

La sobreexpresión de *SOX2* y *KDM4A* en células de la pulpa dental humana induce la generación de células con características neurales

Ulíbarri-Viniegra Valeria¹, Carrillo-Cocom Leydi M.¹, Rodas-Junco Beatriz A.^{2,3}, Nic-Can Geovanny I.^{2,3,*}

¹Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico Norte, Kilómetro 33.5. Mérida, Yucatán, CP 97302.

²Laboratorio Traslacional de Células Troncales de Origen Bucal, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Yucatán, Calle 61A x 90 y 92. Mérida, Yucatán, CP 97000.

³CONACYT-Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán. Periférico Norte Kilómetro 33.5. Mérida, Yucatán, CP 97302.

Fecha de recepción: 5 de diciembre de 2022 - Fecha de aceptación: 11 de mayo de 2023

Resumen

A pesar de que las células troncales derivadas de la pulpa dental (CTPD) constituyen una fuente prometedora para la desdiferenciación celular debido a sus características mesenquimales, propiedades inmunomoduladoras y su perfil de expresión de genes asociados a la pluripotencia incluyendo *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, *KLF4* y *c-MYC*, la eficiencia de reprogramación es extremadamente baja. En ese aspecto, en el presente trabajo se evaluó la sobreexpresión de los genes *SOX2* y/o *KDM4A*, un gen asociado a la pluripotencia celular y una desmetilasa de la lisina 9 de la histona H3 respectivamente, en CTPD en un medio de desdiferenciación celular (TeSR™-E7™) durante 30 días. Se demostró que la sobreexpresión (OE) de los genes *SOX2* y *KDM4A* induce cambios en los patrones de expresión de los genes asociados a la pluripotencia (*OCT4*, *NANOG*, *KLF4* y *c-MYC*). Adicionalmente, se observó que a partir del día 11 de cultivo, la OE de los genes indujeron cambios morfológicos asociados con la transición mesenquimal-epitelial. Al día 30, la reprogramación transcripcional inducida por ambos factores parece promover la formación de células progenitoras neurales (CPN) al presentar polaridad morfológica y extensiones de la superficie celular y el citoplasma. Los análisis moleculares indican que únicamente la coexpresión de *SOX2* y *KDM4A* facilitan la expresión de *SOX1*, *SOX2* y *NES*, marcadores claves de CPN. Los resultados obtenidos sugieren que los eventos de remodelación de la cromatina podrían facilitar el ambiente del desarrollo neural en las CTPD.

Palabras claves: Células troncales de pulpa dental, Células progenitoras neurales, *KDM4A*, Reprogramación celular, *SOX2*.

*geovanny.nic@correo.uady.mx; ginicca@conacyt.mx

***SOX2* and *KDM4A* overexpression generates neural-like cells in human dental pulp stem cells**

Abstract

Although dental pulp stem cells (DPSC) have become a promising source for cellular dedifferentiation because of its mesenchymal characteristics, immunomodulatory properties, and pluripotency genes expression profile, including *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, *KLF4*, and *c-MYC*, the reprogramming efficiency remains extremely low. In this regard, we aimed to evaluate the overexpression of *SOX2* and/or *KDM4A*, a pluripotency-related gene and a demethylase of lysine 9 of histone 3, respectively, in DPSC cultivated in a dedifferentiation media (TeSR™-E7™) for 30 days. Here, we show that overexpression (OE) of *SOX2* and *KDM4A* induced changes in the expression patterns of pluripotency genes (*OCT4*, *NANOG*, *KLF4* y *c-MYC*). We also notice morphological changes within 11 days of culture induced by the OE. These changes were related to the mesenchymal-to-epithelial transition. Apparently, by day 30, the transcriptional reprogramming induced by both factors seems to drive the neural progenitor cells formation (NPC), by the morphological polarity and cytoplasm and cellular surface extensions. Molecular analysis revealed that only the coexpression of *SOX2* and *KDM4A*, prompted transcriptional reactivation of neural progenitor cells-associated genes such as *SOX1*, *SOX2* y *NES*. This data suggests that chromatin remodelling might facilitate neural lineage commitment in DPSC.

Keywords: Dental Pulp Stem Cells, *KDM4A*, Neural Progenitor Cells, Cellular reprogramming, *SOX2*.

Introducción

La generación de células pluripotentes (iPSC) se ha vuelto una herramienta para la investigación de diversas enfermedades y la generación de posibles tratamientos con células derivadas de los mismos pacientes. Sin embargo, su inducción y obtención ha probado constituir un proceso ineficiente y complicado, por lo que surge la necesidad de disponer de modelos celulares humanos confiables para la investigación previo a la generación de posibles tratamientos de enfermedades (Zhou et al. 2011; Poetsch, Strano y Guan, 2022). Las células troncales de pulpa dental (CTPD) representan una fuente viable de células troncales mesenquimales al extraerse de manera menos invasiva y sin restricciones éticas, en comparación con las derivadas de la médula ósea y las embriogénicas (Li et al.,

2021). Además, el hecho de que las CTPD puedan expresar los factores asociados a la pluripotencia (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4* y *c-MYC*) (Rodas-Junco et al., 2017) podrían convertirlas en un candidato adecuado para la generación de iPSC.

