*, 2020). De esta manera, existen cambios morfológicos importantes que demuestran una diferenciación celular en el caso de *Caulobacter crescentus*, dado que en el proceso de pasar de las células de enjambre a un estado reproductivo se produce la pérdida del flagelo y los pili de adherencia (Curtis and Brun, 2010). No solo *Caulobacter* es un ejemplo en investigación de la diferenciación celular en bacterias, sino que también se encuentra el caso de *Escherichia coli* (*E. coli*). Uno de los casos más llamativos de diferenciación celular en *E. coli*, es el tipo celular conocido como *E. coli* uropatogénica o UPEC, debido a que representa más de 80% de las infecciones del tracto urinario en pacientes adultos (Alteri, Smith and Mobley, 2009).

El proceso de infección de las UPEC está relacionado con la diferenciación celular, en la cual se pasa de una morfología bacilar, internalizada e inmóvil, a lo cual se le denomina comunidades bacterianas intracelulares tempranas o IBCs tempranas (Justice *et al.*, 2014). La unión entre la adhesina FimH a las integrinas $\alpha 3$ y $\beta 1$ provocan una separación entre los microtúbulos que provoca el ordenamiento de la actina mediante la activación de Rho, dando lugar a la internalización de las IBCs que poseen una ratio más bajo de crecimiento y empiezan a formar biofilms con una morfología cocoide, lo que se denomina periodo IBC medio (Dhakal and Mulvey, 2009; Croxen and Finlay, 2010; Matta-Chuquisapon *et al.*, 2020). Finalmente, en la última fase, las IBCs completamente desarrolladas, recuperan la motilidad y la forma bacilar (Justice *et al.*, 2014). Para ello, se vuelven activar los pili de tipo 1, lo que provee a las IBCs una movilidad más amplia y mayor capacidad de infección (Croxen and Finlay, 2010). Sin

embargo, algunas de estas bacterias se quedan en las superficies de las células epiteliales renales, que poseen menos motilidad que las anteriores en las que se activaron el pili 1. En estas células existe una mayor cantidad de expresión de las fimbrias P, provocada por la unión con las glicoproteínas Gal β y Gal α , lo cual provoca a las IBCs una menor motilidad (Simms and Mobley, 2008; Schocker *et al.*, 2015). En la figura 2 se observa un resumen de este proceso que presenta otro ejemplo de adaptación y de diferenciación celular, donde las UPEC pasan de un estado no motil y bacilar, a organizarse en biofilms con una forma cocoide y finalmente recuperar la forma bacilar y móvil para aumentar su capacidad de infección.

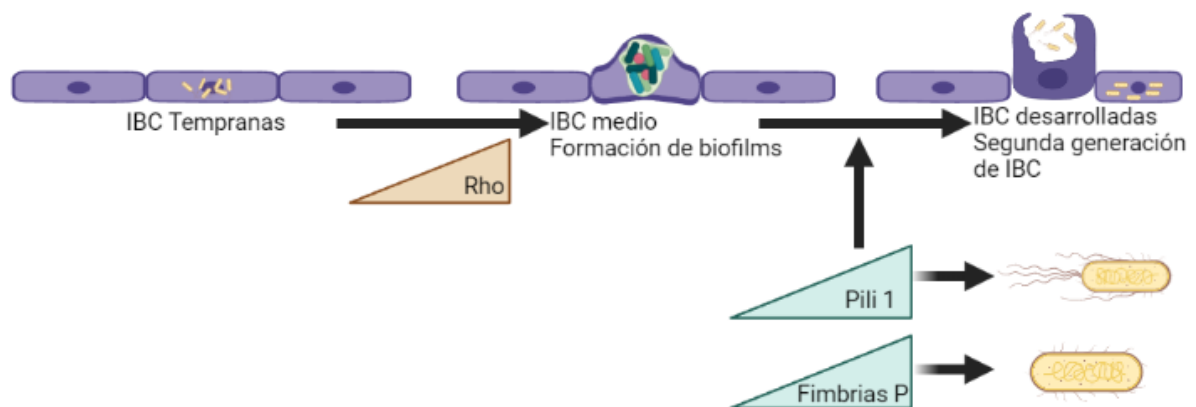


Figura 2: Resumen del proceso de diferenciación intracelular de las bacterias de *E. coli*, donde se observa cómo van cambiando su propia morfología con la finalidad de mayor capacidad de colonización. Imagen creada en BioRender.com.

1.2.2.- Diferenciación celular en el reino protista.

Desde mitad del siglo pasado, con (Trager, 1963) comenzaban los estudios sobre la diferenciación celular en los protozoos, organismos que pertenecen al reino *Protista*. Este reino, pese a ser anterior a la llegada de la simbiosis unicelular o la endosimbiosis que dio lugar a la aparición de los eucariotas multicelulares (Lazcano and Peretó, 2017), poseen procesos celulares semejantes a los de cualquier diferenciación celular ocurrida en el desarrollo de vertebrados o en procesos de reparaciones tisulares.

Ya en 1963 (Trager, 1963) se hablaba de lo que significa una posible citodiferenciación o en inglés (cytodifferentiation), la cual es una consecuencia de la propia interrelación existente entre el genotipo y el fenotipo (Baye, Abebe and Wilke, 2011). Siguiendo el principio de que todos los procesos de regulación genética suceden cuando el organismo lo requiere (Bolívar Zapata,

2004); en un principio la citodiferenciación era definida como el proceso por el cual una célula era transformada a una estructura especializada calificada por resultados de su transformación (Trager, 1963). Pese a que se trata de una definición ya distada de ser completa, marca el inicio de la investigación de dichas “transformaciones”, puesto que los cuerpos celulares cambiaban su fenotipo, pero siempre han mantenido el mismo genotipo.

Desde 1963 hasta ahora, se ha ido destacando la importancia de la diferenciación celular en los protozoos, puesto que la supervivencia del organismo depende de estos cambios de fenotipos para mantener el ciclo vital del organismo (Silvester, McWilliam and Matthews, 2017). Teniendo en cuenta que el ciclo vital de los protozoos se basa en la parasitación de un organismo huésped, en el caso de parasitación en mamíferos, la diferenciación celular se basa en el procesamiento de distintas señales que envía el mamífero hacia el parásito mediante las proteínas G (Huang, 2011). Estas señales activan el mecanismo de diferenciación celular gracias a varias vías de señalización, dentro de las cuales se pueden destacar dos, como la utilizada por el adenosín monofosfato cíclico (cAMP) o la que utiliza como segundo mensajero los iones de Ca^{2+} , el inositol trifosfato y el diacilglicerol (Perez-Landero and Nieto-Sotelo, 2013) (Newton, Bootman and Scott, 2016). Cuando termina la vía de señalización, provoca cambios en las fases del ciclo celular dando lugar a cambios en el crecimiento del organismo y observando cambios en el fenotipo del organismo, como, por ejemplo, formas *Opisthomastigote* o *Promastigote* (Dutra *et al.*, 2020).

1.2.3.-Diferenciación celular en anfibios.

Desde los experimentos de Spemann en 1924 (Spemann and Mangold, 1924), se observaba la importancia de la capacidad de diferenciación celular desde el punto de vista del desarrollo, puesto que el estudio se basaba en el desarrollo de dos gemelos unidos de especies diferentes de *triturus* posterior a un trasplante de la parte dorsal del blastoporo a la parte ventral de un embrión huésped (Cousin, 2019). Esta capacidad de diferenciación por parte de los anfibios ya había sido demostrada por Spemann y Mangold con anterioridad en 1918 al dividir por la mitad un embrión y mostrar la capacidad de desarrollo por ambas mitades (Spemann, 1918).

Posteriormente en 1990, gracias a la capacidad de maniobrabilidad de los huevos y embriones de anfibios, aumentaron la cantidad de estudios de desarrollo con un aspecto más enfocado a los aspectos moleculares. Para estudiar los procesos de diferenciación celular, se dependía totalmente de la realización de hibridaciones *in situ* con el fin de demostrar los procesos que daban lugar a la inducción del mesodermo (Gurdon, 1987). Durante este periodo se estudiaron

los diferentes procesos de diferenciación durante el desarrollo de la especie *Xenopus*, donde, durante la gastrulación, se induce la diferenciación celular para dar lugar al ectodermo y formar el tubo neural (Takata, Yamamoto and Ozawa, 1981; Gurdon, 1987).

El proceso de diferenciación neuronal es uno de elementos más importantes a lo largo del desarrollo, puesto que da lugar a la formación de la notocorda y la posterior placa neural (Bayona, 2012). Ya desde los años 80's los estudios de la especie *Xenopus* dieron lugar a diferentes investigaciones sobre los principales componentes moleculares que inducían la diferenciación celular hacia la formación del tubo neuronal, como lo es la participación de la glicoproteína N-CAM y un dominio del DNA en el que aparecería el gen *XIHbox6* (Jacobson and Rutishauser, 1986; Gurdon, 1987).

Ya en la actualidad, la información sobre las señales moleculares que actúan en la diferenciación neuronal aumentó exponencialmente. Principalmente la neurogénesis en el desarrollo de los anfibios no es muy diferente a los procesos que ocurren en la mayor parte de los vertebrados (Hartenstein, Omoto and Lovick, 2021). Posterior a la formación del neuroectodermo, se producen las diferentes diferenciaciones celulares que darán lugar a la formación del tubo y la cresta neural. Para ello en la zona de la capa ventricular se sucede un equilibrio de la vía de señalización de Notch entre la cantidad de células que se dirigirán a convertirse en neuronas o glías posmitóticas, o permanecer como un progenitor neuroepitelial mediante la división celular asimétrica (Dong *et al.*, 2012; Huang, Chan and Schuurmans, 2014). En el caso particular de los anfibios los progenitores epiteliales de la capa ventricular se diferencian directamente a los precursores neurales posmitóticos, formando finalmente la capa neural basal. La participación de la vía de Notch de decidir el destino de las células para cualquier de los dos caminos, resulta más evidente en el caso de su propia inhibición, puesto que al disminuir su actividad aumentan considerablemente la cantidad de neuronas, y disminuye la cantidad de precursores neuroepiteliales como se muestra en la figura 3 (Hartenstein, Omoto and Lovick, 2021).

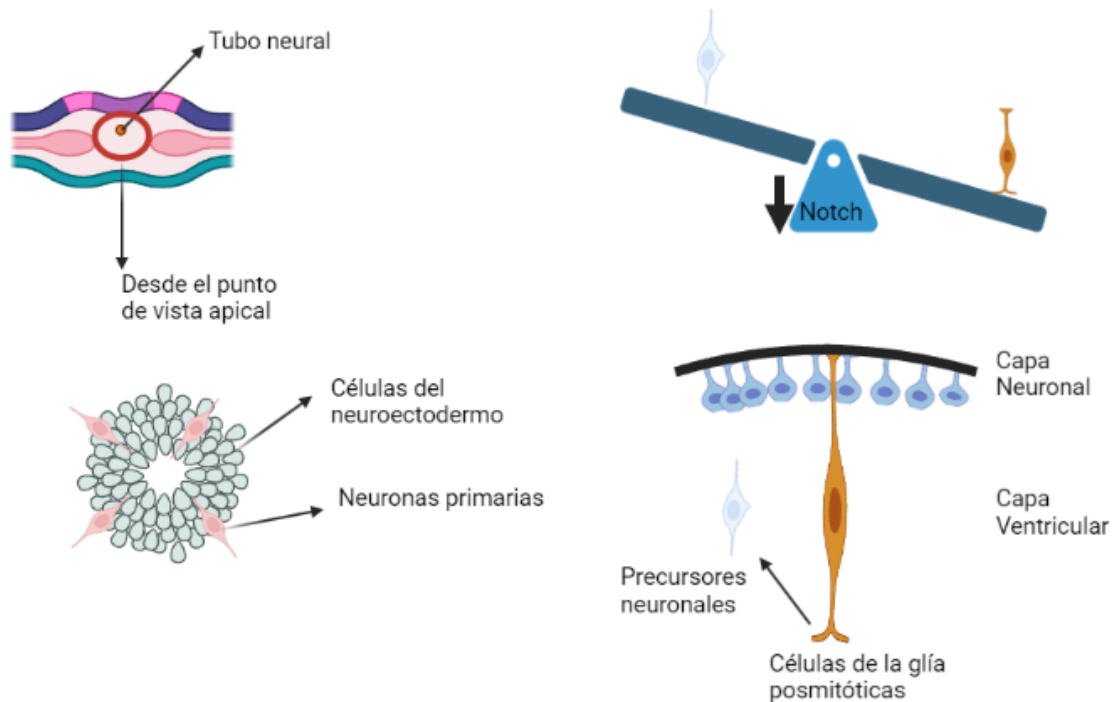


Figura 3: Esquema que presenta la diferenciación neuronal en las primeras etapas en el desarrollo de anfibios. También se destaca la participación de la vía de señalización Notch para mantener el equilibrio entre la diferenciación de las células de la glía (naranja) y los precursores neuronales (azul). Al disminuir la actividad de la vía de señalización Notch aumentan las cantidades de las células de la glía y disminuyen los precursores neuronales. Imagen creada en BioRender.com.

Como se ha visto, la importancia de Notch a lo largo del desarrollo es crucial para la formación del tubo neural y del neuroectodermo, sin embargo, no es la única vía de señalización que se encuentra presente en los procesos de diferenciación celular. Otros componentes moleculares importantes a lo largo de la neurogénesis es el caso de Sox3 y Sox2, pues se tratan de miembros de la familia de SoxB1 que poseen un papel fundamental en el mantenimiento de los progenitores neurosensoriales, en el caso de actuar junto con el factor de transcripción Neurog1 (Steevens *et al.*, 2017; Gou *et al.*, 2018). Por otro lado, en el caso de que la familia de SoxB1 actúe junto a Neurog2 activa los procesos de diferenciación celular para mantener la neurogénesis del sistema nervioso central (SNC) (Schlosser, 2021). Además, en los últimos años se ha destacado el papel de las proteínas Eya, las cuales participan, junto con el factor de transcripción Six1, en el desarrollo de las placodas craneales en vertebrados (Almasoudi and Schlosser, 2021). Las placodas craneales son una parte del ectodermo no neural que formarán, posterior a la gastrulación, los órganos sensoriales (Bayona, 2012). Durante el desarrollo actúan diferentes genes que lo regulan como Ngn1, Ngn2 o NeuroD, sin embargo, el desarrollo de las placodas e incluso la forma en la que se da el desarrollo es dependiente de las señales y de la

expresión de las proteínas Eya y Six1 como se muestra en la figura 4 (Kim *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003).

Principalmente existen dos maneras de formar las placodas, por invaginación o por delaminación, de las cuales, cada una de ellas darán lugar a diferentes órganos sensoriales. En este proceso intervienen varios tipos de señales moleculares que indicarán el camino y el desarrollo del tipo de placoda (figura 4). El grupo de moléculas que pertenecen a la familia de las proteínas morfogénicas óseas (BMP) participan activamente en el desarrollo de ganglios simpáticos, estimulando la expresión de Phox2a (Reissmann *et al.*, 1996). Sin embargo, la BMP que activa la forma de delaminación es la BMP-7, aumentando la cantidad de células neuronales involucradas en el proceso del desarrollo de la placoda epibranquial que dará lugar exclusivamente a células sensoriales (Begbie *et al.*, 1999; Lassiter *et al.*, 2007). Otra molécula que activa la delaminación de la placoda es Pax3, activada por la vía de señalización Wnt y los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) en la región del tubo neural, en específico por la molécula Wnt1, que aumenta la expresión de Pax3 (Canning *et al.*, 2008; Fleenor and Begbie, 2014). Por otra parte, la expresión de Eya y Six1 influyen en la invaginación de la placoda para dar lugar a la placoda neurogénica que dará lugar a células neuronales y no neuronales (Lassiter *et al.*, 2007). En primer lugar, se da lugar a la expresión de Six1/Eya para activarse SoxB1 y dar lugar a la invaginación de la placoda para pasar a la expresión de NeuroG en los progenitores neuronales y terminar de expresarse NeuroD en las neuronas sensoriales (Moody and LaMantia, 2015). Este proceso se resume en la figura 4, demostrando la importancia de la diferenciación celular en el desarrollo del sistema nervioso en anfibios, haciendo énfasis en las primeras etapas del desarrollo neuronal.

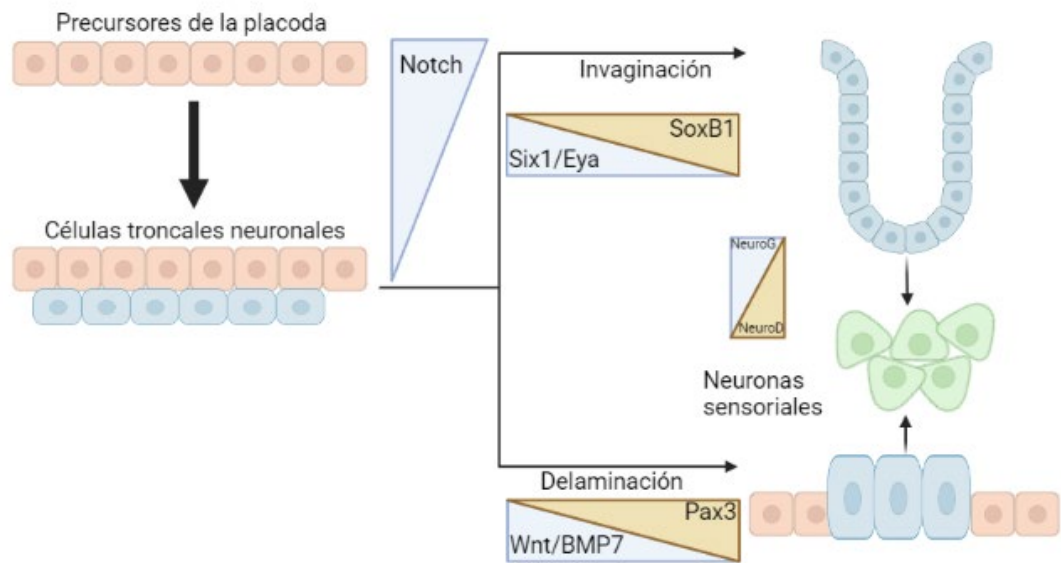


Figura 4: Se muestra un resumen de la formación de las placodas en anfibios y las señales moleculares que hacen que los precursores se diferencien y de lugar a la formación de la placoda. Imagen creada en BioRender.com.

1.3.- Células troncales mesenquimales:

La base de la diferenciación celular, como se ha visto anteriormente, es un conjunto de señales que el organismo envía a las células troncales con la finalidad de llegar a la especificación celular para dar lugar a la formación y el desarrollo de los órganos y tejidos. Esta característica es fundamental en el campo de la ingeniería de tejidos, dado que, de alguna manera se puede aprovechar este potencial para diferenciar células troncales y completar el tejido dañado.

Existen varias células con capacidad de diferenciación, como las células pluripotentes inducidas por el humano (iPS), células troncales embrionarias (ESCs) o incluso llevar a las células somáticas a un proceso de transdiferenciación. Sin embargo, el proceso de adquisición o de diferenciación a partir de estas células es caro y en muchas ocasiones conllevan a problemas éticos.

Desde su descubrimiento y descripción por Friedenstein (Friedenstein, Piatetzky-Shapiro and Petrakova, 1966) en la médula ósea de ratón como células clonogénicas adherentes similares a fibroblastos, el nombre como tal de células troncales mesenquimales (MSC) ha ido cambiando a lo largo de los años. Debido a su origen desde Friedenstein, a lo largo de la bibliografía se ha referenciado a estas células como “células del estroma”, aunque posteriormente el nombre llegó a entrar en polémica debido a la demostración de que las MSC pueden originarse de células

progenitoras adventicias de la mayor parte de los tejidos (Ankrum, Ong and Karp, 2014). En la actualidad las MSC ya son ampliamente conocidas como células troncales debido a su potencial de diferenciación hacia varios linajes como el óseo, condrogénico y adipogénico (Mortada and Mortada, 2018) o incluso hacia el linaje neuronal (Zhang *et al.*, 2018a). Pese a que la definición exacta de las MSC aún sigue en debate, la definición más actualizada por (Li, Hu and Zhong, 2019) define a las MSC como una población de células adherentes al plástico que puede ser dirigida a diferenciar *in vitro* en células de linajes osteogénicos, condrogénicos, adipogénicos, miogénicos y otros. Además, tal como indica (Castro Manreza and Montesinos Montesinos, 2015) las MSC deben poseer varias características para ser consideradas MSC como tales:

- Dar positividad para los marcadores CD105, CD73, CD90.
- Expresar bajo niveles de HLA-I.
- Presentar negatividad para marcadores HLA-II, CD11b, CD14, CD34, CD45 y CD31
- Capacidad de diferenciación a diferentes linajes mesenquimales como hueso, cartílago y adiposo.

Las MSC poseen varias características que las hacen muy estudiadas en los últimos años, como autorrenovación clonogénica, ya que las MSC proliferan y se convierten en células hijas con el mismo fenotipo y patrón de expresión génica tras su manipulación *in vitro* (Lee *et al.*, 2010). Además de su capacidad de diferenciación hacia diferentes tejidos o linajes, las MSC poseen una capacidad de modular el sistema inmune, de tal forma, que las MSC pueden regular a las células de sistema inmune innato y adaptativo, como bloquear la proliferación y la función de células T, células B, o las células natural killer (Ding, Shyu and Lin, 2011), mediante la utilización la liberación de factores solubles como la prostaglandina E2 (PGE2), indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (Kim *et al.*, 2018). En el trabajo de (Kim *et al.*, 2018), se pone en especial énfasis en la importancia de las MSC a la hora de utilizarlas en el campo de la regeneración neuronal, dado que no es suficiente con solo reemplazar las células neuronales motoras por unas nuevas, dado que si la red neuronal está defectuosa, cambiando solo las células llevaría eventualmente a la misma complicación original, dado que las nuevas células motoras no se conectarían de forma eficiente a la red cerebral o a la población de la médula espinal. Por ello, para una recuperación idónea es necesario utilizar las características de las MSC, que no solo se enfoca en la regeneración tisular, sino también de la capacidad de modulación del sistema inmune que incluye la liberación de distintos factores en el tejido que lleve eventualmente a una completa regeneración. Por otra

parte, las MSC se pueden encontrar en numerosos nichos en los diferentes tejidos, como se muestra a continuación.

1.3.1.-Células troncales mesenquimales derivadas de sangre menstrual (MenSC)

Una de las ventajas de las MSC es su fácil obtención de tejidos o partes de estos que son usualmente descartados. En el caso de las MenSCs, la mayor parte de la sangre menstrual es descartada (Ding, Shyu and Lin, 2011), sin embargo, tras su descubrimiento en 2007 (Toyoda, Cui and Umezawa, 2007), las MenSCs han sido foco de varios estudios por su potencial miogénico (Toyoda, Cui and Umezawa, 2007) o su capacidad de diferenciación a otros tipos celulares como los miocitos distrofiados, células de tejido ovárico, ovocitos, células endometriales, células de tipo hepatocito, o a células de tipo glial (Toyoda, Cui and Umezawa, 2007). Estas MenSCs dan positivo a los marcadores CD13, CD29, CD44, CD54, CD55, CD59, CD73, CD90, y CD105 y son negativas a HLA-II, CD14, CD34 y CD45, además de ser positivas para HLA-1 por lo que cumplen las condiciones para ser consideradas MSC (Toyoda, Cui and Umezawa, 2007). Estas células poseen un potencial importante para la investigación, ya que no solo se trata de una obtención no invasiva de MSC, sino que su potencial de diferenciación hace de estas células un candidato ideal para su estudio en la ingeniería de tejidos y en la medicina regenerativa del tracto reproductivo. Este potencial aumenta por la capacidad de las MenSCs a la hora ser utilizadas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, concretamente para el tratamiento de derrame cerebral utilizando el medio secretado por las MenSCs para la protección de cultivos neuronales primarios dado que las MenSCs poseen la capacidad de secretar factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) y neurotrofina-3 (NT-3) (Sanberg *et al.*, 2011).

