



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICA, ODONTOLÓGICAS Y
DE LA SALUD.

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA.

USO DE MICROARREGLOS DE EXPRESIÓN PARA DETERMINAR EL PAPEL BIOLÓGICO DE CEMP1.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
PRESENTA

MTRA. MERCEDES BERMÚDEZ CORTÉS

TUTORES

DRA. GABRIELA ELISA MERCADO CELIS
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM

DR. HIGINIO ARZATE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D.F. MARZO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

I. ABSTRACT	2
II. RESUMEN	4
III. INTRODUCCIÓN	6
1. FASE DE DESCUBRIMIENTO	9
1. ANTECEDENTES	10
1.1. CEMENTO RADICULAR	10
1.2. PROTEÍNA DEL CEMENTO 1	12
1.3. MICROARREGLOS	18
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. OBJETIVOS	24
5. METODOLOGÍA GENERAL	25
5.1. FASE DE DESCUBRIMIENTO	25
5.2. FASE DE VALIDACIÓN	29
5.3. ESTUDIOS FUNCIONALES	31
5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	34
6. RESULTADOS DE LA FASE DE DESCUBRIMIENTO	36
6.1. Sobreexpresión de CEMP1 en HGF	36
6.2. Preprocesamiento de datos	38
6.3. Análisis de componentes principales	39
6.4. Análisis de serie de tiempos	41
6.5. Análisis de expresión diferencial	41
6.6. Análisis funcionales	42
2. FASE DE VALIDACIÓN	47
1. RESULTADOS DE LA FASE DE VALIDACIÓN	48
1.1. Validación a nivel transcripcional mediante qRT-PCR	48
1.2. Validación a nivel traduccional mediante Western Blot	51
3. ESTUDIOS FUNCIONALES	53
1. HIPÓTESIS	54
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	54
3. CONTEXTO	55
4. OBJETIVOS	58
5. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS FUNCIONALES	59
5.1. Relación de CEMP1 con los transcritos validados	59
5.2. Búsquedas <i>in silico</i> de la amplificación de la región 16p13.3	60
5.3. Búsqueda <i>in silico</i> de la expresión de CEMP1 en cánceres humanos	62
5.4. Tamizaje de líneas celulares de cáncer para determinar la expresión de CEMP1 por medio de qRT-PCR y Western Blot	64
5.5. Ensayos de tumorigenicidad mediante formación de colonias en agar suave	65
4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	68
1. DISCUSIÓN	69
2. CONCLUSIONES	76
3. ABREVIATURA	78
4. TABLA SUPLEMENTARIA	81
5. BIBLIOGRAFÍA GENERAL	103

I. ABSTRACT.

Introduction: Cementum protein 1 (*CEMP1*) is involved in cell adhesion, cell differentiation, regulates the mineralization processes during cementogenesis, and selects progenitor cells from periodontal ligament.

Objective: To determine the gene expression profiling induced by *CEMP1* overexpression by non-osteogenic cells such as human gingival fibroblasts using microarray technology.

Methods: We performed microarrays (Human Gene 1.0 ST, Affymetrix) to identify differentially expressed transcripts between human gingival fibroblasts (HGF) and those that overexpress *CEMP1* (HGF/*CEMP1*). Data were analyzed using The Comprehensive R Archive Network and Partek software. To validate the results we used Taqman Gene expression assays for real time PCR (Applied Biosystems). For the functional analysis we used NIH DAVID and IPA.

Results: 1025 DE (differentially expressed) genes were obtained using a filter Fold Change of > 2 or < -2 and adjusted $p < 0.001$; 39 “functional clusters” were identified, and the most relevant are genes that regulate growth, tumorigenesis, apoptosis and genes that stimulate cell proliferation (*HOXA5*, *CDH1*, *CDH2*, *HBEGF*, *FGFR2*, *HMGB2* and *MET* were validated). Because of the expression profile and the functions found in analysis it was hypothesized that *CEMP1* could act as a proto-oncogene in cases where their expression is not regulated; for this reason we sought for the expression of *CEMP1* in 12 cancer cell lines (rhabdomyosarcoma: RH28, RD, SMS; Ewing sarcoma: A673; breast cancer: T47D, MCF7 MDAM, HS587T; prostate cancer: PC3, 22RV1; hepatocellular carcinoma: HEPG2; cervical epithelial cancer: HELA). All cell lines expressed *CEMP1* as showed by Taqman assay and Western blot. Soft agar assays showed that cells overexpressing *CEMP1* can live without extracellular matrix attachment.

Conclusions: Overexpression of CEMP1 increased the expression of genes that regulate growth and cell proliferation, decreased apoptosis related-genes, enable the cells to live without attachments and importantly this gene is expressed in cancer cell lines. These results suggest that CEMP1 could be an oncogene candidate. Partially supported by grants from DGAPA-UNAM: IT200414; CONACyT: 224081 and INMEGEN.

II. RESUMEN.

Introducción: La proteína de cemento 1 (CEMP1) está involucrada en adhesión celular, diferenciación, regula procesos de mineralización durante la cementogénesis y selecciona células progenitoras del ligamento periodontal.

Objetivos: Determinar el perfil de expresión génica inducido por la sobreexpresión de CEMP1 en fibroblastos gingivales humanos usando la tecnología de microarreglos de expresión.

Metodología: Realizamos microarreglos (Human Gene 1.0 ST, Affymetrix) para identificar transcritos diferencialmente expresados entre fibroblastos gingivales humanos (HGF) y aquellos que sobreexpresan CEMP1 (HGF/CEMP1). Los datos se analizaron usando The Comprehensive R Archive Network y Partek software. Para validar los resultados mediante qRT-PCR usamos Taqman Gene expression assays (Applied Biosystems). El análisis funcional se realizó empleando NIH DAVID e IPA.

Resultados: 1025 genes diferencialmente expresados (DE) se obtuvieron usando un filtro de Log Fold change de > 2 o < -2 y p ajustada < 0.001 . Se identificaron 39 clúster de función y los más relevantes son transcritos que regulan crecimiento, tumorigénesis, apoptosis y transcritos que estimulan proliferación celular (HOXA5, CDH1, CDH2, HBEGF, FGFR2, HMGB2 and MET todos validados). Debido al perfil de expresión y al análisis funcional se hipotetizó que CEMP1 podría actuar como oncogén en casos donde su expresión no está regulada; por esta razón se evaluó la expresión de CEMP1 en 12 líneas celulares de cáncer (rabdomyosarcoma: RH28, RD, SMS; sarcoma de Ewing: A673; cáncer de mama: T47D, MCF7, MDAM HS587T; cáncer de próstata: PC3, 22RV1; carcinoma hepatocelular: HEPG2; cáncer cervical: HELA). Todas las líneas celulares expresaron CEMP1 tanto en ensayos Taqman como en Western Blot.

Además, se realizaron ensayos de agar suave y se demostró que las células que sobreexpresan CEMP1 pueden vivir libres de anclaje.

Conclusiones: La sobreexpresión de CEMP1 incrementó la expresión de transcritos que regulan crecimiento y proliferación, disminuye la expresión de transcritos relacionados con apoptosis, posibilita a las células para vivir libres de anclaje y se expresa de manera importante en líneas celulares de cáncer. Estos resultados sugieren que CEMP1 podría ser un oncogén candidato. Parcialmente apoyado por DGAPA-UNAM: IT200414; CONACyT: 224081 e INMEGEN.

III. INTRODUCCIÓN.

La mayor problemática de la biología celular contemporánea es la necesidad de comprender la asombrosa complejidad y versatilidad de los sistemas vivos. Aunque al paso de los años la biología molecular ha tenido éxitos, es evidente que aun conociendo una vasta cantidad de genes, proteínas y metabolitos, éstos no son suficientes para entender la complejidad de la célula y menos aún para resolver los problemas relacionados con la falla de un sistema celular que desencadena enfermedades, las cuales por tanto, son difíciles de diagnosticar, pronosticar y tratar oportunamente.

De acuerdo al dogma básico de la biología molecular, el ácido desoxirribonucleico (ADN) es el depositario final de la complejidad biológica. De hecho, es ampliamente aceptado que el almacenaje de información, su procesamiento y la ejecución de varios programas celulares reside en distintos niveles de organización: el genoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma de la célula. Esta integración de diferentes niveles organizacionales lleva forzosamente a ver las funciones celulares como grupos de componentes heterogéneos que interactúan dentro de grandes redes¹.

A través de este enfoque, es imperativo mapear y medir detalladamente la dinámica celular, poniendo atención especial en el tiempo específico de cada proceso que forma parte de estas redes.

Aunque esta perspectiva de sistemas nos lleva de lo particular a lo universal, no hay que perder de vista que mirando desde ese enfoque general y gracias a las nuevas herramientas generadas en el campo biológico, se obtiene una mayor cantidad de información en menos tiempo; y que esta gran escala de datos debe ser procesada para poder interpretar y descubrir las funciones en las que moléculas específicas pueden estar participando. De este modo,

queda establecido que esta perspectiva general también es usada para generar hipótesis de manera delimitada, lo que ayuda a enriquecer y generar conocimiento.

Cabe destacar que el manejo de la información obtenida a través de las nuevas herramientas en genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica no se puede manejar fuera de un enfoque interdisciplinario, por ello es necesaria la contribución equitativa de biólogos, ingenieros, matemáticos, físicos y otros científicos para dar dirección y generar mayor conocimiento acerca de los sistemas vivientes.

Este trabajo trata precisamente de valerse de este nuevo enfoque y a partir de una visión general, generar información que ayude a caracterizar funcionalmente a la Proteína del Cemento 1 (CEMP1). Esto, mediante el uso de microarreglos para realizar perfiles de expresión de transcriptoma completo.