Dentro de los factores asociados a la generación de pluripotencia, se ha encontrado que *SOX2* tiene un papel esencial al formar parte de la red central transcripcional y que, junto con *OCT4* y *NANOG*, suprimen la expresión de genes relacionados con la determinación del linaje (Zhang y Cui, 2014). Sin embargo, se ha sugerido que la capacidad de *SOX2* para realizar su actividad depende de la configuración de la cromatina (Friman et al., 2019).

Lo anterior es importante debido a que existen ciertos factores asociados a la cromatina que pueden actuar como barreras que impiden la reprogramación celular, esto para mantener el programa transcripcional asociado al fenotipo celular (Ordog et al., 2012). Además, los cambios en la forma de la cromatina tienen un efecto directo en la actividad transcripcional, ya que al relajarse o compactarse, puede activar o suprimir la expresión génica (Papp y Plath, 2013). Específicamente, el estado de la cromatina puede ser influenciado por enzimas que actúan como borradores de marcas epigenéticas represivas conocidas como desmetilasas de histonas (Bannister y Kouzarides, 2011). En este sentido, se ha demostrado que KDM4A tiene la capacidad de eliminar o diluir la trimetilación de la lisina 9 en la histona H3 (H3K9me3), una de las principales barreras de reprogramación celular (Wang et al., 2018; Young y Dere, 2021), mientras que SOX2 puede actuar como un remodelador de la cromatina (Friman et al., 2019).

En el presente estudio, se encontró que la coexpresión de *SOX2* y *KDM4A* en las CTPD induce la transición mesenquimal-epitelial, una característica del inicio de la reprogramación celular, pero que cambia a la generación de células progenitoras neurales, estimuladas probablemente, por la naturaleza de las CTPD que derivan de la cresta neural.

Metodología

Plásmidos para la sobreexpresión de *KDM4A* y *SOX2*

Brevemente, los plásmidos pcDNA3.3_*SOX2* (Addgene, # 26817) y pcDNA-flag-h*KDM4A*-polyA (Addgene, # 101051), que contienen al gen *SOX2* y *KDM4A* respectivamente, fueron aislados y purificados a partir de *E. Coli* DH5- α por medio del kit PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep (Invitrogen, # K2100-04), cuantificados por medio de NanoDrop™

2000/2000c (ThermoFisher Scientific) y almacenados a -20°C hasta su uso.

Cultivo celular

Células con características mesenquimales fueron obtenidas a partir de la pulpa dental de un diente deciduo de un paciente masculino de 7 años. La extracción dental se realizó acorde con el protocolo aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” (CIE 06-2017). A partir del órgano dentario se obtuvieron los cultivos primarios mediante el método del explante, del cual se aislaron las CTPD de acuerdo con la metodología descrita previamente (Pérez-Argueta, 2020).

Transfección celular

Aproximadamente 2×10^5 CTPD fueron sembradas en placas de 12 pozos 24 horas previas a la transfección celular, la cual fue realizada con los plásmidos pcDNA3.3_*SOX2* y pcDNA-flag-h*KDM4A*-polyA de manera individual y de manera simultánea. Para cada transfección, 500 ng de ADN plasmídico en combinación con 1.5 μL de Lipofectamina 3000 y 2 μL del reactivo P3000 como agente de transfección (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific Inc., # L3000015) fueron utilizados para la formación de los complejos lipídicos aplicados por cada pozo. Las células fueron transfectadas en ausencia de suero fetal bovino (SFB) y antibiótico utilizando 500 μL de medio Opti-MEM (Gibco, # 31985070) durante 12 horas. Posteriormente, las células fueron cultivadas en α -MEM enriquecido con 10% de SFB y 1% de antibiótico-antimicótico y recolectadas a las 48 horas con tripsina-EDTA al 0.25% (Gibco, # 25200056) para los análisis moleculares. Las células transfectadas con *SOX2* y *KDM4A* fueron llamadas PD OE-*SOX2* y PD OE-*KDM4A*, respectivamente, mientras que las células cotransfectadas de manera simultánea con ambos plásmidos fueron denominadas PD OE-SK. Finalmente,

CTPD sin transfectar fueron utilizadas como control y fueron denominadas PD Ctrl. Todos los cultivos fueron mantenidos a 37°C con 5% de CO₂.

Inducción a pluripotencia celular

Las células transfectadas fueron cultivadas en α -MEM enriquecido con 10% de SFB y 1% de antibiótico-antimicótico (medio basal) 24 horas post-transfección. Después, las CTPD transfectadas fueron inducidas a la reprogramación celular con 1 mL de medio TeSR™-E7™ (STEMCELL Technologies, # 05914). El cambio de medio se realizó cada dos días hasta alcanzar los 30 días de inducción de la reprogramación celular. CTPD sin transfectar y cultivadas en TeSR™-E7™ y en α -MEM enriquecido con 10% de SBF y 1% de antibiótico-antimicótico, fueron utilizadas como control. Los análisis morfológicos fueron realizados durante la inducción a pluripotencia y registrados mediante microscopio de contraste de fases. En todo momento los cultivos se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂.

Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa (qPCR) y semicuantitativa

Muestras de CTPD cultivadas en medio basal, 48 horas post-transfección, o bajo condiciones

de inducción a la reprogramación (30 días) fueron utilizadas para la extracción de ARN mediante el kit Direct-zol™ RNA Miniprep (Zymo Research, # R2050-1-200) siguiendo las instrucciones del proveedor. El ADNc se sintetizó mediante el kit SuperScript™ First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, # 11904-018). Los análisis de qPCR de los genes asociados a la pluripotencia (*OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, *KLF4* y *c-MYC*) fueron realizados en el termociclador Eco Real time PCR System (Illumina), utilizando iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) y 10 μ M de iniciadores correspondientes a cada gen (Tabla 1). Triplicados de los valores C_T (Cycle Threshold) por cada gen fueron normalizados con el gen constitutivo *β -actina*. Los cambios relativos en la expresión ($\Delta\Delta C_T$) se presentan como Unidades Relativas de Expresión (URE). Adicionalmente, se realizó un análisis de los genes asociados al fenotipo neural (*SOX1*, *SOX2* y *NES*) o no (*OCT4*), por medio de PCR semicuantitativa, utilizando 2X PCR Master Mix (Promega # M7505), Taq polimerasa (ThermoScientific # EP0402) y 10 μ M de cebadores de cada gen enlistados en Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de los cebadores utilizados en este estudio.

Gen	Secuencia Forward (5'-3')	Secuencia Reverse (5'-3')	Ta (°C)
<i>GAPDH</i>	CTT TGG CGT GGA AGG ACT C	GTA GAG GCA GGG ATG ATG TTC T	61
<i>B-ACTIN</i>	GAT CAT TGC TCC TCC TGA GC	GTC ATA GTC CGC CTA GAA GCA T	61
<i>c-MYC</i>	GGA CCC GCT TCT CTG AAA GG	TAA CGT TGA GGG GCA TCG TC	61
<i>KLF4</i>	TAC CAA GAG CTC ATG CCA CC	CGC GTA ATC ACA AGT GTG GG	61
<i>NANOG</i>	TGC TGA GAT GCC TCA CAC GGA	TGA CCG GGA CCT TGT CTT CCT T	61
<i>OCT4</i>	GAA AGG GAC CGA GGA GTA	CCG AGT GTG GTT CTG TAA C	61
<i>SOX2</i>	GCC GAG TGG AAA CTT TTG TCG	GCA GCG TGT ACT TAT CCT TCT T	61
<i>KDM4A</i>	TGG CAC CAG CAT ACT CGT TT	ACA GCA GTC CTC CTC TAG GG	61
<i>SOX1</i>	AAC ACT TGA AGC CCA GAT GGA	GCA GGC TGA ATT CGG TTC TC	54
<i>NES</i>	GAG GGA AGT CTT GGA GCC AC	AAG ATG TCC CTC AGC CTG G	61

Ta: Temperatura de alineamiento

Análisis estadístico

Con los valores de CT obtenidos de la expresión relativa de los triplicados de los genes control y diana se calcularon los valores de $\Delta\Delta CT$ siguiendo lo descrito por Livak y Schmittgen (2001). La prueba paramétrica t de student fue utilizada en el análisis estadístico para determinar si existen diferencias significativas respecto al control mediante el software GraphPad Prism 8. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$.

Resultados

La sobreexpresión de *SOX2* y *KDM4A* induce cambios en los patrones de expresión de los genes asociados a pluripotencia

Una vez verificada la sobreexpresión de *SOX2* y *KDM4A* en las CTPD, nos preguntamos si la ganancia en la expresión de estos genes induce un incremento en los niveles de expresión de los genes asociados a pluripotencia (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC* y *NANOG*). A pesar de que ambos plásmidos incrementaron la expresión de *SOX2* a las 48 horas posteriores a la transfección, los resultados de qPCR mostraron que la expresión de *OCT4* y *NANOG* fueron reducidas particularmente en las células cotransfectadas simultáneamente (PD OE-SK, Figura 1). Por otro lado, se observó que tanto las transfecciones individuales, como la cotransfección de ambos genes, indujeron un incremento de 2-5 veces la expresión de *KLF4* y *c-MYC* respecto a al control, indicando una regulación positiva para *KLF4* y *c-MYC*.

