



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**LA PROTEÍNA DEL CEMENTO 1 (CEMP1) INDUCE LA EXPRESIÓN
GÉNICA DE MOLÉCULAS ASOCIADAS A LA REPROGRAMACIÓN
CELULAR**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CARMEN MARÍA CARRANZA ARELLANO

TUTOR:

DR. HIGINIO ARZATE

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE 2014



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.

Dedicado a aquellas personas me han ayudado siempre, a levantarme cuando he caído y que me brindan su amor de mil maneras. Con todo mi amor a:

Mamá y Papá

Mi Hermano

Mi tío Benjamín

Mi amado Angelito

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Higinio Arzate por abrirme las puertas de su laboratorio, brindándome una oportunidad de superación, por su apoyo y guía durante este tiempo.

A mis revisores de tesis y miembros del jurado Dr. Javier Portilla Robertson, Dra. Patricia M. Tato Zaldívar, Dr. Higinio Arzate, Dra. Elba Rosa Leyva Huerta, Dra. Ana María Fernández Presas. Gracias por su tiempo y comentarios que ayudaron a la terminación de este trabajo.

A mis maestros, por su tiempo y dedicación. A Dulce que siempre me brindó su ayuda y consejo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Janeth, Lia, Faby, Rita, Silvia, Adri, Paty, Cecy, Mary Chuy, Carlos, y Gonzalo. Por compartir conmigo sus conocimientos, su ideas, su amistad, su apoyo y esa palmadita de que todo irá bien.

Al Dr. Víctor Manuel Bautista de Lucio y al Dr. Ricardo Cevallos, por su ayuda en este trabajo.

A Tere, Diana y Lalo, que me brindaron su apoyo y cariño.

A mis amigos que han estado tras bambalinas, Chuy, Carmen, Sam, Kary, Anabelli, Armando, Martín, Reina, Ricardo, Chely y Alondra.

Al Dr. Julián que fue una de las personas que me animo siempre.

Al CONACyT (130950) y DGAPA-UNAM IT 200414 por el financiamiento otorgado para esta investigación.

GRACIAS.

Índice

Resumen.....	6
Abstract.....	8
Introducción	
Periodonto.....	10
Encía.....	11
Ligamento Periodontal.....	12
Hueso Alveolar.....	13
Cemento Radicular.....	14
CAP.....	17
CEMP1.....	17
Enfermedad Periodontal.....	18
Terapia Regenerativa.....	19
Reprogramación Celular.....	20
Oct3/4.....	21
Sox-2.....	22
Nanog.....	23
Klf-4.....	23
c-Myc.....	24
SSEA-4.....	25
Justificación.....	26
Hipótesis.....	26

Objetivo General.....	26
Objetivos Específicos.....	26
Materiales y Métodos.....	27
Resultados.....	32
Discusión.....	46
Conclusión.....	49
Bibliografía.....	51

Resumen

LA PROTEÍNA DEL CEMENTO 1 (CEMP1) INDUCE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MOLÉCULAS ASOCIADAS A LA REPROGRAMACIÓN CELULAR

Introducción:

El periodonto es un conjunto de tejidos que le brindan sostén y protección al órgano dentario, está conformado por dos tejidos blandos: la encía y el ligamento periodontal y dos tejidos mineralizados: el hueso alveolar y el cemento radicular.

El cemento radicular está constituido por un 50% de contenido inorgánico que es principalmente hidroxiapatita y un 50% de contenido orgánico formado por colágena tipo I (90%) y colágena tipo III (5%), proteínas asociadas al proceso de mineralización: Osteopontina, Osteocalcina, Sialoproteína Ósea y Fibronectina. Además se han identificado a dos proteínas cemento-específicas, estas son: la Proteína de adhesión del cemento radicular (CAP) y la Proteína del cemento 1 (CEMP1). CEMP1 es una proteína que puede regular la nucleación de cristales de fosfato octacálcico. Se ha demostrado que al transfectar la región codificante de CEMP1 y sobreexpresar dicha proteína en Fibroblastos Gingivales Humanos, el resultado fue un cambio en el fenotipo hacia mineralizante. Estos antecedentes permiten plantear que esta molécula podría estar participando en los eventos tempranos de reprogramación celular.

La reprogramación celular es una técnica por la que se induce la pluripotencia de células bien diferenciadas. Dicha técnica forma parte de la medicina regenerativa que busca la regeneración o reemplazo de tejidos u órganos dañados o perdidos para restablecer su función biológica.

Objetivo:

Identificar reguladores transcripcionales implicados en reprogramación celular en HFG que sobreexpresen CEMP1.

Materiales y métodos:

Se realizaron cultivos de fibroblastos gingivales humanos que sobreexpresan CEMP1 y controles con un vector vacío, con el fin de identificar moléculas

relacionadas con reprogramación celular (Oct3/4, Sox-2, c-Myc, Nanog, Klf4 y SSEA-4) a nivel transcripcional (qRT-PCR) y traduccional (western blot).

Resultados:

A nivel transcripcional los HFG/CEMP1 reportan una mayor expresión de Oct3/4 y Sox-2, sin embargo la expresión de otros marcadores que confirman el mantenimiento de la reprogramación poseen una menor expresión en los HFG/CEMP1.

No encontramos diferencias significativas a nivel traduccional entre los HFG y los HFG/CEMP1 a pesar de los altos niveles de Sox-2, posiblemente exista un mecanismo de regulación postranscripcional. Las diferencias que se observan entre los HFG y los HFG/CEMP1 muestran que los reguladores de la pluripotencia se encuentran regulados de forma negativa en los HFG/CEMP1, por lo cual CEMP1 parece no participar en el proceso de reprogramación.

Conclusiones:

Los hallazgos sugieren que CEMP1 no interviene en procesos de reprogramación celular, sin embargo podría intervenir en el proceso de diferenciación celular, al regular de forma negativa a los marcadores de reprogramación celular.

Abstract

CEMENTUM PROTEIN 1 (CEMP1) GENE EXPRESSION INDUCED MOLECULES ASSOCIATED WITH CELL REPROGRAMMING

Introduction:

The periodontium is a complex of tissues that provide support and protection to the dental organ. It is composed by four tissues: gingival and periodontal ligament (soft tissues) and two mineralized tissues alveolar bone and root cementum.

The cementum has a 50% of inorganic content formed by hydroxyapatite and 50% of organic content comprising by collagen I (90%) and collagen III (5%), mineralization associated proteins (osteopontin, Osteocalcin , bone sialoprotein, fibronectin, etc.) and two proteins that were described as cementum-specific that are the cementum attachment protein (CAP) and cementum protein 1 (CEMP1). This protein is a regulator of octacalcium phosphate crystals. It transfection of CEMP1 in Human Fibroblasts Gingival results in a change toward a mineralizing phenotype. This suggests that this molecule could be involved in the early events of cellular reprogramming.

Cellular Reprogramming is a technique that induces a distinct cell pluripotency, reprogramming is part of regenerative medicine that seeks the regeneration or replacement of tissues or organs to restore function.

Objective:

To identify transcriptional regulators involved in cellular reprogramming in transfected with CEMP1 gene (HGF/CEMP1).

Materials and methods:

Cultured human gingival fibroblasts overexpressing CEMP1 and with empty vector controls were used in order to identify related cellular reprogramming molecules (Oct3 / 4, Sox-2, c-Myc, Nanog, Klf4, and SSEA-4) at the transcriptional (qRT-PCR) and translational levels (western blot).

Results:

A transcriptional level HGF/CEMP1 reported the increased expression of Oct3 / 4 and Sox-2, however the expression of other markers that confirm the maintenance of reprogramming showed a lower expression in HGF/CEMP1. Unexpectedly, at the translational level no differences between HGF and HGF/CEMP1 showed no differences.

Conclusions:

Our findings suggest that CEMP1 do not to participate in processes of cell reprogramming, however, it seems to participate during the cell differentiation process by regulating negatively markers of cellular reprogramming.

Introducción

Periodonto

El periodonto es un conjunto de tejidos dinámicos que brinda protección y sostén a los órganos dentarios, por lo que es considerado como un órgano conectivo. Está constituido por tejidos blandos como: el ligamento periodontal y la encía; y tejidos mineralizados como: el hueso alveolar y el cemento radicular

(Fig.1). El periodonto participa en el proceso de reparación y remodelación que le confieren la capacidad de adaptación^{1,2}.

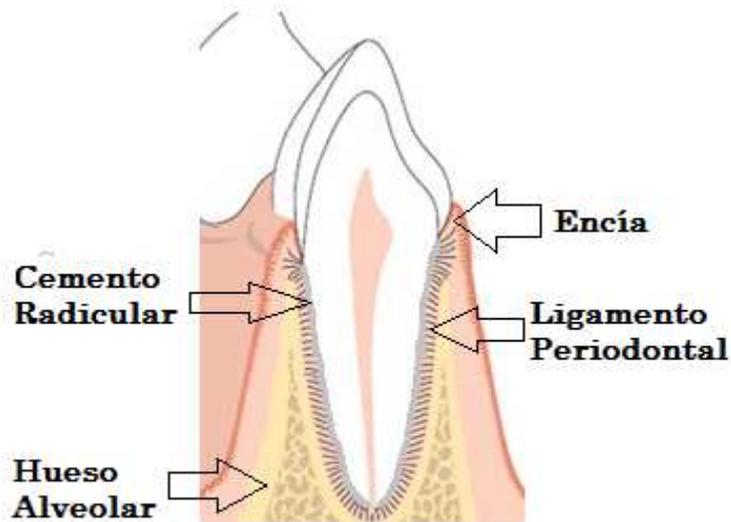


Fig.1 Componentes del periodonto

El periodonto se adapta a las diversas condiciones como la masticación, y modificaciones fisiológicas que lo remodelan por la edad. De acuerdo a su función puede dividirse en: Periodonto de Protección formado por la encía que forma un cuello alrededor del órgano dentario y la unión dentinogingival. Periodonto de inserción formado por el cemento radicular, el ligamento periodontal y el hueso alveolar que tienen su origen en el saco dentario³ (Fig. 2).



Fig. 2 Periodonto de Inserción

Encía

Es una membrana de epitelio estratificado escamoso queratinizado⁴, que posee dos capas, una es la capa superior formada por epitelio y la otra inferior formada por tejido conectivo (redes de proteínas fibrosas y no fibrosas, factores de crecimiento, etc.) El tejido epitelial de revestimiento deriva del ectodermo y el tejido conectivo subyacente del ectomesénquima. El epitelio se puede clasificar en gingival, epitelio del surco bucal y el epitelio de unión. La encía anatómicamente puede dividirse como: encía libre, encía interdental y encía fija que es aquella que se encuentra adherida al periostio del hueso alveolar³. En la población el 85% tiene un biotipo periodontal grueso comparado con la forma ondulada fina (15%). Los biotipos periodontales gruesos están asociados con la salud periodontal⁵.

Clínicamente podemos observar características como son:

El color rosa coral que depende del grado de queratinización, cuanto más queratinizado se encuentre el grosor del epitelio será mayor, regularmente el espesor del epitelio va 1mm a 0.25mm dependiendo de la localización anatómica. Otros factores que intervienen en el color, es el aporte sanguíneo, los melanocitos y la melanina que se sintetice³.

El componente celular predominante en este tejido son los fibroblastos que derivan del mesénquima y representan un 65% de la población celular, tienen una forma alargada o fusiforme, además de una gran cantidad de organelos como mitocondrias, vesículas y vacuolas en el citoplasma además de poseer un extenso retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Desempeñan un papel en el desarrollo y en la reparación de tejidos conectivos. Su principal actividad es la síntesis de fibras conectivas además de la síntesis de matriz extracelular, sin embargo también están implicados en la homeostasis, debido a que tiene la capacidad de censar los cambios en la matriz extracelular e incluso secretar productos (Ejem. Factores de crecimiento) que actúan sobre la actividad celular⁴. Se ha observado que la encía tiene una gran capacidad de regeneración después de sufrir alguna transgresión, generando nuevas fibras gingivales⁶ por lo que se sugirió que en la encía existen subpoblaciones de células mesénquimales⁷.

Ligamento Periodontal

Deriva del ectomesénquima⁸, como se mencionó es un tejido blando conectivo fibroso especializado y muy vascularizado, pertenece a las gónfosis (articulación fibrosa). El ligamento se une al cemento radicular que rodea a la raíz del órgano dentario y lo une al hueso alveolar. Las funciones que desempeña son: soportar y distribuir las fuerzas oclusales, además de su capacidad receptiva sensorial propioceptiva. El espesor del ligamento periodontal varía de 0.15 a 38 μm ⁹, la variación puede deberse a la edad, el órgano dentario al que rodea, si su localización es apical o cervical, e incluso varía entre la población. Posee una población heterogénea de células, fibras, matriz amorfa, nervios y vasos sanguíneos¹⁰.

Población Celular

En su mayoría constituida por Fibroblastos (20%) que juegan un papel importante durante el desarrollo, para la función y como parte de la estructura, Osteoblastos, Osteoclastos, Cementoblastos, Cementoclastos, células del sistema inmune, células epiteliales, células de Malassez y células troncales⁶. Además de la población celular el ligamento está constituido por diferentes

tipos de fibras como: las fibras colágenas que son las más abundantes (principales), estas fibras tienen colágena tipo I que es la más predominante, se encuentran presentes colágenas como la colágena tipo III, IV y XII. Aquellas fibras de colágena que se insertan en el cemento al hueso alveolar se conocen como fibras de Sharpey¹¹. Otro elemento del ligamento es su matriz amorfa que está constituida por Proteoglicanos, glucosaminoglicanos relacionados con las fuerzas de contracción o extensión, relacionada con los haces de colágena^{11, 12}

Hueso alveolar

Recibe también el nombre de proceso alveolar y conforma los alveolos que son cavidades donde se alojan a los órganos dentarios, se le considera como un tejido conectivo y es parte de los huesos mandibulares⁹. Tiene una alta concentración de sales de calcio que forman calcificaciones y dentro de estas calcificaciones también encontramos lagunas óseas donde quedan atrapadas células.

Composición

Está constituido por: minerales (60%), agua (20%), moléculas orgánicas (20%), el agua que le confiere elasticidad, mientras que el resto de los componentes inorgánicos le otorgan sus características de dureza. Su matriz orgánica consta principalmente de colágena tipo I y III¹³, sin embargo también se encuentra colágena tipo III y IV, otras moléculas no colágenas como: glicoproteínas (Osteopontina, Osteocalcina, Sialoproteína Ósea, Proteína Morfogénica Ósea), fosfoproteínas y proteoglicanos (Condrítin, Dermátin, Heparán sulfato, Ácido Hialurónico.) que representan un 8% de la matriz orgánica, la fosfatasa alcalina junto con otras enzimas representan el resto de los componentes de la matriz orgánica. La población celular está compuesta por células progenitoras, osteoblastos (origen mesenquimal), osteoclastos y osteocitos³. Los componentes inorgánicos son: hidroxiapatita (80%), carbonato de calcio y sales minerales.