Dado que este estudio es “**generador de hipótesis**” se dividirá en cuatro partes, las dos primeras para obtener anotaciones funcionales de transcritos DE, la tercera para que una vez analizada la información anterior se dé lugar a la hipótesis y la cuarta corresponda al apartado de discusión y conclusiones:

1. Fase de descubrimiento: se describirán los antecedentes, planteamiento del problema, la justificación que da pie a este trabajo, objetivos y metodología general. También abarcará los resultados del pre-procesamiento, análisis de agrupamiento y análisis de expresión diferencial de los datos obtenidos de los microarreglos de expresión. Asimismo describirá las anotaciones funcionales obtenidas de los transcritos DE.
2. Fase de validación: Se describirán los transcritos seleccionados para ser validados y se evaluarán tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional con el fin de determinar sí los datos de los microarreglos son reproducibles.

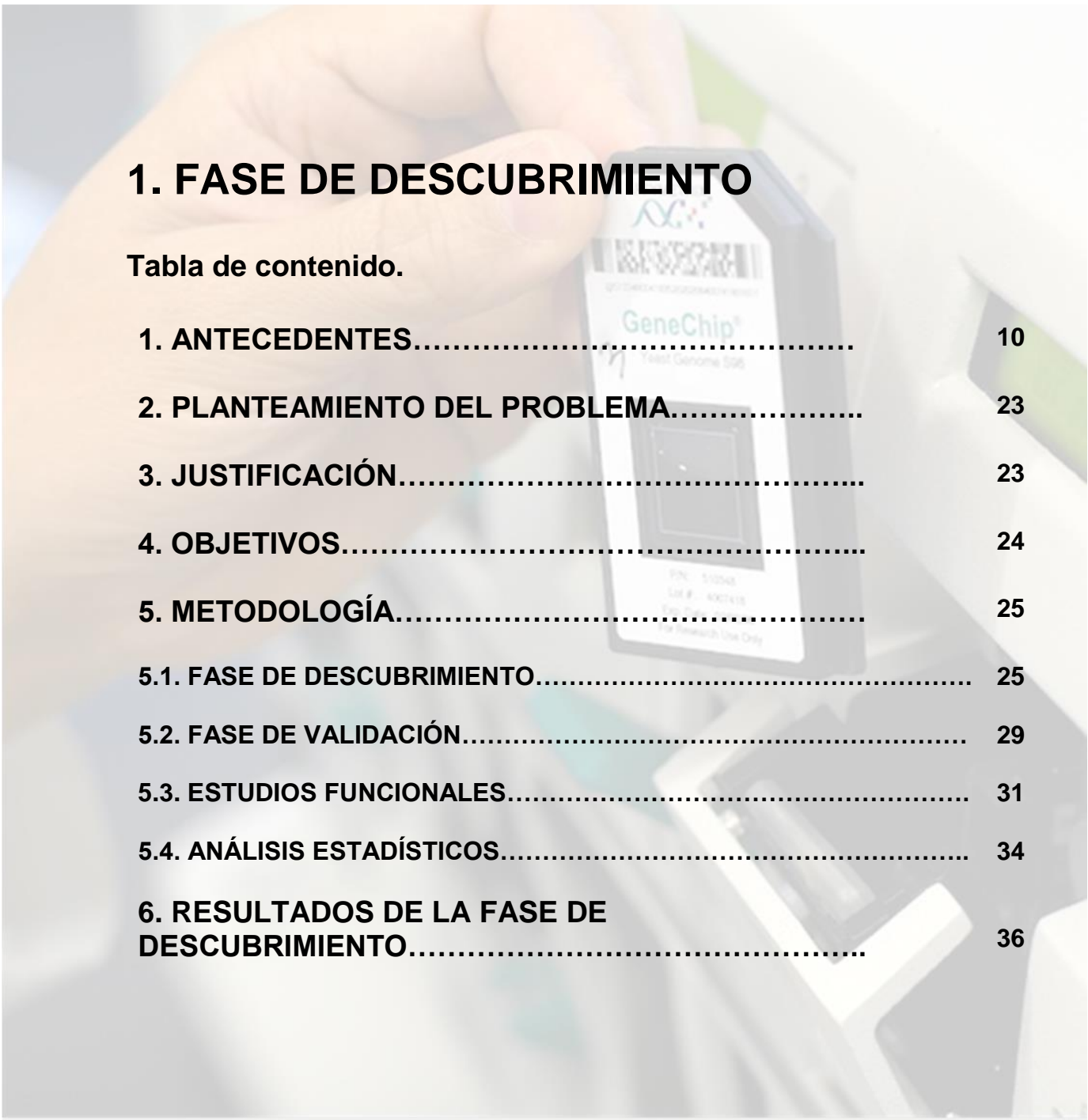
3. Estudios funcionales: abarcará la hipótesis generada a través de los resultados de la fase de descubrimiento y validación. Además, se describirá el planteamiento del problema y justificación. Se resumirá el contexto en el que cobra relevancia nuestra hipótesis, objetivos y resultados de los estudios utilizados para confirmar la hipótesis.
4. Discusión y conclusiones: Se realizará el análisis exhaustivo de los resultados de las fases anteriores.



1. FASE DE DESCUBRIMIENTO

Tabla de contenido.

1. ANTECEDENTES.....	10
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. OBJETIVOS.....	24
5. METODOLOGÍA.....	25
5.1. FASE DE DESCUBRIMIENTO.....	25
5.2. FASE DE VALIDACIÓN.....	29
5.3. ESTUDIOS FUNCIONALES.....	31
5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	34
6. RESULTADOS DE LA FASE DE DESCUBRIMIENTO.....	36



1. ANTECEDENTES

1.1. CEMENTO RADICULAR

El cemento radicular puede describirse como un tejido mineralizado que recubre las raíces de los dientes y su función es anclar el diente al hueso alveolar mediante fibras de colágena del ligamento periodontal²⁻⁹.

Los primeros acercamientos al estudio del cemento en las raíces de dientes humanos se atribuyen a Ringelmann en 1824, seguidas por los fisiólogos Jan Evangelista Purkinje y posteriormente por el histólogo clásico Anders Adolf Retzius en 1836¹⁰⁻¹².

Un dato importante es que en casi todas las especies de mamíferos el número de estructuras progresivas en el cemento dental (apositiones) puede ser correlacionado con la edad y son usadas tanto en estudios arqueológicos como forenses¹⁰.

El cemento radicular puede clasificarse basándose en la ausencia o presencia de células y la organización de las fibras colágenas como se presenta a continuación: cemento acelular afibrilar (se localiza en la unión dentina-esmalte, consiste de una matriz homogénea sin componentes celulares ni fibras colágenas), cemento celular con fibras intrínsecas (cubre la parte apical e interradicular de las superficies radiculares, donde hay presencia de cementocitos y fibras colágenas intrínsecas. Se cree que está involucrado en la reparación ya que se encuentra dispuesto también en zonas de trauma), cemento acelular con fibras intrínsecas (se sitúa en zonas apicales e interradiculares pero no contiene células)¹³.

Es un tejido conectivo especializado, mineralizado, que no presenta vascularización ni inervación y cubre la superficie de la raíz de los órganos dentarios. No presenta procesos de remodelación pero si un proceso de aposición constante. Además de mediar la inserción de las fibras del ligamento periodontal se encarga también de distribuir las fuerzas de la

masticación y es parte sustancial para que se dé la reparación de la superficie radicular. Estas funciones son afectadas por procesos inflamatorios e infecciosos como la periodontitis, la cual es considerada un problema de salud a nivel mundial. A pesar de la importancia que cobra, es un tejido pobremente definido a nivel celular y molecular, debido en parte, a su distribución y tan limitada.

Su constitución puede dividirse en un 50% de matriz inorgánica conformada por fosfatos de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ aunque también se encuentran trazas de magnesio, flúor, sodio, cobre, azufre y zinc¹³. El otro 50% es matriz orgánica, la cual está compuesta predominantemente por colágena tipo I y III, además de otras proteínas colágenas entre las que se encuentran las tipo V, VI y XII. También se conforma por proteínas no colágenas que participan en el proceso de mineralización, durante la formación de la raíz, como son la sialoproteína ósea (BSP), rna (DMP-1), sialoproteína dentinaria, fibronectina, osteonectina, osteocalcina, osteopontina, tenansina, proteoglucanos, proteolípidos y factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado del cemento (CGF)^{6,9,14} También se encuentran contenidas proteínas consideradas específicas de este tejido como son la proteína del cemento 1 (CEMP1)¹⁵ y la proteína de adhesión del cemento (CAP)¹⁶.

1.2. PROTEÍNA DEL CEMENTO 1 (CEMP1).

La proteína de cemento 1 (CEMP1) se aisló de una línea celular derivada de un cementoblastoma humano^{17,18}. Estas células producen una matriz extracelular mineralizada que es similar al cemento celular humano, sintetizan y secretan una proteína de ~50 kDa (proteína derivada de cementoblastoma, CP).

Un anticuerpo policlonal producido en conejo contra la CP reveló que esta proteína está distribuida a través de la longitud del cemento radicular (ambos acelular y celular) y en células progenitoras cementoblásticas tanto *in vivo* como *in vitro*¹⁵. Estudios posteriores donde se utilizó CP purificada e inducción con medio mineralizante sugieren que esta proteína promueve la adhesión de fibroblastos gingivales humanos, células del ligamento periodontal humanas, y células derivadas de hueso alveolar y promueve la expresión de la fosfatasa alcalina y la producción de matriz extracelular mineralizada en células mesenquimales embrionarias sin un fenotipo definido¹⁹.