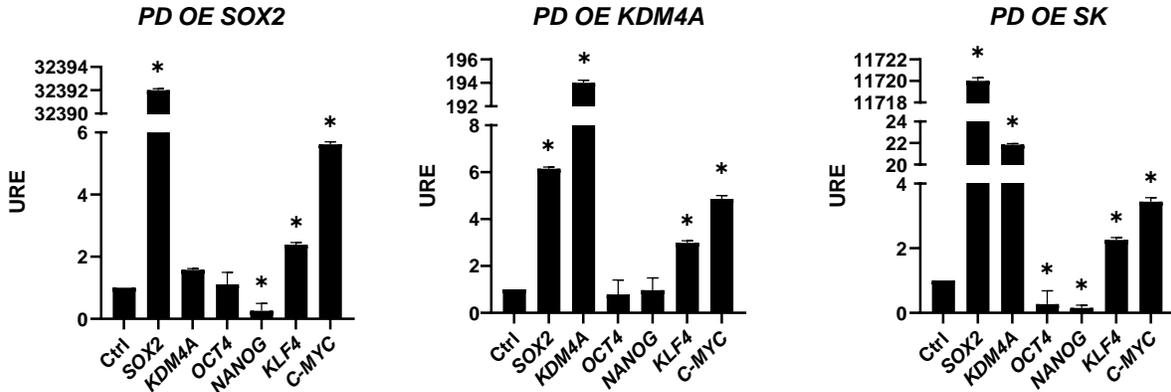


Figura 1. Perfil de expresión de genes asociados a la pluripotencia celular en CTPD control y transfectadas con *SOX2*, *KDM4A* y ambas. CTPD transfectadas o no, fueron utilizadas para la generación de cDNA y evaluadas mediante qPCR para determinar los niveles de expresión de los genes asociados a pluripotencia: *SOX2*, *OCT4*, *NANOG*, *KLF4* y *c-MYC*. El asterisco (*) indica el nivel de significancia del análisis estadístico ejecutado en los valores de $\Delta\Delta CT$. *: $p < 0.05$, que indica diferencias significativas respecto al control. URE: Unidades relativas de expresión.

La sobreexpresión de los genes *SOX2* y *KDM4A* inducen la morfología de un fenotipo neural

Para determinar si la ganancia funcional de *SOX2*, *KDM4A* y *SK* es suficiente para inducir la pluripotencia, las células PD OE-*SOX2*, PD OE-*KDM4A* y PD OE-*SK* fueron cultivadas en medio de reprogramación celular TeSR™-E7™. Se observó que el medio TeSR™-E7™ induce cambios significativos en la morfología de las CTPD transfectadas, pasando de una

morfología fibroblastoide típica, a células más compactas y redondeadas en el día 11 posterior a la transfección (Figura 2). Por el contrario, la morfología de las CTPD sin transfectar (control) no presentaron las mismas características, ya que se alargaron y se engrosaron en el día 30. Por otro lado, las células transfectadas adquirieron un fenotipo similar a células neurales, debido a la formación de estructuras poco polarizadas y el inicio de contactos célula-célula debido a la compactación celular (Figura 2).

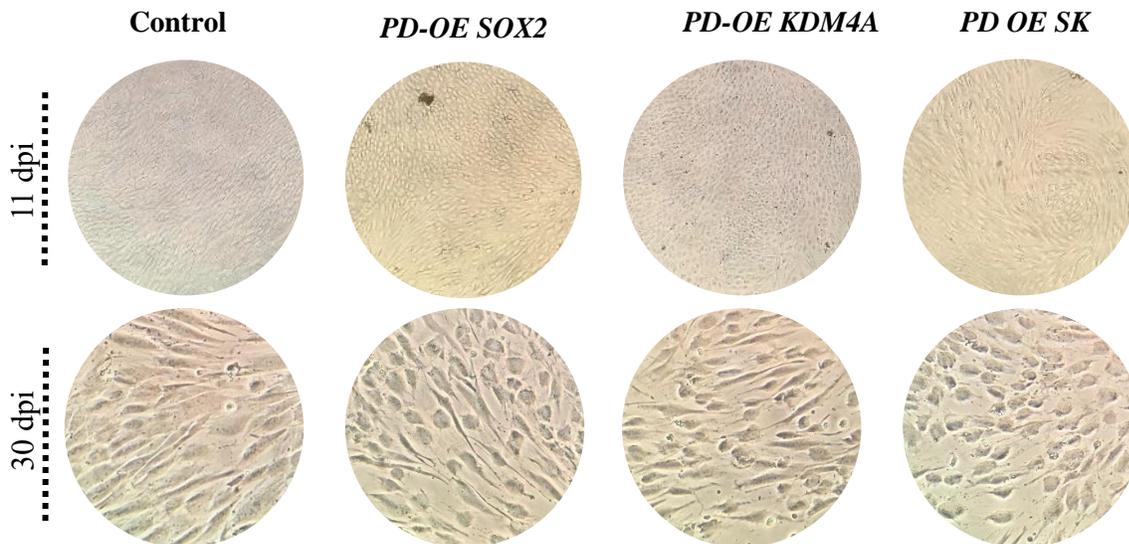


Figura 2. Cambios morfológicos durante la inducción en medio de desdiferenciación celular. Los cambios observados en los cultivos celulares de CTPD a los días 11 y 30 contrastan las formas celulares, pasando de una morfología alargada a una redonda en las células transfectadas con *SOX2* (PD OE-*SOX2*), *KDM4A* (PD OE-*KDM4A*) y contransfectadas con *SOX2* y *KDM4A* (PD OE-*SK*) respecto al tratamiento control (CTPD sin transfectar), que presenta estructuras gruesas y alargadas. Objetivo a 10X. dpi: días posteriores a la inducción.