1.3.2.-Células troncales mesenquimales derivadas de la matriz del cordón umbilical (UMSC)

Las UMSCs han sido foco de distintas investigaciones relacionadas sobre todo con el potencial de diferenciación, que estas poseen, hacia el linaje neuronal (Fu *et al.*, 2004a; Park, Lee and Kang, 2006; Rezniczek *et al.*, 2016). Estas células mesenquimales pueden ser adquiridas principalmente del denominado revestimiento del cordón, de la membrana amniótica, de la jalea de Wharton o de la región perivascular (Ding *et al.*, 2015) y al contrario que el caso de las ESCs o iPSCs no poseen la principal limitación de los problemas éticos. El potencial de diferenciación

de las UMSCs surgió por primera vez en el año 2000, donde (Erices, Conget and Minguell, 2000) aisló las células de la placenta y de la filtración de la sangre durante el parto, donde se probó el potencial de diferenciación hacia linaje osteogénico y adipogénico. En cuanto a los marcadores de superficie, las UMSCs son positivas a CD29, CD44, CD90, CD73, CD105 y HLA-I, pero son negativas a CD31, CD34, CD45, CD117, cumpliendo así los requisitos para ser denominadas MSC. Su capacidad de diferenciación se ha demostrado hacia linajes adipocíticos, osteogénicos, cartilagosos y neuronales (Fu *et al.*, 2004b; Fong *et al.*, 2012; Mennan *et al.*, 2013). En cuanto a la diferenciación osteogénica, se ha demostrado que la utilización de las UMSCs aisladas a partir de la jalea de Wharton llevan a una diferenciación óptima. En el caso de (Zajdel *et al.*, 2017) se logró la diferenciación hacia osteoblastos utilizando un cóctel de diferenciación de dexametasona, ácido ascórbico, β -glicerolfosfato, suplemento de crecimiento para células mesenquimales, L-glutamina, y penicilina/estreptomicina.

1.3.3.-Células troncales mesenquimales derivadas de ligamentos cruzados humanos (MSC derivadas – ACL/PCL)

Se trata de una fuente poco utilizada de MSC y poco estudiada, incluso teniendo en cuenta que su descubrimiento fue dado en 2005 por (Ge, Goh and Lee, 2005), sin embargo, se trata de una fuente muy común para su aislamiento y utilización, debido a la alta incidencia de este tipo de lesiones en el mundo del deporte. Solo en Estados Unidos se han detectado al menos 100, 000 casos de lesiones de ligamento cruzado anterior (ACL) (D'Elía, 2015), tratándose de una lesión muy típica en el entorno deportivo, aumentando el riesgo en deportes como baloncesto, fútbol, esquí alpino, balonmano, tenis y voleibol (Quijada García, 2017). Estas MSC resultaron ser positivas a CD29, CD44, CD90 y CD105 y negativo a CD34 y CD45, de tal forma que, pese a no cumplir totalmente todas las características de las MSC, se observa que estas MSC derivadas – ACL poseen características fenotípicas de las MSC (Fu *et al.*, 2016). Estas MSC poseen capacidad de diferenciación hacia linaje osteogénico, adipogénico y condrogénico (Liu *et al.*, 2017).

1.3.4.-Células troncales mesenquimales derivadas del endometrio (eMSC)

Al igual que las MenSCs, se tratan de unas células poco explotadas en el área de la investigación, pero que se tratan de una fuente importante de MSC válidos de un tejido altamente regenerativo que durante los años reproductivos de la mujer experimenta alrededor

de 400 ciclos de desprendimiento, crecimiento y diferenciación. Debido a su alto ritmo de diferenciación y de regeneración (Liu *et al.*, 2017), no es de extrañar que exista poblaciones de MSC, las cuales fueron descubiertas en 2004 por (Chan, Schwab and Gargett, 2004) utilizando como objeto de estudio mujeres ovulando de edades entre 34 y 51 años que se encontraban sometidas a histerectomía por fibromas o adenomiosis. Estas eMSC son positivas a CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, pero negativas a STRO-1, CD31, CD34, CD45 y HLA-II, por tanto, las eMSC pueden ser consideradas propiamente como MSC. Estas eMSC poseen capacidad de diferenciación hacia linajes adipogénico, condrogénico, osteogénico y neuronal (Mobarakeh *et al.*, 2012; Gargett, Schwab and Deane, 2015). Las eMSC han demostrado ser una fuente fiable de células troncales mesenquimales a la hora de utilizarlas como un recurso en el campo de la bioingeniería de tejidos y la consecuente regeneración de los tejidos, utilizando unas MSC de fácil obtención.

1.3.5.-Células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea (BM- MSC)

Tras el descubrimiento de las Células Troncales Hematopoyéticas (HSCs) (Trentin, 1978), las investigaciones se enfocaron en el ambiente de autorregeneración que se encontraba en la médula ósea, de tal forma que, (Gartner and Kaplan, 1980) aplicaron el sistema que se utilizó para descubrir las HSC, para poder confirmar la existencia de unas células troncales mesenquimales que se encontraban en la médula ósea. Éstas BM-MSCs son positivas a la expresión de CD29, CD44, CD73 y CD105, sin embargo, en la bibliografía se encuentran evidencias de que las BM-MSCs no expresan HLA-II, pero tampoco expresan bajos niveles de HLA-I (Wang *et al.*, 2016). Estas células también se caracterizan por su habilidad para diferenciarse en numerosos linajes, entre ellos se encuentran el linaje osteogénico, adiposo, condrogénico, musculo cardiaco y neuronal (Guo *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018; Lo Furno, Mannino and Giuffrida, 2018). Hablando específicamente de la diferenciación osteogénica, la diferenciación hacia este linaje se encuentra mayormente estudiado, llegado a saber que vías de señalización y moléculas se encuentran involucradas en el proceso de diferenciación, como la vía de señalización Wnt/ β -catenina, BMP, proteínas hedgehog, hormona paratiroidea (PTH), reguladores epigenéticos, y varios factores de crecimiento (Day *et al.*, 2005; Weinstein *et al.*, 2010; D'Alimonte *et al.*, 2013), durante la ruta de diferenciación es importante recalcar 2 principales pasos, el paso de diferenciación de las BM-MSCs a osteoblastos y evitar la diferenciación adipocítica, a nivel molecular, el factor de transcripción relacionado a Run 2

(Runx2), Osterix (Osx) y el gen homeobox menos distal 5 (Dlx5) son los encargados de llevar las BM-MSC a una diferenciación de osteoblastos y, por otra parte, el complejo formado por Runx2/Cbfa1 es el encargado de frenar la diferenciación de tipo adiposa (Hutchings *et al.*, 2020). En los últimos años, la mayor parte de estrategias regenerativas se basan en la utilización conjunta de las BM-MSCs junto con técnicas típicas del área de ingeniería de tejidos como la utilización de andamios (Costa-Pinto *et al.*, 2012) o técnicas de cultivo 3D sin andamios como el uso de los denominados esferoides (Fennema *et al.*, 2018).

1.3.6.-Células troncales mesenquimales derivadas de la cavidad bucal.

Durante los últimos años, esta población de MSC han sido estudiadas durante mucho tiempo por su potencial a la hora de utilizarlas. No solo poseen características similares a las BM-MSC (Volponi and Sharpe, 2013), sino que, además, se tratan de poblaciones celulares que se obtienen fácilmente con procesos no invasivos, dado que la mayor parte de estas células son desechadas en procesos quirúrgicos dentales. Recordando la estructura dental como 2 capas, una externa de esmalte y una capa interna de dentina que lleva dentro el tejido blando interno de la pulpa de los fibroblastos, donde el esmalte y la dentina cubren la pulpa dental (fibroblástica, poseyendo el riego sanguíneo, la red nerviosa del diente y tejido conectivo) (Sharpe, 2016; Aydin and Şahin, 2019). Estas MSCs se pueden encontrar en el interior de la pulpa dental, así como del ligamento periodontal y de los tejidos gingivales.

Una de las primeras células mesenquimales derivadas de cavidad bucal descubiertas fueron las DP-MSCs en 2000, identificando una población de células troncales en la pulpa dental del tercer molar (Gronthos *et al.*, 2000). Estas células poseen las características típicas de las MSC, como la capacidad de adherencia al plástico, y siendo positivas a la expresión de CD29, CD90, CD13, CD166, CD105, CD73, CD44 y STRO-1, y negativas a CD14, CD34 y CD45 (Yamada *et al.*, 2010; Stanko *et al.*, 2018). Al igual que las BM-MSC, AMSC y UMSC, las DP-MSC poseen capacidad de diferenciación hacia tejidos óseos, cartílago y adipocítico, aunque también poseen capacidad de diferenciación neuronal (Nosrat *et al.*, 2004). Dado la localización de estas DP-MSC y su similitud con las BM-MSCs y UMSCs, las DP-MSC poseen tanto capacidad de diferenciación ósea, como de diferenciación neuronal (Noda *et al.*, 2019). Las DP-MSC poseen una gran capacidad de diferenciación hacia otros linajes, entre los que se encuentra el tejido neuronal y poseen una gran ventaja frente a otros tipos de MSC dado que poseen una fácil obtención a partir de un tejido que normalmente suele ser desechado, como los son las extracciones de los terceros molares.

Las células dentales foliculares progenitoras (DFPCs) fueron aisladas por primera vez de la región molar de un ratón, en donde, posteriormente diferenciaron hacia un fenotipo osteoblástico utilizando la BMP2 (Zhao *et al.*, 2002). Estas células son positivas CD44, CD73 y CD90, y negativas a CD31, CD33, CD34 y CD45 (Sowmya *et al.*, 2015), aunque no poseen todas las características propias para evaluarlas como MSC, poseen un potencial similar a las células troncales mesenquimales derivadas de tejido periodontal (PDL-MSC) o las BM-MSC. Al tener características similares a las MSC, también poseen un potencial de diferenciación hacia un linaje óseo y fibroblástico (Ayoub, Berbéri and Fayyad-kazan, 2020). Para lograr la diferenciación ósea (Sowmya *et al.*, 2015) utilizaron un medio osteogénico formado por 10% DMEM, suplementado con 10nM de dexametasona, 10mM β -glicerolfosfato y 50 μ g/ml de ácido ascórbico durante 10 días. Las DFPCs son células progenitoras, que, aunque hace tiempo de su descubrimiento, aun su capacidad de diferenciación e inmunorregulación no han sido explotadas, por tanto, faltarían mayor cantidad de estudios para evaluar su potencial real.

Otro grupo de células no utilizadas habitualmente son las células troncales de la papila apical (SCAPs), la papila apical es un tejido conectado a la parte superior de un diente en desarrollo (Aydin and Şahin, 2019). La primera vez que estas células fueron aisladas fue en 2006 por (Sonoyama *et al.*, 2006), al reconocer que el tejido de la raíz de la papila apical humana era positivo a un marcador típico de MSC como lo es STRO-1. La zona rica de SCAPs se encuentra en una zona entre la papila y la pulpa, donde existe una clara diferencia entre ambas zonas dado que la zona de la papila posee menor cantidad de componentes celulares y vasculares que la pulpa (Sonoyama *et al.*, 2008). (Sonoyama *et al.*, 2008) extrajo las SCAPs a partir de terceros molares con raíces inmaduras, donde en este mismo estudio se probó la capacidad de diferenciación hacia un linaje osteogénico, adiposo y neuronal, posteriormente también se descubrió la posibilidad a una diferenciación condrogénica (Kang, et al., 2019). Estas células resultaron ser positivas a CD13, CD24, CD29, CD44, CD49, CD51, CD56, CD61, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166, NOTCH3 y Vimentina, y negativas a CD14, CD18, CD34, CD45, CD117 y CD150. Con la expresión/no expresión de estos marcadores se comprueba que las SCAPs poseen marcadores típicos de MSC y pueden ser tratadas como tal (Kang *et al.*, 2019). Además, la expresión de CD24 puede servir como marcador de distinción entre las SCAPs y las DP-MSC, dado que CD24 es indetectable en las DP-MSC (Sonoyama *et al.*, 2006). El descubrimiento de estas SCAPs no solo ha ampliado el horizonte del potencial de las MSC de la cavidad oral, sino que debido a su fácil obtención puede ser un gran paso en la medicina regenerativa para la regeneración de tejidos óseos o también neuronales como en terapias para

la médula espinal (De Berdt *et al.*, 2015), sin embargo, aún quedan varios aspectos a estudiar como el hecho de englobar los protocolos de cultivo celular para estas SCAPs.

El proceso germinal de los terceros molares en humanos empieza a los 6 años, para entonces los tejidos mantenidos en dicha zona permanecen indiferenciados y estas células poseen una capacidad de troncalidad y de proliferación típicas de las MSC y son las denominadas células troncales germinales del diente (TGSCS) (Aydin and Şahin, 2019). Estas células son positivas a CD105, CD166, CD29, CD73 y CD90, y negativas para los marcadores típicos hematopoyéticos como CD34, CD45, CD133, y CD14 (Taşlı *et al.*, 2013). Pese que ya hace tiempo de su descubrimiento, aun no se han llegado a utilizar abundantemente en las investigaciones, aunque (Taşlı *et al.*, 2016) llegó a comprobar la diferenciación osteogénica y neurogénica. Con esta revisión de las TGSCS se pudo comprobar la necesidad de estudiar más a fondo estas células troncales, debido a que con su potencial de diferenciación y la facilidad de obtención de estas presentan una gran ventaja frente a las demás MSC.

Otros tipos de células troncales encontradas en la cavidad oral son las células troncales de dientes temporales exfoliados (SHED), estas células fueron descubiertas en el 2003 por (Miura *et al.*, 2003) donde se utilizaron incisivos temporales de niños de entre 7 y 8 años. Estas células son positivas a los marcadores de CD13, CD44, CD90, CD146, CD166, STRO-1, CD29 y CD73, y negativos a CD3, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD117, y HLA-II (Ayoub, Berbéri and Fayyad-kazan, 2020) por tanto estas SHED cumplen características para que puedan ser consideradas MSC. Estas células poseen mayor capacidad de proliferación que las BM-MS (Yamada *et al.*, 2010) y poseen capacidad de diferenciación hacia linajes condrocítico, miocíticos, adiposo y neurogénico (Aydin and Şahin, 2019). Hasta la fecha, estas células no poseen capacidad de diferenciación directa a osteoblastos, sin embargo, estas SHED poseen capacidad de inducir la formación de hueso nuevo mediante la formación de un templado osteoinductivo para reclutar células osteogénicas de un huésped murino (Brar and Toor, 2012). Aun es necesaria mayor investigación sobre las SHED y su potencial de diferenciación y su capacidad inmunomoduladora, sin embargo, estas células poseen ventaja frente a otros tipos de MSC, ya que estas células proceden de dientes que habitualmente son descartados y que pueden ser encontrados muy habitualmente.

Por último, una de las MSC mayormente utilizadas en la regeneración ósea son las PDL-MS. Estas células mesenquimales fueron las primeras en ser caracterizadas, ya en 1983, (Shuttleworth and Smalley, 1983) explican cuál es la función de estas células. Las PDL-MS o PDLSCs son unas células encargadas de promover la conexión entre el hueso y el cemento

(Aydin and Şahin, 2019). Sin embargo, no fue hasta 2004 cuando se aislaron las PDLSCs y se observaron características similares a las MSCs (Seo *et al.*, 2004). Estas células pueden ser aisladas de varias fuentes, premolares, terceros molares o dientes sanos (Huang, Yang and Zhou, 2018). Las PDLSCs son positivas a los marcadores STRO-1, CD146, CD105, CD166, CD73, CD50 y CD90 y negativas a CD29 y CD105. Estas células poseen uno de los mayores potenciales de diferenciación de las MSC, con una capacidad de diferenciación hacia músculo, cartílago, adipocitos, neuronas o hueso (Ayoub, Berbéri and Fayyad-kazan, 2020). Además de la buena capacidad de diferenciación, estas células poseen una capacidad inmunomoduladora que no depende del ambiente, es decir, su capacidad inmunomoduladora no es constitutiva, activando las citocinas inflamatorias (Krampera, 2011). Las PDLSCs poseen una gran capacidad de diferenciación demostrando que estas células pueden ser utilizadas en un gran número de experimentos aplicados a la medicina regenerativa, teniendo la ventaja de que estas células pueden ser aisladas de una fuente amplia y siempre disponible.

1.4.-Esferoides:

Uno de los avances más importantes de la historia de la medicina regenerativa fue la entrada de la ingeniería de tejidos, lo cual ha permitido una ampliación de las bases para la regeneración de tejidos. La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario que aplica el principio de ingeniería y ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran la función de los tejidos (Langer and Vacanti, 1993). Sin embargo, una de las grandes limitantes que se ha enfrentado este campo es el tipo de cultivo que se utiliza a la hora de trabajar con las células aisladas y trabajadas para este fin, dado que es normal pensar que, si en general la vida se desarrolla en un ámbito 3D, el estudio de la regeneración tisular también sea en 3D, dado que la mayoría de los estudios se han realizado en cultivos 2D (monocapa) se observa que no son representativos en su totalidad para la regeneración tisular debido a que no reflejan la morfología y la funcionalidad de sus fenotipos nativos. Como resultado de los esfuerzos para superar dicha limitación de los cultivos en monocapa, aparecieron nuevas técnicas de cultivos en 3D que poseen numerosas ventajas (Park *et al.*, 2018).

Existen varios aspectos para tener en cuenta a la hora de trabajar en el campo de la regeneración de tejidos, sin embargo, un aspecto clave, es donde se encuentran las células normalmente en los tejidos, que es la matriz extracelular (ECM), esta ECM proporciona señales biomecánicas y bioquímicas distintas y, además, determina de manera crucial la diferenciación celular, la

proliferación y la homeostasis (Kinney *et al.*, 2014). El otro aspecto para tener en cuenta en este campo son los patrones de oxígeno, nutrientes, metabolitos y moléculas de señalización a las que son sometidas las células (Laschke and Menger, 2017).

En el contexto de la MSC, las limitantes de los cultivos 2D son más evidentes debido a que el mantenimiento del potencial de diferenciación y la troncalidad es más complicado en el ámbito de la monocapa (Lei and Schaffer, 2013).

Las técnicas de regeneración de tejidos pueden dividirse en 2 grandes grupos: aquellas que no requieren de andamios y aquellas que requieren de andamios. Anteriormente los esfuerzos se dirigían hacia la creación de materiales biocompatibles que posean una resistencia mecánica y una porosidad óptima e interconectada para la siembra celular, transporte de nutrientes y oxígeno, y la capacidad de unirse a las células adyacentes y liberar factores de crecimiento cuando sea necesario (Gilbert Triplett and Budinskaya, 2017). Debido a que la existencia de un material “perfecto”, que cumpla todas estas características es muy complicado, actualmente la mayor parte de los esfuerzos están dirigidos a otros tipos de cultivos 3D, como la utilización de esferoides.

Los esferoides son un modelo de cultivo celular que aprovecha la tendencia natural de las células a forma agregados mediante el proceso de autoensamblaje (Ryu, Lee and Park, 2019a). Estos esferoides poseen numerosas ventajas frente a los demás cultivos 3D, y, más aún de los cultivos en monocapa, estos esferoides poseen una mayor facilidad para mantener las interacciones células-células, o célula-matriz, provee un ambiente fisicoquímico similar al que ocurre *in vivo*, mantienen las propiedades fenotípicas intrínsecas, promueven la expresión de marcadores de troncalidad, ayudan a la secreción de citocinas, quimiocinas y factores angiogénicos, promueve la proliferación y la viabilidad, las células del esferoide no se encuentran adheridas a un soporte, sino que forman un agregado celular de forma esferoidal en el interior de un líquido pipeteable durante todo el tiempo que dura el cultivo, no se requiere de un andamiaje externo o interno para agregarse y las células del esferoide pueden originar su propia matriz extracelular (Meseguer *et al.*, 2015; Ryu, Lee and Park, 2019a). Por otro lado, en cuanto a sus limitantes, se puede hablar de su tamaño, debido a que cuanto mayor tamaño sea el esferoide, más complicado será que los nutrientes o la cantidad de oxígeno lleguen al centro del esferoide (Achilli, Meyer and Morgan, 2012).

Existen principalmente 7 formas de creación de los esferoides:

- **Cultivo de Pellet:** En este tipo de cultivo celular, se forman los esferoides mediante centrifugación en un solo paso, esta simplicidad en el método posee ventajas frente a

las demás técnicas por su rendimiento a la hora de autoensamblar las células (Handschel *et al.*, 2007).

- **Recubrimiento líquido:** La base de ésta en la capacidad de las células para adherirse a los materiales con propiedades no adherentes, dado que las células no se pueden adherir a los materiales, las células se unen entre ellas para formar agregados (Costa *et al.*, 2018).
- **Gota colgante:** La base de esta técnica es similar a la técnica anterior, al faltar un soporte rígido, se sustituyen las interacciones células-sustrato, por las interacciones célula-célula, de tal forma que las células comienzan a unirse entre ellas (Panek, Grabacka and Pierzchalska, 2018). Para ello se utiliza la tensión superficial y la fuerza gravitacional para que las células se mantengan siempre en suspensión (Ryu, Lee and Park, 2019a).
- **Cultivo giratorio:** Esta técnica se basa en que la suspensión celular se mantenga en recipientes de biorreactor de matraz giratorio (frascos Spinner) y la mezcla se mantenga siempre girando (Ryu, Lee and Park, 2019a).
- **Biorreactores de vaso de pared:** Los biorreactores se basan en el movimiento rotatorio lento sobre su eje, lo cual arrastra el fluido y cualquier partícula que haya en él, de tal forma que las células que se encuentren dentro del biorreactor estarán provistas de un ejemplar intercambio de nutrientes. Estos biorreactores poseen una gran ventaja frente a otros, la cual es que estos biorreactores no poseen impulsores o agitadores, por lo producen menor cizallamiento y ambiente de turbulencia, lo que reduce el posible daño que se pueda realizar frente a los tejidos formantes (Phelan *et al.*, 2019).
- **Microfluídica:** También denominado “laboratorio en un chip” (Ryu, Lee and Park, 2019a), estos chips son dispositivos de cultivo celular compuestos por polímeros flexibles que contienen microcanales huecos perfundidos poblados por células vivas que recapitulan la fisiología y la fisiopatología a nivel de órganos *in vivo* recreando todos los niveles estructurales *in vitro* (Sontheimer-Phelps, Hassell and Ingber, 2019). Este método de cultivo tiene dimensiones de microescala correspondientes a la escala de microestructuras *in vivo*.
- **Levitación magnética:** es un método de cultivo 3D en el que se mantienen las células en una interfaz aire/liquida mediante el uso de excitadores magnéticos de neodimio y el uso de nanopartículas magnéticas (Mims, 2011).

En nuestro trabajo de investigación hemos utilizado la metodología de levitación magnética, que, mediante la utilización de NPM de magnetita se formaron esferoides de DP-MSC, con la finalidad de demostrar su diferenciación hacia tejidos óseos y neuronales.

Capítulo 2:
Metodología

2.1.- Pregunta de investigación:

¿La aplicación de la técnica de levitación magnética llevará a un autoensamblaje esferoidal que nos permita estudiar la diferenciación celular en los microtejidos 3D formados?