También se comprobó mediante ensayos de inhibición *in vitro* utilizando el anticuerpo anti-CP sobre células cementoblásticas, que la CP regula las características morfológicas de la matriz extracelular mineralizada depositada *in vitro*, modificando las características composicionales de la relación Ca/P de los cristales de hidroxiapatita. Estos cambios parecen estar asociados con la expresión y función de la osteopontina, sialoproteína ósea y la fosfatasa alcalina²⁰.

Estos datos en conjunto, sugirieron que la CP juega un papel clave durante la mineralización de la matriz extracelular en la formación del cemento radicular.

Posteriormente se aisló, clonó, secuenció y caracterizó este gen, el cual fue nombrado de manera definitiva como Proteína del Cemento 1 (*CEMP1*) (GenBank Número de Acceso: NM_001048212; HGNC: ID 32553) que representa la especie CP²¹.

CEMP1 se encuentra en el cromosoma 16p13.3, su secuencia principal fue deducida de una secuencia de ADN complementario (2580036...2581409, cadena complementaria). El gen humano tiene un exón de 1374 pares de bases (pb) del cual codifican 744pb para dar un producto final de 247 aminoácidos. Tiene un peso molecular estimado de 26 KiloDaltons (kDa) y parece ser una proteína alcalina, además carece de péptido señal. La proteína *CEMP1* es rica en prolina (11.3%), glicina (10.5%), alanina (10.1%), serina (8.9%), leucina (8.1%), treonina y arginina (7.7%) y contiene trazas de triptófano, ácido aspártico, isoleucina (2.0%) y fenilalanina (1.6%). Carece de tirosinas. El análisis de su secuencia de aminoácidos da como resultado una localización nuclear, sin embargo no tiene motivos de unión a ADN. Los aminoácidos 30 a 110 muestran 48% de similitud con la colágena humana I α (cadena I), un 46% con la tipo XI y 40% con la tipo X.

El análisis de contenido de estructura secundaria de la proteína humana recombinante de *CEMP1* (hr*CEMP1*) por dicroísmo circular indica un 23% de alfa hélice, 13% de láminas beta y posee un alto valor de contenido de estructura organizada al azar (62.5%)²².

Se ha determinado que *CEMP1* es altamente expresada a niveles de proteína y ARNm en cementoblastos, subpoblaciones celulares del ligamento periodontal, así como en células progenitoras localizadas paravascularmente en el ligamento periodontal y en los espacios endosteales del hueso alveolar²¹.

Se ha relacionado a esta proteína con el proceso de biomineralización, particularmente con el cemento radicular, ya que hasta el momento se ha demostrado que es una molécula específica de este tejido

En el campo de la biomineralización se han realizado varios estudios que han mostrado que la sobre-expresión de CEMP1 en células de origen no esquelético u osteogénico como los fibroblastos gingivales humanos (HGF) produce cambios fenotípicos en éstas cuando son inducidas con un medio mineralizante, tales como la expresión a nivel transcripcional y traduccional de fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina (OCN) y sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN), proteína de adhesión del cemento radicular (CAP), factor de transcripción asociado a Runt (RUNX2) y CEMP1, proteínas asociadas al proceso de mineralización y al fenotipo cementoblástico/osteoblástico y las cuales no son expresadas por fibroblastos gingivales humanos²³. Estos resultados son consistentes con la posibilidad de que CEMP1 participa en el proceso de mineralización de cementoblastos putativos *in vitro*²⁴ y más importante aún, sugieren que induce la transdiferenciación de fibroblastos gingivales, células que habitualmente no mineralizan *in vivo* o *in vitro*, hacia un fenotipo cementoblástico/osteoblástico. Además, estas células mostraron incrementos en su proliferación y formación de nódulos mineralizados. Consistentemente, la proteína CEMP1 recuperada del medio condicionante de HGF transfectados con el gen *CEMP1* indican que esta posee una alta afinidad por la hidroxiapatita (ya que es eluída con 300 mM de NaH₂PO₄) y promueve la nucleación de cristales de hidroxiapatita²⁵. Además, en ensayos en sistemas libres de células se demostró que hrCEMP1 promueve la nucleación de cristales de fosfato octacálcico, que es precursor de la hidroxiapatita²⁶.

Se ha encontrado que CEMP1 es preferencialmente expresada en células ALP-positivas y la expresión de CEMP1 se reduce cuando las células del ligamento periodontal son cultivadas

bajo condiciones osteogénicas, por ejemplo, cultivadas con proteína morfogénica ósea (BMP2) o medio inductor osteogénico ^{27,28}. A pesar de que se ha reportado en cementoblastos la localización de CEMP1 en el núcleo, las células del ligamento periodontal exhiben intenso marcaje de CEMP1 solo en el citoplasma, indicando que la localización subcelular de CEMP1 cambia durante la diferenciación cementoblástica de células del ligamento periodontal. Además, la sobreexpresión de CEMP1 en células del ligamento periodontal incrementa marcadores cementoblásticos como CAP y BSP. Estos datos sugieren que CEMP1 selecciona células del ligamento periodontal, o progenitores celulares presentes en el ligamento periodontal, para diferenciarlos hacia el fenotipo cementoblástico ²⁸.

Se ha demostrado que CEMP1 estimula células del ligamento periodontal a proliferar en un material globular en 3D con características morfológicas y tinciones representativas de tejido cartílago y tipo cemento/hueso²⁹. Además, estas células fueron capaces de expresar colágena tipo II (COL2A1) y agrecano (ACAN) (marcadores para condrocitos pre-hipertróficos) ^{30,31}. La expresión de la proteína SOX9, un factor de transcripción que regula la diferenciación condrogénica en células creciendo en presencia de hrCEMP1 sugiere que CEMP1 promueve diferenciación condrogénica ²⁹. Lo anterior indica que CEMP1 podría ejercer un rol en la diferenciación de poblaciones celulares de células del ligamento periodontal, seleccionando células madre multipotentes que provee un reservorio único para diferenciarse hacia diversos fenotipos celulares ³², o como un inductor de las poblaciones celulares heterogéneas del ligamento periodontal teniendo un efecto sobre las células en varios grados de diferenciación.

Estudios sobre regeneración de cemento en un modelo canino que presenta necrosis de pulpa dental, demostraron la habilidad de CEMP1 para reclutar células madre mesenquimales del ligamento periodontal y promover proliferación y mineralización de estas células. Estudios *in vivo* de colocalización de células positivas a CEMP1 y al marcador 1 de superficie de células

estromales (STRO-1) adyacentes a áreas de la superficie radicular donde es depositado el nuevo cemento indican que las células responsables de la deposición de cemento reparativo son de origen mesenquimal ³³. *In vitro*, CEMP1 promueve la proliferación y migración de células del ligamento periodontal con el frente de migración comprendido por células STRO-1 positivas. Este estudio sugiere que CEMP1 es un mediador en reparación de heridas y regeneración periodontal dado que estimula la proliferación de células del ligamento periodontal y su migración³³. El rol de CEMP1 como quimioatrayente y como promotor de mineralización es además apoyado por los hallazgos de que la mineralización se reduce después de bloquear la función de CEMP1 *in vitro*. Además, en células derivadas de cementoblastoma, bloquear la actividad de CEMP1 disminuye la actividad de ALP y la expresión de BSP y OPN, sin alterar la proliferación celular ²⁰. Estos estudios también muestran que el calcio extracelular incrementa la expresión de CEMP1 y CAP en células madre del ligamento periodontal, a través de la vía de señalización de la MAPK, esto se ha confirmado usando un bloqueo de ERK-1 y ERK-e con ARN de interferencia lo cual reguló negativamente la expresión de PTPLA/CAP y CEMP1. Además el uso de bloqueadores de canales de calcio impide la expresión de PTPLA/CAP y CEMP1 demostrando el rol de los iones de calcio en la cementogénesis ³³.

Recientemente se han reportados resultados utilizando la estrategia de terapia génica que indican que el gen *CEMP1* promueve la neoformación de tejido mineralizado en defectos de tamaño crítico en calvarias de ratas Wistar. Este tejido muestra características histológicas y de densidad normales por lo que se demostró que hrCEMP1 estimula la formación y regeneración de hueso y que tiene potencial terapéutico para el tratamiento de defectos óseos y la regeneración de tejidos mineralizados³⁴.

A pesar de que el papel fisiológico de CEMP1 no ha sido completamente dilucidado a la fecha, todos estos datos muestran contundentemente que CEMP1 es una proteína única que tiene múltiples propiedades como inductor de mineralización, proliferación, diferenciación y maduración celular. Además, se sugiere que CEMP1 puede ser regulador de células madre mesenquimales presentes en el ligamento periodontal e inducir su diferenciación a través de diferentes vías. Estas propiedades lo postulan como un candidato para ser usado en terapias de regeneración periodontal y de tejidos mineralizados.

1.3. MICROARREGLOS.

Una limitante en el campo de la investigación es que no es posible indagar sobre un gran número de genes al mismo tiempo usando los métodos tradicionales. A la fecha, se han desarrollado nuevas y más poderosas tecnologías que incrementan substancialmente la velocidad y la cantidad de datos obtenidos en el campo de la investigación biológica³⁵. Estas nuevas estrategias dan la posibilidad de trabajar en el área biológica sin una presunción concebida, es decir, “libre de hipótesis”, y a partir de la información obtenida a gran escala y del cuidadoso análisis, generar nuevas líneas de investigación que den como resultado final el enriquecimiento del conocimiento de un área en particular.