La coexpresión de *SOX2* y *KDM4A* induce la expresión de genes asociados al establecimiento del ambiente neural

Debido a que las células PD OE-*SOX2*, PD OE-*KDM4A* y PD OE-*SK* cultivadas en TeSR™-E7™ durante 30 días exhibieron una

morfología similar al fenotipo neural, nos cuestionamos si dichas poblaciones celulares realmente podrían expresar marcadores asociados a células neurales (*SOX1*, *SOX2*, *NES*). Los análisis de expresión revelaron que las CTPD cultivadas en TeSR™-E7™ (PD Ctrl-2) pierden la habilidad de mantener la expresión de *SOX2* en comparación al cultivo

primario cultivadas en α -MEM (PD Ctrl-1). También se determinó que PD OE-SOX2 y PD OE-KDM4A expresan *NES* y *SOX2*, pero no *SOX1*, un marcador clave del ambiente neural. De manera interesante, la coexpresión de los genes *SOX2* y *KDM4A* (PD OE-SK), estimuló la expresión de marcadores neurales tempranos, incluyendo *SOX1*, *SOX2* y *NES* (Figura 3). Este último hallazgo sugiere que la expresión conjunta de *SOX2* y *KDM4A* influye en el establecimiento células progenitoras neurales (CPN). Para determinar si la población celular (PD OE-SK) generó CPN, evaluamos la expresión de *OCT4*, ya que se ha

reportado que la disminución de su expresión es necesaria para el desarrollo y maduración neural (Lee et al., 2010; Thomson et al., 2011; Zhang et al., 2019).

Se pudo apreciar que, mientras las poblaciones celulares de transfectadas (PD OE-SOX2 y PD OE-KDM4A) o no (α -MEM Ctrl-1, PD Ctrl-2) mantuvieron la expresión de *OCT4*, las células PD OE-SK exhibieron una reducción importante en los niveles de dicho transcrito, lo que es consistente con la nula participación de *OCT4* en el ambiente neural (Zhang et al., 2019).

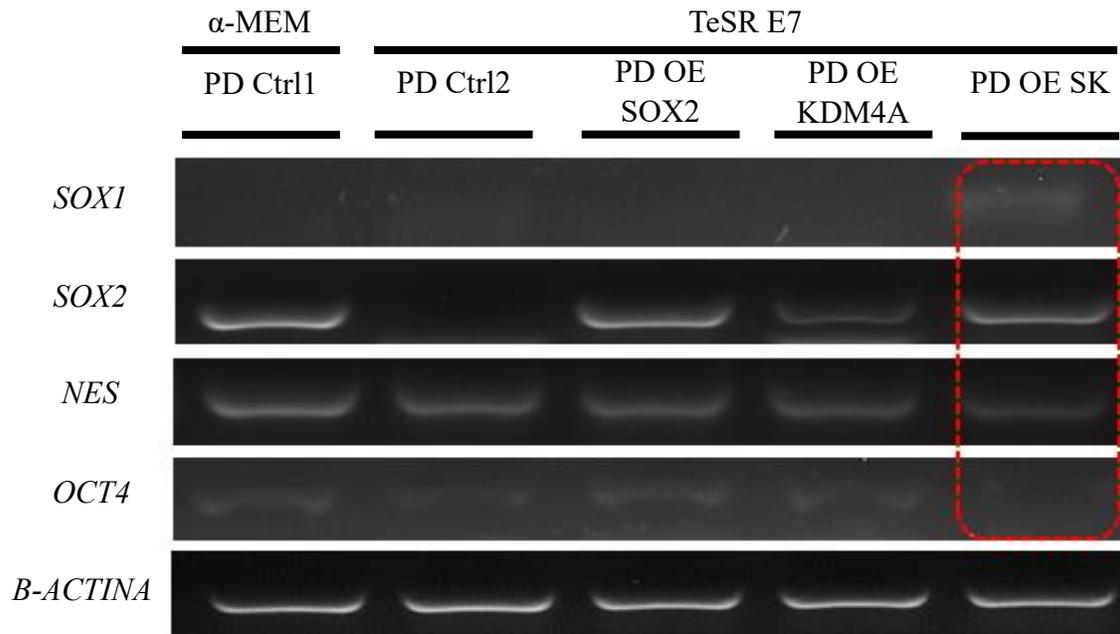


Figura 3. Evaluación de la expresión de marcadores neurales en CTPD transfectadas con SOX2 (PD OE-SOX2), KDM4A (PD OE-KDM4A), y ambos genes de manera simultánea (PD OE-SK). CTPD transfectadas o no (α -MEM Ctrl-1, TeSR™-E7™ PD Ctrl-2), y bajo condiciones de desdiferenciación o no, fueron utilizadas para la generación de cDNA y evaluadas mediante PCR semicuantitativa para determinar los perfiles de expresión de SOX1, SOX2, NES y OCT4. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5% y teñidos con SYBR Gold para visualizar los amplicones de cada gen. El cuadro rojo, indica la presencia de SOX1, SOX2 y NES, así como la disminución de la expresión de OCT4, característicos de las células progenitoras neurales. Cantidades similares de cDNA fueron utilizados para normalizar los análisis con respecto a la expresión del gen constitutivo β -Actina.