Cemento radicular

En 1835 se describió el cemento¹⁶, es un tejido conectivo mineralizado no vascularizado, que ancla las fibras de colágena del ligamento periodontal a la superficie radicular del diente. Participa en la reparación y adaptación radicular por lo que tiene una constante remodelación. Cubre a la dentina en su porción radicular y tiene contacto con la pulpa (porción apical), la dentina (raíz del órgano dentario), el ligamento periodontal y el esmalte (unión cemento esmalte)¹⁷. El ápice es donde existe una mayor cantidad de cemento depositado, y donde tiene menor espesor es en la parte coronal donde puede tener contacto con el esmalte o apenas tocarlo³. El cemento es de gran importancia para la adecuada formación del periodonto y tiene su origen en el folículo dentario (ectomesénquima)¹⁷.

Cementogénesis

La cementogénesis es un proceso complejo del cual falta aún por dilucidar, sin embargo se sabe que la función de la Vaina Epitelial de Hertwing reside en la diferenciación de las células como cementoblastos y odontoblastos, además de la formación del número de raíces según el órgano dentario. Por lo que surgen teorías que buscan explicar el proceso de la formación del cemento, existen dos teorías¹⁸ de las cuales, la primera (clásica) propone que las células del folículo dental se diferencian a cementoblastos y atraviesan la Vaina Epitelial de Hertwig, causando la fragmentación de la vaina¹⁹. En estudios realizados por Hammarström se determinó que la amelogenina está implicada en el proceso de desarrollo del cemento radicular²⁰. La segunda teoría postula que la formación del cemento es un proceso originado de células epiteliales, en donde hay una transformación epitelio mesenquimal por parte de las células epiteliales de vaina de Hertwig.¹⁹

Tipos de Cemento: La clasificación clásica es aquella que se basa en la presencia o ausencia de células (cementocitos) y el momento en que se forma, siendo la siguiente; el cemento acelular es el primero en formarse por lo que se encuentra en las dos terceras partes de la raíz y carece de cementocitos, está cubierto por el cemento celular; el cemento Celular (Secundario) empieza a ser depositando cuando se inicia la oclusión y permanece depositándose por los

cementoblastos haciendo que las fibras de colágena queden atrapadas por el cemento radicular (fibras de Sharpey), además estos cementocitos al microscopio tienen una forma estrellada^{3, 19,21}.

Sin embargo, existe otra clasificación que se basa en las fibras intrínsecas o extrínsecas en el cemento: Cemento afibrilar acelular: se forma después de que la corona dental termina de formarse, este cemento está constituido exclusivamente por la matriz mineralizada, se localiza en la unión cemento esmalte, y como lo indica no tiene fibras que lo anclen. Cemento celular con fibras intrínsecas: contiene cementocitos atrapados en la matriz de colágena que recubren a la raíz. Su aposición es más rápida lo que le confiere la capacidad de reparación, se encuentra en la porción apical. Cemento acelular con fibras extrínsecas: tiene una aposición constante, la raíz se encuentra cubierta por este tipo de cemento de un 40% hasta un 70% y se localiza perpendicularmente^{14, 17,22}.

Composición del cemento

El cemento está constituido por un 50% de contenido inorgánico que es principalmente hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) y el otro 50% formado por matriz orgánica. La composición de la matriz orgánica contiene colágena tipo I (90%) que desempeña un papel estructural, colágena tipo III (5%), en menor proporción se encuentran colágenas tipo XII, V, VI y XIV. El cemento posee también proteínas no colágenas como: proteoglicanos, glucosaminoglicanos²³ sialoproteína ósea, proteína de la matriz de dentina 1 (DMP-1), fibronectina, osteocalcina, osteonectina, osteopontina, tenascina, proteolípidos, además de factores de crecimiento^{17,24}. Se puede mencionar algunas de las proteínas no colágenas que juegan un papel importante en el cemento radicular como: Osteopontina: es una fosfoproteína glicosilada que contiene un dominio arginina-glicina-Aspartato, desempeña un papel en el desarrollo y en la reparación celular, está implicada en el crecimiento celular, diferenciación y en la migración celular²⁵. Sialoproteína ósea: es un monoéster ortofosfórico fosfohidrolasa, existen cuatro tipos que son: intestinal, de placenta, de células germinales y no-tejido específico. La de tipo no-tejido específica es producida por cementoblastos y osteoblastos²⁶.

Tanto la Osteopontina como la Sialoproteína Ósea se expresan durante etapas tempranas del desarrollo de la raíz de los órganos dentarios y son abundantes en el cemento afibrilar acelular, por su secuencia Arginina- Glicina-Ácido aspártico tienen una unión fuerte a la colágena y la hidroxiapatita, se piensa que participan en la diferenciación de las células troncales para que se diferencien a cementoblastos¹⁷. La osteopontina y la Sialoproteína ósea tienen la capacidad de regular cristales de fosfato octacálcico (precursor de la hidroxiapatita) por su estructura con poli- Asp y Poli- Glu que unen calcio a superficies mineralizadas²⁷. Fibronectina: se piensa que tiene un papel en la diferenciación de los odontoblastos y en el desarrollo al unir ciertos elementos de la matriz extracelular. La osteocalcina: es una proteína de peso molecular pequeño (6kDa), se cree que está implicada en el proceso de mineralización y en el desarrollo, y que su papel consiste en controlar la concentración de minerales. La osteonectina es una proteína glicosilada se encuentra en el cemento acelular y es expresada por los cementoblastos, también está implicada en el proceso de mineralización ^{17, 22,28}.

Población celular del cemento radicular.

Cementoblastos: están localizados en la superficie del cemento orientados hacia el ligamento periodontal, son los responsables de la constante aposición del cemento celular. Cementocitos: son los cementoblastos que quedaron atrapados en el cemento radicular. Cementoclastos: estas células son las responsables de la resorción del cemento radicular³. Como se mencionó anteriormente, el cemento radicular y el hueso alveolar tienen una composición similar, sin embargo en un estudio comparativo entre cemento radicular y hueso alveolar, se encontraron 83 proteínas presentes en el cemento radicular. A continuación se listarán algunas de las 83 proteínas y el proceso al que se encuentran asociadas: Metabolismo: SOD3, GALNT12, MCCC2, FAXDC2, ENO1, HCG2026193; Comunicación celular y señalización: PPP1R10, GNAZ, MFGE8, ALS2, TGFB1, RAB5B, TGFB2, DEPDC5, SORCS1, TMEM9B, SPARCL1, GP1BB, OR5M3, RAB1C, GAS6, ITGAV; Crecimiento celular y mantenimiento de estructuras: COL25A1; PCOLCE; SPP1; FMOD; C1QTNF5; EMILIN1; COL11A2; COL5A3; STRIP2; KIF13B; COL11A1; VIL1¹⁵.

Las proteínas que se listaron anteriormente solo son la comparación de dos tejidos sin embargo hay dos proteínas que se describen como cemento-específicas una de ellas es la Proteína de Adhesión del cemento radicular (CAP) y la segunda es la Proteína del Cemento 1 (CEMP1), estas proteínas se relacionan con procesos de biomineralización²⁹, adhesión celular³⁰ y diferenciación celular³¹.

Proteína de Adhesión al Cemento (CAP)

Otro nombre que recibe es PTPLA. (Proteína tirosina tipo fosfatasa; prolina con sitio catalítico en lugar de la arginina). El gen que codifica para esta proteína se encuentra en el cromosoma 10p14-p13³², considerado como un splicing alternativo del gen PTPLA. La proteína pertenece a la familia de PTP (proteínas tirosina tipo fosfatasa) que está implicada en procesos de crecimiento celular, diferenciación y cuando se encuentra desregulada en oncogénesis. Esta familia se divide en tres integrantes de los cuales uno de ellos es PTPL que posiblemente tiene una localización nuclear, también se cree que el producto de PTPLA regule la fosforilación de miembros de la familia de Retinoblastoma, cuando se elimina el gen se presentan el síndrome de DiGorge y el velocardi facial³³. CAP es una proteína colágena con una movilidad relativa de 56kDa, está compuesta por 140 aminoácidos, participa en el reclutamiento y diferenciación, cuando el cemento está en formación, promueve la adhesión celular fundamental para la regeneración de tejidos, tiene la capacidad de unirse a poblaciones de fibroblastos del ligamento que los diferencia hacia un tipo osteoblástico³⁴.

Proteína del Cemento 1(CEMP1)

Inicialmente esta proteína fue aislada de células derivadas de un cementoblastoma humano. El gen que codifica para esta proteína es el 16p13.3. La proteína de CEMP1 se compone de 1374pb, que codifican para una proteína final de 247 aminoácidos. Tiene un peso teórico de 25.9 kDa, pero presenta una gran cantidad de modificaciones postraduccionales como glicosilaciones y fosforilaciones. Debido a las modificaciones postraduccionales obtiene una movilidad relativa de 50kDa. Se piensa que se localiza en el núcleo

pero no se han encontrado motivos de unión a DNA. Al buscar en las bases de datos no se encontró homología con otra proteína. Se encontró una expresión alta del ARNm en la capa que recubre tanto al cemento celular como al acelular³⁵. Se expresa en cementoblastos, subpoblaciones del ligamento periodontal que tienen una localización paravascular y espacios endosteales del hueso³⁶. En un sistema libre de células utilizando a la proteína recombinante humana hrCEMP1, se demostró que regula la nucleación de cristales de fosfato octacálcico (precursor de la hidroxiapatita) en forma de aguja³⁷, además se ha demostrado experimentalmente que tiene una alta afinidad a la hidroxiapatita. En el año 2007, Carmona et al., demuestran que al transfectar con el gen de CEMP1 y sobreexpresar a la proteína en células como son los Fibroblastos Gingivales Humanos (HFG), aumentaba la velocidad de la proliferación en los Fibroblastos que fueron transfectados con el gen de CEMP1, de manera sobresaliente los fibroblastos transfectados formaron nódulos de calcio que fueron teñidos con alizarina roja que demostraba la inducción de los fibroblastos hacia un fenotipo mineralizante, para corroborar estos hallazgos se buscaron moléculas implicadas en el proceso de biomineralización (Fosfatasa Alcalina, sialoproteína ósea, osteocalcina y osteopontina) que se expresaron en los fibroblastos transfectados, a nivel transcripcional como traduccional, confirmando que los HGF al ser transfectados con el gen de CEMP1 adquieren un fenotipo tipo mineralizante³⁸.

Enfermedad Periodontal

La enfermedad periodontal es un proceso inflamatorio que afecta a los tejidos de sostén del periodonto³⁹, cuando este proceso se vuelve crónico hay una pérdida de tejidos, una reducción de la altura de la cresta alveolar derivando en la pérdida de los órganos dentarios, se considera que es una enfermedad multifactorial, algunos de los factores que contribuyen son: el tabaquismo, enfermedades sistémicas (diabetes, enfermedades autoinmunes, etc.), fármacos, prótesis mal adaptadas que permiten la acumulación de biopelícula bacteriana⁴⁰.

La terapéutica empleada para la enfermedad periodontal es inicialmente la eliminación de microorganismos y la biopelícula dentobacteriana para detener

el avance de la enfermedad periodontal. Una vez eliminado el foco de infección y que se ha delimitado el daño pueden emplearse terapéuticas como la regeneración tisular guiada, la medicina regenerativa, además de agentes activos biológicamente como la matriz derivada de esmalte (EMD) y factores de crecimiento⁴⁴.

Terapia Regenerativa

Para alcanzar la regeneración es necesaria la formación de cemento para que puedan anclarse las nuevas fibras periodontales que se unan al hueso alveolar y lograr restablecer totalmente la funcionalidad de aquellos tejidos que se perdieron en la enfermedad periodontal, pero es complicado hacerlo en la clínica por la cantidad de variables que dificultan el proceso, debido a que la boca es un nicho expuesto a una gran cantidad de sustancias, aunado a la respuesta inmune que desencadena debido a la inserción de agentes extraños, por ejemplo: los injertos óseos. Las terapias que comúnmente se usan son aquellas dirigidas a hueso, por medio de sustitutos óseos. Los injertos pueden ser de diferentes tipos según el origen que tengan ⁴⁵ (Tabla 1).

Tipo de Injerto	Origen
Autógenos	Mismo individuo
allogénicos	Misma especie
xenoinjertos	Otra especie
aloplásticos	Sintético

Tabla 1. Tipos de Injertos

Una innovación como alternativa para la regeneración, es la medicina regenerativa en la que participan células mesenquimales como un medio para lograr la regeneración de tejidos^{44,46,47}, las células que por excelencia poseen la capacidad de formar cualquier tipo de tejido son las embrionarias, pero esto plantea un problema ético ⁴⁸, razón por la cual se buscan fuentes de las cuales se puedan obtener células pluripotentes, pero las fuentes no son tan accesibles, por lo que se buscó la forma de obtener una fuente de células con capacidad de pluripotencia como es la reprogramación celular.

Reprogramación Celular

La reprogramación se puede definir como una técnica empleada para la obtención de iPS (células troncales pluripotentes inducidas) de células somáticas. Las iPS presentan las características similares a las células embrionarias como son: autorenovación, pluripotencia, morfología, expresión génica y la expresión de marcadores asociados a la superficie celular⁴⁹. La autorenovación puede definirse como la capacidad de las células troncales para dividirse de forma asimétrica e ilimitada, manteniendo a las células en estado indiferenciado. Más de 100 genes fueron identificados como reguladores de la pluripotencia⁵⁰. Yamanaka y Takahashi en el 2006 seleccionaron a 24 genes que podrían ser reguladores maestros y mediante la transducción viral en Fibroblastos Embrionarios de Ratones (MEF), llegaron a la conclusión que se podía inducir a la pluripotencia los MEF con un mínimo de cuatro factores que fueron: Oct3/4, Sox2, Klf-4 y c-Myc^{51,52}.

La reprogramación se divide en 3 fases de acuerdo al perfil de expresión génica que son iniciación, maduración y estabilización

Primera etapa

Es una fase que se caracteriza por la transición de mesénquima epitelio (MET) que da como resultado un cambio en su morfología. A nivel molecular la expresión de genes exógenos, causando la activación de genes endógenos por ejemplo: Cdh1 y Epcam, mientras que otros que son marcadores de linajes se suprimen, existe un cambio en el metabolismo, en la velocidad de proliferación^{53, 54}.

Segunda Etapa.

Se expresan genes asociados a la reprogramación celular como: Oct/4, Nanog, Fbox15, ICAM1, etc. pero todavía hay dependencia a los transgenes. En esta fase se da la activación del circuito de pluripotencia que se integra de Oct3/4, Sox2 y Nanog. Es uno de los pasos críticos ya que son pocas las células que llegan a esta fase⁵⁴.

Tercera Etapa.

Ocurre cuando las células adquieren su estado de Pluripotencia, presentan estabilidad y tienen la capacidad de autorenovación sin la ayuda de los transgenes, hay cambios epigenéticos y una remodelación del citoesqueleto^{51, 53,54}.

Proteínas asociadas a la reprogramación celular.