2.2.- Justificación:

El campo de la ingeniería de tejidos y el campo de la regeneración tisular depende de la aplicación y uso de fuentes celulares que posean la capacidad de regenerar el tejido objetivo, sin embargo, las células ya diferenciadas poseen varias limitaciones como la accesibilidad, capacidad de colonización en andamios o el costo de estas. Es por ello, que los enfoques actuales se basan en la utilización de células troncales, adquiriendo importancia el uso de las MSC. Una de las MSC que poseen mayor accesibilidad son las DP-MSC, las cuales provienen de tejidos que habitualmente son desechados. Estas células DP-MSC han mostrado tener la capacidad de diferenciación hacia linajes óseos y neuronales. Sin embargo, los estudios se han realizado en cultivos en monocapa debido a que son los cultivos mejor caracterizados y más accesible en los laboratorios, los cuales presentan limitantes como no reflejar el microambiente tridimensional de lo que sucede en un tejido nativo. Se ha incrementado la búsqueda de modelos de cultivos tridimensionales (3D) que permitan un mejor entendimiento de la complejidad del microambiente y nicho permitiendo la formación de tejidos imitando lo que sucede *in vivo*. Es por ello, que la justificación principal de este trabajo es la implementación de cultivos 3D bajo la técnica de levitación magnética que nos puede permitir el autoensamblaje de las células DP-MSC y evaluar su capacidad de diferenciación neurogénica y osteogénica enfocados en los microambientes que se facilitan de la interacciones célula-matriz extracelular-NPM debido a las interacciones generadas en la membrana celular que facilitarían el desarrollo de esferoides que se pueden organizar en órdenes superiores de complejidad como la formación de un microtejido 3D *in vitro*.

2.3.- Hipótesis:

La técnica de levitación magnética basada en nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 induce la formación de esferoides de células troncales mesenquimales derivadas de pulpa dental y permitirá la obtención de microtejidos 3D durante las condiciones de diferenciación celular como estrategia para la regeneración de tejidos.

2.4.-Objetivo general y objetivos específicos:

Implementar cultivos bajo levitación magnética que faciliten y guíen la respuesta celular (proliferación y diferenciación) durante el autoensamblaje del esferoide (NPM-célula) hacia microtejidos 3D.

Los objetivos específicos del proyecto han sido:

- Determinar el papel de las nanopartículas de Fe₃O₄ en la formación de esferoides.
- Evaluar la proliferación y viabilidad celular de los esferoides durante las condiciones de cultivos bajo levitación magnética (LM).
- Evaluar el papel del autoensamblaje NPM-DP-MSM en la formación de un microtejidos 3D durante las condiciones de cultivo bajo LM
- Evaluar la capacidad de diferenciación de los esferoides 3D hacia linajes osteogénicos y neurogénicos.
- Caracterizar la capacidad de colonización de los esferoides en un andamio de PLA.

2.5.-Diseño experimental:

2.5.1.-Tipo de estudio:

Investigación experimental.

2.5.2.-Universo de estudio:

Esferoides formados por DP-MSM, por hFOB y cultivos monocapa de células SH-SY5Y.

2.5.3.-Variables de estudio:

Nombre	Tipo de variable
Tipo de cultivo	Nominal
Tiempo	Ordinal
Tamaño	Continua
Absorbancia	Continua
ALP	Continua
Alizarina Roja	Continua
Gen	Nominal
Expresión Relativa	Continua

Capítulo 3:
Osteogénesis

3.1.-Regeneración ósea:

La regeneración ósea es un proceso que ocurre posterior a un evento de daño en la estructura ósea, en el cual, el tejido óseo es capaz de recuperar las funcionalidades sin necesidad de dejar cicatriz (Checa, 2018).

Así como los artrópodos poseen la cutícula, la cual es parte del esqueleto y da soporte a los tejidos internos, los vertebrados poseen el esqueleto formado por el tejido óseo que da soporte a los tejidos blandos. Sin embargo, al contrario que los artrópodos que poseen una endocutícula más flexible y una exocutícula más rígida, y poseer la capacidad de ecdisis para realizar el cambio del exosqueleto (Barnes, 2006; Soto, Dionizio Moreira and Pallini, 2011), los vertebrados poseen una capacidad de recambio óseo que se basa en el equilibrio constante entre la actividad de dos células importantes, los osteoblastos y los osteoclastos (Dimitriou *et al.*, 2011).

Durante un defecto óseo, se activa un proceso inflamatorio y si no hay un proceso de regeneración, se da un proceso de reparación por la aparición de tejido fibroso y cartílago. Sin embargo, si existe la activación de regeneración debido a que el defecto no es de tamaño crítico, se da lugar el reclutamiento de células MSCs al sitio dañado y su diferenciación hacia el linaje osteogénico para comenzar con la formación de un tejido mineralizado por parte de los osteoblastos (Dimitriou, Tsiridis and Giannoudis, 2005) que al estar en su fase activa de secreción de matriz mineralizada quedan atrapados para diferenciarse en osteocitos que se propone son células sensoriales del tejido óseo y se mantengan la funcionalidad del mismo, debido a la conexión que se lleva entre otros osteocitos y osteoblastos en fase secretora (Ansari, 2019).

3.1.1: Proceso de diferenciación ósea:

En la actualidad y gracias al avance de las técnicas moleculares se ha conseguido identificar varias vías de señalización que dan lugar a la diferenciación en osteoblastos (también denominado osteogénesis) (Ansari, 2019; Guasto and Cormier-Daire, 2021a) o de osteoblastos hacia osteocitos. De entre ellas se destacan la vía de Hedgehog (HH), la de la proteína relacionada a la hormona paratiroidea (PTHrP), la de Wingless e int-1 (WNT), la de NOTCH, la del TGF- β , la de BMP y la de factor de crecimiento fibroblástico (FGF), sin embargo, la activación de la vía de NOTCH, y la inhibición de la vía canónica de Wnt/ β -catenina da lugar a la diferenciación de osteocitos (Guasto and Cormier-Daire, 2021a).

Una de las principales y primeras vías de señalización más estudiadas para la diferenciación ósea es la vía de señalización de WNT. Esta vía posee varios subtipos de recorridos

intracelulares de la vía dependiendo de cual correceptor es el activador de la vía, ya sea las proteínas relacionadas a lipoproteínas o los receptores huérfanos tipo tirosina quinasa (ROR), denominándose vía canónica o vía no canónica (Katoh, 2002). Este proceso inicia con la unión a receptores Frizzled (FZD) por parte del ligando y cuando se da la unión del complejo de FZD y los receptores anteriores, se da lugar a la activación de la proteína Disheveled (Dsh) y en el caso de que la vía de señalización activada fuera la canónica, se da lugar a la activación de β -catenina, donde en el núcleo se une al factor de transcripción LEF dando lugar a la activación de genes asociados a la diferenciación osteoblástica como la Osteoprotegerina (OPG) (Plotkin and Bruzzaniti, 2019). Si en su lugar se activa la vía no canónica, Dsh activa la quinasa Jun (JNK) o enzimas sensibles al calcio, dando lugar a la activación del factor nuclear C-Jun, el cual provocará la expresión de genes asociados a la diferenciación ósea como la sialoproteína ósea (BSP), fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OCN) (Xu *et al.*, 2017).

La activación de Wnt inhibe la condrogénesis desde las MSCs, dando lugar a la osteogénesis, como, por ejemplo, inhibiendo SOX9, dando lugar a la diferenciación de osteoblastos maduros (Hill *et al.*, 2005).

Otra de las vías de señalización que activan la osteogénesis es por medio de factores de crecimiento como el FGF. El FGF se encuentran en la matriz extracelular (ECM), hasta que son necesarios, activándose mediante la intervención de proteasas que permite que se unan a sus receptores FGFR1-4, que en caso específico de la osteogénesis son los receptores 1-3 en etapas de desarrollo adulto (Jacob *et al.*, 2006; Ornitz and Marie, 2015). Posterior a su unión, se genera una fosforilación del sustrato 2α de las proteínas adaptadoras FGFR (FRS2 α) la cual dará lugar a la activación de factor de transcripción 1 (STAT1), la fosfolipasa γ (PLC γ) y el factor de intercambio del nucleótido guanina (GRB2) (Guasto and Cormier-Daire, 2021b). Específicamente para la osteogénesis, es importante recalcar que la inhibición de FGFR1 provoca una pérdida de la masa esquelética (Plotkin and Bruzzaniti, 2019), y que además la unión al FGFR1 provoca una baja expresión de RUNX2 (marcador de diferenciación temprano en la osteogénesis) en las etapas de desarrollo temprano e inhibe la mineralización en osteoblastos ya maduros, sin embargo, la unión de FRFR2 provoca la proliferación de pre-osteoblastos y la expresión de RUNX2 (Yu *et al.*, 2003). La actuación de estas 2 vías de señalización sobre la osteogénesis se presenta en la figura 5.

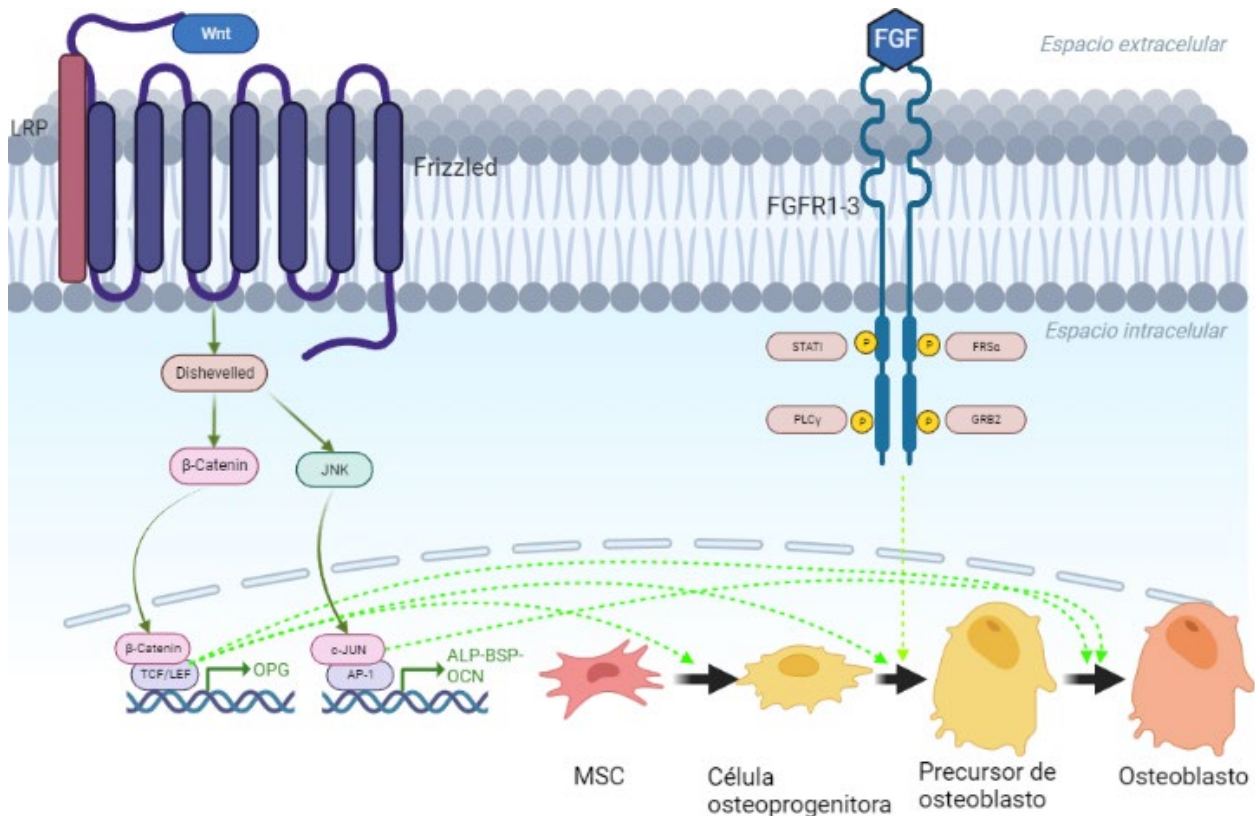


Figura 5: Imagen que resume la vía de señalización de Wnt y de FGF y su posterior implicación en la diferenciación ósea desde las MSC. Las flechas continuas verdes implican la activación de la molécula y las flechas discontinuas muestran la implicación de la vía hacia que etapa de la osteoblastogénesis es referida. En el caso de la vía canónica de WNT activa la diferenciación desde MSC hacia cualquier etapa de la osteoblastogénesis, sin embargo, la vía no canónica actúa en las etapas finales del osteoblasto hasta su madurez. La vía de FGF activa el paso de la célula osteoprogenitora hacia los precursores osteoblásticos, inhibiendo la diferenciación condrogénica. Imagen creada en BioRender.com.

3.1.2.-Marcadores de la osteogénesis:

Como se ha visto anteriormente, la activación de las diferentes vías de señalización de la osteogénesis da lugar a la expresión de marcadores propios de los osteoblastos, los cuales poseen diferentes funciones y objetivos dentro del proceso de la diferenciación ósea.

- **ALP:** Se trata de una metaloenzima encargada de hidrolizar esteres monofosfatos (Khotib *et al.*, 2021). Después del periodo de proliferación celular de los osteoblastos recién diferenciados comienza un periodo de cambio en la ECM para conseguir una ECM con capacidad de mineralización. Para llevarlo a cabo, uno de los genes que son expresados es la ALP (Lian and Stein, 2008). Su actividad se relaciona con la hidrolisis

del pirofosfato para proporcionar los fosfatos esenciales en la formación de la hidroxiapatita (Vimalraj, 2020). La ALP tiene sus picos de expresión durante las etapas tempranas de la madurez de los osteoblastos o incluso cierta actividad en los precursores de osteoblastos (Ha *et al.*, 2017).

- **OCN:** La osteocalcina es una proteína γ -carboxiglutamato que se expresa mayormente en osteoblastos, siendo la proteína no colagénica más abundante del hueso (Komori, 2020). Una de las funciones de la osteocalcina es su participación en el proceso de mineralización del hueso y dentina, o incluso en la regulación de la insulina (Song, 2017). Sin embargo, el aumento de la densidad ósea al realizar un knockout del gen, indica que el papel principal está relacionado en la participación de la remodelación ósea, además de ser uno de los principales marcadores de la osteogénesis (Cundy, Reid and Grey, 2014).
- **Runx2:** Se trata de un factor de transcripción presente en el proceso de osteogénesis y en ciertas etapas de la condrogénesis (Rutkovskiy, Stenslkken and Vaage, 2016). Su expresión empieza en los precursores de osteoblastos y se encuentra presente en cada una de las fases de diferenciación celular del tejido óseo (Khotib *et al.*, 2021), gracias a su afinidad con la subunidad Cbfa (núcleo de unión del factor alfa) (Cubillos Rey *et al.*, 2012). Por otra parte, su alta expresión bloquea la vía de señalización hacia condrocitos (Maeno *et al.*, 2011), por lo que se trata de otro marcador importante para la osteogénesis.
- **COL1:** La matriz ósea está formada principalmente entre un 90% de proteínas colagénicas y un 10% de proteínas no colagénicas, y dentro de este porcentaje del 90%, se conforma de colágeno tipo I, III y V, siendo el de tipo I, el más abundante (Lin *et al.*, 2020). Este tipo de colágeno tiene la principal función de ser el material de soporte de la formación de los cristales de hidroxiapatita y es la base estructural del tejido óseo (Khotib *et al.*, 2021). El colágeno de tipo I se expresa mediante la unión entre Runx2 y la región promotora de COL1, además, su síntesis en las células osteoblásticas, indican que, su expresión, lleva a la osteogénesis (Blair *et al.*, 2017), teniendo un papel como marcador de la diferenciación celular.

Con la finalidad de esclarecer y de colocarlos en un espacio/tiempo el proceso de la osteogénesis, se ha elaborado una imagen (figura 6) que resume este proceso y el nivel de expresión a lo largo de esta diferenciación.

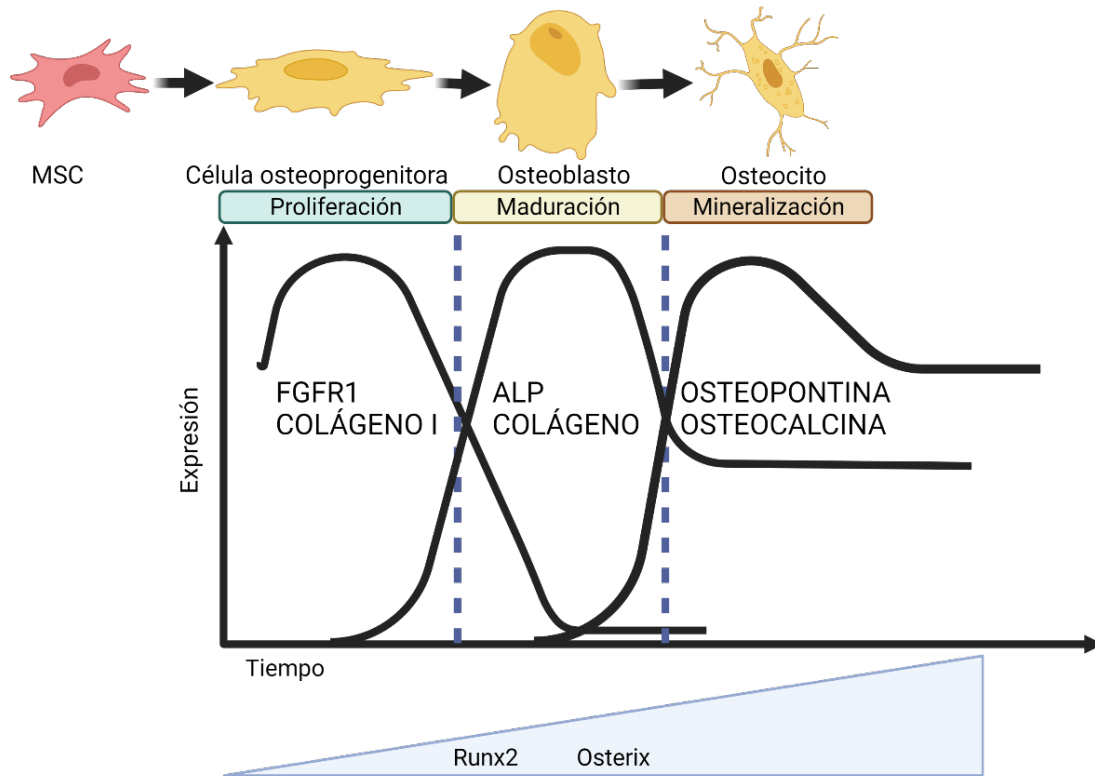


Figura 6: Se muestran los diferentes marcadores de la osteoblastogénesis, durante cada etapa de la diferenciación celular a partir de las MSC. Los receptores de FGF son los primeros en expresarse, al igual que el colágeno de tipo I. Durante esta etapa se comienza a observar la expresión de Runx2, la cual marca el comienzo a la diferenciación osteoblástica, con la expresión de ALP y de los demás tipos de colágeno. Finalmente, con la mayor expresión de Osterix (posterior a Runx2) los osteoblastos empiezan a expresar OPN (Osteopontina) y OCN finalizando su diferenciación a osteocitos. Las líneas discontinuas representan la separación de cada uno de los procesos de diferenciación. Imagen creada en BioRender.com.

Como parte del desarrollo experimental de este trabajo doctoral, nosotros en este capítulo abordamos la formación de esferoides de células troncales mesenquimales derivadas de pulpa dental por medio de la técnica de levitación magnética y evaluamos su capacidad de diferenciación hacia el linaje osteogénico, analizando moléculas que están involucradas en la osteogénesis previamente descrita. Para ello, se desglosa a continuación la metodología, los resultados y discusión:

3.2.-Materiales y Métodos:

3.2.1.- Formación de los esferoides por levitación magnética:

Se utilizaron como control positivo osteoblastos fetales humanos (hFOB, 1.19 ATCC CRL-11372) y las células experimentales DP-MSC que han sido una donación del Dr. Juan José Montesinos del laboratorio de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas IMSS del Hospital Siglo XXI, las cuales han sido caracterizadas previamente (De la Rosa-Ruiz *et al.*, 2019). Estas células son positivas a los marcadores CD105, CD90 y CD73, y negativas para los marcadores HLA-DR, CD34, CD45, CD14 y CD31. Las células han demostrado tener capacidad de diferenciación hacia linaje osteogénico y condrogénico, pero no han demostrado diferenciación hacia linaje adipogénico. La línea celular muestra una morfología fibroblástica, con un citoplasma escaso, alargado y un núcleo central.

Los hFOB se cultivaron en un medio DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, Biosciences, CA, United States), 2,5 mM de L-glutamina y una solución de antibióticos (Estreptomina 100 µg/ml y penicilina 100 U/ml, Sigma-Aldrich, MO, United States). En el caso de las DP-MSC, se cultivaron en un medio α -MEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) suplementado de la misma manera que en el caso anterior.

Los esferoides se formaron gracias a la utilización de las NPM (Nano Shuttle™-PL; Greiner Bio-One, Houston, TX, USA). Para la diferenciación ósea se utilizó un medio de diferenciación osteogénico compuesto por 50 µM de ácido ascórbico, 10 mM de β -glicerolfosfato, y 10^{-7} M de dexametasona). El medio se cambió cada 3 días durante el periodo experimental.

3.2.2.- Ensayos de proliferación, viabilidad y morfología:

Con la finalidad de realizar los ensayos de proliferación, se realizó la prueba de Resazurina. Para ello, se colocan 10 µl de la solución de resazurina directamente al medio donde se encuentran los esferoides. Posteriormente, pasadas 4 h, se retiran 100 µl del medio donde se encontraba la solución de resazurina y se lee en el espectrofotómetro a 570 nm (ChroMate, AWARENESS, Palm, FL, USA).

En el caso del ensayo de viabilidad y de morfología, los esferoides se analizaron mediante microscopía de fluorescencia gracias a la incubación del CellTracker Green CMFDA (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Posterior a la incubación del CellTracker, los esferoides se observaron en un microscopio invertido de epifluorescencia (AE31E model, MOTIC, Schertz, TX, USA). Para la tinción de los núcleos se realizó una contratinción con DAPI. Para la medición

del tamaño del esferoide y evaluar la morfología se utilizó el software Motic Images Plus 3.0 realizándose mediciones entre dos puntos de la periferia pasando por el centro del esferoide. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.2.3.- Medición de la osteogénesis:

Para medir la capacidad de diferenciación de las DP-MSC hacia un linaje osteogénico, se realizaron diferentes ensayos:

Se evaluó la actividad enzimática de la ALP, este ensayo se basa en un cambio colorimétrico debido a la desfosforilación del p-nitrofenil fosfato a p-nitrofenol por medio de la fosfatasa alcalina. Para llevarlo a cabo se utilizó el kit de ALP (ABCAM, Cambridge, UK) donde, en primer lugar, se le añadió 100 µl de tripsina para disolver la esfera y posteriormente se lisaron las células. A esta solución se le añadió 50 µL de 5 mM de p-nitrofenil fosfato (pNP) y posterior a su incubación durante una hora se midió en el espectrofotómetro a 405 nm la reacción enzimática. Con la absorbancia obtenida, se calculó la cantidad de ALP (U/L), mediante la siguiente formula:

$$ALP (U/L) = \left(\frac{B}{\Delta T * V} * D \right)$$

Donde:

- B es la cantidad de p-nitrofenol generado por las muestras en µmol.
- ΔT es el tiempo en el que se han dejado las muestras.
- V es el volumen utilizado.
- D es el factor de dilución de la muestra.

Por otra parte, para medir la cantidad de la mineralización extracelular obtenida de los esferoides relacionada con los depósitos de calcio, se utilizó la tinción de alizarina roja (Millipore, Burlington, VT, USA). Las imágenes representativas se tomaron posterior a 14 y 21 días mediante microscopía de óptica. Para el análisis cuantitativo de la alizarina roja, posterior a la obtención de las imágenes, se añadieron 200 µL de hidróxido de amonio al 10% durante 15 minutos a 85°C, se centrifugaron a 13,000 rpm y se retiraron 100 µL de la solución para medirse en el espectrofotómetro a 405nm. La absorbancia se correlacionó con una curva estándar de alizarina roja en µM previamente establecida.