Un microarreglo consiste en un gran número de moléculas ordenadas sobre un sustrato sólido de manera que formen una matriz de secuencias en dos dimensiones. Estos fragmentos de material genético pueden ser secuencias cortas llamadas oligonucleótidos, o de mayor tamaño, ADNc (ADN complementario, sintetizado a partir de ARN mensajero), o bien productos de PCR (replicación in vitro de secuencias de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa). A estos fragmentos de ADN de una sola hebra inmovilizados en el soporte, se les denomina a menudo “sondas”.

Los ácidos nucleicos de las muestras a analizar se marcan por diversos métodos (enzimáticos, fluorescentes, etc.) y se incuban sobre el panel de sondas, permitiendo la hibridación (reconocimiento y unión entre moléculas complementarias) de secuencias homólogas (figura 1). Durante la hibridación, las muestras de material genético marcadas, se unirán a sus complementarias inmovilizadas en el soporte del chip, permitiendo la identificación y cuantificación del ADN presente en la muestra (mutaciones, patógenos, etc.). Después, el

escáner y las herramientas informáticas nos permiten interpretar y analizar los datos obtenidos³⁶⁻⁴⁰.

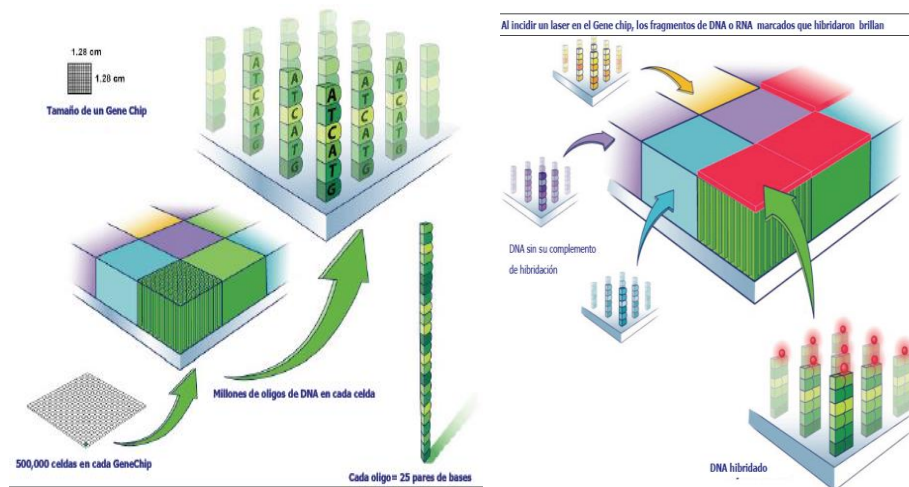


Figura 1. Los microarreglos son placas de vidrio, nylon o silicón donde se inmovilizan ordenadamente cientos o miles de sondas para el estudio del genoma. Esta técnica se basa en la hibridación anti paralela y complementaria del ADN sobre una base sólida, entre moléculas de ácidos nucleicos fijos o sondas (ADN, ADNc u oligonucleótidos) y su molécula complementaria proveniente de la muestra en estudio, la cual ha sido marcada. Tomada de <http://www.vsni.co.uk/software/genstat/htmlhelp/marray/AffymetrixChips.htm>

Los microarreglos pueden clasificarse de diversas formas, la figura 2 muestra de manera resumida las clasificaciones.

La técnica de detección de ácidos nucleicos no radiactiva más sensible hasta el momento es aquella que utiliza sondas de ADN marcadas con biotina y detectadas a través de conjugados enzimáticos de avidina. Además, para amplificar aún más la señal se puede acoplar una segunda enzima a la molécula de avidina y estreptavidina. Después del uso de la biotina como marcador indirecto, la digoxigenina es el marcador más utilizado en la actualidad⁴⁰.

	Características	Nombre	
Clasificación de los microarreglos según:	Material inmovilizado	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Oligonucleótidos. ▪ cDNAs. ▪ Proteínas. ▪ Tejidos 	<ul style="list-style-type: none"> • Gene Chips. • cDNA Array. • Protein Chip. • Tissue Chip.
	Diseño	Personalizado	Arrayers
		Industrial	Cassettes
	Fabricación	Densidad de integración	Alta: microarray
			Baja: macroarray
	Impresión	Generación de la sonda	<i>In situ</i>
depositadas			
Soporte/ tipo de unión	No poroso/ covalente	Soporte rígido (cristal, silicón)	
	Poroso/ no covalente	Membranas	
Aplicación	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Secuenciación por hibridación. ▪ Detección de cambios en la expresión génica. ▪ Cuantificación de la expresión génica. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Chips de secuenciación. ▪ Chips de hibridación comparativa ▪ Chips de expresión. 	

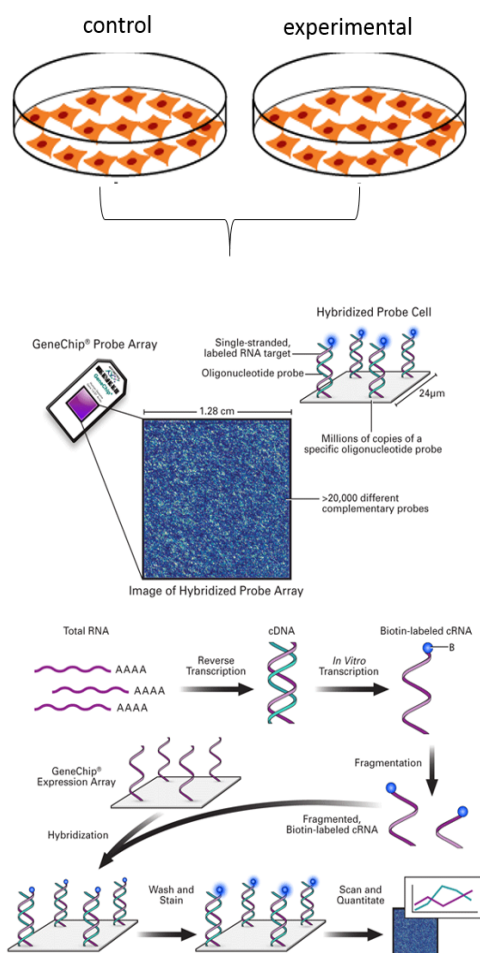
Figura 2. Clasificación de los microarreglos⁴⁰.

Una vez que se obtiene el escaneo del microarreglo, el análisis de los datos y la interpretación de los mismos mediante diversos programas bioinformáticos, es sin duda uno de los principales obstáculos en la utilización de la tecnología de microarreglos y biochips. Los avances en la capacidad de gestión y almacenamiento de las bases de datos son esenciales para mejorar la calidad de la información obtenida mediante técnicas de Explotación de Datos que permiten la elaboración de modelos de análisis como por ejemplo aquellos que agrupan genes o experimentos en función de diferentes patrones (“clustering”).

Dentro de las aplicaciones más comunes de los microarreglos se encuentran:

- 🌐 Monitorización de la Expresión Génica: El análisis de la expresión génica es útil en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades ligadas a patrones de expresión genética

particulares. Los microarreglos de ADN son especialmente útiles para la clasificación de tumores y la identificación de parámetros (marcadores) que permitan estimar el pronóstico de la enfermedad. Se puede estudiar la función de los genes al facilitar la identificación de aquellos genes activados, inhibidos o mutados (polimorfismos) de forma diferencial (análisis de expresión diferencial) cuando se comparan tejido sano y enfermo (figura 3).



Análisis de la expresión génica en sistemas modelo.

El uso de modelos biológicos proporciona gran cantidad de información y la posibilidad de comparar sus patrones genéticos de expresión. Estos experimentos se realizan con células o animales transgénicos que o bien sobre expresan genes específicos, o bien carecen de alguno de estos genes (mutaciones puntuales, knockouts, etc).

Análisis de la expresión génica en células y tejidos normales.

Si llegamos a caracterizar las secuencias homólogas de una familia génica, así como los procesos que desencadenan la expresión selectiva de sus genes, podremos diseñar fármacos que activen dicha expresión de manera específica, minimizando los efectos secundarios.


Análisis comparativo de la expresión génica en condiciones patológicas.

La regulación negativa o positiva de la expresión de un gen puede ser la causa de la patología o bien el resultado de la misma. Aunque el principal objetivo sea actuar sobre el gen cuya expresión causa la patología, también se busca modificar la actividad de alguno de los genes que se expresan como consecuencia de la enfermedad con el fin de aliviar sus síntomas. Por lo tanto, la posibilidad de comparar la expresión de miles de genes en tejidos o células enfermas y normales, permitirá la identificación de múltiples dianas terapéuticas potenciales.


Análisis de la expresión génica en patógenos.

Una de las ventajas que presenta el trabajo con genomas procedentes de microorganismos es su pequeño tamaño, lo que ha permitido la secuenciación de un gran número de ellos en poco tiempo. Entre sus genes se hallan los que codifican factores de virulencia que se encuentran regulados por agentes ambientales tales como la temperatura. Los microarreglos pueden ser aplicados igualmente en el estudio de la expresión de los genes virales durante el curso de la infección y periodo de latencia, así como en el estudio de la respuesta del organismo hospedador frente al patógeno.

Figura 3 Monitorización de la Expresión Génica ⁴⁰. Imagen armada, tomada de <http://www.weizmann.ac.il/> y <http://www.nature.com/scitable/content/cells-growing-in-a-tissue-culture-14264811>

 **Farmacogenómica:** los microarreglos permiten conocer mejor el mecanismo de acción de medicamentos, mejorando su eficacia y eficiencia; e incluso pueden determinar los efectos secundarios de un fármaco en desarrollo, evitando la entrada en ensayos

clínicos en caso de detectar toxicidad. La farmacogenómica pretende realizar una terapéutica individualizada al determinar el fármaco de elección para la manifestación específica de la enfermedad en el paciente, y la dosis apropiada para conseguir el efecto terapéutico minimizando el riesgo de reacciones adversas.