- **OCT 3/4 (Octamer binding protein)**

Es conocido también como Oct3, Oct 4, OTF3, OTF4 y Pou5F1(Pit-Oct-Unc). El gen que codifica para esta proteína se localiza en el cromosoma 6p21.13⁵⁵ y pertenece a la familia POU que son factores que activan la expresión de genes blancos que se unen a la secuencia consenso AGTCAAAT usando una unión bipartita al ADN⁵⁶. Oct3/4 está formado por dos subdominios, cada subdominio se constituye por una estructura dos hélice- vuelta- hélice que mantienen contacto con el ADN, se mantienen conectados por una fracción variable. El primer dominio tiene 75 aminoácidos en el extremo amino terminal, tiene gran cantidad de prolina y residuos ácidos, mientras que el segundo dominio de 60 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal abundante en prolina, serina y residuos de treonina. Parece que ambos tienen la capacidad de transactivación^{57,58}. El homeodominio de POU está implicado en el desarrollo embrionario, el ARNm se encuentra en oocitos maduros, en el blastómero y posteriormente por la Masa Interna Celular (IMC), la expresión de Oct3/4 solo se mantiene en células germinales primordiales (PGC), y se encuentra asociada con el mantenimiento de la pluripotencia en células madre⁵⁸.

Oct3/4 interactúa con un 623 de genes⁵⁹, como por ejemplo: Oct4, Nanog, Sox-2, LEFTY2/EBAC, CDX2 HAND1, DPPA4, GJA1/ CONNEXIN43, FOXO1A, CRIPTO/TDGF1, ZIC3, Ibx-15⁵⁴.

La manera en que se regula Oct3/4 a nivel transcripcional es mediante elementos cis que se encuentran río arriba del gen, además de las metilaciones que presenta la cromatina. Se reportaron dos elementos potenciadores, uno distal y otro proximal que podrían regular la expresión de Oct3/4. Se demostró que el Factor Nuclear de Células Germinales al unirse con el potenciador

proximal tiene la capacidad de reprimir al gen de Oct3/4 durante la diferenciación celular⁵⁶. Niwa et al., en sus estudio establecen que los niveles de expresión de la Oct3/4 son determinantes para el mantenimiento de la pluripotencia como para la diferenciación celular. Cuando Oct3/4 se sobreexpresa da como resultado una diferenciación a linajes como el endodermo y mesodermo, mientras que para mantener la diferenciación se requiere de niveles críticos, al subexpresarse hay una diferenciación a Trofoectodermo. Por lo que se le considera un gen maestro, en el mantenimiento de la pluripotencia o para la diferenciación. La familia de POU cooperan con otros factores en este caso el que es de gran interés es un factor de la familia Sry que es Sox2⁶⁰.

Sox2 (SRY-related HMG-box)

Es integrante de la familia SRY (Sex Determining region Y)⁶¹ que consta 20 miembros, también se le conoce como ANOP3 y MCOPS3. El gen que codifica para la proteína de Sox2 se localiza en el cromosoma 3q26.3-q27. Se expresa en el neuroectodermo durante la gastrulación y también el sistema nervioso. Se ha demostrado que el ARNm se encuentra inicialmente expresado en la mórula y posteriormente se expresa en la IMC⁶². Tiene un dominio HMG (High-Mobility Group) que se encuentra muy conservado que le otorga la capacidad de unión al ADN. Se ha descrito que está implicado en la autorrenovación de las células madre, además de que se requiere para la diferenciación de las células neurales⁶³. Se ha observado que Oct3/4 junto con Sox-2 y OPN se encuentran presentes en células embrionarias de ratón en estadios tempranos. Probablemente, la OPN se correlaciona con los niveles de Oct3/4 y Sox-2 durante la diferenciación de las células, y que Oct3/4 y Sox2 regulan la expresión de la OPN, además de células del hipoblasto que se convertirá en el endodermo parietal⁶⁴. El sinergismo que hay entre Oct3/4 y Sox2 esta mediado por las interacciones que hay entre sus proteínas, se ha descrito que cuando Sox2 está ausente la expresión de Oct3/4 no es suficiente para potenciar la actividad de FGF4. Se ha demostrado que la eliminación de Sox2 es letal en células como el cigoto, debido a que Sox2 se encuentra implicado en la formación del trofoectodermo para la implantación⁶⁵.

Nanog

El gen que codifica para esta proteína se localiza en el cromosoma 12p13.31⁶⁶, es un factor transcripcional que forma parte de una familia de 11 pseudogenes, de los cuales NANOGP8 solo se encuentra en el genoma humano. Está implicado en el mantenimiento de la pluripotencia en células embrionarias, autorenovación y se encuentra expresado en la IMC y en células troncales⁶⁷. La proteína de NANOG se forma por la unión de 280 aminoácidos, posee un dominio “Homebox”, que tiene homología con la familia de genes NK2 (por sus descubridores Kim y Niremberg). La estructura que posee es la siguiente: tiene un dominio de 96 aminoácidos constituido principalmente por serinas en el extremo amino terminal, y un dominio de 50 aminoácidos, principalmente triptófano en el extremo carboxilo. En el extremo carboxilo se encuentran repeticiones de pentapéptidos (actúan como transactivadores) que inician con el aminoácido triptófano⁶⁸. Se ha señalado que Nanog puede inducir a las células embrionarias hacia una diferenciación a mesodermo, esto se obtiene cuando Nanog interactúa con SMAD1 e impide el reclutamiento de complejos de las SMAD, impidiendo la activación de la Proteína Morfogénica Ósea (BMP). Por lo que se piensa que Nanog tendría la capacidad de disminuir la cantidad de progenitores del mesodermo⁶⁹.

KIF-4 (Kruppel-like factor 4)

En humanos, el gen que codifica para esta proteína se localiza en el gen 9q31⁷⁰, es un factor de transcripción del tipo de dedos de Zinc, se expresa en el ectodermo y en el endodermo intestinal⁷¹, que también se le conoce bajo los nombres de EZF y GKLF. Es una proteína que consta de 479 aminoácidos. Es una familia que se compone de 25 miembros en humanos, incluidos los factores KLF como los SP1, se ha determinado que KLF-5 se expresa a nivel intestinal. La familia de KLF tiene relación con diversos procesos biológicos como son: diferenciación, proliferación y apoptosis celular, además de que participa en la reprogramación de células para la inducción a la pluripotencia^{72,73}. Participa en la regulación del ciclo celular, regulando negativamente la expresión de marcadores relacionados con el endodermo, regulando las funciones de p53 en la transición de G1→S y G2→M. Un

knockdown de Klf-4 va a conducir a sobreregular la expresión de marcadores del endodermo y la diferenciación hacia mesodermo⁷². Se ha demostrado que con la delección de Klf4 las células de piel no se diferenciaban de forma adecuada lo que corrobora que Klf4 interviene en la proliferación y diferenciación⁷³. Se ha identificado que cuando la expresión de KLF4 disminuye, también lo hace la proliferación, porque evita el paso de G1 a S. Por otro lado cuando la proliferación es muy alta, los niveles de KLF4 tienden a disminuir, por el contrario cuando no hay las condiciones apropiadas para el crecimiento como la ausencia de suero o la presencia de citocinas que inhiben el crecimiento la expresión de KLF4 se ve aumentada⁷⁴.

c-Myc (myelocytomatosis oncogen)

Pertenece a la familia de factores transcripcionales Myc que tienen la capacidad de reconocer la secuencia que están relacionados con procesos como el crecimiento celular, la replicación, regulación del ciclo celular, apoptosis, diferenciación e incluso la estabilidad del genoma, también se le ha descrito como un activador y represor transcripcional⁷⁵. La familia Myc tiene una cremallera de leucina y un dominio hélice vuelta hélice. Por lo general esta familia necesita de la heterodimerización a MAX que es un factor X que se asocia a alguno de los miembros de la familia MYC a sus dominios de la cremallera de leucina⁷⁶. La familia Myc se divide en 4 miembros que son: c-Myc, N-Myc, L-Myc y B-Myc (carece de los dominios que le dan función por lo que algunos autores no lo consideran)⁷⁷. Se ha descrito que c-Myc puede actuar río arriba, río abajo y paralelo. Cuando lo hace río abajo actúa sobre las ciclinas, sobre Rb y E2F. También se ha observado que cuando se sobreexpresa p21 subexpresa a c-Myc y como consecuencia se disminuye el crecimiento celular. Mientras que río arriba c-Myc regula de forma negativa a p15, p16, y p 21. Por lo que evita una acumulación de p15 (impidiendo la senescencia). Se piensa que c-Myc actúa al regular los niveles de las ciclinas E-CDK⁷⁸. Y por tanto es un regulador del ciclo celular, al controlar la transición de fase G1 a síntesis⁵⁴. En los trabajos de Yamanaka se demostró que c-Myc es uno de los factores que inducen la pluripotencia, posteriormente se demostró que aun sin c-Myc se podía obtener la inducción sin embargo la tasa de reprogramación es muy baja, finalmente Nakawaga afirma que c-Myc

puede reprogramar a las células independientemente de su capacidad transformante⁷⁹.

SSEA-4 (Stage Specific Embryonic Antigen 4)

Se le conoce también por el nombre de Monosialosyl globopentaosylceramide (MSGb5). Es un glicofosfolípido que se propuso y se ha empleado como marcador de células embrionarias humanas y para el aislamiento de células pertenecientes al linaje mesénquimal^{80,81}. Se expresa en estados embrionarios, en tumores testiculares de células germinales, entre otros. La función que desempeña aún es desconocida pero se emplea como un marcador de poblaciones que tiene la capacidad de pluripotencia sin embargo no es indispensable para la regulación en la pluripotencia⁸². Sin embargo se piensa que SSEA4 podría jugar un rol en la diferenciación celular en células pluripotentes pero todavía falta mucho por dilucidar⁸³. En un estudio realizado en páncreas humano fetal se encontró la presencia de varios marcadores de pluripotencia, de los cuales SSEA4 se expresaba en mayor cantidad, se ha descrito la presencia de SSE en células neurales humanas, además de células mesénquimales de la dermis humana⁸⁴. Se piensa que no es una determinante para la regulación de la pluripotencia, incluso se expresa en células que están especializadas⁸⁵. Se ha observado que las células del ligamento periodontal expresan marcadores como: SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, OCT4, NANOG, SOX2 y REX1, además de tener actividad fosfatasa alcalina⁸⁶.

Justificación

- Estudios recientes han demostrado que el gen de CEMP1 al ser transfectado y expresado en células no mineralizantes como son los fibroblastos gingivales humanos, induce un cambio en la expresión de moléculas asociadas al proceso de biomineralización, así como al fenotipo cementoblástico/osteoblástico, por lo que es de suma importancia determinar si CEMP1 podría intervenir en la reprogramación celular.

Hipótesis

La expresión de CEMP1 en fibroblastos gingivales humanos, induce la expresión de reguladores transcripcionales implicados en la reprogramación celular.

Objetivo General

Identificar reguladores transcripcionales implicados en reprogramación celular en HGF transfectados con el gen de CEMP1 (HGF/CEMP1).

Objetivos Específicos

A nivel transcripcional y traduccional:

- *Determinar la expresión del regulador Oct3/4
- * Determinar la expresión del regulador Sox2
- * Determinar la expresión del regulador c-Myc
- * Determinar la expresión del regulador Klf4
- * Determinar la expresión del regulador SEEA-4
- * Determinar la expresión del regulador Nanog.

Materiales y métodos

Cultivo Celular

Los fibroblastos gingivales que se utilizaron en este estudio se obtuvieron de encía humana sana a través de la técnica de explante celular, como se ha descrito previamente⁸⁷.

Las células de encía humana fueron cultivadas en cajas falcón de 75 cm² en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con suero fetal bovino (SBF) al 10% y antibióticos (100 µg/ml estreptomina y 100 U/ml penicilina, Sigma Chemical CO, Saint Louis MO). Las células se incubaron a una temperatura de 37°C, con 95% de humedad y 5% de CO₂. Las células de encía humana se usaron en el segundo pasaje para todos los procedimientos experimentales.

Cultivo Experimental

Las células se sembraron por triplicado y se recolectaron en los siguientes periodos de tiempo (0, 1, 5 y 7 días) tanto para HFG con el vector vacío como para los HFG que fueron transfectados con el gen de CEMP1 (HFG/CEMP1). En cada periodo de tiempo las células se desprendieron de la caja de cultivo con un gendarme y centrifugaron (2000 rpm, 5 min, temperatura ambiente). El botón celular se lavó con amortiguador de fosfatos estéril pH 7.4. Una vez obtenido el botón celular, este se resuspendió con el amortiguador de lisis 200µl y con inhibidores de proteasas.

Lisis Celular

La lisis celular se realizó mediante vibración ultrasónica con un homogenizador ultrasónico (Sonic Ruptor 250, OMNI USA) que genera una frecuencia de salida de 20 kHz, teniendo la muestra en hielo, esta se sónico durante un ciclo de 10 segundos y un pulso intermitente del 40%.

Transfección de Fibroblastos gingivales humanos.

La región codificante de CEMP1 (GenBank Accession No. NM_001048212) fue ligada al vector pENTR/SD/D (Invitrogen, Carlsbad, CA.).

La construcción resultante fue pENTR/SD-CEMP1 que se recombinó con el vector de expresión pcDNA40 (Invitrogen). Con el plásmido resultante pcDNA40-CEMP1, los HFG fueron transfectados mediante Lipofectamina 2000.

Expresión a nivel Transcripcional

Extracción de RNA

Para la extracción del RNA total de las células, se empleó un amortiguador con un agente caotrópico como el tiocinato de guanidina (Trizol® invitrogen). La cuantificación del RNA se realizó mediante espectrofotometría utilizando luz UV con una longitud de onda de 260nm (Nanodrop®ND-1000 Spectrophotometer).

PCR en tiempo Real (qRT-PCR)

Para los ensayos de qRT-PCR (por sus siglas en Inglés *quantitative polymerase chain reaction*) se utilizó un kit SuperScrip®III Platinum® SYBR® Green One-Step y un termociclador (Corvertt 6000). La cantidad de RNA usada para cada reacción fue 10 ng. La programación para qRT-PCR fue la siguiente: Reacción de cadena polimerasa: a 95°C durante 5 minutos, 50 ciclos formados por dos periodos: desnaturalización a 60°C durante 30 segundos y realineamiento: a 60 grados por 30 segundos. La extensión fue a 72°C por un minuto.