Finalmente, la cuantificaron de la expresión de genes involucrados en la diferenciación osteogénica como: Col1, Runx2 y OCN, se analizaron mediante qRT-PCR. Para ello, se aisló el RNA de las muestras mediante el kit Isolate II RNA Mini Kit (Bioline), se midió la concentración del RNA mediante el ensayo fluorométrica Qubit (RNA HS Assay Kit). Para la obtención de la cadena complementaria (cDNA) se llevó a cabo mediante el sistema de transcripción reversa Improm-II y la amplificación de los genes por qPCR, se realizó utilizando el kit Forget-Me-Not EvaGreen qPCR Master Mix kit mediante los cebadores mostrados en la tabla 1. El GAPDH se utilizó como gen constitutivo.

Nombre del Gen	Secuencia de los cebadores
Osteocalcina (OCN)	Forward: TGAGAGCCCTCACACTCCTC
	Reverse: CGCCTGGGTCTCTTCACTAC
Colágeno 1 (COL1)	Forward: GAGAGCATGACCGATGGATT
	Reverse: ATGTAGGCCACGCTGTTCTT
Factor de transcripción relacionado a Run 2 (Runx2)	Forward: CTCTGACCGCCTCAGTGATT
	Reverse: GCCTGGGGTCTGTAATCTGA
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	Forward: GCATCCTGGGCTACACTGAG
	Reverse: TGCTGTAGCCAAATTCGTTG

Tabla 1: Cebadores utilizados para la qRT-PCR.

3.2.4: Potencial de colonización de los esferoides en una membrana de PLA:

Como estrategia para una futura aplicación de los esferoides en terapias de regeneración ósea, se evaluó la interacción de los esferoides con membranas fibrilares de PLA.

La técnica de hilado por propulsión de gas se usó para elaborar las membranas de PLA al 10% (w/v) como se ha reportado previamente (Chanes-Cuevas *et al.*, 2020). Una vez obtenidas

las membranas se colocaron los esferoides directamente sobre la superficie con la finalidad de analizar el potencial de colonización por parte de las células que conforman a los esferoides durante 7 y 14 días. Para obtener imágenes de la interacción, colonización y viabilidad en los cultivos se realizó el ensayo LIVE/DEAD (Invitrogen). Las imágenes se obtuvieron mediante un microscopio de epifluorescencia (model AE31E; MOTIC, Schertz, TX, USA) y como contratincción se realizó la técnica de DAPI para observar los núcleos.

3.2.5: Análisis estadístico:

Los resultados se muestran como una media \pm su desviación estándar. Para la comparación entre distintos grupos con más de dos factores se empleó la prueba de ANOVA de 2 vías con una Post-hoc de Tukey o de Bonferroni dependiendo de la cantidad de grupos para analizar. Las pruebas estadísticas se realizaron en el software Graphpad Prism 9.0.1.

3.3.- Resultados y Discusión:

En primer lugar, se obtuvieron los esferoides de DP-MSK y de hFOB por levitación magnética, tal y como se ha reportado anteriormente (Gaitán-Salvatella *et al.*, 2021). En el caso de la levitación magnética, existen reportes en los que el sistema es utilizado con la finalidad de inducir la diferenciación ósea (Chan *et al.*, 2021; Labusca *et al.*, 2021), sin embargo, la gran mayoría de casos están asociados a la formación de tumoroides o de estructuras 3D (Kotze *et al.*, 2021; Onbas and Arslan Yildiz, 2021).

Los esferoides que se formaron obtuvieron un aumento significativo de tamaño con una media de 300 μm en el día 14 (figura 7) que concuerda con reportes previos en la generación de esferoides en el campo de la diferenciación ósea (Labusca *et al.*, 2021).

En los primeros días de cultivo se aprecia un lento crecimiento que se puede atribuir a los fuertes enlaces e interacciones entre las células y el comienzo de la secreción de ECM para garantizar la cohesión celular en los esferoides, y a partir de que se logra la unión célula-ECM-célula, se aprecia una activa proliferación celular (Chan *et al.*, 2021). Esto concuerda con los estudios morfológicos representados en la figura 7, donde a lo largo de los 14 días, las esferas han mantenido su forma esférica y aumentan gradualmente el tamaño directamente proporcional a lo esperado con el número de células utilizado (9000) durante el tiempo de cultivo. Este comportamiento es influenciado por la propia técnica de la LM, pues en otros casos como la técnica de gota colgante o de placas de ultra baja adherencia, no se suelen cumplir la morfología requerida o existe riesgo a la hora del cambio de medio de su disgregación o ruptura,

demostrando que la LM es una de las técnicas que mejora la estrecha unión celular permitiendo mantener la morfología homogénea de la esfera (Ryu, Lee and Park, 2019b).

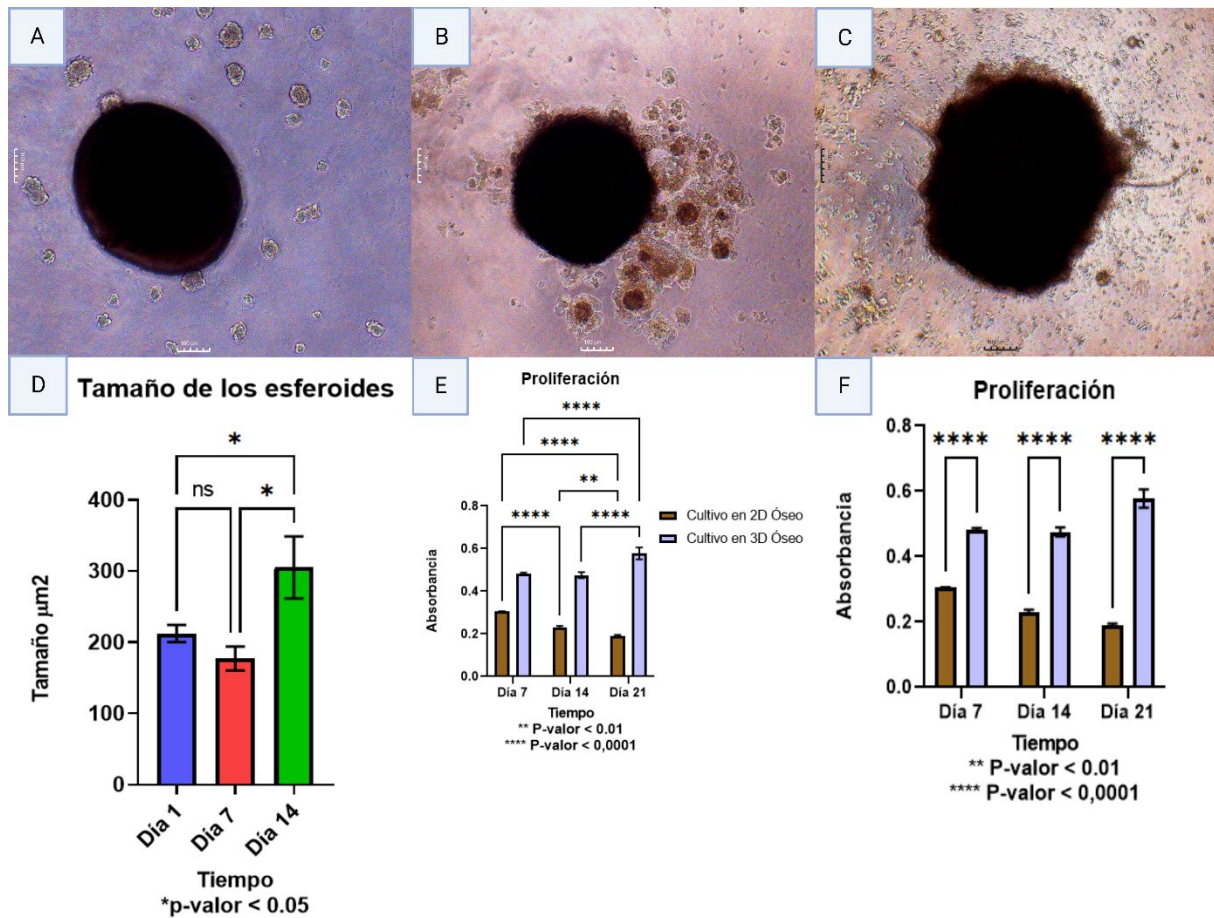


Figura 7: Se muestra la morfología de los esferoides llevados a diferenciación ósea, en A la esfera al día 1, B en el día 7 y C en el día 14, mostrando el crecimiento progresivo de la esfera hasta el día 14, corroborado por el análisis realizado en D, donde se muestran los tamaños de los esferoides demostrando una diferencia significativa en el día 14 en relación con los demás días. En E se muestra el análisis realizado para estudiar la proliferación celular mediante el ensayo de resazurina. Se puede observar cómo aumenta la proliferación celular significativamente hasta el día 14, y en F se observa como los esferoides poseen mayor proliferación celular que el cultivo celular en monocapa. Barra de escala: 100 μm (color blanco en A y B, color negro en C). Se realizaron ANOVA de dos vías con una prueba de Bonferroni como prueba Post hoc.

Las ventajas de los cultivos en 3D sobre los cultivos tradicionales en 2D, son evidentes y como, por ejemplo, la capacidad de proliferación en los sistemas 3D imita lo que sucede *in vivo* permitiendo la expresión de moléculas que regulen la ECM (Ravi *et al.*, 2015; Habanjar *et al.*, 2021). Esto puede ser observado en nuestros ensayos de proliferación por resazurina (figura 7E y 7F) donde se observa como los esferoides poseen significativamente una mayor proliferación que los cultivos en monocapa. Esto es principalmente por las interacciones entre las células y

la célula-ECM al estar en una configuración 3D, donde el microambiente es más similar al que se encontrarían en un tejido nativo (Ryu, Lee and Park, 2019c).

Por otra parte, el ensayo de viabilidad de por el marcaje CellTracker nos permitió observar por fluorescencia el estado en el que se encuentran los esferoides. Tal y como se muestra en la figura 8, se observa como en las capas más externas del esferoide, las células muestran una fluorescencia más activa, indicando que hay mayor viabilidad de la esfera, característica que se ve influenciada por las interacciones realizadas entre las células y la ECM facilitando el flujo de nutrientes (Edmondson *et al.*, 2014). Sin embargo, una de las limitantes a la hora de trabajar con los esferoides, es su propia morfología en sí, puesto que la observación del núcleo de la esfera mostraría mayormente la viabilidad de dicha zona. Una de las características principales de los esferoides es la presencia de un núcleo necrótico debido a que las células internas no son capaces de recibir suficiente oxígeno, metabolitos y aparece un exceso de desechos en el centro del esferoide (Onbas and Arslan Yildiz, 2021). Con la finalidad de conseguir dicha información sobre el núcleo necrótico, existen varias tecnologías que podrían ser utilizadas para este fin, como el uso de un microscopio confocal, ensayos LIVE/DEAD o cortes de parafina (Wartenberg and Acker, 1995; Bussador do Amaral, Shiniti Urabayashi and Maria Machado-Santelli, 2010; Brancato et al., 2018). Para conseguir la imagen del núcleo necrótico del esferoide en este proyecto realizamos imágenes de fluorescencia mediante el ensayo LIVE/DEAD (figura 13).

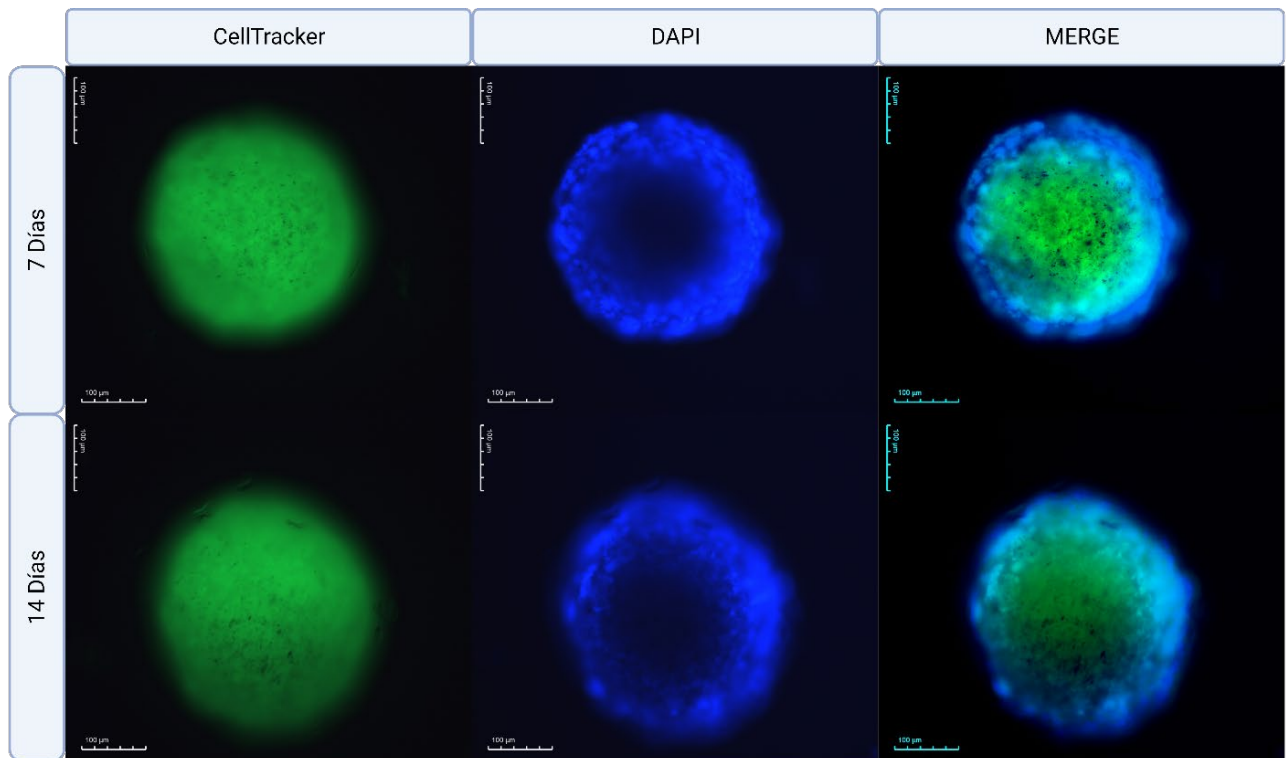


Figura 8: Imagen que muestra el ensayo de viabilidad y su contraindicación con DAPI. En la figura se muestra como la capa externa del esferoide se encuentra con viabilidad positiva. Barras de escala: 100µm

El evento de osteogénesis que se lleva durante la diferenciación celular de las DP-MSC y de los osteoblastos fetales, se analizó primeramente por medir la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina. La ALP es una enzima expresada gracias a la vía de señalización de Wnt (Xu *et al.*, 2017), que posee la principal función de aumentar el fosfato inorgánico en la ECM para que empiece la formación del cristal de hidroxiapatita (Boonrunsiman *et al.*, 2012).

La presencia de ALP en suero es suficiente y posee capacidad de inducir una diferenciación ósea sin la necesidad de factores osteogénicos (Ansari, Ito and Hofmann, 2022), demostrando la capacidad de inducción osteogénica de la ALP. En nuestros resultados, encontramos que los niveles de actividad de la ALP son mayores en los primeros 7 días en comparación con la actividad a los 14 días de cultivo (figura 9). Este comportamiento en la actividad de la enzima ALP coincide con la activación de la ALP en las etapas tempranas de la diferenciación osteogénica (Ha *et al.*, 2017). Asimismo, nuestros resultados indican que la actividad de la ALP se ve aumentada significativamente en los esferoides de DP-MSC que en el control positivo de esferoides formados con hFOB. Mostrando el potencial terapéutico que pueden tener las células troncales mesenquimales derivadas de pulpa dental en futuras aplicaciones de regeneración del tejido óseo.

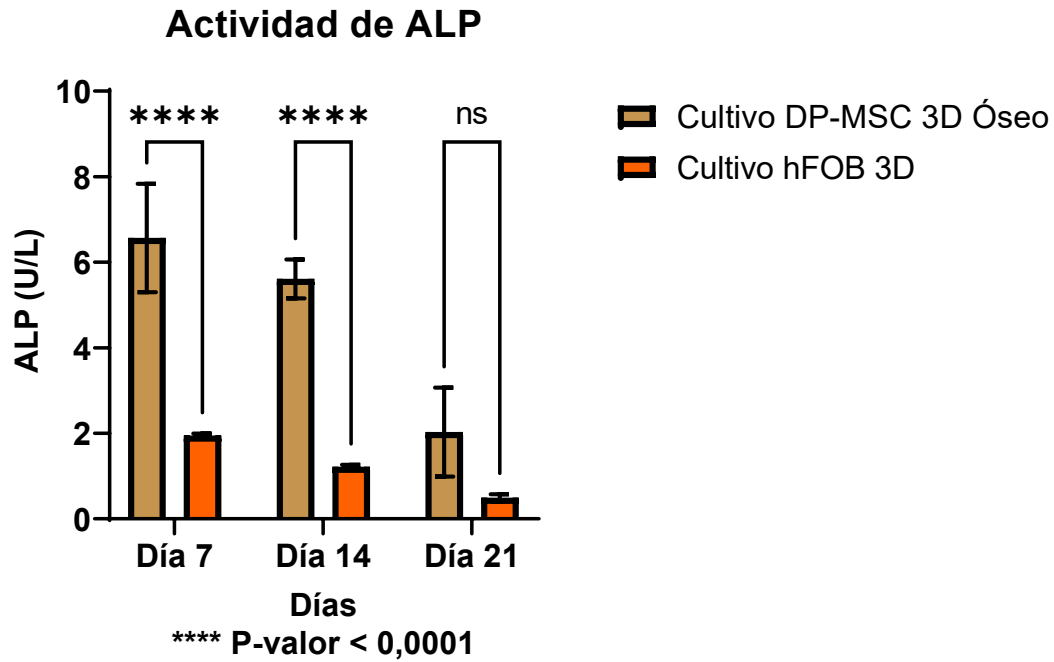


Figura 9: Gráfica que muestra la diferencia entre la actividad enzimática entre los cultivos 3D. Se muestra una clara diferencia estadística entre ambos grupos demostrando que en el grupo de las DP-MSC, la actividad de la ALP es mayor a lo largo de los 21 días. Se realizó un ANOVA de 2 vías y Tukey como prueba post hoc.

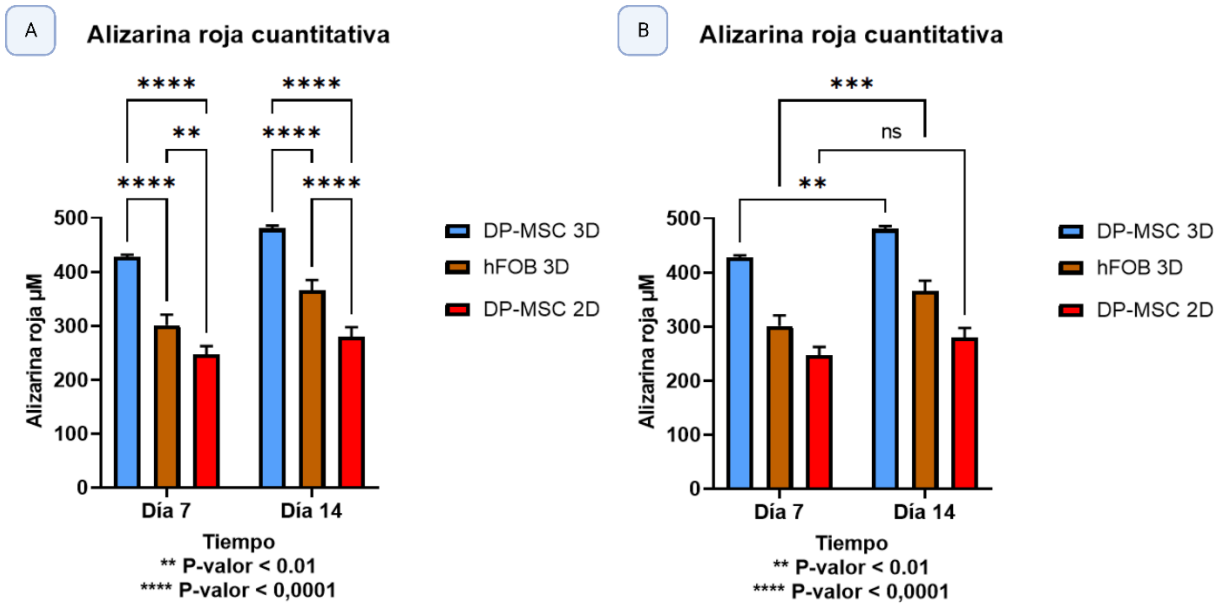


Figura 10: Gráficas que muestran la estadística entre los esfereoides formados por DP-MSC y osteoblastos, con los cultivos en monocapa. En A se muestra una comparación entre los diferentes cultivos en ambos días, mostrando que las DP-MSC poseen mayor capacidad de formación de nódulos de calcio. En B se muestran las diferencias entre los 2 días en un mismo tipo de cultivo, mostrando que ambos esfereoides, incrementaron la cantidad de nódulos del día 7 al día 14. Se realizaron ANOVAS de 2 vías y Tukey como prueba post hoc.

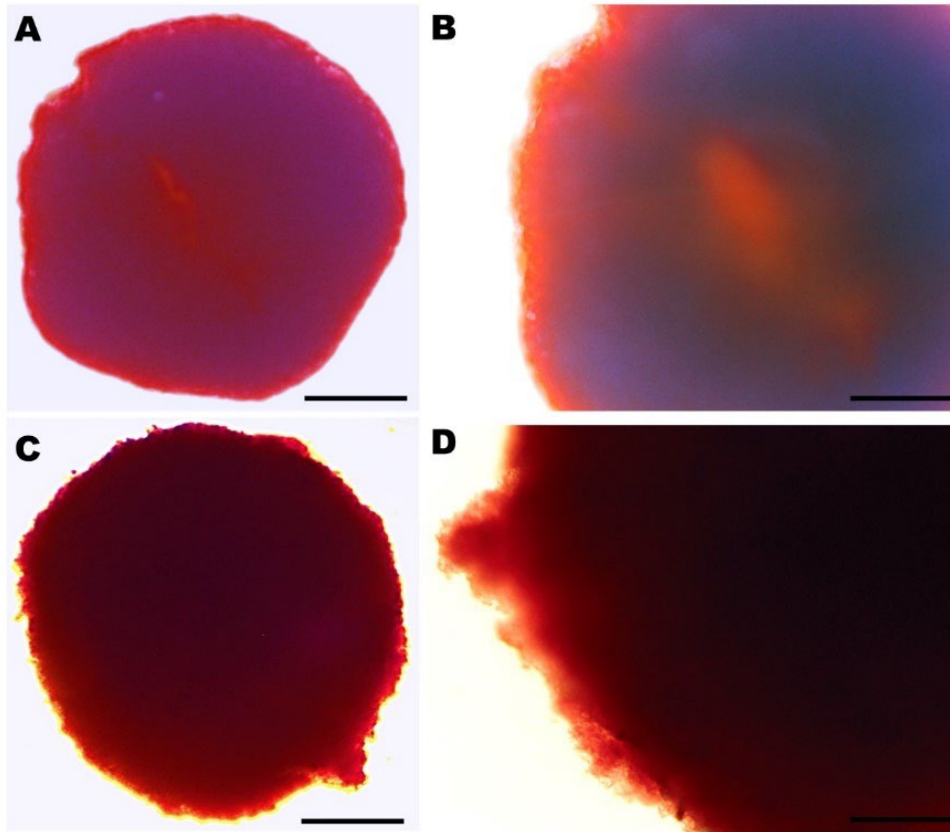


Figura 11: Imagen que muestra en microscopía óptica, los esféroides de 21 días con una tinción de ARS, mostrando en los bordes las formaciones de los nódulos de calcio, en A-B son los esféroides de DP-MSC y C-D de osteoblastos. Barra de escala: 100 μm .