 Diagnóstico molecular: Los chips que se están desarrollando en la actualidad con aplicaciones en diagnóstico molecular son de distinta naturaleza: a) Chips para identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). La detección de mutaciones y polimorfismos permite el estudio de todas las variantes de un mismo gen, características de cada individuo, y la detección de mutaciones en genes que participan en enfermedades complejas. b) Chips de caracterización genética. Para elaborar un chip de diagnóstico y caracterización tumoral, se utilizan secuencias que contienen distintas mutaciones en protooncogenes o en genes supresores de tumor, cuya presencia en las células tumorales atribuye distintas características al tumor en cuestión. c) Chips de detección de enfermedades infecciosas. Actualmente existen varias líneas de desarrollo de chips para diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas, como el SIDA o la hepatitis, convergiendo todas ellas hacia la integración y facilidad de ensayo.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ya se ha demostrado de manera consistente que CEMP1 participa en el proceso de biomineralización, lo que lo hace un candidato potencial en la búsqueda de la regeneración de tejidos mineralizados; sin embargo, la falta de conocimientos acerca de la estructura del producto génico y los mecanismos de señalización que están involucrados en la regulación de su expresión son una limitante. Debido a que se considera ésta como una molécula cemento específica, no se ha indagado más acerca de qué otras funciones puede desempeñar. Por lo tanto el propósito de este estudio es investigar qué genes pueden interactuar o ver afectada su expresión cuando se sobreexpresa CEMP1 y de este modo saber más acerca de sus funciones biológicas.

3. JUSTIFICACIÓN.

El presente problema nos lleva a la necesidad de usar nuevas herramientas biotecnológicas que permitan determinar qué genes son regulados o interactúan con CEMP1. Una estrategia adecuada para este fin son los microarreglos de expresión de genoma completo ya que permiten evaluar los transcritos conocidos de un organismo, de manera que se integran un número mayor de datos en menos tiempo. Además, es una herramienta poderosa en el campo de la investigación biomédica, debido a que permite analizar diferentes tipos de muestras biológicas y miles de moléculas de manera simultánea por ensayo, a diferencia de lo que ocurre con otras técnicas de biología molecular (RT-PCR, PCR, Western Blot, Northern Blot, Southern Blot) en las cuales sólo se pueden analizar un número limitado de moléculas por ensayo.

La investigación de las funciones que desempeña *CEMP1* además de enriquecer el conocimiento que se tiene sobre su participación en los procesos de cementogénesis, también arrojará nueva información de gran importancia biológica no solo en el campo odontológico, sino el campo de la biología en general.

4. OBJETIVOS.

4.1. OBJETIVO GENERAL.

Determinar el efecto que la sobreexpresión del gen *CEMP1* ejerce en células no esqueléticas como son los HGF, así como los genes que son regulados durante el proceso.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar y validar grupos de transcritos DE entre los HGF transfectados con un vector vacío (HGF) y aquellos trasfectados con el gen de *CEMP1* (HGF/*CEMP1*).
2. Obtener anotaciones funcionales de los transcritos DE con el fin de determinar en qué funciones puede estar participando *CEMP1*.

5. METODOLOGÍA GENERAL.

5.1. Fase de descubrimiento.

Se utilizaron 3 réplicas biológicas de Fibroblastos Gingivales Humanos (HGF) y 3 de HGF transfectados con el gen *CEMP1* (HGF/*CEMP1*). Estos fueron cultivados independientemente a los 3, 7 y 14 días y los cultivos se sincronizaron para realizar la extracción del ARN mensajero (ARNm) el mismo día.

Se realizaron los microarreglos de ADN complementario (ADNc) utilizando los chips de expresión de Affymetrix Human Gene ST 1.0 (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) para la identificación diferencial de transcritos expresados por HGF y HGF/*CEMP1*.

A. Cultivo celular.

Se aislaron fibroblastos gingivales humanos como se ha descrito previamente⁴¹. Las células fueron utilizadas para la fase experimental entre el segundo y quinto pasaje. Las células se crecieron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% aire, con humedad del 100%.

B. Construcción del vector de expresión pcDNA40-*CEMP1* y transfección en células HGF.

Se clonó la región codificante del gen *CEMP1* (GenBank Accession No. NM_001048212) en el vector pENTR/SD/D (Invitrogen, Carlsbad, CA). El ADNc de esta construcción pENTR/SD/D-*CEMP1* se ligó al vector pcDNA40 (+) usando los sitios de restricción EcoR1. Este vector confiere resistencia a G418, para selección de clonas. El plásmido resultante, pcDNA40-*CEMP1* se transfectó en las células HGF usando lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA.) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las células control se transfectaron usando

el vector vacío pcDNA40 usando el mismo procedimiento. Dos días después de la expresión estable del producto de pcDNA40-*CEMP1*, las células HGF se seleccionaron usando 600 µg/ml de G418 (Sigma Chemical, Co. St. Louis, MO) durante ocho semanas. Las clonas positivas para el ADN introducido fueron monitoreadas por qRT-PCR usando los primers específicos para *CEMP1* (primer Forward: TGAGAACCTCACCTGCCTCT, primer Reverse: ACCCCTTAGGAAGTGGCTGT) y el kit SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para determinar la expresión relativa se utilizó el método $2^{-[\Delta] [\Delta] Ct}$ ⁴² y se utilizó a GAPDH como control endógeno (primer Forward: CAACGGATTTGGTCGTATTGG, primer Reverse: GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTAA). Para corroborar a nivel traduccional se utilizó Western Blot con anticuerpos policlonales anti-humano rhCEMP1 (producido en el laboratorio, 1:3000). Después de las ocho semanas, los cultivos expandidos de HGF que expresaban *CEMP1* de forma estable fueron mantenidas en medio DMEM suplementado de la forma descrita anteriormente.

C. Extracción de ARN

El ARN fue aislado de las células HGF y HGF/*CEMP1* usando RNeasy Mini Kit de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA, USA). El ARN fue cuantificado espectrofotométricamente (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) usando 2µl de muestra de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El radio de absorbancia a 260nm y 280nm se utilizó para evaluar la pureza del ARN, un radio de 1.8 a 2 fue aceptado. Para los microarreglos, la integridad del ARN extraído de HGF y HGF/*CEMP1* fue evaluado por electroforesis capilar usando RNA 6000 Nano Chip (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies). El ARN de las muestras con números de RIN (RNA integrity numbers) ≥ 7.0 fue usado⁴³.

D. Hibridación de los microarreglos y detección.

Las células HGF y HGF/CEMP1 se utilizaron a los 3, 7 y 14 días. Los microarreglos se corrieron para cada tiempo por triplicado, dando un total de 18. Todos los protocolos fueron desarrollados como se describe en The Affymetrix GeneChip Expression Analysis Technical Manual (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA). Brevemente, a partir de 200 ng de ARN total se sintetiza una primera hebra de ADNc utilizando la Superscript II transcriptasa reversa y los primers (hexámeros al azar) que incorporan la secuencia del promotor de T7. La síntesis de la hebra complementaria de ADNc se genera a partir del producto de la reacción anterior utilizando una ADN polimerasa. El ADN de doble cadena (dsADN) generado se utiliza para generar una hebra de ARN complementario mediante una reacción de transcripción *in vitro* donde se obtienen múltiples copias de ARN antisentido. Este ARN se usa como templado para una nueva síntesis de ADNc mediante una reacción de transcripción inversa donde a diferencia de la primera se incorporan dUTP's, nuevamente se utilizan primers con el promotor T7 y la Superscript II transferasa. Esta nueva cadena de ADNc se trata con uracil ADN glicosilasa y apurin apirimidin endonucleasa I (APE I) que reconoce específicamente los dUTP's presentes en la hebra, generando fragmentos de 40-70 nucleótidos. Los fragmentos se marcan mediante una reacción de adición de un deoxinucleótido terminal marcado con biotina. El ADN marcado se incuba a 95°C e hibridiza en los microarreglos Human Gene 1.0 ST microarray (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) por 17 ± 1 hr a 45°C. Los microarreglos se lavan con amortiguadores de alta y baja astringencia y se tiñen con estreptavidina-ficoeritrina. La fluorescencia se amplifica adicionando anti-estreptavidina biotinilada y una alícuota adicional de estreptavidina-ficoeritrina. Finalmente se utiliza un escáner confocal (Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G plus) para coleccionar la señal fluorescente a 3µm de resolución después de la

excitación a 570 nm. La media de los valores de la señal de dos escaneos secuenciales se calculó para cada microarreglo.

E. Preprocesamiento y análisis de datos de los microarreglos.

Los análisis estadísticos se realizaron usando el software R 2.15.1, Bioconductor (<http://bioconductor.org>) y Partek software v6.3 (© Partek corporation. St Luis, MO) Los datos derivados de estos microarreglos se depositaron en Gene Expression Omnibus (GEO número de acceso GSE53929) provisto por NCBI, (NIH, Bethesda, MD.) todas las muestras fueron normalizadas con RMA (Robust Multiarray Average)⁴⁴, que incluye corrección de fondo, normalización y cálculo de los valores de expresión. Después del preprocesamiento, se realizó el análisis de componentes principales (PCA) como un método no supervisado para determinar si había diferentes grupos fenotípicos identificables a los diferentes tiempos.

Los análisis de serie de tiempos se realizaron usando Bioconductor Time Course package ⁴⁵ (<http://www.bioconductor.org/>). El estadístico Hotelling's T^2 ⁴⁶ fue usado como clasificador métrico para identificar transcritos que presentan patrones de expresión temporal comparando HGF contra HGF/CEMP1⁴⁶.