Discusión

Las CTPD han atraído la atención científica en los últimos años debido a sus propiedades inmunomoduladoras y su potencial de multidiferenciación. Sin embargo, se ha encontrado que la reprogramación de CTPD basada en la sobreexpresión de los factores asociados a la pluripotencia (OSKM), no ha logrado aumentar la eficiencia, ya que solo se ha logrado un máximo del 1.3% (Pisal et al., 2018). De hecho, esta resistencia a la reprogramación se encontró también en el presente trabajo, pues a pesar de tener aumentos en la expresión de dos genes asociados a la reprogramación celular (*KLF4* y *c-MYC*) debido a la sobreexpresión de un gen asociado a la red central transcripcional (*SOX2*), y un regulador de la cromatina (*KDM4A*), no fue posible inducir la generación de pluripotencia en las CTPD. Dado que se ha demostrado que las células en presencia del medio TeSR™-E7™, un medio ampliamente utilizado en la inducción de la reprogramación, facilita los procesos de desdiferenciación celular (Pei et al., 2019), y la generación de colonias pluripotentes a través de la sobreexpresión de OSKM, se decidió evaluar si las CTPD transfectadas o cotransfectadas y cultivadas en TeSR™-E7™ podría facilitar los eventos de reprogramación. La ganancia funcional de *SOX2* y *KDM4A*, así como la cotransfección de ambos genes empleados en la presente investigación, indujo la formación de células esferoidales entre los 11 y 20 días posteriores a la inducción. Se ha indicado que estos cambios fenotípicos se encuentran estrechamente relacionados con la transición mesenquimal-epitelial, un paso crítico e intermedio en la inducción de pluripotencia que se encuentra asociado con cambios metabólicos, modificaciones epigenéticas y cambios en el destino celular (Pei et al., 2019). Sin embargo, se observó que al cabo de 30 días el fenotipo obtenido resultó ser bastante similar

a la morfología de células bajo inducción hacia el linaje neural. Cabe destacar que dichos cambios podrían depender de variaciones de acuerdo con el tipo celular usado, el vector, así como el número de transfecciones empleadas en los procesos de desdiferenciación (Yan et al., 2010; Yu et al., 2010; Soda et al., 2019).

Por ejemplo, bajo condiciones de inducción neural, las células troncales del ligamento periodontal detienen su proliferación celular, pierden su forma fibroblastoide e inician con morfología redondeada e irregular, además de presentar procesos cortos, formando estructuras unipolares, bipolares y multipolares típicos del inicio del desarrollo neural (Bueno, Martínez-Morga y Martínez, 2019). Sin embargo, hay que resaltar que la morfología no garantiza en absoluto el linaje al que pueden corresponder las células. Por ejemplo, el silenciamiento génico de *SOX2* mediado por ARN de interferencia en las células embriogénicas humanas (ESCs), no parece perturbar la morfología celular respecto al control cuando ambas son inducidas a la diferenciación neural. Sin embargo, las ESCs pierden la capacidad de expresar los genes clave asociados al ambiente neural, como *SOX1*, *SOX2* y *NES* (Kim et al., 2008; Choi et al., 2013; Yin et al., 2013; Fedorova et al., 2019; Zhang et al., 2019; Dey et al., 2021). Lo que coincide parcialmente con la expresión de un solo factor como *SOX2* o *KDM4A* en las CTPD de este trabajo. El hecho de que la coexpresión de ambos factores (PD OE-SK) parezca ser una condicionante que facilita el ambiente neural en las CTPD, se puede explicar de manera parcial debido a que se ha encontrado que la proteína KDM4A se une dinámicamente al promotor del gen *SOX2* y a su potenciador N1 para facilitar su expresión mediante la remoción de la H3K9me3 (una marca epigenética represiva) durante el desarrollo temprano de la placa neural (Bouzas et al., 2016). Además, las CTPD y las células

neurales comparten la misma línea de desarrollo en el árbol ontológico del desarrollo embrionario, ya que éstas derivan específicamente de la cresta neural (Luo et al., 2018; Wakamatsu y Uchikawa, 2021). En este sentido, se sugiere que la tendencia de las CTPD hacia la formación de células con características neurales podría relacionarse con su origen, lo que permite sugerir que la actividad de KDM4A podría ser esencial para facilitar el enlace de SOX2 a los motivos de

unión de los genes asociados al desarrollo neural para dar inicio al desarrollo de células progenitoras neurales (Figura 4). Estudios posteriores en las CTPD cotransfectadas serán necesarios para confirmar la eficiencia de conversión neural y su supervivencia en medios neurales especializados que podrían ser usados para entender el inicio y desarrollo de neuronas y oligodendrocitos, entre otras células neurales especializadas.