Las secuencias de los cebadores que se emplearon son las siguientes:

OCT3/4

Sentido 5´ GGTTCTCGATACTGGTTCGC 3´

Antisentido 5´ GTGGAGGAAGCTGACAACAA 3´

SOX-2

Sentido5´ GCTTAGCCTCGTCGATGAAC 3´

Antisentido 5´ AACCCCAAGATGCACAACCTC 3´

NANOG

Sentido 5´ ATGGAGGAGGGAAGAGGAGA 3´

Antisentido 5´ GATTTGTGGGCCTGAAGAAA 3´

c-MYC

Sentido 5´ GCAGCCTCAGAGTTTGAGAAA 3´

Antisentido 5´ CCCTCGTGTTCCGCTACC 3´

KLF-4

Sentido5´GTCAGTTCATCTGAGCGGG 3´

Antisentido 5´ AGAGTTCCCATCTCAAGGCA 3´

SSEA4

Sentido 5´ AGGGTACATGAAATGGTGGG 3´

Antisentido 5´ GACGGGCACAACCTTCATCAT 3´

CEMP1

Sentido5´ ATGGGCACATCAAGCAVCTGA 3´

Antisentido 5´ CCCATTAGTGTCATCCTGC 3´

GAPDH

Sentido 5´CAACGGATTTGGTCGTATTGG 3´

Antisentido 5´ GCAACAATATCCACTTTACCAAGAGTTAA 3´

Expresión de Proteínas

La expresión a nivel traduccional de las moléculas relacionadas con la reprogramación celular (Oct3/4, Sox-2, Nanog, Klf-4, c-Myc y SSEA-4) se confirmó mediante la técnica de Western Blot.

Preparación de la muestra

La cuantificación de proteína se realizó con la técnica de Bradford⁸⁸. El extracto de proteínas se precipito durante una noche con ácido tricloroacético 20%. El botón de proteína se resuspendió en 12 µl de amortiguador de carga y se le agrego 6 µl de agentes caotrópicos, urea, detergentes no iónicos (MOPS y CHAPS), EDTA y ditiotrietol para evitar un replegamiento de la estructura de la proteína.

Electroforesis SDS-PAGE

Para la realización de la electroforesis, en todos los casos, se utilizó 20µg de extracto de proteína por cada muestra. Se emplearon geles de poliacrilamida SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) al 12%.

Inmunodetección (Western Blot)

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas que fueron electroforéticamente separadas se electro-transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (Immobilon-PVDF), posteriormente se bloquearon sitios de unión inespecíficos en la membrana con la solución de bloqueo (apéndice 1 amortiguador de fosfoproteínas y 5% de leche descremada) durante 2 horas a 4°C, en agitación. Cumplido el tiempo de bloqueo, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween al 0.15% cada lavado con una duración de 15 minutos. Posteriormente se realizó la incubación del anticuerpo primario (Tabla 2) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se hicieron 3 lavados cada uno de 15 min para después incubar el anticuerpo secundario (1:2000) durante 2 horas. La inmunodetección se llevó a cabo mediante precipitación de diaminobenzidina (DAB).

Anticuerpo Primario	Dilución
Oct3/4	1:200
Sox-2	1:500
Nanog	1:500
Klf-4	1:300
c-Myc	1:300
SSEA-4	1:200
GAPDH	1:1000

Tabla 2. Dilución de los Anticuerpos Primarios

Procesamiento de la membrana.

La membrana de PVDF fue digitalizada, para obtener la densitometría (Image J) de las bandas. Los resultados de la densitometría se analizaron con la prueba estadística t-student pareada con ayuda del programa informático Prism5, considerando como diferencia estadística cuando la $p < 0.05$.

Análisis Estadístico

Los resultados del qRT-PCR se normalizaron y analizaron con el programa Rotor Gene 6000, los datos recolectados se compararon con la prueba estadística t-student pareada mediante el programa GraphPad Prism 5.

Resultados

Expresión a nivel transcripcional.

OCT 3/4

A nivel transcripcional observamos que en los días 1,5 y 7 la expresión génica de OCT3/4 tiene diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los HFG y los HFG/CEMP1, donde los HFG/CEMP1 tienen una mayor expresión del ARN mensajero comparada con los HFG en los días 1 y 5; para el día 1 la expresión en los HFG/CEMP1 es el doble de los HFG; para el día 5 la expresión génica de los HFG/CEMP1 duplica a la cantidad de ARN mensajero presente en los HFG, pero con el paso del tiempo del día 0 al día 7 la presencia del ARN mensajero va disminuyendo en los HFG/CEMP1, hasta que la expresión del gen OCT3/4 es mayor en los HFG para el día 7 (Fig. 3).

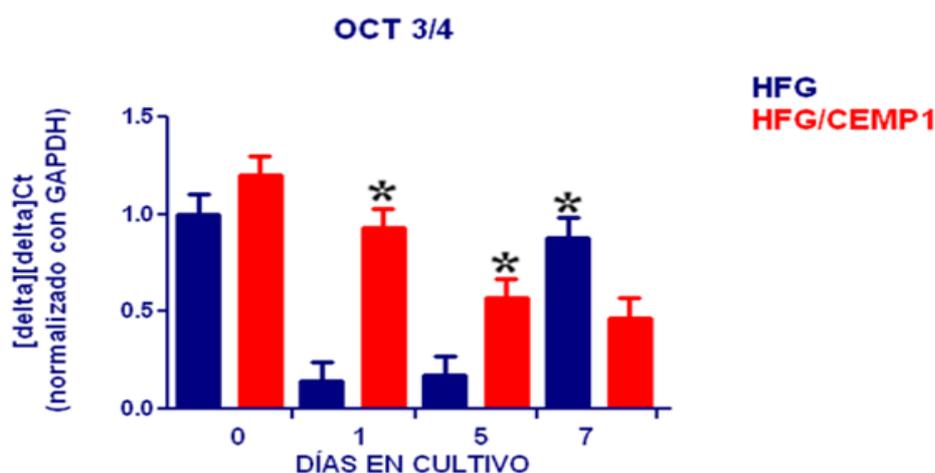


Fig. 3 Análisis de la expresión diferencial del gen OCT3/4 en los HFG (Azul) y en los HFG/CEMP1 (Rojo) a los días 0, 1, 5 y 7. El experimento se realizó por triplicado y se compararon los dos grupos con la prueba t-student pareada, $p < 0.05$

Al comparar la expresión del gen de CEMP1 y OCT3/4 en los HFG/CEMP1 se muestra un comportamiento contrario donde a mayor expresión de ARN mensajero de CEMP1 el ARN mensajero de OCT3/4 disminuye (Fig. 4), posiblemente CEMP1 podría regular de forma negativa a OCT3/4. Como se explicó anteriormente OCT3/4 es parte del circuito de pluripotencia y la expresión de esta molécula puede inducir la pluripotencia o la diferenciación según los niveles que se exprese, según la literatura al decaer la expresión de OCT3/4 va a desencadenar la diferenciación celular⁸⁹.

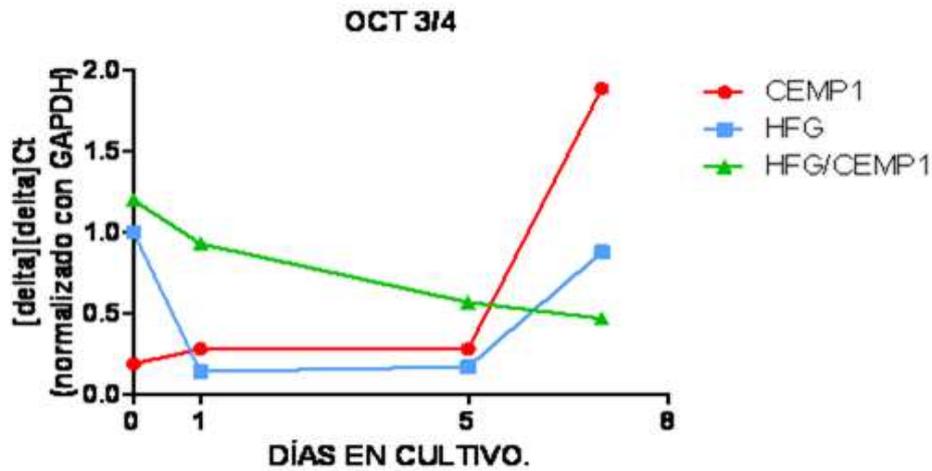


Fig. 4. Análisis de la expresión del gen OCT3/4 en los HFG (Azul) y en los HFG/CEMP1 (Verde), expresión de CEMP1 en los HFG/CEMP1 (Rojo) a los días 0,1, 5 y 7.

SOX-2

En la expresión del gen SOX-2 se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los HFG y los HFG/CEMP1, de tal forma que la expresión génica de SOX-2 en los HFG/CEMP1 es mayor, comparada con la expresión de los controles, esto se observa desde el día 0 hasta el día 7. En el día 0 los HFG/CEMP1 duplican la expresión de SOX-2 que la reportada por los HFG; para el día 1 la expresión del mensajero en HFG/CEMP1 es cinco veces mayor que la expresión de los HFG; durante el día 5 el mensajero expresado por los HFG/CEMP1 se cuadruplica respecto a la expresión del mensajero de los HFG y finalmente para el día 7 el mensajero presente en los HFG/CEMP1 supera por más de 10 veces la expresión de SOX-2 en los HFG (Fig. 5).



Fig. 5. Análisis de la expresión diferencial del gen SOX-2 en los HFG (Azul) y en los HFG/CEMP1 (Rojo) a los días 0, 1, 5 y 7. El experimento se realizó por triplicado y se compararon los dos grupos con la prueba t-student pareada, $p < 0.05$

La expresión de SOX-2 en los HFG/CEMP1 siempre tiene niveles altos de expresión (Fig. 6), y de acuerdo a la metodología, la única diferencia entre los HGF es que un grupo fue transfectado con gen de CEMP1, por lo que CEMP1 puede jugar un papel importante en la regulación de la expresión a nivel transcripcional de SOX-2. Al igual que OCT3/4 SOX-2 también es responsable de activar diversos genes, pero SOX-2 no tiene la capacidad de auto-regularse como lo hace OCT3/4, por lo que SOX-2 continua transcribiéndose, pero al incrementarse su expresión se induce la diferenciación celular al regular SOX-2 de forma negativa a otras moléculas como OCT3/4 y NANOG⁹⁰.

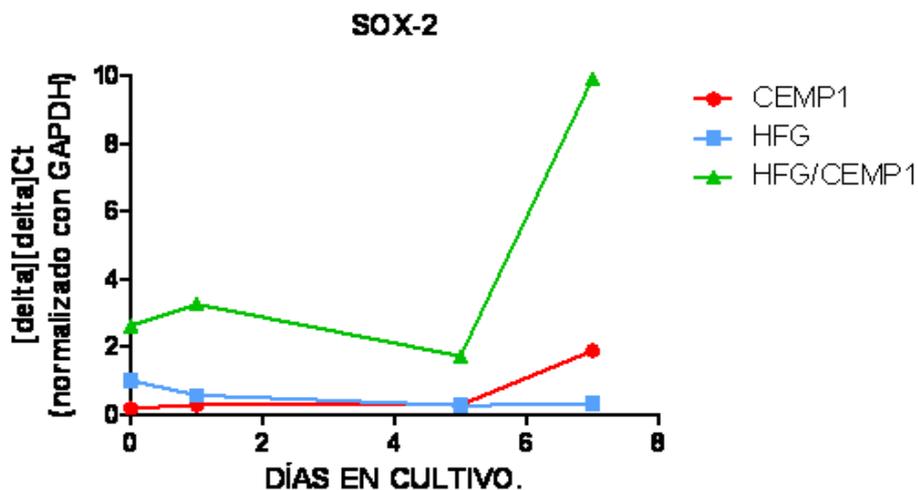


Fig. 6 Análisis de la expresión del gen SOX-2 en los HFG (Azul) y en los HFG/CEMP1 (Verde), expresión de CEMP1 en los HFG/CEMP1 (Rojo) a los días 0,1, 5 y 7.

NANOG

Los HGF y HGF/CEMP1 presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los días 1, 5 y 7. Durante los días 1 y 5 es cuando los HGF/CEMP1 tienen una mayor expresión génica que los HGF. En el día 1 la expresión de los HGF/CEMP1 es de más de 20 veces mayor, que la de los HGF; en el día 5 la cantidad de mensajero en los HGF/CEMP1 es 0.5 más que la de los HGF, pero para el día 7 en los HGF/CEMP1 hay una disminución de 6 veces la expresión del mensajero en los HGF (Fig. 7)

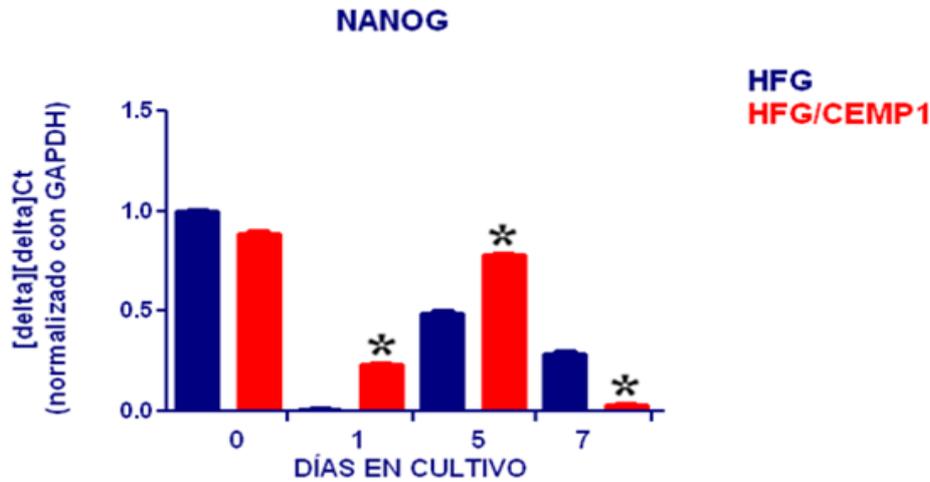


Fig. 7 Análisis de la expresión diferencial del gen NANOG en los HFG (Azu) y en los HFG/CEMP1 (Rojo) a los días 0, 1, 5 y 7. El experimento se realizó por triplicado y se compararon los dos grupos con la prueba t-student pareada, $p < 0.05$

El nivel del mensajero en los HGF comparado con los HFG/CEMP1 parece incrementar y disminuir en los mismos días por lo que posiblemente CEMP1 no está interviniendo en la regulación a nivel transcripcional de NANOG (Fig. 8).

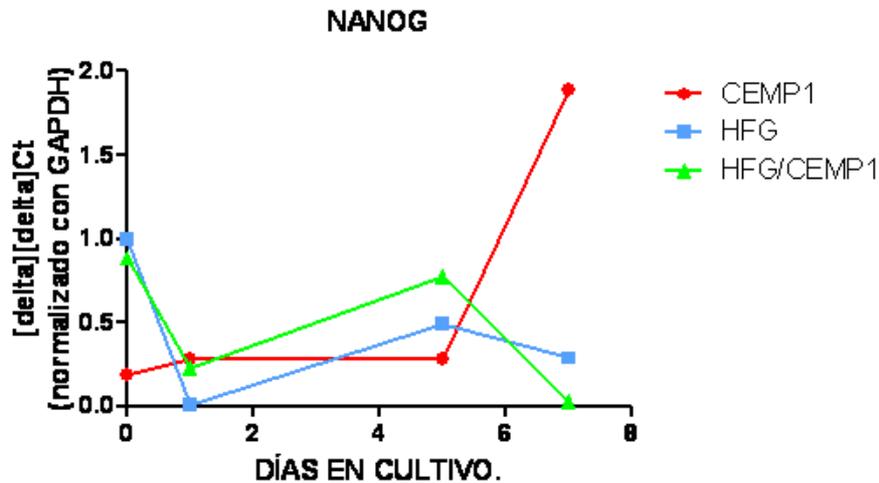


Fig. 8 Análisis de la expresión del gen NANOG en los HFG (Azu) y en los HFG/CEMP1 (Verde), expresión de CEMP1 en los HFG/CEMP1 (Rojo) a los días 0, 1, 5 y 7.