El análisis de expresión diferencial entre HGF y HGF/CEMP1 fue realizado usando limma ⁴⁷. Los transcritos DE entre los dos grupos fueron seleccionados usando como criterio una diferencia de Log Fold Change (LogFch) absoluto entre los dos grupos con valores >2 o <-2 Se aplicó el método de Benjamini y Hochberg ⁴⁸ para identificar la tasa de falsos positivos (FDR), los transcritos con un valor ajustado de $p < 0.001$ fueron aceptados.

F. Análisis de enriquecimiento funcional.

Para obtener una interpretación confiable de los datos obtenidos de los microarreglos se utilizaron dos procedimientos separados de análisis de enriquecimiento. Se utilizaron IPA (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com) y DAVID (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)⁴⁹⁻⁵¹. Estas plataformas bioinformáticas fueron usadas para interpretar los datos de expresión génica en el contexto de procesos biológicos y vías. DAVID es un recurso bioinformático para mejorar el análisis de datos en la anotación funcional. Este programa es capaz de extraer el significado o las características biológicas asociadas a largas listas de genes. DAVID adopta una estrategia para mapear sistemáticamente un gran número de genes de interés de una lista sobre la anotación biológica asociada a dichos genes (por ejemplo, los términos GO), para luego resaltar estadísticamente las anotaciones biológicas sobre-representadas. Para corroborar y complementar la información, se utilizó la función de Core Analysis incluida en IPA a la lista de transcritos DE identificados en los análisis de microarreglos. Basado en la lista de transcritos subexpresados y sobreexpresados, IPA realiza un análisis funcional con el fin de identificar los procesos biológicos y funciones sobrerrepresentadas en una lista dada de transcritos. La significancia de las categorías enriquecidas se evaluó mediante el valor de p de la prueba exacta de Fisher.

5.2. Fase de validación

Con el fin de determinar si los resultados obtenidos en los microarreglos son reproducibles se eligieron transcritos que se mantuvieron constantes y que además se encontraron relevantes dentro de los análisis funcionales. Estos transcritos fueron validados a nivel transcripcional y traduccional.

A. qRT-PCR en tiempo real.

Seguido del análisis de microarreglos, se realizó una validación con qRT-PCR usando ARN de tres experimentos independientes con el fin de validar patrones de expresión para los transcritos seleccionados para validación. La primera cadena de ADNc fue sintetizada del ARN total (1µg) usando High Capacity ADNc Archive kit de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems de México, México). Se realizaron análisis de expresión con tecnología Taqman (Taqman gene expression assays Applied Biosystems de México, México). Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo con un volumen total de 10 µl y medidas con ABI ViiA•7 Sequence Detection System (Applied Biosystems de México, México) en placas de 384 pozos. El gen del ARN ribosomal 18S (ensayo Taqman Hs99999901_s1) fue usado como control endógeno. Las muestras se corrieron por triplicado y la media se utilizó para análisis posteriores. Los datos fueron analizados usando cuantificación absoluta (AQ). Los transcritos incluidos para validación fueron seleccionados por su relevancia biológica. Los números de ensayo Taqman para cada gen son CDH1 (Hs01023894_m1), CDH2 (Hs00983061_m1), FGFR2 (Hs01552926_m1), HBEGF (Hs00181813_m1), HMGB2 (Hs01127828_g1), MET (Hs01565584_m1) y HOXA5 (Hs00430330_m1).

B. Western blot

Para la validación de los transcritos seleccionados, se obtuvieron anticuerpos anti-CDH1, anti-CDH2, anti-FGFR-2, anti-HMG-1/2/3 (FL-215), anti-HB-EGF, anti-HoxA5, anti-c-Met y anti-GAPDH como control endógeno (Santa Cruz Biotech, CA, USA). Las células se desprendieron con gendarme en amortiguador de fosfatos salino (PBS), la muestra se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 minutos y el pellet se colocó con 50 µl de buffer de lisis (0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5 M PMSF, 10 mM de fluoruro de sodio, y Complete-EDTA

free (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO). La muestra se sonicó en un baño con hielo. Para el ensayo de Western Blot se utilizaron 10 µg de proteína que se mezcló 1:1 con buffer de carga 2x (20% glicerol, 4% SDS, 0.05% azul de bromofenol y 1.25 M Tris-HCl pH 6.8), la muestra se cargó en un gel al 10 o 12% SDS-PAGE y se corrió a 30V por 1 hora. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore) por 2 horas. Posteriormente, la membrana se bloqueó con 150 mM NaCl, 100mM Tris- HCl pH 7.8 (TBST) y 5% de leche descremada en polvo toda la noche a 4°C. Se lavó en tres ocasiones y se incubó con el anticuerpo primario (1:500). Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C y posteriormente se lavaron durante 3 ocasiones con TBST y se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. Las bandas inmunorreactivas se revelaron con diaminobencidina.

5.3. Estudios funcionales.

A. Relación de CEMP1 con los transcritos validados.

Para determinar qué transcritos podrían tener una relación directa con CEMP1 se decidió interferir su expresión en las células HGF/CEMP1 mediante secuencias de ARN de interferencia, las cuales fueron diseñadas mediante el software Invitrogen's RNAi designer. El protocolo para el silenciamiento génico mediante ARNi utilizado fue tomado del manual del usuario BLOCK-iT™ Pol II miR ARNi Expression Vector Kits, Gateway® -adapted expression vector for the expression of microARN (miARN) in mamalian cells under control of Pol II promoters Version D (Invitrogen, USA). Se crecieron bacterias de *E.coli* transformadas. Se realizó la purificación del plásmido ARNi de CEMP1. Para la transfección en células HGF/CEMP1 se usó Lipofectamina ARNiMAX Transfection Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las células transfectadas

(HGF/CEMP1/ARNi) fueron seleccionadas con DMEM conteniendo 12.5 µg/mL de blasticidina (Invitrogen Corp.). Para comprobar la efectividad de ARN de interferencia se realizó qRT-PCR y Western Blot tal como se indicó anteriormente.

B. Búsquedas *in silico* de la amplificación en la región 16p13.3.

Con el fin de determinar si CEMP1 podría estar sobreexpresado en cánceres humanos se decidió buscar primero si la región donde se encuentra gen codificante se ha reportado amplificada, se realizó una búsqueda bibliográfica que se enlista en la colección de NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/myncbi/1NUnbauTImrkz/collections/44911422/public/>. Además la información se resumió en una tabla conteniendo el tipo de cáncer donde se presenta la amplificación, el número de muestras y la metodología con la que se realizó el hallazgo.

C. Búsquedas *in silico* de la expresión de CEMP1 en cánceres humanos

Para determinar la expresión de CEMP1 en muestras tumorales humanas, se utilizaron bases de datos públicas de microarreglos de expresión (GEO <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, ArrayExpress <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>, TBROWSER <http://tagc.univ-mrs.fr/tbrowser/>, GENEVESTIGATOR <https://www.genevestigator.com/gv/>, RAD <http://www.cbil.upenn.edu/RAD>, SMD (<http://smd.princeton.edu/>), PEPR <http://microarray.cnmcresearch.org/pgadatatable.asp>, Yale Microarray Database (YMD) <http://medicine.yale.edu/keck/ynd/index.aspx>, DRAGON Database <http://pevsnerlab.kennedykrieger.org/dragon.htm>, Another MicroArray Database. AMAD <http://www.microarrays.org/AMADFaq.html>, SOURCE Search <http://smd.princeton.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>. Se utilizaron filtros de búsqueda en cada base de datos y se enlistaron los ensayos y el número de muestras que presentaron expresión de CEMP1. La lista

de datos de microarreglos que contienen información de CEMP1 en GEO profile puede consultarse en la colección de NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/myncbi/1NUnbauTImrkz/collections/44911422/public/>. Además se utilizó la base de datos de microarreglos de tejido The Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000205923/cancer>) que incluye muestras de 20 diferentes tipos de cáncer de 216 pacientes donde la localización de CEMP1 se realizó con el anticuerpo anti-CEMP1 (HPA057658, Sigma Chemical).

D. Tamizaje de líneas celulares de cáncer para determinar expresión de CEMP1 por medio de qRT-PCR y Western Blot.

Con el fin de verificar la expresión de CEMP1 en líneas celulares derivadas de cáncer se buscó su expresión mediante qRT-PCR usando el ensayo Taqman para CEMP1 Hs04185363_s1 (Applied Biosystems de México, México). El ensayo se realizó como se describe en la sección qRT-PCR en tiempo real. Para la búsqueda de expresión a nivel traduccional se utilizó Western Blot usando anticuerpo policlonal anti-huma rhCEMP1 (producido en el laboratorio, 1:3000) siguiendo el proceso que se describe en la sección de Western Blot. Las líneas celulares utilizadas son RH28 (rabdomyosarcoma alveolar), SMS, RD (rabdomyosarcoma embrionario), A673 (sarcoma de Ewing) PC3, 22RV1 (carcinoma de próstata), MCF7, T47D (carcinoma ductal de mama) HS578T, MDAMB28 (cáncer de mama), HEPG2 (carcinoma hepatocelular) y HELA (cáncer cervical epitelial).