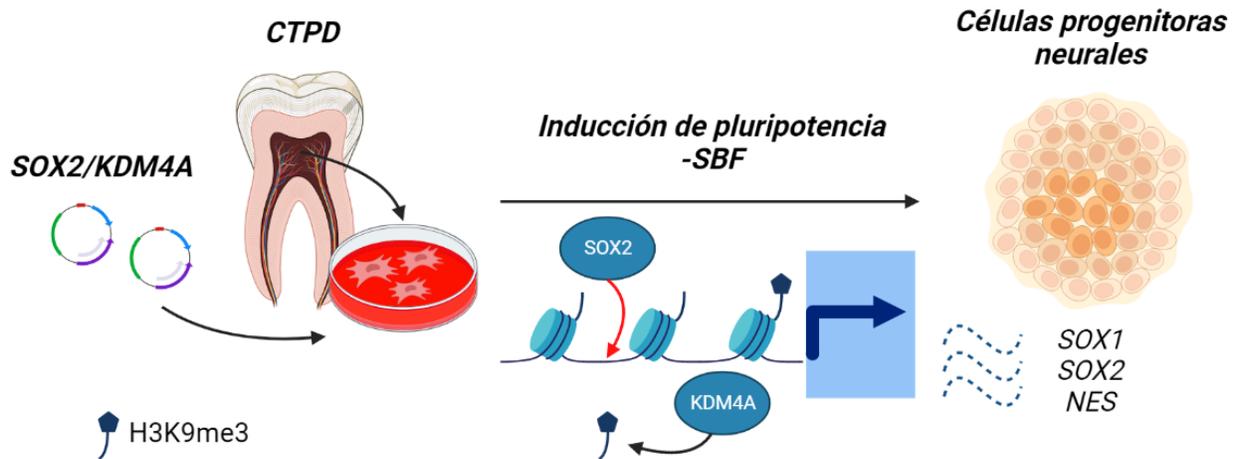


Figura 4. Diagrama esquemático de los resultados obtenidos. La sobreexpresión de *SOX2* y *KDM4A* de manera simultánea en CTPD induce una reconfiguración de la cromatina, probablemente a través de la eliminación de *H3K9me3* mediante *KDM4A* promoviendo la expresión de *SOX1*, *SOX2* y *NES* (transcritos representados por las líneas azules punteadas) para el establecimiento de células progenitoras neurales.

Conclusiones

En este trabajo se encontró que la sobreexpresión de *SOX2* y *KDM4* en CTPD mantenidas en condiciones de inducción de pluripotencia durante 30 días, indujo la formación de células con fenotipos neurales sin la necesidad de un medio de diferenciación neural especializado. La presencia de marcadores neurales positivos (*SOX1*, *SOX2* y *NES*) puede deberse a que las células de pulpa dental y las neurales comparten la misma línea de desarrollo en el árbol ontológico, que fue inducida por la cooperatividad de *SOX2*, al ser

un gen regulador del mantenimiento de células progenitoras neurales, y de *KDM4A*, para derribar las barreras epigenéticas y facilitar la modulación positiva de genes del ambiente neural. Mecanismo que podría ser una vía importante para facilitar la obtención de diversos tipos neurales. Sin embargo, estudios adicionales podrían ser necesarios para determinar cómo y qué genes son encendidos bajo la coexpresión de *SOX2* y *KDM4A*.

Reconocimientos

Este trabajo fue financiado por el CONACYT como parte del proyecto “Buscando pistas en la caja negra de la reprogramación celular, una

nueva perspectiva de la regulación epigenética en la decisión celular” (Proyecto A1-S-38758).