NANOG es activado por OCT3/4 y SOX-2⁹¹ si los niveles no son suficientes para activar a NANOG, los niveles de NANOG disminuyen, en este caso podría sugerirse que los bajos niveles de OCT3/4 causan que NANOG disminuya su expresión génica, aunado a que cuando SOX-2 se encuentra elevado regula de forma negativa a SOX-2.

Se ha observado que cuando se reduce la expresión de OCT3/4 y NANOG se produce la diferenciación de las células⁹². Por lo que es posible que SOX-2 a pesar de poseer niveles altos en los HFG/CEMP1 no sea capaz de mantener el circuito de pluripotencia cuando OCT3/4 y NANOG se encuentran regulados a la baja.

Circuito de Pluripotencia

El circuito de pluripotencia tiene la capacidad de activar a un gran número de genes, entre ellos se encuentra KLF-4 y c-MYC, si el circuito de pluripotencia está activado desencadenara la activación de genes relacionados con pluripotencia mientras que reprime la expresión de otros genes que están asociados a la diferenciación celular. La sobreexpresión de CEMP1 parece tener repercusión en OCT3/4 pero principalmente influye en la expresión de SOX-2 haciendo que tenga niveles muy elevados que podría contribuir a la diferenciación celular, mientras que los niveles de expresión en los controles son más uniformes lo cual podría conferirle un equilibrio al circuito de pluripotencia y así podría obtener las características similares a las células troncales. (Fig. 9)

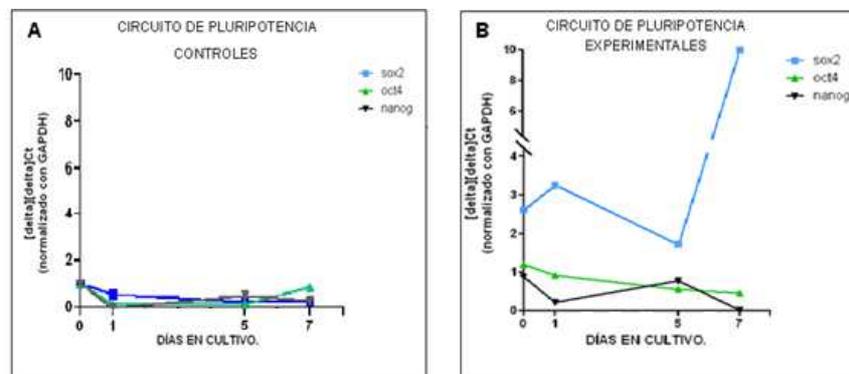


Fig. 9 (A) Gráfica de la expresión de las proteínas que integran al circuito de Pluripotencia en los HFG. (B) Gráfica de la expresión de las proteínas del circuito de Pluripotencia en HFG/CEMP1.

KLF-4

Los HFG y los HFG/CEMP1 tienen diferencias a los días 0,1 y 7. Donde los HFG tienen una mayor expresión del gen KLF-4 respecto a los HFG/CEMP1; en el día 0 la cantidad de mensajero presente en los HFG es el doble de la que expresan los HFG/CEMP1; durante el día 1 la diferencia entre los controles y experimentales es significativa pero no duplica la cantidad de mensajero en los

controles como lo hace en el primer y en el día 7, el mensajero expresado por los HFG/CEMP1 es duplicado por el mensajero de los HFG. El día 5 no muestra diferencias significativas (Fig. 10)

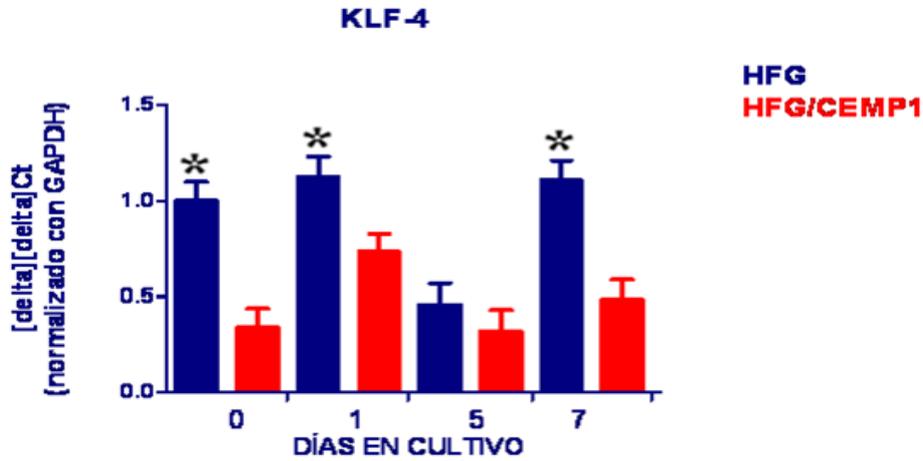


Fig. 10 Análisis de la expresión diferencial del gen KLF-4 en los HFG (Azul) y en los HFG/CEMP1 (Rojo) a los días 0, 1, 5 y 7. El experimento se realizó por triplicado y se compararon los dos grupos con la prueba t-student pareada, $p < 0.05$

La expresión génica de KLF-4 a lo largo de los días tanto en los HFG como en los HFG/CEMP1 se incrementa o disminuye en los mismos días (Fig. 11), no parece existir una relación entre la expresión de CEMP1 y KLF-4 sin embargo en los experimentales es menor su expresión y dado que KLF-4 está involucrado en la diferenciación de células epiteliales y en algunas funciones del desarrollo esquelético, y al estar a la baja es muy posible que facilite la diferenciación.

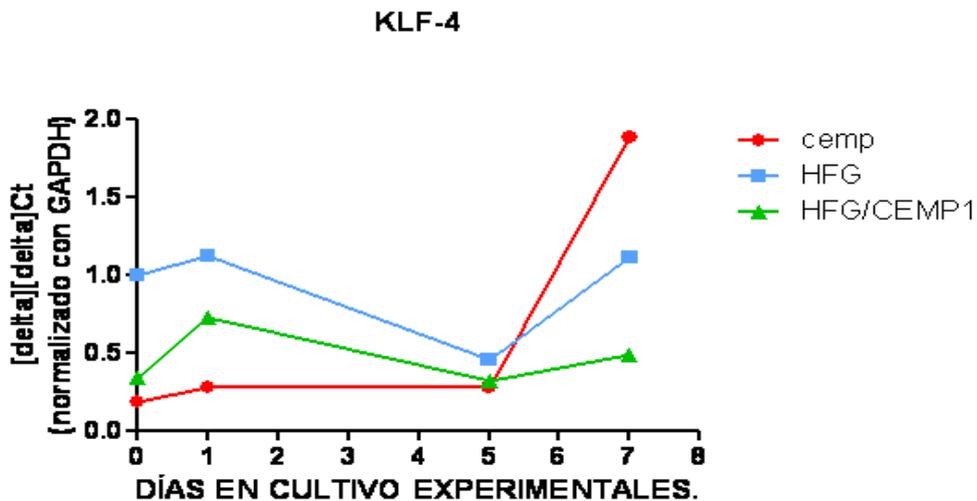


Fig. 11 Análisis de la expresión del gen KLF-4 en los HFG (Azul) y en los HFG/CEMP1 (Verde), expresión de CEMP1 en los HFG/CEMP1 (Rojo) a los días 0, 1, 5 y 7.

c-MYC

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los días 0,1, y 5 donde los HFG tienen una mayor expresión génica en comparación a los HFG/CEMP1. En el día 0 la cantidad de mensajero de los HFG duplica la expresión de los HFG/CEMP1, para el día 1 la cantidad en los HFG triplica la cantidad de mensajero expresada por los HFG/CEMP1, y en el día 5 la cantidad expresada por los HFG supera por seis veces la cantidad de los HFG/CEMP1, mientras que para el día 7 no hay diferencias estadísticamente significativas (Fig. 12)

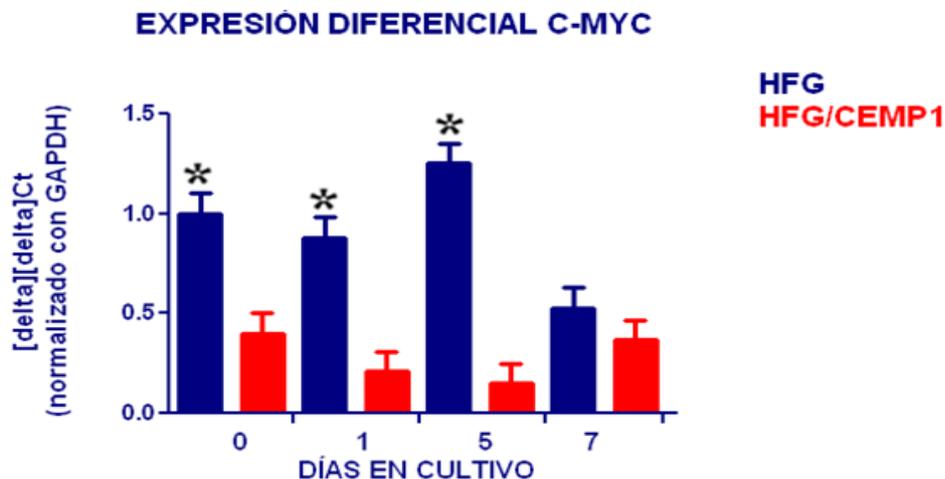


Fig. 12 Análisis de la expresión diferencial del gen c-MYC en los HFG (Azul) y en los HFG/CEMP1 (Rojo) a los días 0, 1, 5 y 7. El experimento se realizó por triplicado y se compararon los dos grupos con la prueba t-student pareada, $p < 0.05$

c-MYC interviene en la regulación del ciclo celular que influye en los tiempos del ciclo celular ya que las células troncales tienen tiempos cortos comparados con las células somáticas que tienen ciclos celulares más largos, además de que participa en la transición de epitelio mesénquima, cuando los niveles son bajos los ciclos celulares se podría pensar en una tasa de proliferación baja, aparentemente no parece existir una relación entre CEMP1 y c-MYC sin embargo la expresión génica en los HFG/CEMP1 es baja y podría ser que directamente CEMP1 no lo regula directamente pero podría ser que interviene con su expresión por otro mecanismo de regulación (Fig. 13).

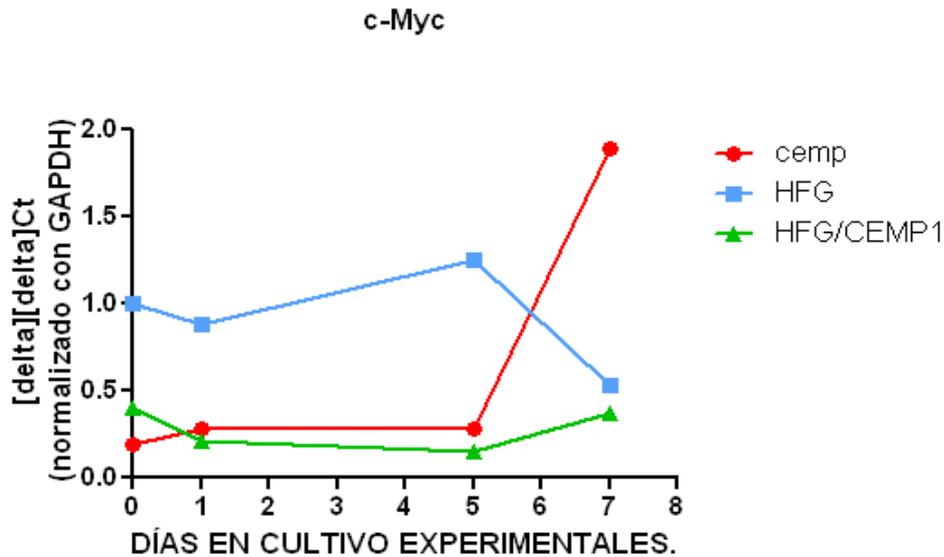


Fig. 13 Análisis de la expresión del gen c-MYC en los HFG (Azul) y en los HFG/CEMP1 (Verde), expresión de CEMP1 en los HFG/CEMP1 (Rojo) a los días 0,1, 5 y 7.

SSEA-4

SSEA-4 tiene una mayor expresión génica en los HFG durante los días 0,1 y 7. En los días 0 y 7 el mensajero en los HFG duplica la cantidad del mensajero expresada por los HFG/CEMP1 y para el día 5 no hay diferencias estadísticamente significativas (Fig. 14).

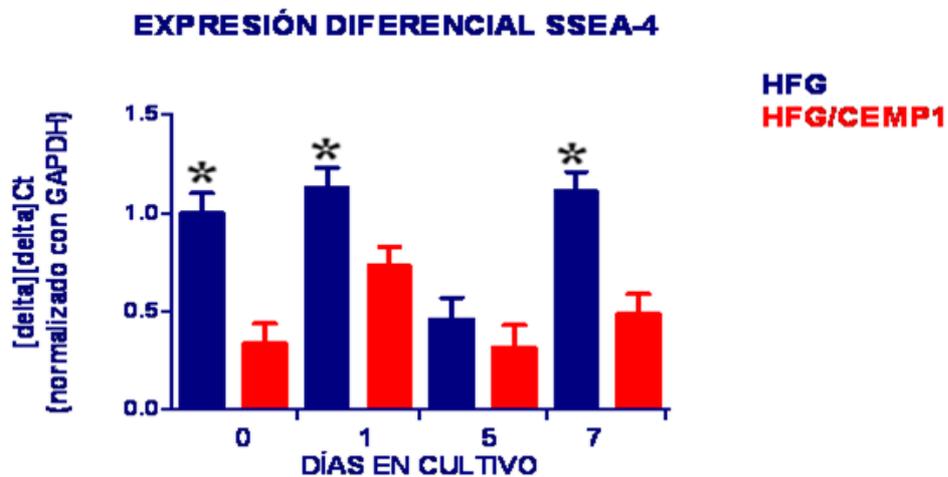


Fig. 14 Análisis de la expresión diferencial del gen SSEA-4 en los HFG (Azul) y en los HFG/CEMP1 (Rojo) a los días 0, 1, 5 y 7. El experimento se realizó por triplicado y se compararon los dos grupos con la prueba t-student pareada, $p < 0.05$

SSEA-4 es un marcador de células embrionarias que también es expresado por las iPS, en este caso la expresión del mensajero de SSEA-4 no supera en

ninguno de los días a la expresión de los HFG, podría sugerirse que CEMP1 regula de forma negativa a SSEA-4 y de esta manera podría facilitarse la diferenciación celular al tener este marcador de células troncales expresado a la baja

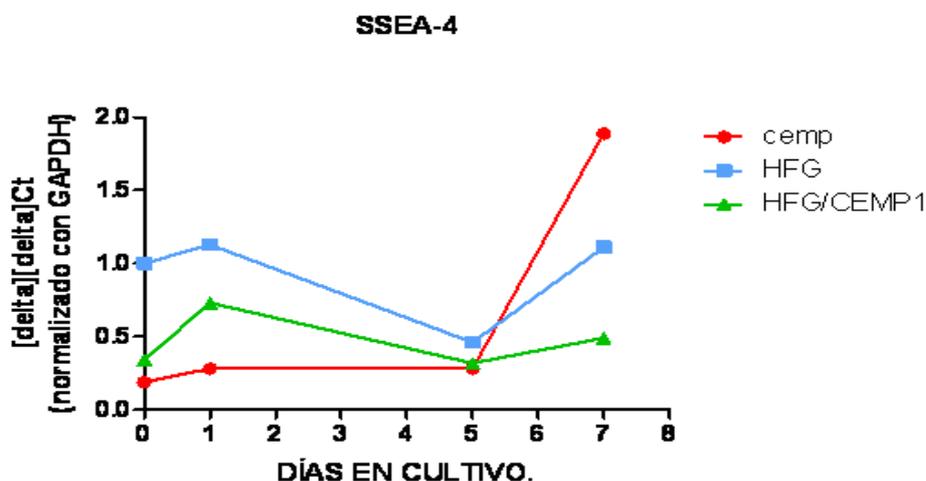


Fig. 15 Análisis de la expresión del gen SSEA-4 en los HFG (Azul) y en los HFG/CEMP1 (Verde), expresión de CEMP1 en los HFG/CEMP1 (Rojo) a los días 0,1, 5 y 7.