E. Ensayos de tumorigenicidad mediante formación de colonias en agar suave.

La tumorigenicidad *in vitro* se determinó mediante formación de colonias en agar suave. Los ensayos fueron realizados por triplicado en tres ensayos independientes. Las células HGF, HGF/CEMP1 y HGF/CEMP1/ARNi fueron analizadas. Para la capa inferior se usaron 5 mL de DMEM suplementado con 10% de SFB con 1% de agarosa. Se tomaron 2 mL de agarosa al 1% y se mezclaron con 2mL de DMEM 10%SFB precalentado. Se colocó la mezcla en la placa de cultivo y se esperó algunos minutos hasta que la mezcla solidificó. Para la capa superior se colocaron 10000 células en 2mL de DMEM 10%SFB y 0.7% de agarosa. La agarosa conteniendo las células se colocó sobre la capa inferior y se esperó hasta que solidificara. Se mantuvo en la incubadora en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% aire, con humedad del 100%. Después de 3 semanas las colonias formadas fueron teñidas con 0.05% de cristal violeta en PBS. Se fotografiaron las colonias teñidas y se contabilizaron mediante el programa Open CFU 3.3 como se ha descrito previamente⁵².

Con el fin de validar si este estado tumorigénico era un fenómeno causado por CEMP1 se decidió utilizar una línea celular diferente. Se utilizaron fibroblastos embrionarios de ratón NIH3T3, los cuales fueron transfectados usando el mismo protocolo usado para transfectar las células HGF/CEMP1. Las células control también se transfectaron con el vector vacío quedando en dos grupos, NIH3T3 y NIH3T3/CEMP1. Antes de realizar los ensayos de agar suave se evaluó la expresión de CEMP1 tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional tal como se describió previamente.

5.4. Análisis estadísticos.

Los resultados fueron presentados como la media \pm desviación estándar. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con T de Student para comparar la expresión HGF vs

HGF/CEMP1 y NIH3T3 vs NIH3T3/CEMP1, así como la formación de colonias entre NIH3T3 vs NIH3T3/CEMP1. Para análisis de más de dos grupos se realizó ANOVA, seguido por la prueba de Dunnet contra el control o la prueba de comparaciones múltiples de Sidak sólo si el ANOVA fue significativo. La prueba de correlación de Spearman fue usada para examinar la relación entre la expresión a nivel transcripcional y traduccional de cada molécula usada para validación, así como para correlacionar patrones de expresión entre transcritos. El valor de r se consideró altamente positivo de .9 a 1, positivo de .7 a .9 y moderadamente positivo de .5 a .7⁵³. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$ a dos colas.

6. RESULTADOS DE LA FASE DE DESCUBRIMIENTO.

6.1. Sobreexpresión de CEMP1 en HGF.

Para confirmar que las células trasfectadas con el gen *CEMP1* expresan establemente su producto a nivel transcripcional y traduccional, se evaluó su expresión a los 0, 3, 7 y 14 días.

El qRT-PCR y Western Blot revelaron que la expresión de CEMP1 fue significativamente mayor en las células HGF/CEMP1 comparadas con las células HGF bajo las mismas condiciones de cultivo a los 3, 7 y 14 días habiendo un mayor nivel de expresión a los 7 días a nivel de transcrito y proteína (figura 4 A y B).

Un hecho sobresaliente es que después de la transfección, las células HGF/CEMP1 mostraron un fenotipo celular diferente al de las células HGF y cambiaron de ser fusiformes (fenotipo característico de fibroblastos), a tener una forma polihédrica o estrellada (figura 4 C). Además, al buscar marcadores de fenotipo fibroblástico en los datos del análisis de expresión diferencial, se encontró que la Vimentina (logFch -2.90617), la proteína de activación de fibroblastos (logFch -6.2116) y la pro-colágena I α 2 (logFch -6.5399) estaban subexpresados en las células HGF/CEMP1.

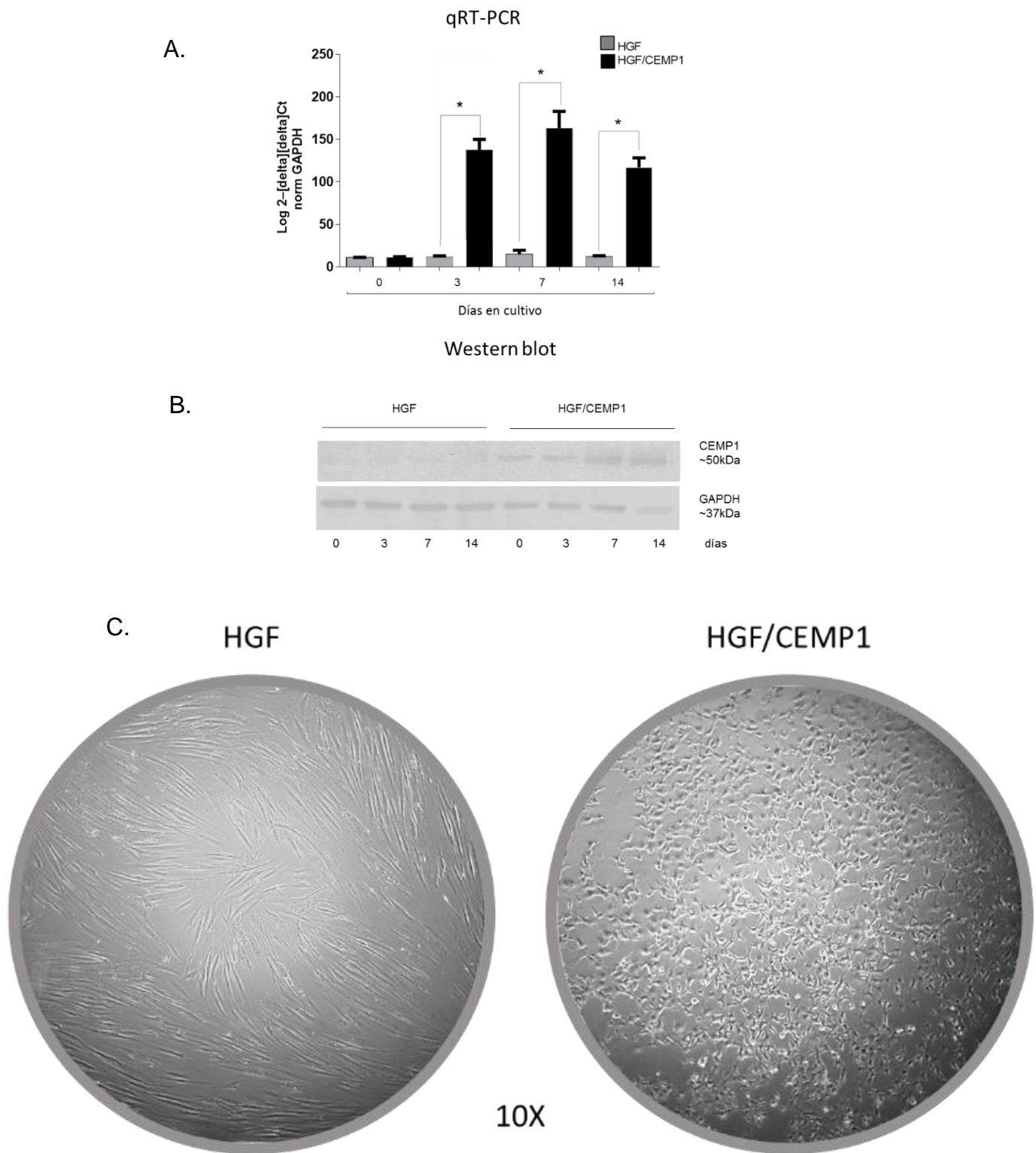


Figura 4. CEMP1 se sobreexpresa en las células HGF/CEMP1 comparándolas con el control, con una significancia de $P < 0.0001$. La sobreexpresión pudo comprobarse tanto a nivel transcripcional (A) como traduccional (B). Las células además, cambian su fenotipo después de la transfección (C).

6.2. Preprocesamiento de datos.

El ARN de HGF/CEMP1 y HGF fue extraído a los 3, 7 y 14 días y se utilizó para realizar la técnica de microarreglos de expresión en la plataforma Human Gene 1.0 ST. Estos chips contienen un total de sondas de 764,885 que interrogan 28,132 genes. Esta plataforma está basada en la secuencia del genoma humano de marzo de 2006 y cubre el 99% de las secuencias presentes en la base de datos RefSeq. Cada gen está representado aproximadamente por 26 sondas. El análisis de estas múltiples sondas es resumido en un valor de expresión que representa todas las transcripciones del mismo gen. Todas las muestras fueron normalizadas con RMA (Robust Multiarray Average). Este preprocesamiento de datos evitó que la variación no debida al experimento dificultara la obtención de resultados.