Referencias

- Bannister, A.J. y Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications, *Cell Research*, 21, 381–395. doi:10.1038/cr.2011.22.
- Bouzas, S.O. et al. (2016). Epigenetic activation of Sox2 gene in the developing vertebrate neural plate, *Molecular Biology of the Cell*, 27(12), 1921. doi:10.1091/MBC.E16-01-0042.
- Bueno, C., Martínez-Morga, M. y Martínez, S. (2019). Non-proliferative neurogenesis in human periodontal ligament stem cells, *Scientific Reports*, 9(1), 1–17. doi:10.1038/s41598-019-54745-3.
- Choi, C. Il et al. (2013). Neural induction with neurogenin 1 enhances the therapeutic potential of mesenchymal stem cells in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model, *Cell Transplantation*, 22(5), 855–870. doi:10.3727/096368912X637019.
- Dey, D. et al. (2021). Hypoxia induces early neurogenesis in human fetal neural stem cells by activating the WNT pathway, *bioRxiv [Preprint]*. doi:10.1101/2021.07.14.452315.
- Fedorova, V. et al. (2019). Differentiation of neural rosettes from human pluripotent stem cells in vitro is sequentially regulated on a molecular level and accomplished by the mechanism reminiscent of secondary neurulation, *Stem Cell Research*, 40, 101563. doi:10.1016/J.SCR.2019.101563.
- Friman, E.T. et al. (2019). Dynamic regulation of chromatin accessibility by pluripotency transcription factors across the cell cycle, *eLife*, 8. doi:10.7554/ELIFE.50087.
- Kim, S.-S. et al. (2008). Neural induction with neurogenin1 increases the therapeutic effects of mesenchymal stem cells in the ischemic brain, *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(9), 2217–2228. doi:10.1634/STEMCELLS.2008-0108.
- Lee, S.-H. et al. (2010). Dynamic methylation and expression of Oct4 in early neural stem cells, *Journal of Anatomy*, 217, 203–213. doi:10.1111/j.1469-7580.2010.01269.x.
- Li, B. et al. (2021). Dental-Derived Mesenchymal Stem Cells: State of the Art, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 0, 1310. doi:10.3389/FCELL.2021.654559.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method, *Methods*, 25(4), 402–408. doi:10.1006/METH.2001.1262.
- Luo, L. et al. (2018). Potential Roles of Dental Pulp Stem Cells in Neural Regeneration and Repair, *Stem Cells International*, 2018. doi:10.1155/2018/1731289.
- Ordog, T. et al. (2012). Epigenetics and chromatin dynamics: a review and a paradigm for functional disorders, *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 24(12), 1054. doi:10.1111/NMO.12031.
- Papp, B. y Plath, K. (2013). Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency, *Cell*, 152(6),

1324. doi:10.1016/J.CELL.2013.02.043.

Pei, D. et al. (2019). Mesenchymal–epithelial transition in development and reprogramming, *Nature Cell Biology* 2019 21:1, 21(1), 44–53. doi:10.1038/s41556-018-0195-z.

Pérez Argueta, E. (2020) “Caracterización de la respuesta adipogénica de células troncales derivadas del ligamento periodontal y la pulpa dental”. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Yucatán, Yucatán, México.

Pisal, R. V. et al. (2018). Directed reprogramming of comprehensively characterized dental pulp stem cells extracted from natal tooth, *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. doi:10.1038/s41598-018-24421-z.

Poetsch, M.S., Strano, A. y Guan, K. (2022). Human Induced Pluripotent Stem Cells: From Cell Origin, Genomic Stability, and Epigenetic Memory to Translational Medicine, *Stem Cells*, 40(6), 546–555. doi:10.1093/STMCLS/SXAC020.

Rodas-Junco, B.A. et al. (2017). Stem Cells from Dental Pulp: What Epigenetics Can Do with Your Tooth, *Frontiers in Physiology*, 8(DEC), 999. doi:10.3389/FPHYS.2017.00999.

Soda, M. et al. (2019). Repeated human deciduous tooth-derived dental pulp cell reprogramming factor transfection yields multipotent intermediate cells with enhanced iPS cell formation capability, *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. doi:10.1038/s41598-018-37291-2.

Thomson, M. et al. (2011). Pluripotency circuit members mediate germ layer fate choice of embryonic stem cells, *Cell*, 145(6), 875. doi:10.1016/J.CELL.2011.05.017.

Wakamatsu, Y. y Uchikawa, M. (2021). The many faces of Sox2 function in neural crest development, *Development, Growth & Differentiation*, 63(1), 93–99. doi:10.1111/DGD.12705.

Wang, C. et al. (2018). Reprogramming of H3K9me3-dependent heterochromatin during mammalian embryo development. *Nature Cell Biology*, 20(5), 620–631. doi: 10.1038/s41556-018-0093-4.

Yan, X. et al. (2010). iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like Stem/Progenitor cells of dental Tissue Origin, *Stem Cells and Development*, 19(4), 469–480. doi:10.1089/scd.2009.0314.

Yin, X. et al. (2013). Development of neural stem cells at different sites of fetus brain of different gestational age, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 6(12), 2757-2764. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3843256/pdf/ijcep0006-2757.pdf>

Young, N.L. y Dere, R. (2021). Mechanistic insights into KDM4A driven genomic instability, *Biochemical Society Transactions*, 49(1), 93. doi:10.1042/BST20191219.

Yu, J. et al. (2010). Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging, *BMC Cell Biology*, 11, 32. doi:10.1186/1471-2121-11-32.

Zhang, S. et al. (2019). OCT4 and PAX6 determine the dual function of SOX2 in human ESCs as a key pluripotent or neural factor, *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1). doi:10.1186/S13287-019-1228-7.

Zhang, S. y Cui, W. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural

differentiation, World Journal of Stem Cells, 6(3), 305. doi:10.4252/WJSC.V6.I3.305.

Zhou, T. et al. (2011). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Urine, Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 22(7), 1221. doi:10.1681/ASN.2011010106.