Expresión a nivel traduccional

Rendimiento de proteína total

Se presenta en la siguiente tabla el rendimiento total de la proteína (Tabla 3)

CONDICIÓN	µg/µl	µg totales
HFG día 0	0.28426966	170.5617978
HFG día1	0.18164794	108.988764
HFG día 5	0.19737828	118.4269663
HFG día 7	0.23146067	231.4606742
HFG/CEMP1 día 0	0.31535581	189.2134831
HFG/CEMP1 día 1	0.2588015	155.2808989
HFG/CEMP1 día 5	0.3988764	239.3258427
HFG/CEMP1 día7	0.65168539	391.011236

Tabla 3. Rendimiento Total de la Proteína en los HFG y en los HFG/CEMP1.

Las membranas donde se realizó la inmunodetección de las moléculas asociadas a la reprogramación celular y CEMP1, fueron digitalizadas y se realizó la medición de la densidad relativa de cada banda en pixeles (Fig. 16).

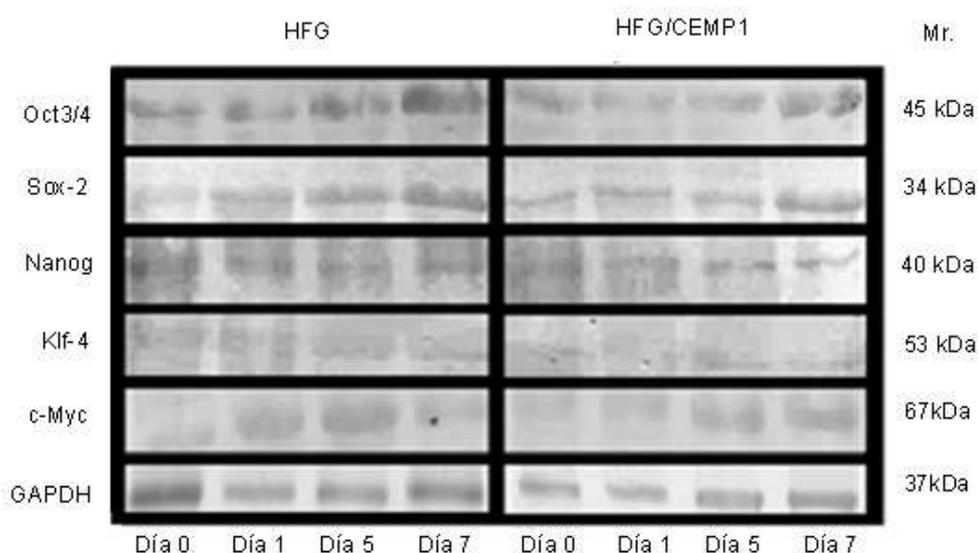


Fig. 16 Western Blot de los HFG y HGF/CEMP1 a los días 0, 1, 5 y 7.

Oct3/4

A nivel traduccional, la expresión de Oct3/4 presenta diferencias estadísticamente significativas en los días 1, 5 y 7 donde es mayor la expresión de proteína en los HGF (Fig. 17). Contrario a lo que se observó a nivel transcripcional los controles tienen una mayor expresión de proteína Oct3/4 por lo que posiblemente hay un mecanismo de regulación postranscripcional.

Según lo reportado en la literatura cuando Oct3/4 se encuentra a la baja se da la diferenciación de las células. Cuando Oct3/4 no puede mantener su propia transcripción y no activar genes o reprimir genes se favorece al proceso de diferenciación celular.

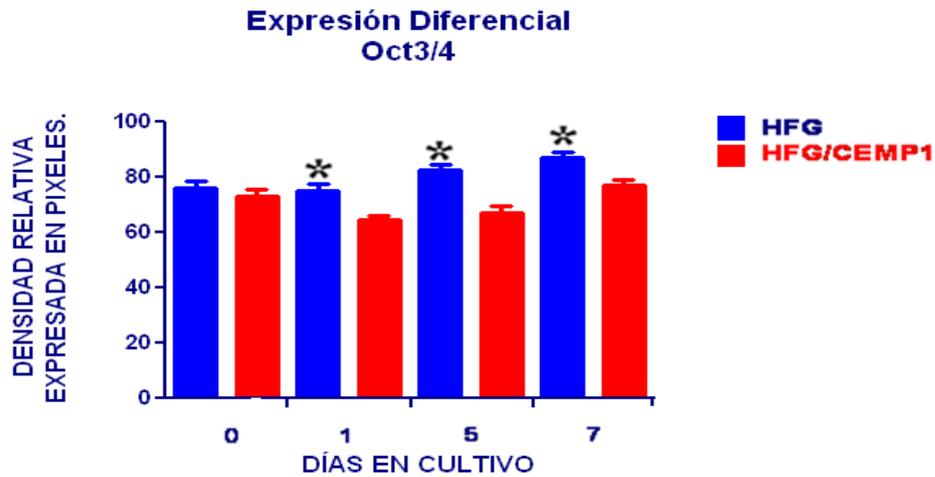


Fig. 17 Análisis de la expresión diferencial de la proteína Oct3/4 en los HFG y HFG/CEMP1 a los días 0, 1, 5 y 7. El experimento se realizó por triplicado y se compararon los dos grupos con la prueba t- student pareada, $p < 0.05$

Sox-2

No existen diferencias estadísticamente significativas a nivel traduccional entre los HFG y los HFG/CEMP1. Contrario a lo que se esperaría por la alta expresión génica de SOX-2, por lo que al igual que Oct3/4 se sugiere un mecanismo de regulación postranscripcional, donde el ARNm se degrada rápidamente.

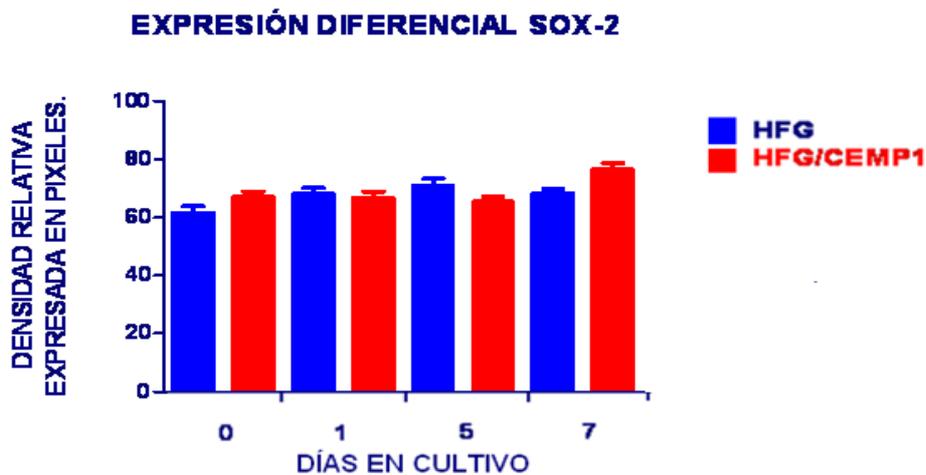


Fig. 18 Análisis de la expresión diferencial de la proteína Sox-2 en los HFG y HFG/CEMP1 a los días 0, 1, 5 y 7. El experimento se realizó por triplicado y se compararon los dos grupos con la prueba t- student pareada, $p < 0.05$

Nanog

La expresión proteica de Nanog muestra diferencias estadísticamente significativas solo en el día 7, donde los HGF expresan una cantidad mayor de proteína en comparación de los HGF/CEMP1. Conforme avanza el tiempo la cantidad de Nanog presente en los HGF/CEMP1 va disminuyendo (Fig. 19).

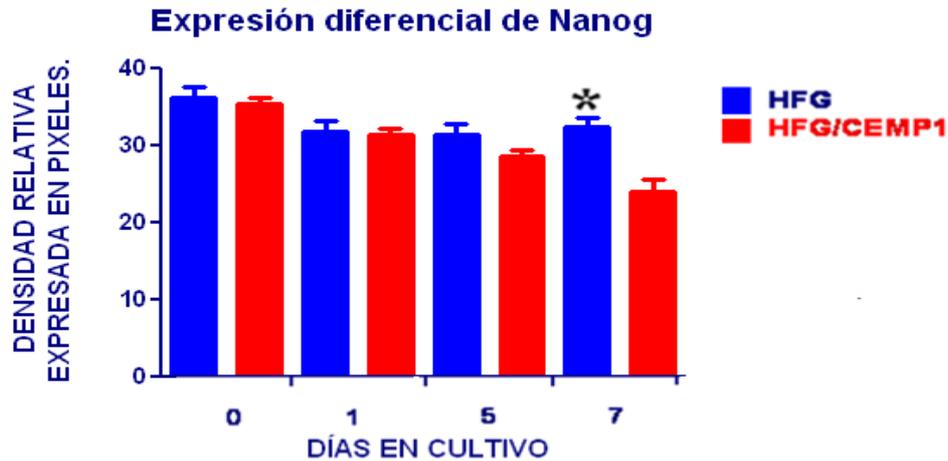


Fig. 19 Análisis de la expresión diferencial de la proteína Nanog en los HGF y HGF/CEMP1 a los días 0, 1, 5 y 7. El experimento se realizó por triplicado y se compararon los dos grupos con la prueba t- student pareada, $p < 0.05$

Nanog pertenece al circuito de pluripotencia, y también regula genes asociados al mantenimiento de pluripotencia pero al reducir su expresión deja de promover la expresión de genes que favorecen la pluripotencia. Como se sabe los niveles tanto de Oct3/4 como de Sox-2 también son determinantes para la expresión de Nanog, lo que nos podría indicar que en los HGF/CEMP1 no hay un mantenimiento del circuito de pluripotencia y por tanto se favorece a la diferenciación celular (Fig. 20)

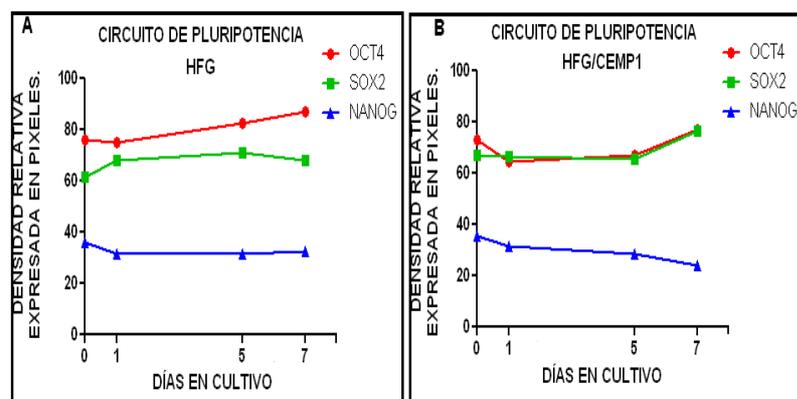


Fig. 20 (A) Gráfica de la expresión de las proteínas que integran al circuito de Pluripotencia en los HGF. (B) Gráfica de la expresión de las proteínas del circuito de Pluripotencia en HGF/CEMP1.

Klf-4

Hay diferencias estadísticamente significativas para el día 1 donde los HGF/CEMP1 expresan menor cantidad de proteína comparada con la cantidad de proteína de los HFG, que mantienen niveles constantes a lo largo de los días (Fig. 21), al igual que sucede a nivel transcripcional parece ser que CEMP1 no regula a Klf-4.

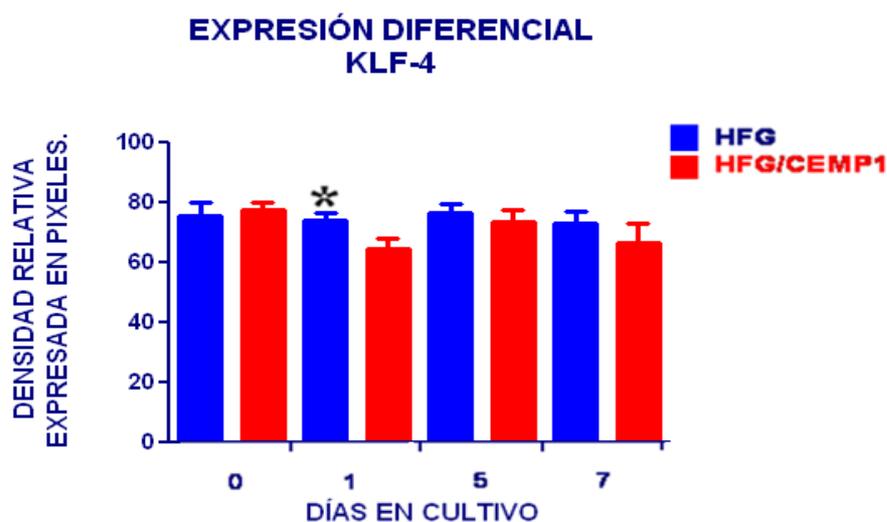


Fig. 21 Análisis de la expresión diferencial de la proteína Klf-4 en los HFG y HGF/CEMP1 a los días 0, 1, 5 y 7. El experimento se realizó por triplicado y se compararon los dos grupos con la prueba t- student pareada, $p < 0.05$

c-Myc

A nivel traduccional encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los HGF y los HGF/CEMP1 donde los HGF están expresando una mayor cantidad de proteína en los días 1 y 5 comparado con los HGF/CEMP1 pero al día 7 la cantidad de proteína presente en los HGF/CEMP1 es mayor que la que se encuentra en los HGF. (Fig. 22).

c-Myc está implicada en la regulación del ciclo celular, por lo que durante la reprogramación hay un incremento en la actividad de c-Myc que desencadena la elevación de las CDK regulando así al ciclo celular. Pero de acuerdo a los resultados la expresión proteica de c-Myc se encuentra disminuida lo que nos podría indicar que su ciclo es similar a la de una célula somática o que su tasa de proliferación no se encuentra asociada a esta molécula.