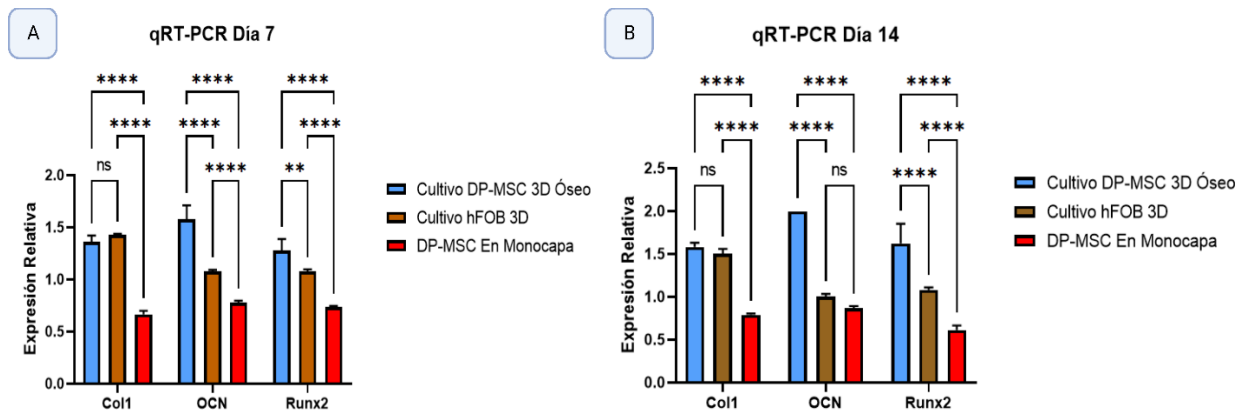


Figura 12: Se muestran los resultados de las pruebas estadísticas para la qRT-PCR. En A se muestran las diferencias estadísticas en el día 7, donde, a excepción de Col1 entre ambos grupos de esféroides, el grupo de las DP-MSC 3D poseen mayor cantidad de expresión relativa en comparación de los demás grupos, resaltando una mayor diferencia estadística hacia el grupo en 2D. De igual manera, se muestra el resultado en B del día 14, donde presenta similares resultados a excepción de la OCN entre los osteoblastos y los DP-MSC en 2D. Se realizó un ANOVA de 2 Vías con una prueba Bonferroni como prueba post hoc.

Una vez los osteoblastos se encuentran completamente diferenciados empiezan a realizar los procesos de mineralización de la ECM, formando estructuras tridimensionales denominadas nódulos óseos o nódulos de calcio (Mechiche Alami *et al.*, 2016). En el caso de las MSC

cultivadas en 2D, que se han llevado a diferenciación ósea, producen nódulos de calcio en áreas más densas provocando un aumento de la cantidad de nódulos desarrollados en el proceso de diferenciación, que en osteoblastos ya maduros (Chatree *et al.*, 2023). Esta misma característica puede ser observable en los esferoides 3D, dado que en el caso de los esferoides de DP-MSC arrojan una mayor cantidad de alizarina roja que los esferoides cultivados en 2D (figura 10).

Las DP-MSC poseen capacidad de diferenciación hacia un linaje osteoblástico mediante varias vías de señalización como se ha mencionado anteriormente. Siguiendo el patrón de las diferentes etapas de la osteogénesis (figura 6), podemos establecer una línea temporal de cada una de las etapas de diferenciación en nuestros esferoides. Para lograr lo anterior se realizó un ensayo cuantitativo por qPCR donde hemos evaluado la expresión de los genes de RUNX2, Col1 y OCN (figura 12). Nuestros resultados muestran una regulación positiva de RUNX2, donde a los 7 días existe una mayor expresión del gen en los esferoides de DP-MSC en comparación con los esferoides de hFOB y del cultivo en monocapa. Este comportamiento se mantiene en el día 14 de evaluación. La expresión de RUNX2 es importante ya que activa a Osterix en las primeras etapas de diferenciación osteogénica en las células MSC, por tanto, nuestros resultados concuerdan con lo reportado en la literatura (Ansari, Ito and Hofmann, 2022).

La evaluación de la expresión de la COL1 nos indica que no hay diferencias significativas en la regulación del gen de la COL1 a los 7 y 14 días de cultivo de los esferoides a diferencia de lo que se observa de una baja expresión en los cultivos en monocapa. Este concuerda con la función de la proteína colágena que es una biomolécula importante de la ECM y que da cohesión a la integridad de la morfología del esferoide y brinda una mayor interacción célula-ECM-célula. Por último, se muestra el análisis de la expresión de OCN, el cual es un marcador tardío que se expresa durante el proceso de mineralización (Wang *et al.*, 2009). En nuestro estudio se observa una regulación positiva en los esferoides de DP-MSC que tienen una mayor expresión de OCN en comparación con los esferoides de hFOB y de los cultivos en monocapa. Notoriamente, la expresión de todos los marcadores ha sido mayor en las DP-MSC en 3D, que en los hFOB. Los hFOB son células inmortalizadas que se han designado como células osteoprogenitoras que poseen capacidad de diferenciación natural hacia osteoblastos maduros, o incluso una capacidad de transdiferenciación hacia linajes neuronales (Yen *et al.*, 2007). La diferencia en el nivel de expresiones de ambos cultivos en 3D, se debería principalmente al potencial de diferenciación celular que tienen las células troncales mesenquimales, dado que

los hFOB al ser células osteoprogenitoras inmortalizadas, el patrón de expresión comenzaría antes que una MSC, esto significaría que los hFOB, como ya están comprometidos, podrían estar adelantados en la fase de diferenciación y por ello nosotros observamos un menor nivel de expresión de los marcadores, demostrando esta diferencia estadística en los niveles de expresión que está asociado al linaje comprometido de los hFOB. Sin embargo, ambas líneas celulares de esferoides revelaron la presencia de marcadores osteogénicos con un mayor aumento en su expresión en comparación con los cultivos en monocapa, lo que nos indica que los cultivos 3D presentan un microambiente que potencia la diferenciación hacia el linaje óseo. Por último, los cultivos 3D en este caso los esferoides poseen una mayor capacidad de diferenciación, de proliferación y viabilidad, que las células cultivadas en 2D. Para realizar futuras pruebas preclínicas en modelos animales de la aplicación de los esferoides en terapias de regeneración ósea; los esferoides necesitan de una estructura biocompatible que realice la función de material de soporte que permita llevar a cabo el proceso de regeneración tisular (Zhang *et al.*, 2018b).

Con este fin, en este estudio cultivamos los esferoides de DP-MSK y hFOB directamente sobre la superficie de una membrana fibrilar de PLA al 10% (w/v). El patrón fibrilar de las membranas de PLA a la concentración de 10% han sido previamente reportadas como un material biocompatible y con propiedades mecánicas similares al tejido óseo (Fairag *et al.*, 2019; Chanes-Cuevas *et al.*, 2020). Por ello, han sido utilizadas como material de soporte de los esferoides. Como se puede observar en la figura 13, mediante el ensayo LIVE/DEAD, los tamaños de los núcleos necróticos son de menor tamaño en los esferoides de DP-MSK, que en las esferas de hFOB. El tamaño del núcleo necrótico depende principalmente del tamaño propio del esferoide, cuanto mayor tamaño posea el esferoide, mayor será su núcleo necrótico (Onbas and Arslan Yildiz, 2021), por tanto, como las esferas de hFOB son de mayor tamaño, poseen un núcleo necrótico mayor.

Finalmente se han medido la distancia entre el esferoide y las células más alejadas de la esfera, con la finalidad de medir el potencial de migración y colonización de la membrana de PLA, observando que las DP-MSK poseen una mayor distancia de colonización, que las hFOB. Las células sembradas en membranas de biomateriales poseen una mayor capacidad de migración, sobre todo en presencia del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), y al igual que las células troncales derivadas del ligamento periodontal (Hsieh *et al.*, 2022), las DP-MSK poseen una mayor capacidad de migración, demostrando la colonización de la membrana de PLA y su futuro uso en el campo de la regeneración tisular ósea.

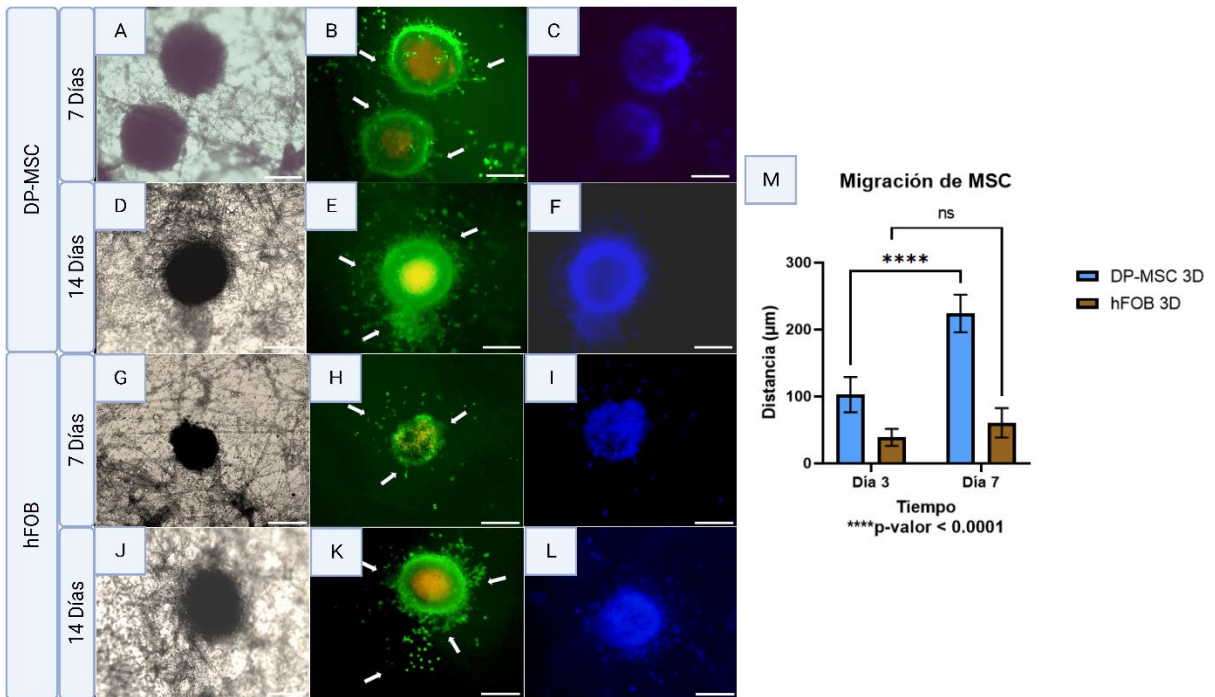


Figura 13: se muestran los cultivos en la membrana de PLA de los esferoides formados por DP-MSC (A-F) y de hFOB (G-L). Se muestran los ensayos de live/dead, donde se observa en verde las células vivas y en rojo, el núcleo necrótico de los esferoides (B, E, H y K). En M se muestra el análisis estadístico de la comparación entre las distancias, mostrando que los esferoides de DP-MSC muestran un mayor potencial de migración que los hFOB. Barras de escala: 100µm.

Capítulo 4:
Neurogénesis

4.1: Regeneración neuronal:

La regeneración neuronal ocurre como respuesta a un traumatismo o debido a enfermedades neurodegenerativas, que provocan la imposibilidad de que las neuronas envíen las señales o impulsos nerviosos a través del sistema nervioso (Steward, Sridhar and Meyer, 2012). La capacidad de regeneración neuronal no es la misma en todos los organismos, como el caso de los anfibios, que son los únicos vertebrados con capacidad de regeneración cerebral (Endo *et al.*, 2007).

La regeneración neuronal puede ocurrir desde tres eventos diferentes: la capacidad de reparación del axón cuando el resto del cuerpo celular se encuentre operativo, la recuperación de daños celulares nerviosos, y la generación de nuevas neuronas completamente operativas (Steward, Sridhar and Meyer, 2012). Sin embargo, cualquiera de estas posibilidades de regeneración solo ocurre de manera específica.

La regeneración neuronal ocurre de manera diferente entre el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). Esta diferencia se encuentra en las células que forman las vainas de mielina. En el SNC los oligodendrocitos son los encargados de dar lugar a las vainas de mielina, envolviendo a varios axones y en el SNP las células de Schwann son las encargadas de generar la mielina envolviendo un solo axón (Martínez-Gómez, 2014).

La neurotmesis ocurre cuando en un nervio dañado la conducción de las diferentes señales es bloqueada y provoca la disrupción del axón y de la vaina de mielina, al contrario de lo que ocurre en la neuropraxia o la axonotmesis (Matos Cruz and De Jesús, 2023). Después de ocurrir la neurotmesis se da lugar a la denominada degeneración walleriana que es un proceso donde se da lugar la pérdida de mielina y la parte del axón se separa del cuerpo celular de la neurona degenerándose de manera distal a la herida (Bermejo Garcés *et al.*, 2010).

Posterior a la neurotmesis, se produce la desdiferenciación de las células de Schwann que metabolizan los desechos de los axones interrumpidos y liberan distintas citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa, la interleucina-1 alfa y el factor inhibidor de la leucemia, para el reclutamiento de los macrófagos y facilitar la fagocitosis de los desechos (Coleman *et al.*, 1998). La gran diferencia con el SNC es que los oligodendrocitos fallan en el proceso de desdiferenciación e imposibilita la formación de la cicatrización glial para una posible reinervación o regeneración.

4.1.1.-Diferenciación neuronal:

Debido a la dificultad de la regeneración neuronal en el SNC, los esfuerzos en el campo de la ingeniería de tejidos han ido en dirección a la creación de biomateriales, que posean el soporte ideal para la llegada de señales para la recuperación celular, repoblar la zona neuronal dañada y reconectar las neuronas (Doblado, Martínez-Ramos and Pradas, 2021). Debido a las dificultades de crear un biomaterial que cumpla las características que permita la regeneración y la limitación del proceso de neurogénesis del SNC, una de las alternativas en la investigación ha sido enfocarse en el proceso de neurodiferenciación en las MSC.

Entre la gran mayoría de tipos de MSC que existen y que se han abordado en el capítulo 1, las células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo, han sido las que mayor potencial de proliferación posee, además de poseer una fuente de obtención más accesible (Urrutia *et al.*, 2019). Estudios anteriores han demostrado la importancia de la participación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en el desarrollo del SNC (Farzaneh *et al.*, 2019), sin embargo, el proceso de diferenciación celular de las MSC hacia un linaje neuronal aún queda por ser definido. Subsecuentemente, son varias vías de señalización las que se encuentran involucradas en la supervivencia o migración de las MSC diferenciadas hacia linaje neuronal, como la vía del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) o la vía canónica de Wnt/ β -catenina, no obstante, las dos vías más detalladas para la diferenciación neuronal a partir de MSC, son la vía de señalización de FGF y la vía no canónica de Wnt (Tzeng *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2022).

Brevemente, al igual que en la diferenciación ósea, la vía de señalización FGF está relacionada con la diferenciación neuronal, sin embargo, en lugar de participar las subfamilias FGF 1-4 como en la osteogénesis, la subfamilia FGF 8 es la que participa en la diferenciación neuronal, debido a la presencia del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento utilizado habitualmente en las investigaciones sobre diferenciación neuronal *in vitro* (Lam *et al.*, 2010). La unión de FGF8 con bFGF provoca un equilibrio entre fosforilaciones o desfosforilaciones de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), provocando así el reclutamiento del segundo mensajero diacilglicerol (DAG) que se unirá a la proteína cinasa C ϵ (PKC ϵ), la cual activará la cascada de las señales extracelulares reclutadas por cinasas/proteínas cinasas activadoras de mitógenos (ERK/MAPK) (Tariq and Luikart, 2021). PKC ϵ activa la proteína Ras la cual se unirá corriente abajo con la proteína Raf-1, la cual, al ser activada, su dominio catalítico C-terminal posee la capacidad de interactuar con MEK 1-2, provocando su fosforilación y la capacidad de interactuar con ERK 1-2 y anclarlo en el citoplasma. En cuanto ERK es activado,

se transloca al núcleo activando al factor de transcripción CREB, dando lugar a la expresión de marcadores neuronales como MAP2 (Tzeng *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2020).

Por otro lado, la vía no canónica de Wnt/Ca²⁺ es otra vía de señalización activada en la diferenciación neuronal en las células MSC, al contrario de la vía no canónica de Wnt/PCP, cuya inhibición aumenta la diferenciación neuronal (Haque *et al.*, 2015). Con la presencia de inductores para la diferenciación neuronal como el β- Mercaptoetanol aumenta la expresión de Wnt3a, proteína involucrada en la ruta no canónica de Wnt/Ca²⁺ (Narendra Talabattula *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2022). De manera resumida, el ligando de Wnt se une a Frizzled (Fz), provocando un aumento del Ca²⁺ intracelular, llevando a la activación corriente abajo de la quinasa dependiente de calmodulina (CaMKIV) la cual es traslocada al núcleo, activando a CREB (Thalhammer *et al.*, 2006; Tzeng *et al.*, 2015). Ambas vías de señalización se encuentran representadas en la figura 14.

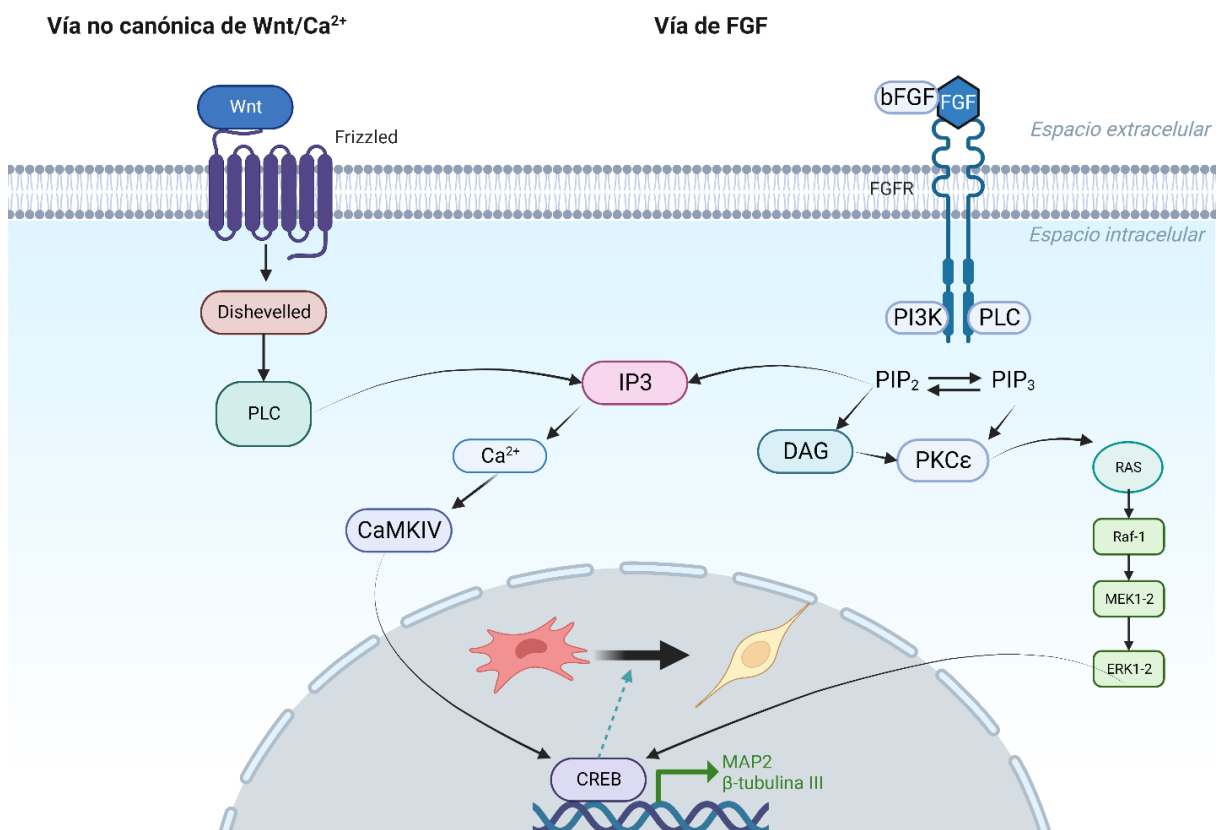


Figura 14: Esquema de ambas vías de señalización de Wnt/Ca²⁺ y de FGF, involucradas en el proceso de diferenciación neuronal desde las MSC. La activación del factor de transcripción CREB da lugar a la expresión de marcadores de diferenciación neuronal como MAP2. Imagen creada en BioRender.com.

4.1.2.-Marcadores de diferenciación neuronal:

En el presente proyecto de investigación de investigación hemos encontrado varios marcadores relacionados con la diferenciación neuronal.

- **Map2:** La familia de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) es un conjunto de proteínas encargadas de estabilizar los microtúbulos, donde MAP2 se expresa de manera primaria en el citoesqueleto de las neuronas (Soltani *et al.*, 2005). Además, estas proteínas tienen la capacidad de reclutar otras proteínas con la finalidad un modificar el citoesqueleto (DeGiosio *et al.*, 2022). La falta de MAP2, por otro lado, está asociada a la formación y/o mantenimiento de la columna vertebral, asimismo, de ser un marcador de muerte neuronal, dado que su falta de expresión en regiones de daño cerebral indicaría una función de marcador de supervivencia neuronal (Schätzle *et al.*, 2018; Mages *et al.*, 2021; DeGiosio *et al.*, 2022).
- **TAU:** Al igual que las proteínas MAP, la proteína Tau pertenece a la familia de las MAPs que posee una función principal como proteína estabilizadora de los microtúbulos, especialmente en las neuronas (Garg, Malhotra and Kumar, 2016). De manera similar a las MAPs, Tau posee capacidad de regulación en otras proteínas presentes en el citoesqueleto para mantener su estabilización, mediante un equilibrio entre fosforilaciones y desfosforilaciones (García and Jay, 2004). Sin embargo, la proteína Tau está relacionada con las denominadas Taupatías, siendo la más conocida la enfermedad de Alzheimer, donde un nivel elevado de Tau es suficiente para ser considerado como factor de riesgo (Mandelkow and Mandelkow, 2012).
- **B-tubulina III:** También denominado Tuj-1, es una proteína que pertenece a la familia de las β -tubulinas, y su expresión está restringida al SNC o al sistema nervioso periférico (SNP), y, por tanto, es utilizado como marcador de las primeras fases de diferenciación neuronal (De Gendt *et al.*, 2011). Por otro lado, el aumento de expresión de esta proteína provoca resistencia frente a los agentes antimicrotúbulos en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (Simon, Costa and Gandara, 2018).
- **NF-H:** Se trata de una subunidad de los neurofilamentos que conforman NF-L, NF-H y NF-M. Posterior a un daño en el SNC, aumentan las cantidades de NF-H fosforilado en suero, por lo que su detección en suero sirve como biomarcador de un daño en el SNC (Shaw *et al.*, 2005). Dada su presencia exclusiva en los cuerpos neuronales, NF-H es utilizado habitualmente como marcador de neurogénesis (Patel *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022).

- **NeuN:** NeuN o proteína nuclear neuronal es una proteína cuya expresión es exclusiva de todos los tipos neuronales y de aquellas células no gliales del sistema nervioso (a excepción de las células del bulbo olfatorio o las células de Purkinje), lo cual posee una ventaja a la hora de detectar las neuronas no gliales (Watson, Kirkcaldie and Paxinos, 2010). Al contrario que los marcadores anteriores, cuya expresión se visualiza en el citoesqueleto, la expresión de NeuN se encuentra mayoritariamente en el núcleo (Mullen, Buck and Smith, 1992). La presencia de NeuN se asocia con la diferenciación neuronal y posteriormente se encuentra presente durante toda la vida celular (Gusel'nikova and Korzhevskiy, 2015).