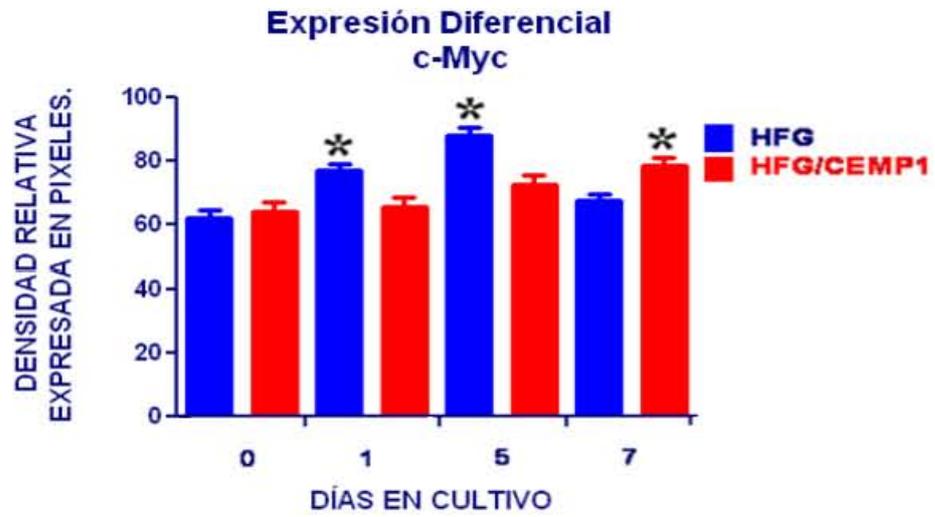


Fig. 22 Análisis de la expresión diferencial de la proteína c-Myc en los HFG y HFG/CEMP1 a los días 0, 1, 5 y 7. El experimento se realizó por triplicado y se compararon los dos grupos con la prueba t- student pareada, $p < 0.05$

Discusión

Durante la enfermedad periodontal, los tejidos que dan soporte al órgano dental, sufren alteraciones como resultado de la respuesta inflamatoria, esta causa la pérdida de los órganos dentarios. La enfermedad periodontal en México tiene una prevalencia del 67.2%⁹³. Por lo general las terapias empleadas para tratar esta enfermedad, se enfocan solamente a la limitación del problema y reparación de los tejidos, pero no hay una regeneración de los tejidos.

Sin embargo siempre se ha buscado la regeneración tisular y una de las propuestas es la medicina regenerativa que emplea a las células como terapia y aunque todavía falta mucho por dilucidar, esta terapia podría aplicarse en una gran cantidad de campos clínicos. Como se mencionó anteriormente mediante la reprogramación celular se pueden obtener iPS que poseen características similares a las células troncales que pueden diferenciarse a cualquier tipo celular de las tres capas germinales por lo que la reprogramación es una alternativa para la regeneración tisular.

El objetivo de este trabajo consistió en determinar la expresión a nivel transcripcional y traduccional de aquellos reguladores relacionados con la reprogramación celular en HFG/CEMP1. De acuerdo a los resultados obtenidos, la expresión a nivel transcripcional es diferente a la expresión a nivel traduccional, las diferencias que se presentan a nivel traduccional entre los HFG y los HFG/CEMP1 es una disminución de la expresión de los marcadores de la reprogramación en el grupo de los HFG/CEMP1. En un principio se esperaba que solo los HFG/CEMP1 expresaran los marcadores relacionados con la pluripotencia pero se encontró evidencia de que en la lámina propia de la encía que expresan ciertos marcadores de la reprogramación, esto se debe a que existen subpoblaciones de células troncales en la encía^{94,95}, sin embargo no es la única fuente de células troncales también se han encontrado en el ligamento, en médula ósea, etc.⁹⁶, la ventaja que se obtendría de las gingivales es que es una fuente muy accesible.

La diferenciación de las células depende de la regulación de genes que reprimen o activan a su vez a otros. Niwa sustenta que los niveles de OCT3/4 pueden determinar el destino de la célula, un aumento en la expresión de OCT3/4 induce la diferenciación hacia endodermo o mesodermo, mientras que una disminución da como resultado la diferenciación a trofoectodermo ⁶⁰, partiendo de que el control es similar a las células troncales al estar a la baja Oct3/4 a nivel traduccional los HFG/CEMP1, se podría pensar que la diferenciación sería hacia trofoectodermo, pero a pesar de que Oct3/4 es determinante en la diferenciación o en el mantenimiento de la pluripotencia también se tiene que considerar la expresión de Sox-2 ya que tienen una regulación recíproca ⁹⁷.

El papel que juega Sox-2 durante el desarrollo es de gran importancia por su implicación en la morfogénesis, proliferación y diferenciación. Sox-2 también está implicado en la proliferación de los progenitores de los osteoblastos, cuando hay una delección de Sox-2 en cultivos de osteoblastos se observa que adquieren un fenotipo de senescencia, mientras que cuando se sobreexpresa se previene la diferenciación según Mansukhani ⁶¹, en otros estudios se propone incrementos en la expresión de Sox-2 lleva a la diferenciación celular ⁹⁰ sin embargo se ha llegado a asociar los altos niveles de Sox-2 a patologías como: el cáncer de ovario⁹⁸, colangiocarcinoma ⁹⁹ y cáncer colorectal esporádico ¹⁰⁰. No se ha publicado en modelo experimental donde se suprima la expresión de Sox-2 en HFG, pero si tomamos en cuenta que al transfectar los HFG con CEMP1 adquieren un fenotipo tipo cementoblástico/ osteoblástico podríamos comparar con otro estudio donde al sobreexpresar a SOX-2 induce la expresión de APC y GSK3 que intervienen en la vía Wnt llegando a inhibir la diferenciación de los osteoblastos ^{101,102}. A pesar de que detectamos altos niveles en la sobreexpresión de Sox-2 a nivel transcripcional, la expresión a nivel traduccional no tiene diferencias significativas con el control, el mecanismo por el cual se da esta regulación se desconoce debido a que aún no se han esclarecido en su totalidad el funcionamiento de CEMP1.

La expresión de NANOG en un inicio se encuentra en la ICM, posteriormente en el blastocito, pero la expresión solo se ve sub-regulada después de la implantación. Las funciones de NANOG consisten en el mantenimiento de la

pluripotencia, evitando la diferenciación hacia el endodermo primitivo, se ha observado que Nanog puede interferir con la señalización de las BMP que pueden promover la diferenciación hacia mesodermo ¹⁰³ según nuestros datos se podría sugerir que al expresar niveles bajos los HFG/CEMP1 de NANOG se está dando paso a la diferenciación. En células estromales de la médula ósea de ratón se ha reportado que cuando los niveles de Nanog se subexpresan se favorece la diferenciación al linaje adipogénico ¹⁰⁴. Otros estudios reportan que el uso de ARN de interferencia logra disminuir la expresión de Nanog y con esto la activación de genes relacionados con el trofoectodermo ¹⁰⁵.

Hay datos que señalan que cuando disminuye la expresión de c-Myc las células tienen una proliferación baja ¹⁰⁶, Bennett también observó un arresto del crecimiento cuando los niveles de c-Myc son bajos ¹⁰⁷. Se ha descrito que una causante de la sub-regulación de c-MYC es por hipoxia ¹⁰⁸ y si consideramos que los HFG/CEMP1 presentan un fenotipo mineralizante podría ser que exprese un componente presente en cemento que es SOD (Superóxido Dismutasa) que causa hipoxia. Según los resultados obtenidos, en los cuales la expresión entre los HFG y los HFG/CEMP1 es similar debido a que per se los HFG expresan moléculas asociadas a la reprogramación no podemos determinar que CEMP1 induce la expresión de las moléculas asociadas a reprogramación, sin embargo, las diferencias que se presentan muestran una regulación negativa y con los antecedentes previos que indican que CEMP1 tiene la capacidad para diferenciar las células³¹, se podría pensar en la posibilidad de que las células estén involucradas con el proceso de transdiferenciación.

La transdiferenciación consiste en que a partir de una célula ya diferenciada de un linaje puede cambiar a otro tipo de célula bien diferenciada, presenta cambios en la expresión génica con la activación de genes maestros ¹⁰⁹. Algunos de los genes maestros que se han descrito son: Pax5 que está involucrado con el desarrollo de linfocitos; el gen PDX-1 participa en el desarrollo pancreático y MyoD que induce la miogénesis¹¹⁰.

Se demostró la transdiferenciación de Fibroblastos a Hepatocitos al usar vectores virales con FOXA2, HNF4 α y C/EBP β ¹¹¹. Con este antecedente se

podría pensar en que CEMP1 podría participar en procesos de transdiferenciación.

Conclusiones:

- A nivel de expresión traduccional no hay diferencias entre los HGF y los HGF/CEMP1, lo que indica que CEMP1 podría no participar en el proceso de reprogramación celular.
- CEMP1 podría intervenir en el proceso de diferenciación celular, al regular negativamente los marcadores de reprogramación celular.
- CEMP1 puede ser empleada en terapias que busquen la regeneración de tejidos mineralizados al dirigir la diferenciación de células hacia un fenotipo mineralizante

Bibliografía

- 1.-Ivanovski S. Periodontal regeneration. *Aust Dent J.* 2009; 54: (Suppl 1):S118–128.
- 2.- Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol.* 1976; 47: 256–260.
- 3.- Ferraris M, Campos A. Histología y embriología bucodental. 2da edición. Editorial Médica Panamericana. España 2003
- 4.- Bartold PM, Walsh LJ. Narayanan AS. Molecular and Cell Biology of The Gingiva. *Periodontol 2000*; 2000(24):28-55
- 5.-Seba A, Deepak KT, Ambili R, Preeja C, Archana V. Gingival biotype and its clinical significance –A review. *The Saudi. J for Dent Res.* 2014;5(1): 3–7
- 6.-Melcher AH. On the Potential Of Periodontal Tissues. *J Periodontol.* 1976;47(5):256-60.
- 7.- Zhang QZ, Nguyen AL, Yu WH. Le AD. Human oral mucosa and gingiva: a unique reservoir for mesenchymal stem cells. *J Dent Res.* 2012 Nov;91(11):1011-1018.
- 8.- Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development.* 127: 1671–1679
- 9.-Nanci A, Bosshardt DD. Structure of Periodontal Tissues in Health and Disease. *Periodontology 2000.* 2006;40:11-28
- 10.-Maeda H, Wada N, Fujii S, Tomokiyo A, Akamine A. Stem Cell in Clinic and Research[en línea]. Agosto 2011, Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/stem-cells-in-clinic-and-research>[Mayo 2014]
- 11.- Lekic P, McCulloch CA. Periodontal Ligament Cell Populations: The Central Role of Fibroblasts in Creating a Unique Tissue. *Anat Rec.* 1996 Jun;245(2):327-41.

- 12.- Carranza FA, Neuman MG. Clinical Periodontology 8th Edition. Section One. The normal periodontum. WB Saunders Company USA 1996.
- 13.- Wang HM, Nanda V, Rao LG, Melcher AH, Heersche JN, Sodek J. Specific immunohistochemical localization of type III collagen in porcine periodontal tissues using the peroxidase-antiperoxidase method. *J Histochem Cytochem* 1980;28: 1215–1223
- 14.- Cho MI, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontology 2000*, 2000; 24:9–27
- 15.- Salmon CR, Tomazela DM, Ruiz KG, Foster BL, Paes Leme AF, Sallum EA, Somerman MJ, Nociti FH Jr. Proteomic Analysis of Human Dental Cementum and Alveolar Bone. *J Proteomics*. 2013 Oct 8;91:544-555.
- 16.- Denton GB. The Discovery of cementum. *J Dent Rest* 1939;18;239-242.
- 17.- Furtado-Gonçalves P, Sallum AE, Wilson Sallum A, Zaffalon Casati M, Toledo S, Nociti FH Jr. Dental cementum reviewed: development, structure, composition, regeneration and potential functions. *Braz J Oral Sci*. 2005;.4(1): 651-658
- 18.-Huang XF, Chai Y. Molecular regulatory mechanism of tooth root Development. *Int J Oral Sci*. 2012;4(4):177-181
- 19.- Diekwisch T. Developmental Biology of Cementum. *Int. J. Dev. Biol*. 2001; 45: 695-706
- 20.- Hammarström L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*. 1997;24(9 Pt 2):658-668.
- 21.- Diamod M. Anatomía Dental, 3ra Edición, Tejidos del diente. Editorial Limusa. México 2004
- 22.-Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000*. 1997 Feb;13:41-75.

- 23.- Olson S, Arzate H, Narayanan AS, Page RC. Cell attachment activity of cementum proteins and mechanism of endotoxin inhibition. *J Dent Res.*;70(9):1272-1277.
- 24.-Nanci A, Boosshardt DD. Structure of Periodontal Tissues in Health and Disease. *Periodontology 2000.*2006;40: 11-28
- 25.- Kato A, Okura T, Hamada C, Miyoshi S, Katayama H, Higaki J, Ito R. Cell Stress Induces Upregulation via the ERK Pathway in Type II Alveolar Epithelial Cells. *PLoS One.* 2014 Jun 25;9(6): e100106. doi: 10.1371/journal.pone.0100106. eCollection 2014.
- 26.-Orimo H. The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease. *Journal of Nippon Medical School.* 2010;77(1): 4-12
- 27.- Alvarez-Pérez MA, Pitaru S, Alvarez- Fregoso O, Reyes-Gasga J, Arzate H. Anti-cementoblastoma-derived Protein Antibody Partially Inhibits Mineralization on a Cementoblastic Cell Line. *Jor of Struct Bio.*2003(143):1-13.
- 28.- Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontol 2000.* 2000;24:73-98.
- 29.- Villarreal-Ramírez E, Moreno A, Mas-Oliva J, Chávez-Pacheco JL, Narayanan AS, Gil-Chavarría I, Zeichner-David M, Arzate H. Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): primary role in biomineralization., adhesión celular. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009(19);384(1):49-54.
- 30.- Olson S, Arzate H, Narayanan AS, Page RC. Cell attachment activity of cementum proteins and mechanism of endotoxin inhibition. *J Dent Res* 1991;70:1272–1277.
- 31.- Arzate H, Chimal-Monroy J, Hernández-Lagunas L, Díaz de León L. Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *J Periodontal Res* 1996;31:144–8.