Como fase final del desarrollo experimental en este capítulo abordamos la formación de esferoides de células DP-MSK por medio de la técnica de LM y comenzamos a proponer un modelo preliminar de diferenciación hacia el linaje neurogénico, analizando la viabilidad, morfología que se obtiene de los esferoides bajo condiciones de diferenciación y el análisis de la presencia de moléculas que están involucrados en la neurogénesis por inmunofluorescencia y qPCR. Para ello, se desglosa a continuación la metodología, los resultados y discusión de estos:

4.2.-Material y métodos:

4.2.1.-Formación de los esferoides por levitación magnética:

Las DP-MSK utilizadas han sido las mismas reportadas anteriormente en el capítulo 3 realizándose el mismo procedimiento de la técnica de LM para la formación de las neuroesferas. Para el medio de diferenciación neuronal se utilizó un medio de inducción neuronal libre de suero (StemCell) con la presencia de 2 factores de crecimiento: NGF (10ng/ml) y BDNF (50ng/ml). El medio fue cambiado cada 3 días. Como control positivo se utilizaron células humanas de neuroblastoma (SH-SY5Y, ATCC CRL-2266) cultivadas en un medio DMEM F12 + EMEM 1:1, 10% de SFB, 2,5 mM de L-glutamina y una solución de antibióticos (Estreptomicina 100 µg/ml y penicilina 100 U/ml, Sigma-Aldrich, MO, United States). El medio se ha cambiado cada 2 días.

4.2.2.-Ensayos de proliferación, viabilidad y morfología:

Para la morfología se obtuvieron imágenes de microscopía óptica para medir el tamaño promedio de las neuroesferas, la proliferación se realizó por el ensayo de resazurina y la

viabilidad por el marcaje de CellTracker como previamente se describió en el capítulo 3. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

4.2.3.-Inmunofluorescencia

Para analizar la detección de los marcadores MAP, TAU y β -tubulina III se realizó una inmunolocalización. Previo al ensayo, las neuroesferas cultivadas por 14 días se fijaron en PFA al 4%. Posteriormente, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con 3 lavados con una solución de PBS + Tween 20% durante 5 minutos y se realizó una deshidratación seriada de alcoholes (20-95%) por 5 minutos, siguiendo de una incubación con metanol frío durante 15 minutos. Previo a la incubación con el anticuerpo primario se lavaron con PBS Tween 20%, y se realizó una incubación durante toda la noche con los anticuerpos que reconocen a MAP2 (AP20 SC-32791), β -tubulina III (2G10 SC-80005) y TAU (TAU-5 SC-58860) a una dilución 1:100. Al término de la incubación del anticuerpo primario se realizaron 3 lavados con PBS + Tween previo a la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con FITC. Las distintas señales fueron visualizadas con el microscopio invertido de epifluorescencia (AE31E model, MOTIC, Schertz, TX, USA).

4.2.4.-qRT-PCR:

Se realizó una cuantificación de la expresión relativa de los genes asociados a la diferenciación neuronal como (NeuN, MAP2 y NF-H). La secuencia de los cebadores se encuentra listados en la tabla 2. El protocolo de amplificación se realizó conforme a lo reportado previamente en el capítulo 3 utilizando los mismos kits: para el cDNA el kit Improm-II, para el qPCR el kit Forget-Me-Not EvaGreen qPCR Master Mix kit.

Nombre del Gen	Secuencia de los cebadores
NeuN	Forward: TCTTCTTGTTGGTCATCACTCG
	Reverse: GAGAAGCTGAATGGGACGAT
NF-H	Forward: GAGCTGGAGGCACTGAAAAG
	Reverse: TCCTGGTAGGAGGCAATGTC
MAP2	Forward: GGTGAACAAGAGAAAGAAGCTCA
	Reverse: GGTGGAGAAGGAGGCAGATT

Tabla 2: Cebadores utilizados para la qRT-PCR.

4.2.5: Análisis estadístico:

Los resultados se muestran como una media \pm su desviación estándar. Para la comparación de la expresión relativa entre ambos grupos (DP-MSC en 3D y DP-MSC en 2D) para los diferentes marcadores se empleó la prueba de ANOVA de 2 vías con una Post-hoc de Bonferroni y en el caso de la comparación entre los tamaños de los esferoides y de su proliferación, se realizó una prueba Post-hoc de Tukey. Las pruebas estadísticas se realizaron con el software Graphpad Prism 9.0.1.

4.3.-Resultados y discusión:

Previamente se han realizado protocolos de diferenciación neuronal a partir de DP-MSC en cultivos monocapa tradicionales (Goorha and Reiter, 2017) o en neuroesferas a partir de iPSC u otros tipos de MSC (Haque *et al.*, 2015; Stricker *et al.*, 2021).

En nuestro estudio se obtuvieron neuroesferas con un tamaño promedio de alrededor de 100 μ m, un tamaño significativamente menor si lo comparamos con los tamaños obtenidos con los esferoides en el capítulo de la diferenciación ósea (Figura 15).

Como se puede observar en la figura 15, las neuroesferas disminuyeron su tamaño significativamente entre el día 1 y el día 7, posiblemente debido al proceso de diferenciación neuronal y al cambio morfológico que sufren las DP-MSC, dado que el tamaño de las neuronas es significativamente menor que las células MSC. Comparado con neuroesferas formadas a partir de GMSC, las neuroesferas formadas por DP-MSC (nDP-MSC) concuerdan con los tamaños reportados con la peculiaridad de que las nDP-MSC alcanzaron dicho tamaño a partir del día 7 (Zhang *et al.*, 2018a).

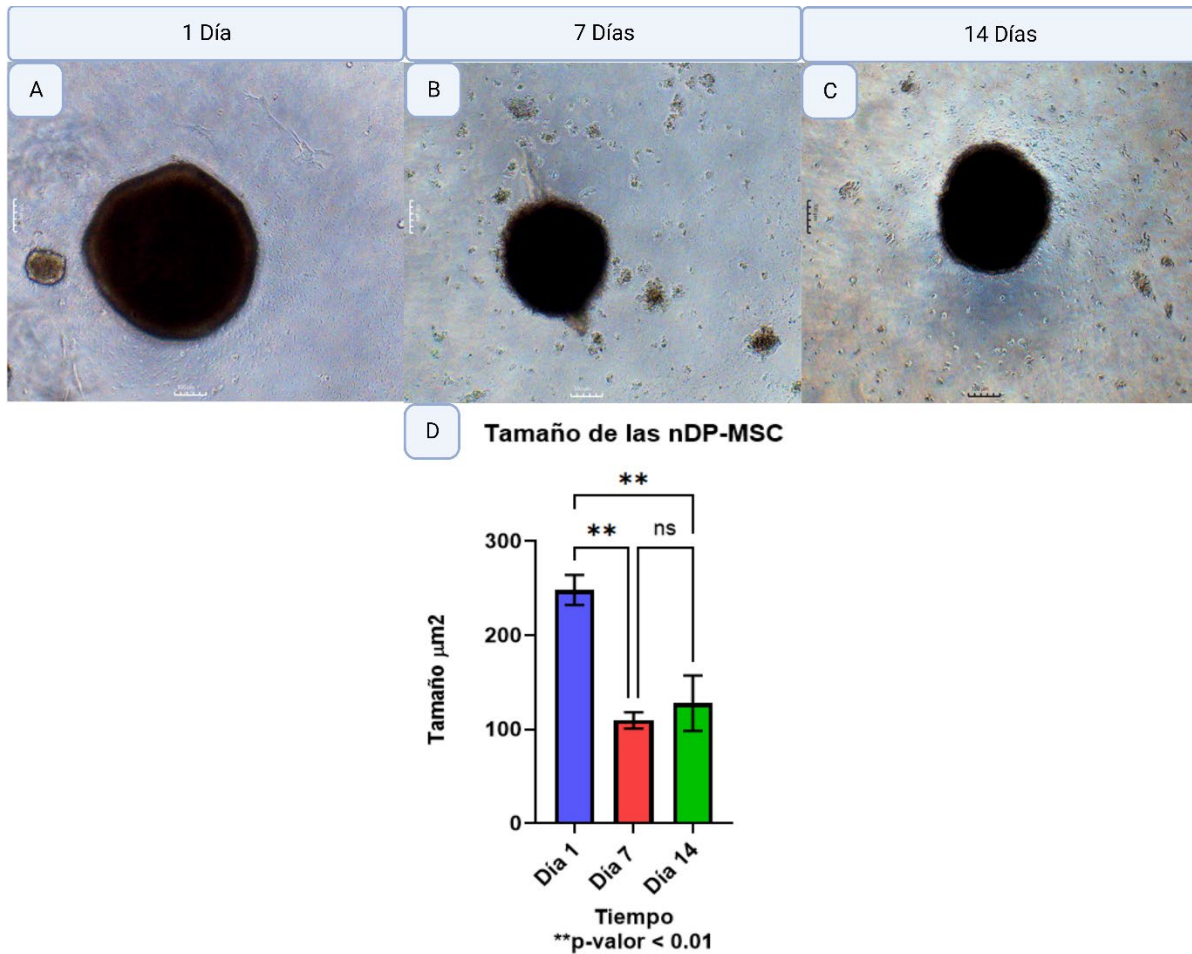


Figura 15: Se muestra la morfología de las neuroesferas en los días 1 (A), 7 (B) y 14 (C). Barra de escala: 100µm. Los análisis estadísticos en la comparativa entre los tamaños con los esferoides llevados a diferenciación ósea muestran un tamaño significativamente mayor que las neuroesferas a excepción del día 1 (E). Por otro lado, las neuroesferas disminuyeron su tamaño significativamente del día 1 al día 7, para luego mostrarse sin crecimiento hasta el día 14 (D).

En cuanto a los ensayos de proliferación, como se muestra en la figura 16, las neuroesferas poseen mayor capacidad de proliferación, en comparación con las DP-MS cultivadas en monocapa. Como se ha reportado anteriormente (Ryu, Lee and Park, 2019c), los beneficios de los cultivos 3D, al estar presentes en un ambiente más similar al microambiente *in vivo*, las propiedades de proliferación de las neuroesferas aumentan. Por otra parte, la proliferación de las neuroesferas presenta una pequeña disminución en la proliferación en los 14 y 21 del cultivo celular, sin embargo al comparar con el cultivo en monocapa se mantiene constante y la disminución podría relacionarse a que se están llevando la diferenciación hacia el linaje neurogénico más que a una falta de aporte de nutrientes y oxígeno, ya que también se ha reportado que las NPM no poseen ningún efecto sobre la viabilidad, ni la proliferación de las neuroesferas, como se ha destacado anteriormente (Qian, Song and Ming, 2019), (Tseng *et al.*, 2014). Tal y como se muestra en la figura 17 donde los ensayos de Cell Tracker muestra una

viabilidad del esferoide en ambos días, con un cambio de morfología de las neuroesferas en el día 14, influenciado por la proliferación celular y la acumulación de neuronas en la parte inferior de la neuroesfera, provocando un estiramiento de la neuroesfera, sin llevar en ningún caso a una muerte celular.

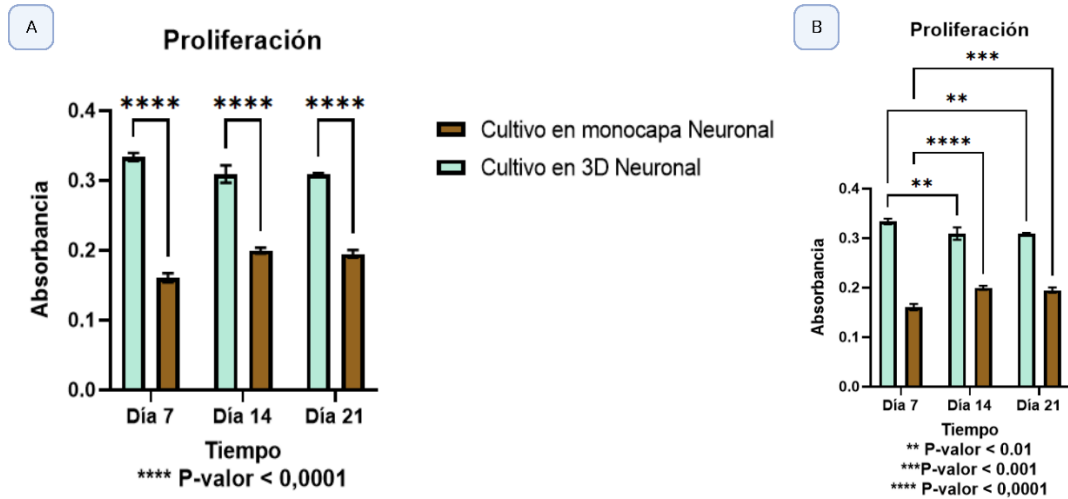


Figura 16: Se muestra la estadística de la proliferación de las nDP-MSc a lo largo de 21 días. En A se muestra la comparación entre los días de ambos grupos a lo largo del tiempo, mostrando la disminución de la proliferación entre el día 7 y 14 del grupo en 3D, de manera contraria que el grupo de las células cultivadas en monocapa, que aumentaron su proliferación entre los mismos días. En el caso de B se muestra la comparación de los cultivos en un mismo día, demostrando una mejor proliferación de las neuroesferas que las células cultivadas en 2D. Se realizaron ANOVA de dos vías y para la comparación entre grupos se realizó una prueba Bonferroni como prueba Post hoc.

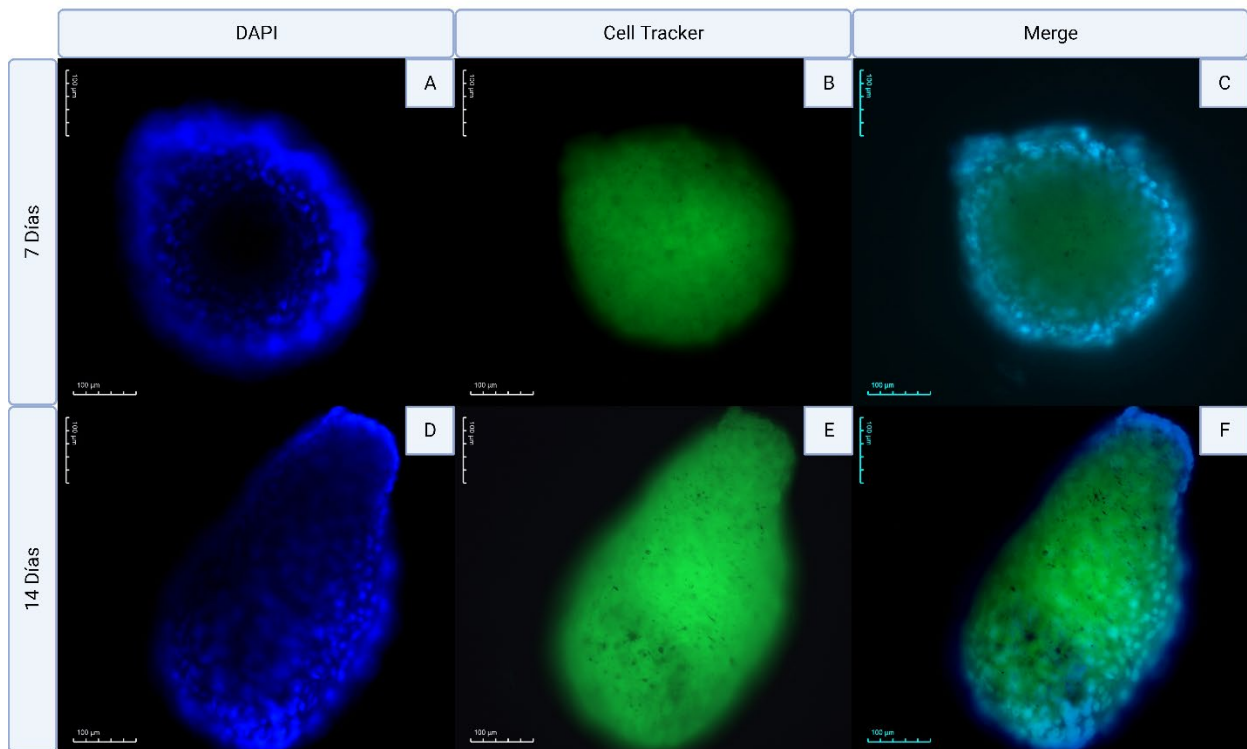


Figura 17: Se muestra el merge del cell tracker y DAPI a los 7 días (D-F) y a los 14 días (G-I), mostrando la viabilidad de la parte superficial del esferoide. Barra de escala 100 μ m.

Los análisis de inmunofluorescencia han resultado en la expresión de marcadores asociados a la diferenciación neuronal como MAP2, β -tubulina III y Tau (figura18). La expresión citoplasmática de los 3 marcadores muestra una capacidad de diferenciación de las DP-MSK hacia linajes neuronales como se ha reportado anteriormente con otros tipos celulares (Gusel'nikova and Korzhevskiy, 2015; Stricker *et al.*, 2021). Tal y como ha publicado (Fu *et al.*, 2008), existen poblaciones dentro de las MSC que poseen capacidad de diferenciarse hacia linajes neuronales, sin embargo, estas poblaciones no han quedado bien definidas, y, por tanto, nuestro objetivo en esta parte del proyecto ha sido la caracterización de los diferentes marcadores asociados a la neurogénesis.

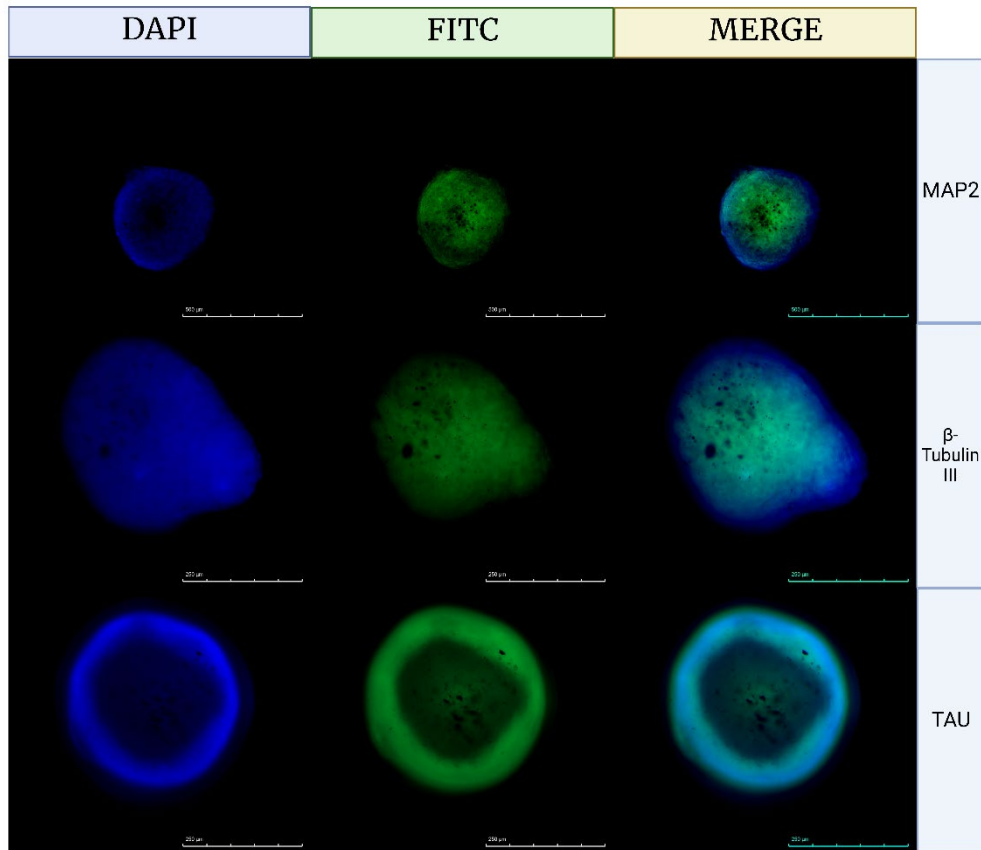


Figura 18: Se muestran imágenes del ensayo de inmunofluorescencia de las nDP-MSc donde se muestran las expresiones de MAP2, β -tubulina III y TAU. barra de escala 100 μ m.

Para ello, se ha realizado un análisis de la expresión relativa mediante qRT-PCR (figura 19). Por este medio, la expresión de NeuN, confirma la diferenciación hacia un linaje neuronal no glial (Watson, Kirkcaldie and Paxinos, 2010), sin embargo, el control positivo de las células de neuroblastoma mostró una mayor expresión de este marcador. Teniendo en cuenta que las células del neuroblastoma son células indiferenciadas con una actividad similar a las neuronas catecolaminérgicas inmaduras (Kovalevich and Langford, 2013) demuestra el bajo nivel de NeuN en comparación con neuronas con mayor proceso de maduración (Påhlman *et al.*, 1984) y, por tanto, expresando un nivel similar a las DP-MSc. Por otra parte, y al igual que en los esferoides llevados a diferenciación ósea, la expresión relativa asociada a la neurogénesis fue mayor significativamente en las neuroesferas, recalando la ventaja de realizar cultivos en 3D.

qRT-PCR Día 14

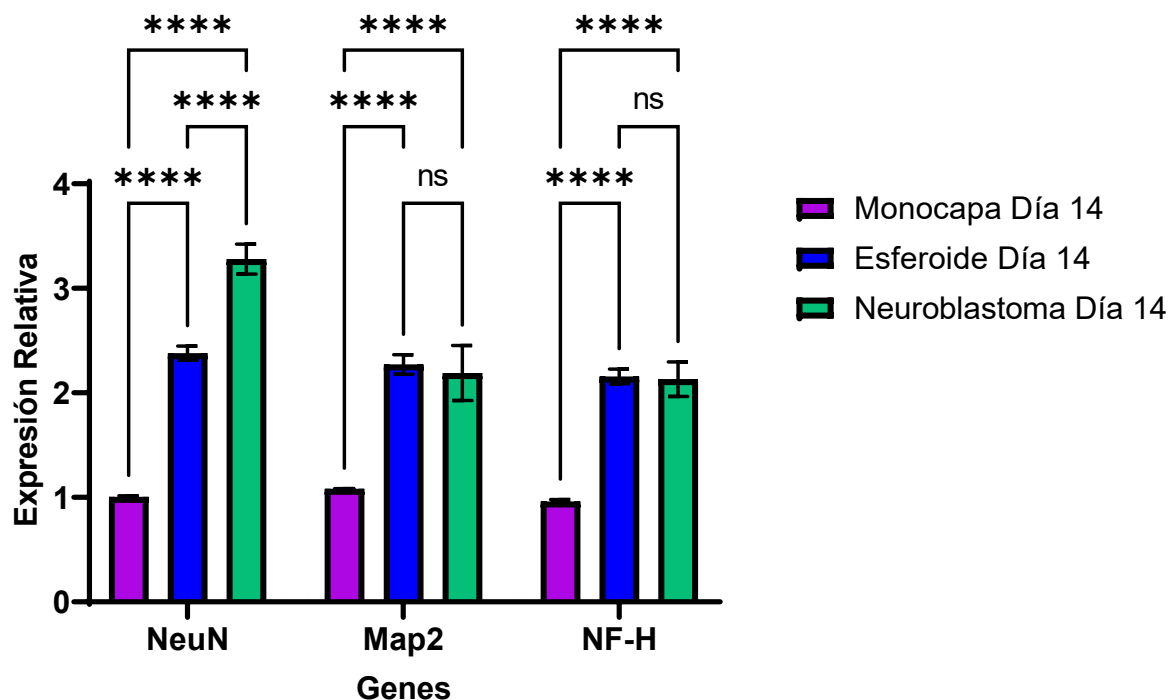


Figura 19: Se muestra la estadística de las pruebas de expresión relativa mediante qPCR, demostrando una mayor capacidad de expresión relativa en las NDP-MSC en comparación de las DP-MSC cultivadas en monocapa. Por otra parte, las neuroesferas mostraron una expresión similar de Map2 y NF-H a las expresadas por las células de neuroblastoma, en diferencia al caso de NeuN, donde las células control mostraron la máxima expresión de este marcador. Se realizó una ANOVA de dos vías y para la comparación entre los grupos se realizó una prueba de Sidak como prueba Post hoc. **** p-valor < 0.001.

En nuestros estudios preliminares de esta investigación hemos demostrado la capacidad de potenciar la diferenciación neuronal de las DP-MSC en un cultivo 3D realizado a partir de la técnica de levitación magnética y como se ha reportado con los datos la morfología cambia y se da una regulación positiva de la expresión de marcadores asociados a la inducción de neurogénesis, no obstante, nuestros resultados nos llevan a plantearnos más preguntas sobre esta diferenciación por lo cual es necesario realizar más estudios en cuanto al estudios de la proyección de neuritas, sus marcadores y sobre la funcionalidad relacionada a la transmisión-recepción de información nerviosa.

Capítulo 5: Conclusiones

- Una de las grandes problemáticas que existen en la actualidad en el contexto de la regeneración de tejidos, son las distintas limitantes a la hora de trabajar con células troncales totipotentes, es por ello por lo que en el presente trabajo de investigación se ha encontrado una posibilidad a la hora de diferenciar MSC mediante la utilización de los cultivos en 3D.
- El uso de las nanopartículas ha estado ampliamente utilizado en los estudios sobre viabilidad celular, y con la utilización del “Nanoshuttle” se ha probado la nula actividad citotóxica hacia los cultivos y, por tanto, permitiendo la utilización de la técnica de levitación magnética.
- En la literatura ya se encuentra bien establecido varias de las ventajas sobre la utilización de los cultivos 3D, sobre los cultivos en monocapa. Una de estas ventajas es el aumento de la proliferación celular, tal y como ha quedado demostrado en el presente proyecto de investigación.
- La LM permitió el manejo de esferoides de las líneas DP-MSc y hFOB de manera homogénea y sin causar disgregación celular.
- Los esferoides 3D de DP-MSc son capaces de diferenciarse por los inductores hacia linajes osteogénicos y neurogénicos bajo las condiciones de cultivo por la técnica de LM. Demostrando la capacidad que poseen las DP-MScs de diferenciarse hacia estos tipos de tejidos.
- La capacidad de diferenciación ósea resultó no solo ser mayor que las células cultivadas en monocapa, sino que también resultó mayor que los esferoides formados por hFOB.
- Las DP-MSc poseen una mayor capacidad de colonización de las membranas de PLA que los esferoides de hFOB, demostrando que las DP-MSc poseen mayores ventajas que los hFOB para posteriormente ser utilizadas en el campo de la regeneración ósea y abriendo un abanico de posibilidades para futuras investigaciones sobre la aplicación *in vivo* de los esferoides.
- En la literatura ya se encuentra estipulado la capacidad de diferenciación de las DP-MScs hacia un linaje neuronal, sin embargo, la gran mayoría de los estudios se encuentran dirigidos hacia un contexto en monocapa y con dificultades a la hora de expresar ciertos marcadores neuronales. Como novedad del actual proyecto de investigación, se ha logrado una diferenciación neuronal de las DP-MScs en un contexto tridimensional.

*Capítulo 6:
Referencias
bibliográficas*

- Achilli, T.-M., Meyer, J. and Morgan, J.R. (2012) 'Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids', *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(10), pp. 1347–1360. Available at: <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.707181>.
- Almasoudi, S.H. and Schlosser, G. (2021) 'Otic Neurogenesis in *Xenopus laevis*: Proliferation, Differentiation, and the Role of *Eya1*', *Frontiers in Neuroanatomy*, 15. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnana.2021.722374>.
- Alteri, C.J., Smith, S.N. and Mobley, H.L.T. (2009) 'Fitness of *Escherichia coli* during Urinary Tract Infection Requires Gluconeogenesis and the TCA Cycle', *PLoS Pathogens*, 5(5), p. e1000448. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000448>.
- Ankrum, J.A., Ong, J.F. and Karp, J.M. (2014) 'Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged', *Nature Biotechnology*, 32(3), pp. 252–260. Available at: <https://doi.org/10.1038/nbt.2816>.
- Ansari, M. (2019) 'Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies', *Progress in Biomaterials*, 8(4), pp. 223–237. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40204-019-00125-z>.
- Ansari, S., Ito, K. and Hofmann, S. (2022) 'Alkaline Phosphatase Activity of Serum Affects Osteogenic Differentiation Cultures', *ACS Omega*, 7(15), pp. 12724–12733. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c07225>.
- Aydin, S. and Şahin, F. (2019) 'Stem Cells Derived from Dental Tissues', in, pp. 123–132. Available at: https://doi.org/10.1007/5584_2018_333.
- Ayoub, S., Berbéri, A. and Fayyad-kazan, M. (2020) 'An update on human periapical cyst-mesenchymal stem cells and their potential applications in regenerative medicine', *Molecular Biology Reports*, 47(3), pp. 2381–2389. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05298-6>.
- Barnes, R.D. (2006) *Form and function*. Available at: <https://www.britannica.com/animal/arthropod/Classification> (Accessed: 15 May 2023).
- Baye, T.M., Abebe, T. and Wilke, R.A. (2011) 'Genotype-environment interactions and their translational implications', *Personalized Medicine*, pp. 59–70. Available at: <https://doi.org/10.2217/pme.10.75>.
- Bayona, F. (2012) 'Desarrollo embrionario del sistema nervioso central y órganos de los sentidos: revisión', *Univ Odontol*, 31(66), pp. 125–132.
- Begbie, J. *et al.* (1999) 'Induction of the epibranchial placodes', *Development*, 126(5), pp. 895–902. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.126.5.895>.
- De Berdt, P. *et al.* (2015) 'Dental Apical Papilla as Therapy for Spinal Cord Injury', *Journal of Dental Research*, 94(11), pp. 1575–1581. Available at: <https://doi.org/10.1177/0022034515604612>.
- Bermejo Garcés, R. *et al.* (2010) 'Degeneración walleriana bilateral de las fibras pontocerebelosas secundaria a ictus pontinos: presentación de 4 casos', *Radiología*, 52(1), pp. 71–75. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rx.2009.09.012>.
- Blair, H.C. *et al.* (2017) 'Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation *In Vivo* and *In Vitro*', *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 23(3), pp. 268–280. Available at: <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2016.0454>.
- de Boer, H.H. (1988) 'The history of bone grafts', *Clin Orthop Relat Res*, (226), pp. 292–298.

Bolívar Zapata, F.G. (2004) *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. 2nd edn. Ciudad de México: El Colegio Nacional, 2007.

Boonrungsiman, S. *et al.* (2012) 'The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(35), pp. 14170–14175. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1208916109>.

Brancato, V. *et al.* (2018) '3D breast cancer microtissue reveals the role of tumor microenvironment on the transport and efficacy of free-doxorubicin in vitro', *Acta Biomaterialia*, 75, pp. 200–212. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.05.055>.

Brar, G. and Toor, R.S. (2012) 'Dental stem cells: Dentinogenic, osteogenic, and neurogenic differentiation and its clinical cell based therapies', *Indian Journal of Dental Research*, 23(3), p. 393. Available at: <https://doi.org/10.4103/0970-9290.102239>.

Bussador do Amaral, J., Shiniti Urabayashi, M. and Maria Machado-Santelli, G. (2010) 'Cell death and lumen formation in spheroids of MCF-7 cells', *Cell Biology International*, 34(3), pp. 267–274. Available at: <https://doi.org/10.1042/CBI20090024>.

Caneparo, C. *et al.* (2021) 'Considerations for the clinical use of stem cells in genitourinary regenerative medicine', *World Journal of Stem Cells*, 13(10), pp. 1480–1512. Available at: <https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i10.1480>.

Canning, C.A. *et al.* (2008) 'Neural tube derived Wnt signals cooperate with FGF signaling in the formation and differentiation of the trigeminal placodes', *Neural Development*, 3(1), p. 35. Available at: <https://doi.org/10.1186/1749-8104-3-35>.

Castro Manrreza, M.E. and Montesinos Montesinos, J.J. (2015) 'Células troncales mesenquimales: biología y uso en el trasplante de células troncales hematopoyéticas', *Rev Med UV* [Preprint].

Cecilia Fabres, V. (2010) 'Técnicas del futuro: ingeniería de tejidos y uso de células madre en medicina reproductiva', *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21(3), pp. 488–493. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(10\)70562-9](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(10)70562-9).

Chan, R.W.S., Schwab, K.E. and Gargett, C.E. (2004) 'Clonogenicity of Human Endometrial Epithelial and Stromal Cells', *Biology of Reproduction*, 70(6), pp. 1738–1750. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.024109>.

Chan, Y.-H. *et al.* (2021) 'Three-dimensional Spheroid Culture Enhances Multipotent Differentiation and Stemness Capacities of Human Dental Pulp-derived Mesenchymal Stem Cells by Modulating MAPK and NF- κ B Signaling Pathways', *Stem Cell Reviews and Reports*, 17(5), pp. 1810–1826. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10172-4>.

Chanes-Cuevas, O.A. *et al.* (2020) 'Synthesis of PLA/SBA-15 Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering', *Materials Research*, 23(5). Available at: <https://doi.org/10.1590/1980-5373-mr-2020-0211>.

Chatree, K. *et al.* (2023) 'Distinctions in bone matrix nanostructure, composition, and formation between osteoblast-like cells, MG-63, and human mesenchymal stem cells, UE7T-13', *Heliyon*, 9(5). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15556>.

- Checa, S. (2018) 'Multiscale Agent-Based Computer Models in Skeletal Tissue Regeneration', *Numerical Methods and Advanced Simulation in Biomechanics and Biological Processes*, pp. 239–244. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811718-7.00013-7>.
- Coleman, M.P. *et al.* (1998) 'An 85-kb tandem triplication in the slow Wallerian degeneration (*Wld^s*) mouse', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17), pp. 9985–9990. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.9985>.
- Costa, E.C. *et al.* (2018) 'Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches', *Biotechnology Journal*, 13(1), p. 1700417. Available at: <https://doi.org/10.1002/biot.201700417>.
- Costa-Pinto, A.R. *et al.* (2012) 'Chitosan-poly(butylene succinate) scaffolds and human bone marrow stromal cells induce bone repair in a mouse calvaria model', *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 6(1), pp. 21–28. Available at: <https://doi.org/10.1002/term.391>.
- Cousin, H. (2019) 'Spemann–mangold grafts', *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(2), pp. 99–103. Available at: <https://doi.org/10.1101/pdb.prot097345>.
- Croxen, M.A. and Finlay, B.B. (2010) 'Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity', *Nature Reviews Microbiology*, pp. 26–38. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>.
- Cubillos Rey, J.A. *et al.* (2012) 'FOSFATASA ALCALINA (ALP) Y RUNX2 EN CULTIVOS CELULARES DE OSTEBLASTOS ESTIMULADOS CON CAMPO ELÉCTRICO', *Revista Med*, 20(2), pp. 14–22.
- Cundy, T., Reid, I.R. and Grey, A. (2014) 'Metabolic bone disease', in *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*. Elsevier, pp. 604–635. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5140-1.00031-6>.
- Curtis, P.D. and Brun, Y. V. (2010) 'Getting in the Loop: Regulation of Development in *Caulobacter crescentus*', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), pp. 13–41. Available at: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-09>.
- D'Alimonte, I. *et al.* (2013) 'Wnt Signaling Behaves as a "Master Regulator" in the Osteogenic and Adipogenic Commitment of Human Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells', *Stem Cell Reviews and Reports*, 9(5), pp. 642–654. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12015-013-9436-5>.
- Day, T.F. *et al.* (2005) 'Wnt/ β -Catenin Signaling in Mesenchymal Progenitors Controls Osteoblast and Chondrocyte Differentiation during Vertebrate Skeletogenesis', *Developmental Cell*, 8(5), pp. 739–750. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.03.016>.
- DeGiosio, R.A. *et al.* (2022) 'More than a marker: potential pathogenic functions of MAP2', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.974890>.
- D'Elía, M.C. (2015) 'Prevalencia de Lesiones Asociadas a Rotura Aguda de Ligamento Cruzado Anterior (LCA)', *Revista de la Asociación Argentina de Traumatología del Deporte*, 22(1).
- Dhakal, B.K. and Mulvey, M.A. (2009) 'Uropathogenic Escherichia coli Invades Host Cells via an HDAC6-modulated Microtubule-dependent Pathway', *Journal of Biological Chemistry*, 284(1), pp. 446–454. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M805010200>.
- Dimitriou, R. *et al.* (2011) 'Bone regeneration: current concepts and future directions', *BMC Medicine*, 9(1), p. 66. Available at: <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-66>.

- Dimitriou, R., Tsiridis, E. and Giannoudis, P. V. (2005) 'Current concepts of molecular aspects of bone healing', *Injury*, 36(12), pp. 1392–1404. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.injury.2005.07.019>.
- Ding, D.-C. *et al.* (2015) 'Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: A New Era for Stem Cell Therapy', *Cell Transplantation*, 24(3), pp. 339–347. Available at: <https://doi.org/10.3727/096368915X686841>.
- Ding, D.-C., Shyu, W.-C. and Lin, S.-Z. (2011) 'Mesenchymal Stem Cells', *Cell Transplantation*, 20(1), pp. 5–14. Available at: <https://doi.org/10.3727/096368910X>.
- Doblado, L.R., Martínez-Ramos, C. and Pradas, M.M. (2021) 'Biomaterials for Neural Tissue Engineering', *Frontiers in Nanotechnology*, 3. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnano.2021.643507>.
- Dong, Z. *et al.* (2012) 'Intralineage Directional Notch Signaling Regulates Self-Renewal and Differentiation of Asymmetrically Dividing Radial Glia', *Neuron*, 74(1), pp. 65–78. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.01.031>.
- Dutra, F.L. *et al.* (2020) 'Lysophosphatidylcholine triggers cell differentiation in the protozoan parasite *Herpetomonas samuelpessoai* through the CK2 pathway', *Acta Parasitologica*, 65(1), pp. 108–117. Available at: <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00135-8>.
- Edmondson, R. *et al.* (2014) 'Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors', *ASSAY and Drug Development Technologies*, 12(4), pp. 207–218. Available at: <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>.
- Endo, T. *et al.* (2007) 'Brain regeneration in anuran amphibians', *Development Growth and Differentiation*, pp. 121–129. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2007.00914.x>.
- Erices, A., Conget, P. and Minguell, J.J. (2000) 'Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood', *British Journal of Haematology*, 109(1), pp. 235–242. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.01986.x>.
- Fairag, R. *et al.* (2019) 'Three-Dimensional Printed Polylactic Acid Scaffolds Promote Bone-like Matrix Deposition in Vitro', *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(17), pp. 15306–15315. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsami.9b02502>.
- Farzaneh, M. *et al.* (2019) 'Paracrine Mechanisms Involved in Mesenchymal Stem Cell Differentiation into Cardiomyocytes', *Current Stem Cell Research & Therapy*, 14(1), pp. 9–13. Available at: <https://doi.org/10.2174/1574888X13666180821160421>.
- Fennema, E.M. *et al.* (2018) 'Ectopic bone formation by aggregated mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue: A comparative study', *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(1), pp. e150–e158. Available at: <https://doi.org/10.1002/term.2453>.
- Fleenor, S.J. and Begbie, J. (2014) 'Neural Crest Cell and Placode Interactions in Cranial PNS Development', in *Neural Crest Cells: Evolution, Development and Disease*. Elsevier Inc., pp. 153–165. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-401730-6.00009-0>.
- Fong, C.Y. *et al.* (2012) 'Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells and its conditioned medium support hematopoietic stem cell expansion ex vivo', *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(2), pp. 658–668. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcb.23395>.

- Friedenstein, A.J., Piatetzky-Shapiro, I.I. and Petrakova, K. V (1966) 'Osteogenesis in transplants of bone marrow cells.', *Journal of embryology and experimental morphology*, 16(3), pp. 381–90.
- Fu, L. *et al.* (2008) 'Derivation of Neural Stem Cells from Mesenchymal Stem Cells: Evidence for a Bipotential Stem Cell Population', *Stem Cells and Development*, 17(6), pp. 1109–1122. Available at: <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0068>.
- Fu, W. *et al.* (2016) 'Mesenchymal stem cells reside in anterior cruciate ligament remnants in situ', *International Orthopaedics*, 40(7), pp. 1523–1530. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00264-015-2925-1>.
- Fu, Y.-S. *et al.* (2004a) 'Transformation of human umbilical mesenchymal cells into neurons in vitro', *Journal of Biomedical Science*, 11(5), pp. 652–660. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF02256131>.
- Fu, Y.-S. *et al.* (2004b) 'Transformation of human umbilical mesenchymal cells into neurons in vitro', *Journal of Biomedical Science*, 11(5), pp. 652–660. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF02256131>.
- Lo Furno, D., Mannino, G. and Giuffrida, R. (2018) 'Functional role of mesenchymal stem cells in the treatment of chronic neurodegenerative diseases', *Journal of Cellular Physiology*, 233(5), pp. 3982–3999. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.26192>.
- Gaitán-Salvatella, I. *et al.* (2021) 'Case Report: Formation of 3D Osteoblast Spheroid Under Magnetic Levitation for Bone Tissue Engineering', *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.672518>.
- García, T. and Jay, D. (2004) 'Fosforilación de tau y enfermedad de Alzheimer', *Gaceta médica de México*, 140(3), pp. 329–333.
- Garg, R.K., Malhotra, H.S. and Kumar, N. (2016) 'Pathophysiology of Acute Disseminated Encephalomyelitis', in *Multiple Sclerosis*. Elsevier, pp. 201–248. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800763-1.00010-5>.
- Gargett, C.E., Schwab, K.E. and Deane, J.A. (2015) 'Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years', *Human Reproduction Update*, p. dm051. Available at: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv051>.
- Gartner, S. and Kaplan, H.S. (1980) 'Long-term culture of human bone marrow cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(8), pp. 4756–4759. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.77.8.4756>.
- Ge, Z., Goh, J.C.H. and Lee, E.H. (2005) 'Selection of Cell Source for Ligament Tissue Engineering', *Cell Transplantation*, 14(8), pp. 573–583. Available at: <https://doi.org/10.3727/000000005783982819>.
- De Gendt, K. *et al.* (2011) 'Expression of Tubb3, a Beta-Tubulin Isoform, Is Regulated by Androgens in Mouse and Rat Sertoli Cells', *Biology of Reproduction*, 85(5), pp. 934–945. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.090704>.
- Gilbert Triplett, R. and Budinskaya, O. (2017) 'New Frontiers in Biomaterials', *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, 29(1), pp. 105–115. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.coms.2016.08.011>.
- Goorha, S. and Reiter, L.T. (2017) 'Culturing and neuronal differentiation of human dental pulp stem cells', *Current Protocols in Human Genetics*, 2017, pp. 21.6.1-21.6.10. Available at: <https://doi.org/10.1002/cphg.28>.

- Gou, Y. *et al.* (2018) 'sox2 and sox3 Play unique roles in development of hair cells and neurons in the zebrafish inner ear', *Developmental Biology*, 435(1), pp. 73–83. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.01.010>.
- Gronthos, S. *et al.* (2000) 'Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), pp. 13625–13630. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>.
- Guasto, A. and Cormier-Daire, V. (2021a) 'Signaling pathways in bone development and their related skeletal dysplasia', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22094321>.
- Guasto, A. and Cormier-Daire, V. (2021b) 'Signaling Pathways in Bone Development and Their Related Skeletal Dysplasia', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), p. 4321. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22094321>.
- Guo, X. *et al.* (2018) 'Cardiomyocyte differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: new regulators and its implications', *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), p. 44. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0773-9>.
- Guo, Y. *et al.* (2020) 'ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review)', *Experimental and Therapeutic Medicine* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>.
- Gurdon, J.B. (1987) *Embryonic induction-molecular prospects*, *Development*.
- Gusel'nikova, V. V and Korzhevskiy, D.E. (2015) 'NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker', *Acta naturae*, 7(2), pp. 42–7.
- Ha, S.-W. *et al.* (2017) 'Nano-Hydroxyapatite Stimulation of Gene Expression Requires Fgf Receptor, Phosphate Transporter, and Erk1/2 Signaling', *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(45), pp. 39185–39196. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsami.7b12029>.
- Habanjar, O. *et al.* (2021) '3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), p. 12200. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms222212200>.
- Handschel, J.G. *et al.* (2007) 'Prospects of micromass culture technology in tissue engineering', *Head & Face Medicine*, 3(1), p. 4. Available at: <https://doi.org/10.1186/1746-160X-3-4>.
- Haque, A. *et al.* (2015) 'An Engineered N-Cadherin Substrate for Differentiation, Survival, and Selection of Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Progenitors', *PLOS ONE*, 10(8), p. e0135170. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135170>.
- Hartenstein, V., Omoto, J.J. and Lovick, J.K. (2021) 'The role of cell lineage in the development of neuronal circuitry and function', *Developmental Biology*, 475, pp. 165–180. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.01.012>.
- Hill, T.P. *et al.* (2005) 'Canonical Wnt/ β -Catenin Signaling Prevents Osteoblasts from Differentiating into Chondrocytes', *Developmental Cell*, 8(5), pp. 727–738. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.02.013>.
- Hsieh, H.-Y. *et al.* (2022) 'Biological properties of human periodontal ligament cell spheroids cultivated on chitosan and polyvinyl alcohol membranes', *Journal of the Formosan Medical Association*, 121(11), pp. 2191–2202. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2022.03.014>.

- Huang, C., Chan, J.A. and Schuurmans, C. (2014) 'Proneural bHLH Genes in Development and Disease', in, pp. 75–127. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405943-6.00002-6>.
- Huang, H. (2011) 'Chapter 15 - Signal Transduction in *Trypanosoma cruzi*', in L.M. Weiss, H.B. Tanowitz, and L. V Kirchhoff (eds) *Advances in Parasitology*. Academic Press, pp. 325–344. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00015-0>.
- Huang, H., Yang, R. and Zhou, Y. (2018) 'Mechanobiology of Periodontal Ligament Stem Cells in Orthodontic Tooth Movement', *Stem Cells International*, 2018, pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.1155/2018/6531216>.
- Hutchings, G. *et al.* (2020) 'Bone Regeneration, Reconstruction and Use of Osteogenic Cells; from Basic Knowledge, Animal Models to Clinical Trials', *Journal of Clinical Medicine*, 9(1), p. 139. Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm9010139>.
- Instituto Nacional de Ciencias Médicas Generales, E. (2020) *REGENERACIÓN PÁGINA 1 EL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS GENERALES*. Available at: <https://www.nigms.nih.gov>.
- Jacob, A.L. *et al.* (2006) 'Fibroblast growth factor receptor 1 signaling in the osteo-chondrogenic cell lineage regulates sequential steps of osteoblast maturation', *Developmental Biology*, 296(2), pp. 315–328. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.031>.
- Jacobson, M. and Rutishauser, U. (1986) 'Induction of neural cell adhesion molecule (NCAM) in *Xenopus* embryos', *Developmental Biology*, 116(2), pp. 524–531. Available at: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(86\)90153-3](https://doi.org/10.1016/0012-1606(86)90153-3).
- Justice, S.S. *et al.* (2014) 'Bacterial differentiation, development, and disease: Mechanisms for survival', *FEMS Microbiology Letters*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12602>.
- Kang, J. *et al.* (2019) 'Stem Cells from the Apical Papilla: A Promising Source for Stem Cell-Based Therapy', *BioMed Research International*, 2019, pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1155/2019/6104738>.
- Katoh, M. (2002) 'WNT and FGF gene clusters (Review)', *International Journal of Oncology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.3892/ijo.21.6.1269>.
- Khotib, J. *et al.* (2021) 'Signaling Pathway and Transcriptional Regulation in Osteoblasts during Bone Healing: Direct Involvement of Hydroxyapatite as a Biomaterial', *Pharmaceuticals*, 14(7), p. 615. Available at: <https://doi.org/10.3390/ph14070615>.
- Kim, J.-H. *et al.* (2018) 'Comparison of Immunological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells from the Periodontal Ligament, Umbilical Cord, and Adipose Tissue', *Stem Cells International*, 2018, pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1155/2018/8429042>.
- Kim, W.-Y. *et al.* (2001) 'NeuroD-null mice are deaf due to a severe loss of the inner ear sensory neurons during development', *Development*, 128(3), pp. 417–426. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.128.3.417>.
- Kinney, M.A. *et al.* (2014) 'Engineering Three-Dimensional Stem Cell Morphogenesis for the Development of Tissue Models and Scalable Regenerative Therapeutics', *Annals of Biomedical Engineering*, 42(2), pp. 352–367. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10439-013-0953-9>.