- 32.-NCBI [en línea] "PTPLA protein tyrosine phosphatase-like". Disponible en : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9200> [Mayo 2014]
- 33.- Uwanogho DA, Hardcastle Z, Balogh P, Mirza G, Thornburg KL, Ragoussis J, Sharpe PT. Molecular Cloning, Chromosomal Mapping, and Developmental Expression of a Novel Protein Tyrosine Phosphatase-like Gene. *Genomics*.1999;62:406 –416.
- 34.- Saito M. Narayanan S. Signaling Reactions Induced in Human Fibroblasts During Adhesion to Cementum-Derived Attachment Protein. *J Bone Miner Res*. 1999 Jan;14(1):65-72.
- 35.- Alvarez-Pérez MA. Narayanan S. Zeichner-David M. Rodríguez Carmona B. Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone*. 2006;38(3):409-419.
- 36.- González-Alva P, Gómez-Plata E & Arzate H. Localización de las proteínas específicas del cemento radicular CEMP1 y CAP en células neoplásicas. *J Oral Res* 2013; 2(1): 11-17.
- 37.- Romo-Arévalo E, Eduardo Villarreal-Ramírez E, Chávez-Pacheco JL, Piña-Barba C, Aguilar-Franco M, Arzate H. *In Vitro* Effects of Cementum Protein 1 (CEMP1) on Calcium Phosphate Crystal Formation and its Role During the Mineralization Process. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*2009;1244: DOI: <http://dx.doi.org/10.1557/PROC-1244-5>.
- 38.- Carmona-Rodríguez B, Alvarez-Pérez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, Molina-Guarneros J, García-Hernández AL, Suárez-Franco JL, Chavarría IG, Villarreal-Ramírez E, Arzate H. Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 ;358(3): 763–769.
- 39.-Swaminathan Y, Thomas JT. What makes cementum a unique structure?. *Int Jor of Sci & Engineering Res*.2013;4(12):2268-2285.
- 40.-García RI, Henscha MM. Krall EA. Relationship between periodontal disease and systemic health. *Periodontology 2000*. 2001;25: 21–36.

- 41.- Williams RC. Understanding and Managing Periodontal Diseases: A Notable Past, a Promising Future. *J Periodontol.* 2008;79(8 Suppl):1552-1559
- 42.-GC Armitage. Periodontal Diagnoses and Clasification of Periodontal Disease. *Periodontology 2000.*2004;34:9-21.
- 43.- . Kim J. Amar S. Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship. *Odontology.* 2006 Sep;94(1):10-21
- 44.-Hughes FJ. Mesenchymal Stem Cells and Periodontal Regeneration. *Curr Oral Health Rep* (2014) 1:1–8.
- 45.- Ivanovski S. Periodontal Regeneration. *Aust Dent Journal* .2009; 54:(1 Suppl): S118–S128
- 46.-Han J, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM.Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Aust Dent Journal.* 2014; 59:(1 Suppl): 117–130
- 47.- Stojkovic M , Lako M, Strachan T, Murdoch A. Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells. *Reproduction.* 2004 Sep;128(3):259-67
- 48.- Green RM. Can we develop ethically universal embryonic stem-cell lines?. *Nat Rev Genet.* 2007;8(6):480-5.
- 49.- Yoshida Y, Yamanaka S. iPS cells: a source of cardiac regeneration. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50(2):327-332
- 50.-Pelayo R. Santa-Olalla J. Velasco, Acevedo- Fernández JJ, Angeles-Chimal JS, Castro ME, Chávez-González MA, Chimal-Monroy J, Gazarian K. Células Troncales y medicina regenerativa. 1ra edición. Capítulo XIII Reprogramación de celulas diferenciadas al estado pluripotencial. Ediciones Buena Onda. México 2011
- 51.- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126(4):663-76.

- 52.- Liu X, Huang J, Chen T, Wang Y, Xin S, Li J, Pei G, Kang J. Yamanaka factors critically regulate the developmental signaling network in mouse embryonic stem cells. *Cell Res.* 2008; 18(12):1177-1189.
- 53.- Buganim Y, Faddah DA, Jaenisch. Mechanisms and Models of Somatic Cell Reprogramming. *Nature Rev Genetics.* 2013; 14: 427-439
- 54.-David L, Polo JM. Phases of reprogramming. *Stem Cell Research* 2014;12:754–761
- 55.- NCBI [en línea] “POU5F1 POU class 5 homeobox 1”. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5460>. [Mayo 2014]
- 56.- Pan GJ, Chang ZY, Schöler HR, Pei D. Stem Cell Pluripotency and Transcription Factor Oct4. *Cell Res.* 2002;12(5-6):321-9.
- 57.- Radziszewska A, Bin Chia GL, Dos Santos RL, Theunissen TW, C. Castro LF, Nichols J, R. Silva JC. A defined Oct4 level governs cell state transitions of pluripotency entry and differentiation into all embryonic lineages. *Nat Cell Biol.* 2013 June ; 15(6): 579–590
- 58.-Hansis C, Grifo JA, Krey LC. Oct-4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts. *Mol Hum Reprod.* 2000 Nov;6(11):999-1004
- 59.- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell.* 2005;122:947-956
- 60.-Niwa H. Molecular Mechanism to Maintain Stem Cell Renewal of ES Cell. *Cell Struct Funct.* 2001;26(3):137-148.
- 61.-Sarkar A. Hochedlinger K. The Sox Family of Transcription Factors: Versatile Regulators of Stem and Progenitor Cell Fate. *Cell Stem Cell.* 2013; 12(1): 15–30
- 62.-Cao Y. Regulation of germ layer formation by pluripotency factors during embryogenesis. *Cell Biosci.* 2013;3(1):15. doi: 10.1186/2045-3701-3-15.)

- 63.- Kishi M, Mizuseki K, Sasai N, Yamazaki H, Shiota K, Nakanishi S, Sasai Y. Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early Xenopus neuroectoderm. *Development*. 2000;127(4):791–800.
- 64.- Botquin V, Hess H, Fuhrmann G, Anastassiadis C, Gross MK, Vriend G, Schöler HR. New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev*. 1998;12(13):2073-2090.
- 65.-Keramari M, Razavi J, Ingman K, Patsch C, Edenhofer F, Ward C, Kimber S. Sox2 is essential for formation of trophoblast in the preimplantation embryo. *PLoS one*. 2010; 5(11):e13952. doi: 10.1371/journal.pone.0013952.
- 66.- NCBI [en línea] “NANOG Nanog homeobox”. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79923>. [Junio 2014]
- 67.- Fairbanks DJ. NANOG8: evolution of a human-specific retro-oncogene. *G3 (Bethesda)*. 2012 ;2(11):1447-57.
- 68.- Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res*. 2007;17(1):42-9
- 69.- Suzuki A, Raya A, Kawakami Y, Morita M, Matsui T, Nakashima K, Gage FH, Rodríguez-Esteban C, Izpisua Belmonte JC. Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(27):10294-10299.
- 70.- NCBI [en línea] “KLF4 Kruppel-like factor 4 (gut)”.Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9314>. [Junio 2014]
- 71.- Fujikawa J, Tanaka M, Itoh S, Fukushi T. Kruppel-like factor 4 expression in osteoblasts represses osteoblast-dependent osteoclast maturation. *Cell Tissue Res*. 2014DOI 10.1007/s00441-014-1931-8
- 72.- Aksoy I, Giudice V, Delahaye E, Wianny F, Aubry M, Mure M, Chen J, Jauch R, Bogu GK, Nolden T, Himmelbauer H, Xavier Doss M, Sachinidis A, Schulz H, Hummel O, Martinelli P, Hübner N, Stanton LW, Real FX, Bourillot PY, Savatier P. Klf4 and Klf5 differentially inhibit mesoderm and endoderm

differentiation in embryonic stem cells. *Nature*. 2014;
DOI:10.1038/ncomms4719

73.- Rowland BD, Peeper DS. KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(1):11–23.

74.- Chen X. Johns DC. Geiman DE. Krüppel-like Factor 4 (Gut-enriched Krüppel-like Factor) Inhibits Cell Proliferation by Blocking G1/S Progression of the Cell Cycle. *J Biol Chem*. 2001; 276(32): 30423–30428).

75.- Meyer N. Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nature Reviews Cancer*. 2008: 976-990 doi:10.1038/nrc2231

76.- Chappell J, Dalton S. Roles for MYC in the Establishment and Maintenance of Pluripotency. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Dec 1;3(12):a014381. doi: 10.1101/cshperspect.a014381.

77.- Alvarado-Moreno JA. Mayani H. El ciclo celular y su papel en la biología de las células progenitoras hematopoyéticas. *Gac Méd Méx*. 2007;143(2): 149-161.

78.- Blagosklonny MV. Parde AB. The Restriction Point of the Cell Cycle. 2002; *Cell Cycle* 1(2): 103-11.

79.- Chappell J, Dalton S. Roles for MYC in the Establishment and Maintenance of Pluripotency. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Dec 1;3(12):a014381. doi: 10.1101/cshperspect.a014381.

80.- Kannagi R, Cochran NA, Ishigami F, Hakomori S, Andrews PW, Knowles BB, Solter D. Stage-specific Embryonic Antigens (SSEA-3 and -4) are Epitopes of a Unique Globo-Series Ganglioside Isolated from Human Teratocarcinoma Cells. *The EMBO Journal*. 1983;12(12): 2355-2361

81.- Truong TT, Huynh K, Nakatsu MN, Deng SX. SSEA4 is a potential negative marker for the enrichment of human corneal epithelial stem/progenitor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Aug 11;52(9):6315-20

- 82.- Truong TT, Huynh K, Nakatsu MN, Deng SX. SSEA4 is a potential negative marker for the enrichment of human corneal epithelial stem/progenitor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Aug 11;52(9):6315-6320.
- 83.- Kawanabe N, Murata S, Fukushima H. Stage-specific embryonic antigen-4 identifies human dental pulp stem cells. *Exp Cell Res.* 2012 Mar 10;318(5):453-463.
- 84.- Afrikanova I, Kayali A, López A, Hayek A. Is Stage-Specific Embryonic Antigen 4 a Marker for Human Ductal Stem/Progenitor Cells? *Biores Open Access.* 2012 Aug;1(4):184-191.
- 85.- Truong TT, Huynh K, Nakatsu MN, Deng SX. SSEA4 is a potential negative marker for the enrichment of human corneal epithelial stem/progenitor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Aug 11;52(9):6315-6320.
- 86.- Kawanabe N, Murata S, Murakami K, Ishihara Y, Hayano S, Kurosaka H, Kamioka H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. Isolation of multipotent stem cells in human periodontal ligament using stage-specific embryonic antigen-4. *Differentiation.* 2010 Feb;79(2):74-83.
- 87.-Narayanan AS, Page RC. Biochemical characterization of collagens synthesized by fibroblasts derived from normal and diseased human gingiva. *The Journal of Biological Chemistry.* 1976, 251, 5464-5471.
- 88.- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
- 89.- Pan GJ, Chang ZY, Schöler HR, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Reserch.*2002; 12(5-6):321-329
- 90.- Kopp JL, Ormsbee BD, Desler M, Rizzino A. Small Increases in the Level of Sox2 Trigger the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cell.* 2008;26(4):903-911.

- 91.- Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem.* 2005;280(26):24731-24737
- 92.- Fong H, Hohenstein KA, Donovan PJ. Regulation of Self-Renewal and Pluripotency by Sox2 in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells.* 2008;26(8):1931-1938
- 93.- Rojo R. Flores A. Arcos M. Prevalencia, severidad y extensión de periodontitis crónica. *Rev Odont Méx.*2011;15(1):31-39.
- 94.- Marynka-Kalmani K, Treves S, Yafee M, Rachima H, Gafni Y, Cohen MA, Pitaru S. The Lamina Propria of Adult Human Oral Mucosa Harbors a Novel Stem Cell Population. *Stem Cells.* 2010 May;28(5):984-895.
- 95.- Fournier BP, Larjava H, Häkkinen L. Gingiva as a source of stem cells with therapeutic potential. *Stem Cells.* 2013;22(24):3157-77.
- 96.- Augello A, TB Kurth and C De Bari. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur Cell Mater.* 2010; 20:121–133.
- 97.- Chew JL, Loh YH, Zhang W, Chen X, Tam WL, Yeap LS, Li P, Ang YS, Lim B, Robson P, Ng HH. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(14):6031-6046.
- 98.- Wang X, Ji X, Chen J, Yan D, Zhang Z, Wang Q, Xi X, Feng Y. SOX2 enhances the migration and invasion of ovarian cancer cells via Src kinase. *PLoS One.* 2014;9(6):e99594. doi: 10.1371/journal.pone.0099594. eCollection 2014.
- 99.- Sun Q, Li J, Wang G, Xie Y. Role of the Embryonic Protein SOX2 in Cholangiocarcinoma. *Cell Biochem Biophys.* 2014. [Epub ahead of print]
- 100.- Lundberg IV, Löfgren Burström A, Edin S, Eklöf V, Öberg Å, Stenling R, Palmqvist R, Wikberg ML.. SOX2 Expression Is Regulated by BRAF and

Contributes to Poor Patient Prognosis in Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2014;9(7):e101957. doi: 10.1371/journal.pone.0101957. eCollection 2014.

101.- Basu-Roy U, Ambrosetti D, Favaro R, Nicolis SK, Mansukhani A, Basilico C. The transcription factor Sox2 is required for osteoblast self-renewal. *Cell Death Differ*. 2010;17(8):1345-1353.

102.- Seo E, Basu-Roy U, Zavadil J, Basilico C, Mansukhani A. Distinct functions of Sox2 control self-renewal and differentiation in the osteoblast lineage. *Mol Cell Biol*. 2011;31(22):4593-4608.

103.- Pan G, Thomson JA. Nanog and Transcriptional Networks in Embryonic Stem Cell Pluripotency. *Cell Res*. 2007;17(1):42-9

104.- Bais MV, Shabin ZM, Young M, Einhorn TA, Kotton DN, Gerstnefeld LC. Role of Nanog in the maintenance of marrow stromal stem cells during post natal bone regeneration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 417(1): 211–216.

105.- Hyslop L, Stojkovic M, Armstrong L, Walter T, Stojkovic P, Przyborski S, Herbert M, Murdoch A, Strachan T, Lako M. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells*. 2005;23(8):1035-1043.

106.-Bretones G, Delgado MD, León J. Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta*. 2014. pii: S1874-9399(14)00073-X. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.03.013

107.- Bennett MR, Littlewood TD, Hancock DC, Evan GI, Newby AC. Down-regulation of the c-myc proto-oncogene in inhibition of vascular smooth-muscle cell proliferation: a signal for growth arrest?. *Biochem. J*. 1994;302, 701-708.

108.- Corn PG, Ricci MS, Arsham AM, Simon MC, El-Deiry WS. Hypoxia causes downregulation of the c-Myc signaling pathway through proteasomal degradation of c-Myc and the transcriptional upregulation of Mad1 and Mxi1, repressors of c-Myc. *Amer Assoc Cancer Res*. 2004; 45

109.- ShenCN, Burke ZD, Tosh D. Transdifferentiation, Metaplasia and Tissue Regeneration. *Organogenesis*. 2004;1(2): 36-44.

110.-Krabbe C, Zimmer J, Meyer M. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells–acritical review. *APMIS*. 2005;113: 831–44.

111.- Kogiso T, Nagahara H, Otsuka M, Shiratori K,. Dowdy SF. Transdifferentiation of human fibroblasts into hepatocyte-like cells by defined transcriptional factors. *Hepatol Int*. 2013;7:937–944.