- Komori, T. (2020) 'Functions of Osteocalcin in Bone, Pancreas, Testis, and Muscle', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), p. 7513. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21207513>.
- Kotze, L.A. *et al.* (2021) 'Establishment of a Patient-Derived, Magnetic Levitation-Based, Three-Dimensional Spheroid Granuloma Model for Human Tuberculosis', *mSphere*, 6(4). Available at: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00552-21>.
- Kovalevich, J. and Langford, D. (2013) 'Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology', in, pp. 9–21. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5_2.
- Krampera, M. (2011) 'Mesenchymal stromal cell "licensing": a multistep process', *Leukemia*, 25(9), pp. 1408–1414. Available at: <https://doi.org/10.1038/leu.2011.108>.
- De la Rosa-Ruiz, M. del P. *et al.* (2019) 'Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Dental Tissues: A Comparative In Vitro Evaluation of Their Immunoregulatory Properties Against T cells', *Cells*, 8(12), p. 1491. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8121491>.
- Labusca, L. *et al.* (2021) 'Magnetic nanoparticle loaded human adipose derived mesenchymal cells spheroids in levitated culture', *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 109(5), pp. 630–642. Available at: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34727>.
- Lam, H.J. *et al.* (2010) 'In Vitro Regulation of Neural Differentiation and Axon Growth by Growth Factors and Bioactive Nanofibers', *Tissue Engineering Part A*, 16(8), pp. 2641–2648. Available at: <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0414>.
- Langer, R. and Vacanti, J.P. (1993) 'Tissue Engineering', *Science*, 260(5110), pp. 920–926. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.8493529>.
- Laschke, M.W. and Menger, M.D. (2017) 'Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering', *Trends in Biotechnology*, 35(2), pp. 133–144. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.08.004>.
- Lassiter, R.N.T. *et al.* (2007) 'Canonical Wnt signaling is required for ophthalmic trigeminal placode cell fate determination and maintenance', *Developmental Biology*, 308(2), pp. 392–406. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.05.032>.
- Lazcano, A. and Peretó, J. (2017) 'On the origin of mitosing cells: A historical appraisal of Lynn Margulis endosymbiotic theory', *Journal of Theoretical Biology*, 434, pp. 80–87. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.06.036>.
- Lee, C.C.I. *et al.* (2010) 'Clonal analysis and hierarchy of human bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells', *Experimental Hematology*, 38(1), pp. 46–54. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2009.11.001>.
- Lei, Y. and Schaffer, D. V. (2013) 'A fully defined and scalable 3D culture system for human pluripotent stem cell expansion and differentiation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(52). Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1309408110>.
- Li, X. *et al.* (2003) 'Eya protein phosphatase activity regulates Six1–Dach–Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis', *Nature*, 426(6964), pp. 247–254. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature02083>.
- Li, X. *et al.* (2018) 'Bone Marrow- and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: Characterization, Differentiation, and Applications in Cartilage Tissue Engineering', *Critical Reviews in*

Eukaryotic Gene Expression, 28(4), pp. 285–310. Available at: <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2018023572>.

Li, Z., Hu, X. and Zhong, J.F. (2019) 'Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Function, and Application', *Stem Cells International*, 2019, pp. 1–2. Available at: <https://doi.org/10.1155/2019/8106818>.

Lian, J.B. and Stein, G.S. (2008) 'Chapter 6 - Osteoblast Biology', in R. Marcus et al. (eds) *Osteoporosis*. third. Elsevier, pp. 93–150. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-012370544-0.50008-2>.

Lin, X. et al. (2020) 'The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration', *Frontiers in Pharmacology*, 11. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00757>.

Liu, X. et al. (2017) 'Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in acute kidney injury is affected by administration timing', *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 49(4), pp. 338–348. Available at: <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx016>.

Maeno, T. et al. (2011) 'Early onset of Runx2 expression caused craniosynostosis, ectopic bone formation, and limb defects', *Bone*, 49(4), pp. 673–682. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.07.023>.

Mages, B. et al. (2021) 'The Cytoskeletal Elements MAP2 and NF-L Show Substantial Alterations in Different Stroke Models While Elevated Serum Levels Highlight Especially MAP2 as a Sensitive Biomarker in Stroke Patients', *Molecular Neurobiology*, 58(8), pp. 4051–4069. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02372-3>.

Mandelkow, E.-M. and Mandelkow, E. (2012) 'Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7), pp. a006247–a006247. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006247>.

Martínez-Gómez, A. (2014) 'Communication glia-neurons II. Myelinating glial cells Comunicación entre células gliales y neuronas II. Células gliales que forman mielina', *Revista de Medicina e Investigación*, 2(2), pp. 85–93. Available at: www.elsevier.es.

Matos Cruz, A.J. and De Jesus, O. (2023) *Neurotmesis, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559108/> (Accessed: 1 June 2023).

Matta-Chuquisapon, J. et al. (2020) 'Presencia de genes fimH y afa en aislamientos urinarios de Escherichia coli productora de betalactamasas de espectro extendido en Lima, Perú', *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 37(2), pp. 282–6. Available at: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2020.372.4829>.

Mechiche Alami, S. et al. (2016) 'Concise Review: In Vitro Formation of Bone - Like Nodules Sheds Light on the Application of Stem Cells for Bone Regeneration', *Stem Cells Translational Medicine*, 5(11), pp. 1587–1593. Available at: <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0413>.

Mennan, C. et al. (2013) 'Isolation and Characterisation of Mesenchymal Stem Cells from Different Regions of the Human Umbilical Cord', *BioMed Research International*, 2013, pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1155/2013/916136>.

Meseguer, J. et al. (2015) 'Esferoides y esferas líquidas. Cultivos celulares en 3D para mimetizar el ambiente de las células en el organismo.', *Revista Eubacteria*, 34, pp. 15–20.

- Mims, C. (2011) *Bio-Assembling in 3-D with Magnetic Levitation*. Available at: <https://www.technologyreview.com/2011/12/15/189164/bio-assembling-in-3-d-with-magnetic-levitation/> (Accessed: 6 June 2023).
- Miura, M. *et al.* (2003) 'SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(10), pp. 5807–5812. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0937635100>.
- Mobarakeh, Z.T. *et al.* (2012) 'Human endometrial stem cells as a new source for programming to neural cells', *Cell Biology International Reports*, 19(1), pp. 7–14. Available at: <https://doi.org/10.1042/CBR20110009>.
- Moody, S.A. and LaMantia, A.-S. (2015) 'Transcriptional Regulation of Cranial Sensory Placode Development', in, pp. 301–350. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2014.11.009>.
- Mortada, I. and Mortada, R. (2018) 'Epigenetic changes in mesenchymal stem cells differentiation', *European Journal of Medical Genetics*, 61(2), pp. 114–118. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.10.015>.
- Mullen, R.J., Buck, C.R. and Smith, A.M. (1992) 'NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates', *Development*, 116(1), pp. 201–211. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.116.1.201>.
- Narendra Talabattula, V.A. *et al.* (2017) 'Non-canonical pathway induced by Wnt3a regulates β -catenin via Pyk2 in differentiating human neural progenitor cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 491(1), pp. 40–46. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.030>.
- Newton, A.C., Bootman, M.D. and Scott, J. (2016) 'Second messengers', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(8). Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005926>.
- Noda, S. *et al.* (2019) 'Effect of cell culture density on dental pulp-derived mesenchymal stem cells with reference to osteogenic differentiation', *Scientific Reports*, 9(1), p. 5430. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41741-w>.
- Nosrat, I. V. *et al.* (2004) 'Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system', *European Journal of Neuroscience*, 19(9), pp. 2388–2398. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03314.x>.
- Onbas, R. and Arslan Yildiz, A. (2021) 'Fabrication of Tunable 3D Cellular Structures in High Volume Using Magnetic Levitation Guided Assembly', *ACS Applied Bio Materials*, 4(2), pp. 1794–1802. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01523>.
- Ornitz, D.M. and Marie, P.J. (2015) 'Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease', *Genes & Development*, 29(14), pp. 1463–1486. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.266551.115>.
- Påhlman, S. *et al.* (1984) 'Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation', *Cell Differentiation*, 14(2), pp. 135–144. Available at: [https://doi.org/10.1016/0045-6039\(84\)90038-1](https://doi.org/10.1016/0045-6039(84)90038-1).

- Panek, M., Grabacka, M. and Pierzchalska, M. (2018) 'The formation of intestinal organoids in a hanging drop culture', *Cytotechnology*, 70(3), pp. 1085–1095. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10616-018-0194-8>.
- Park, J. *et al.* (2018) '3D Miniaturization of Human Organs for Drug Discovery', *Advanced Healthcare Materials*, 7(2), p. 1700551. Available at: <https://doi.org/10.1002/adhm.201700551>.
- Park, K.-S., Lee, Y.-S. and Kang, K.-S. (2006) 'In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood', *Journal of Veterinary Science*, 7(4), p. 343. Available at: <https://doi.org/10.4142/jvs.2006.7.4.343>.
- Patel, T. *et al.* (2022) 'Transcriptional dynamics of murine motor neuron maturation in vivo and in vitro', *Nature Communications*, 13(1), p. 5427. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33022-4>.
- Perez-Landero, S. and Nieto-Sotelo, J. (2013) 'La ruta de señalización de la Cinasa de proteínas tipo A dependiente del AMPc en *Saccharomyces cerevisiae*', *Revista de educación bioquímica*, 32(3), pp. 97–105.
- Phelan, M.A. *et al.* (2019) 'An Air Bubble-Isolating Rotating Wall Vessel Bioreactor for Improved Spheroid/Organoid Formation', *Tissue Engineering Part C: Methods*, 25(8), pp. 479–488. Available at: <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2019.0088>.
- Plotkin, L.I. and Bruzzaniti, A. (2019) 'Molecular signaling in bone cells: Regulation of cell differentiation and survival', in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Academic Press Inc., pp. 237–281. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.002>.
- Qian, X., Song, H. and Ming, G.L. (2019) 'Brain organoids: Advances, applications and challenges', *Development (Cambridge)*. Company of Biologists Ltd. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.166074>.
- Quijada García, S. (2017) *Revisión bibliográfica sobre las lesiones de ligamento cruzado anterior (LCA) en los distintos deportes*. Trabajo de fin de grado. Universidad Miguel Hernández.
- Ravi, M. *et al.* (2015) '3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications', *Journal of Cellular Physiology*, 230(1), pp. 16–26. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.24683>.
- Reissmann, E. *et al.* (1996) 'Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons', *Development*, 122(7), pp. 2079–2088. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.122.7.2079>.
- Rezniczek, G.A. *et al.* (2016) 'Factors influencing yield and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood and matrix', *Regenerative Medicine*, 11(5), pp. 465–474. Available at: <https://doi.org/10.2217/rme-2016-0023>.
- Rutkovskiy, A., Stensløyken, K.-O. and Vaage, I.J. (2016) 'Osteoblast Differentiation at a Glance', *Medical Science Monitor Basic Research*, 22, pp. 95–106. Available at: <https://doi.org/10.12659/MSMBR.901142>.
- Ryu, N.-E., Lee, S.-H. and Park, H. (2019a) 'Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells', *Cells*, 8(12), p. 1620. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8121620>.
- Ryu, N.-E., Lee, S.-H. and Park, H. (2019b) 'Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells', *Cells*, 8(12), p. 1620. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8121620>.

- Ryu, N.-E., Lee, S.-H. and Park, H. (2019c) 'Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells', *Cells*, 8(12), p. 1620. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8121620>.
- Sanberg, P.R. *et al.* (2011) 'The Treatment of Neurodegenerative Disorders Using Umbilical Cord Blood and Menstrual Blood-Derived Stem Cells', *Cell Transplantation*, 20(1), pp. 85–94. Available at: <https://doi.org/10.3727/096368910X532855>.
- Sánchez Alvarado, A. and Yamanaka, S. (2014) 'Rethinking Differentiation: Stem Cells, Regeneration, and Plasticity', *Cell*, 157(1), pp. 110–119. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.041>.
- Schätzle, P. *et al.* (2018) 'Activity-Dependent Actin Remodeling at the Base of Dendritic Spines Promotes Microtubule Entry', *Current Biology*, 28(13), pp. 2081–2093.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.004>.
- Schlosser, G. (2021) *Development of Sensory and Neurosecretory Cell Types. Vertebrate Cranial Placodes*. Boca Raton: CRC Press.
- Schocker, N.S. *et al.* (2015) 'Synthesis of Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α -, Gal β (1,4)GlcNAc α - and GlcNAc-containing neoglycoproteins and their immunological evaluation in the context of Chagas disease', *Glycobiology*, p. cww081. Available at: <https://doi.org/10.1093/glycob/cww081>.
- Seo, B.-M. *et al.* (2004) 'Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament', *The Lancet*, 364(9429), pp. 149–155. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16627-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16627-0).
- Shapiro, L., Agabian-Keshishian, N. and Bendis, I. (1971) 'Bacterial Differentiation: The cell cycle of *Caulobacter* is used as a model system for studying the molecular basis of differentiation.', *Science*, 173(4000), pp. 884–892.
- Sharpe, P.T. (2016) 'Dental mesenchymal stem cells', *Development*, 143(13), pp. 2273–2280. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.134189>.
- Shaw, G. *et al.* (2005) 'Hyperphosphorylated neurofilament NF-H is a serum biomarker of axonal injury', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(4), pp. 1268–1277. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.252>.
- Shuttleworth, C.A. and Smalley, J.W. (1983) 'Periodontal Ligament', in, pp. 211–247. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-363710-9.50010-1>.
- Silvester, E., McWilliam, K.R. and Matthews, K.R. (2017) 'The cytological events and molecular control of life cycle development of *Trypanosoma brucei* in the mammalian bloodstream', *Pathogens*. MDPI AG. Available at: <https://doi.org/10.3390/pathogens6030029>.
- Simms, A.N. and Mobley, H.L.T. (2008) 'PapX, a P Fimbrial Operon-Encoded Inhibitor of Motility in Uropathogenic *Escherichia coli*', *Infection and Immunity*, 76(11), pp. 4833–4841. Available at: <https://doi.org/10.1128/IAI.00630-08>.
- Simon, G.R., Costa, R.R. and Gandara, D.R. (2018) 'Pharmacogenomics in Lung Cancer', in *IASLC Thoracic Oncology*. Elsevier, pp. 466–478.e3. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52357-8.00047-0>.
- Snyder, R.A. *et al.* (2020) 'Surface sensing stimulates cellular differentiation in *Caulobacter crescentus*', *BIOLOGICAL SCIENCES*, 117(30), pp. 17984–17991. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1920291117/-/DCSupplemental>.

- Soltani, M.H. *et al.* (2005) 'Microtubule-Associated Protein 2, a Marker of Neuronal Differentiation, Induces Mitotic Defects, Inhibits Growth of Melanoma Cells, and Predicts Metastatic Potential of Cutaneous Melanoma', *The American Journal of Pathology*, 166(6), pp. 1841–1850. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62493-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62493-5).
- Song, L. (2017) 'Calcium and Bone Metabolism Indices', in, pp. 1–46. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2017.06.005>.
- Sonoyama, W. *et al.* (2006) 'Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine', *PLoS ONE*, 1(1), p. e79. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000079>.
- Sonoyama, W. *et al.* (2008) 'Characterization of the Apical Papilla and Its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth: A Pilot Study', *Journal of Endodontics*, 34(2), pp. 166–171. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.11.021>.
- Sontheimer-Phelps, A., Hassell, B.A. and Ingber, D.E. (2019) 'Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips', *Nature Reviews Cancer*, 19(2), pp. 65–81. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0104-6>.
- Soto, A., Dionizio Moreira, M. and Pallini, A. (2011) *Análisis de la Composición Química de la Cutícula de TETRANYCHUS EVANSI Backer & Pritchard Y de TETRANYCHUS URTICAE KOCH (acarí: tetranychidae) **.
- Sowmya, S. *et al.* (2015) 'Periodontal Specific Differentiation of Dental Follicle Stem Cells into Osteoblast, Fibroblast, and Cementoblast', *Tissue Engineering Part C: Methods*, 21(10), pp. 1044–1058. Available at: <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2014.0603>.
- Spemann, H. (1918) "'Über die Determination der ersten Organanlagen des Amphibien Embryo I-IV', *Roux's Archiv für Entwicklungsmechanik*, pp. 448–555.
- Spemann, H. and Mangold, H. (1924) 'Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren', *Archiv für Mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik*, pp. 599–638.
- Stanko, P. *et al.* (2018) 'Dental Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Exosomes', *Stem Cells International*, 2018, pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1155/2018/8973613>.
- Stevens, A.R. *et al.* (2017) 'SOX2 is required for inner ear neurogenesis', *Scientific Reports*, 7(1), p. 4086. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04315-2>.
- Steward, M.M., Sridhar, A. and Meyer, J.S. (2012) 'Neural Regeneration', in, pp. 163–191. Available at: https://doi.org/10.1007/82_2012_302.
- Stricker, P. *et al.* (2021) 'Human Mesenchymal Stem Cells Seeded on the Natural Membrane to Neurospheres for Cholinergic-like Neurons', *Membranes*, 11(8), p. 598. Available at: <https://doi.org/10.3390/membranes11080598>.
- Takata, K., Yamamoto, K.Y. and Ozawa, R. (1981) 'Use of lectins as probes for analyzing embryonic induction', *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*, 190(2), pp. 92–96. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00848401>.
- Tariq, K. and Luikart, B.W. (2021) 'Striking a balance: PIP2 and PIP3 signaling in neuronal health and disease', *Exploration of Neuroprotective Therapy*, 1(2). Available at: <https://doi.org/10.37349/ent.2021.00008>.

- Taşlı, P.N. *et al.* (2013) 'Effect of F68, F127, and P85 Pluronic Block Copolymers on Odontogenic Differentiation of Human Tooth Germ Stem Cells', *Journal of Endodontics*, 39(10), pp. 1265–1271. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.06.011>.
- Taşlı, P.N. *et al.* (2016) 'Myogenic and neurogenic differentiation of human tooth germ stem cells (hTGSCs) are regulated by pluronic block copolymers', *Cytotechnology*, 68(2), pp. 319–329. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9784-2>.
- Thalhammer, A. *et al.* (2006) 'CaMKII translocation requires local NMDA receptor-mediated Ca²⁺ signaling', *The EMBO Journal*, 25(24), pp. 5873–5883. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601420>.
- Tonelli, F.M.P. *et al.* (2017) 'Tissue Engineering: The Use of Stem Cells in Regenerative Medicine', in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Human and Animal Health Applications*. Elsevier Inc., pp. 315–324. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63660-7.00012-7>.
- Torre-Bouscoulet, L. (2015) *www.medigraphic.org.mx Los retos de la medicina personalizada, Neumol Cir Torax*. Available at: www.medigraphic.org.mx.
- Toyoda, M., Cui, C. and Umezawa, A. (2007) 'Myogenic transdifferentiation of menstrual blood-derived cells', *Acta myologica: myopathies and cardiomyopathies: official journal of the Mediterranean Society of Myology*, 26(3), pp. 176–8.
- Trager, W. (1963) *Differentiation in Protozoa**.
- Trentin, J.J. (1978) 'Hemopoietic microenvironments', *Transplantation proceedings*, 10(1), pp. 77–82.
- Tseng, H. *et al.* (2014) 'A three-dimensional co-culture model of the aortic valve using magnetic levitation', *Acta Biomaterialia*, 10(1), pp. 173–182. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.09.003>.
- Tzeng, H.H. *et al.* (2015) 'Cell signaling and differential protein expression in neuronal differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells with hypermethylated Salvador/Warts/Hippo (SWH) pathway genes', *PLoS ONE*, 10(12). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145542>.
- Urrutia, D.N. *et al.* (2019) 'Comparative study of the neural differentiation capacity of mesenchymal stromal cells from different tissue sources: An approach for their use in neural regeneration therapies', *PLOS ONE*, 14(3), p. e0213032. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213032>.
- Vimalraj, S. (2020) 'Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization', *Gene*, 754, p. 144855. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144855>.
- Volponi, A.A. and Sharpe, P.T. (2013) 'The tooth – a treasure chest of stem cells', *British Dental Journal*, 215(7), pp. 353–358. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2013.959>.
- Wang, C. *et al.* (2016) 'Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Osteoblasts and Adipocytes and its Role in Treatment of Osteoporosis', *Medical Science Monitor*, 22, pp. 226–233. Available at: <https://doi.org/10.12659/MSM.897044>.
- Wang, J. *et al.* (2009) 'Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells promoted by overexpression of connective tissue growth factor', *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 10(5), pp. 355–367. Available at: <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820252>.

- Wartenberg, M. and Acker, H. (1995) *Quantitative Recording of Vitality Patterns in Living Multicellular Spheroids by Confocal Microscopy*.
- Watson, C., Kirkcaldie, M. and Paxinos, G. (2010) 'Techniques for studying the brain', in *The Brain*. Elsevier, pp. 153–165. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373889-9.50011-5>.
- Weinstein, R.S. *et al.* (2010) 'Intermittent Parathyroid Hormone Administration Counteracts the Adverse Effects of Glucocorticoids on Osteoblast and Osteocyte Viability, Bone Formation, and Strength in Mice', *Endocrinology*, 151(6), pp. 2641–2649. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2009-1488>.
- Xu, R. *et al.* (2017) 'c-Jun N-Terminal Kinases (JNKs) Are Critical Mediators of Osteoblast Activity In Vivo', *Journal of Bone and Mineral Research*, 32(9), pp. 1811–1815. Available at: <https://doi.org/10.1002/jbmr.3184>.
- Yamada, Y. *et al.* (2010) 'A Feasibility of Useful Cell-Based Therapy by Bone Regeneration with Deciduous Tooth Stem Cells, Dental Pulp Stem Cells, or Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Clinical Study Using Tissue Engineering Technology', *Tissue Engineering Part A*, 16(6), pp. 1891–1900. Available at: <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0732>.
- Yao, P. *et al.* (2022) 'Wnt/PCP pathway regulates the migration and neural differentiation of mesenchymal stem cells in vitro', *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 60(1), pp. 44–54. Available at: <https://doi.org/10.5603/FHC.a2022.0006>.
- Yen, M. *et al.* (2007) 'Multilineage Differentiation and Characterization of the Human Fetal Osteoblastic 1.19 Cell Line: A Possible In Vitro Model of Human Mesenchymal Progenitors', *Stem Cells*, 25(1), pp. 125–131. Available at: <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0295>.
- Yu, K. *et al.* (2003) 'Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth', *Development*, 130(13), pp. 3063–3074. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.00491>.
- Zajdel, A. *et al.* (2017) 'Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue and Wharton's jelly of the umbilical cord', *Acta Biochimica Polonica*, 64(2). Available at: https://doi.org/10.18388/abp.2016_1488.
- Zhang, M. *et al.* (2022) '3D printing of tree-like scaffolds for innervated bone regeneration', *Additive Manufacturing*, 54, p. 102721. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addma.2022.102721>.
- Zhang, Q. *et al.* (2018a) '3D bio-printed scaffold-free nerve constructs with human gingiva-derived mesenchymal stem cells promote rat facial nerve regeneration', *Scientific Reports*, 8(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24888-w>.
- Zhang, Q. *et al.* (2018b) '3D bio-printed scaffold-free nerve constructs with human gingiva-derived mesenchymal stem cells promote rat facial nerve regeneration', *Scientific Reports*, 8(1), p. 6634. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24888-w>.
- Zhao, M. *et al.* (2002) 'Bone Morphogenetic Protein 2 Induces Dental Follicle Cells to Differentiate Toward a Cementoblast/Osteoblast Phenotype', *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(8), pp. 1441–1451. Available at: <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.8.1441>.