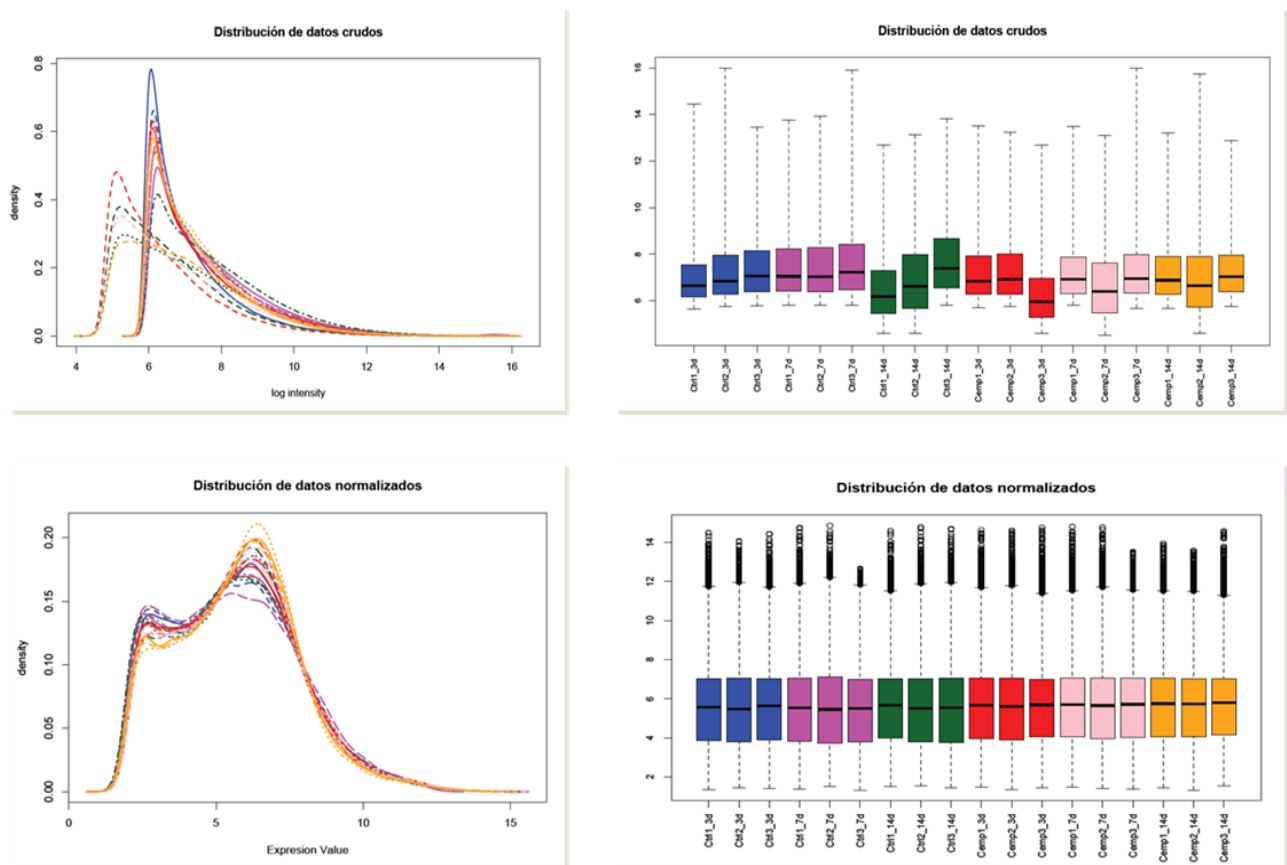


Figura 5. Después del escaneo y la obtención de los datos crudos de los 18 microarreglos, el preprocesamiento de datos antes del análisis de expresión diferencial, dio como resultado la normalización de los valores. Esto los hace comparables entre sí.

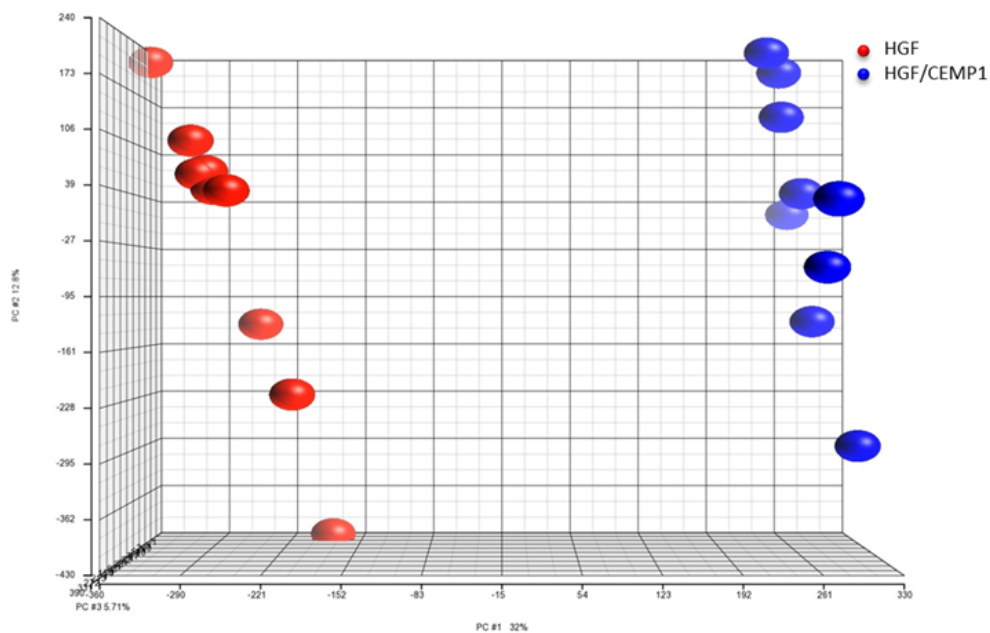
6.3. Análisis de componentes principales.

Se realizó el análisis de componentes principales (PCA) como un método no supervisado para determinar si había diferentes grupos fenotípicos identificables a los diferentes tiempos. PCA es una técnica utilizada para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos. Esta técnica sirve para hallar las causas de la variabilidad de un conjunto de datos y ordenarlas por importancia (a mayor parecido entre las muestras, más cercanas serán). En este análisis es evidente que los datos del grupo HGF/CEMP1 y HGF están totalmente separados, por lo que podemos inferir que hay una gran diferencia en cuanto a la expresión de transcritos (figura 6 A).

Cuando se realizó el análisis a los diferentes tiempos, la distribución de las réplicas por día no sigue un patrón definido, con lo que podemos inferir que no hay cambios sustanciales en expresión a través del tiempo (figura 6 B).

PCA HGF VS HGF/CEMP1

A.



PCA TIEMPOS

B.

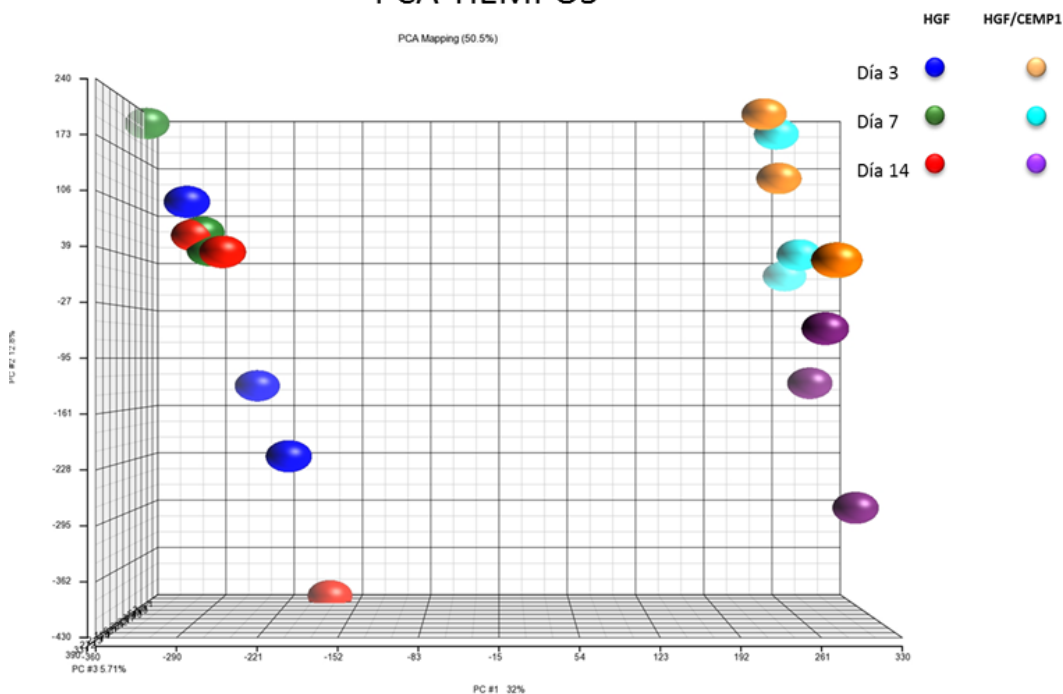


Figura 6. Análisis de componentes principales. A. Se realizó PCA entre HGF/CEMP1 y HGF con el fin de identificar diferentes grupos fenotípicos, los cuales son evidentes al observar que el grupo control y experimental están completamente separados. B. Al realizar el análisis para observar cambios identificables a los diferentes tiempos no se observan diferencias evidentes.

6.4. Análisis de serie de tiempos.

El estadístico Hotelling's T-cuadrada fue usado como clasificador métrico para identificar transcritos que presentan patrones de expresión temporal comparando HGF contra HGF/CEMP1. Los primeros 1000 transcritos que tienen el mayor cambio en su valor de LogFch fueron usados con el fin de verificar si hay cambios que nos hablen de alguna interacción a través del tiempo en el patrón de expresión. Los resultados que se obtuvieron de este análisis arrojaron que a los 3 diferentes tiempos no hay cambios en el patrón de expresión de estos transcritos, lo que podría sugerir que los cambios en el patrón de expresión se dan de manera temprana, en las primeras horas después de transfectar las células con el vector de expresión de CEMP1.

6.5. Análisis de expresión diferencial.

Ya que no se encontraron diferencias a lo largo del tiempo, se decidió reanalizar los datos y realizar análisis generales de los 18 microarreglos, separándolos en grupo control HGF y experimental HGF/CEMP1. Al realizar el análisis se obtuvieron gráficos de Volcano plot (figura 7), que son usados para identificar rápidamente cambios en sets de datos grandes. Éstos grafican la significancia o grado de confianza (log Odds) versus el LogFch. Estos gráficos nos dan la posibilidad de visualizar a qué valor de LogFch están los sets de datos que tienen una mayor significancia o grado de confianza, por lo que se decidió utilizar como filtro de búsqueda de transcritos un LogFch >2 o <-2 , con una p ajustada >0.001 .

Con este filtro se obtuvieron 1025 transcritos DE (806 subexpresados y 219 sobreexpresados) (Tabla suplementaria 1), ambos con respecto al control que fueron usados posteriormente para realizar el análisis por función.

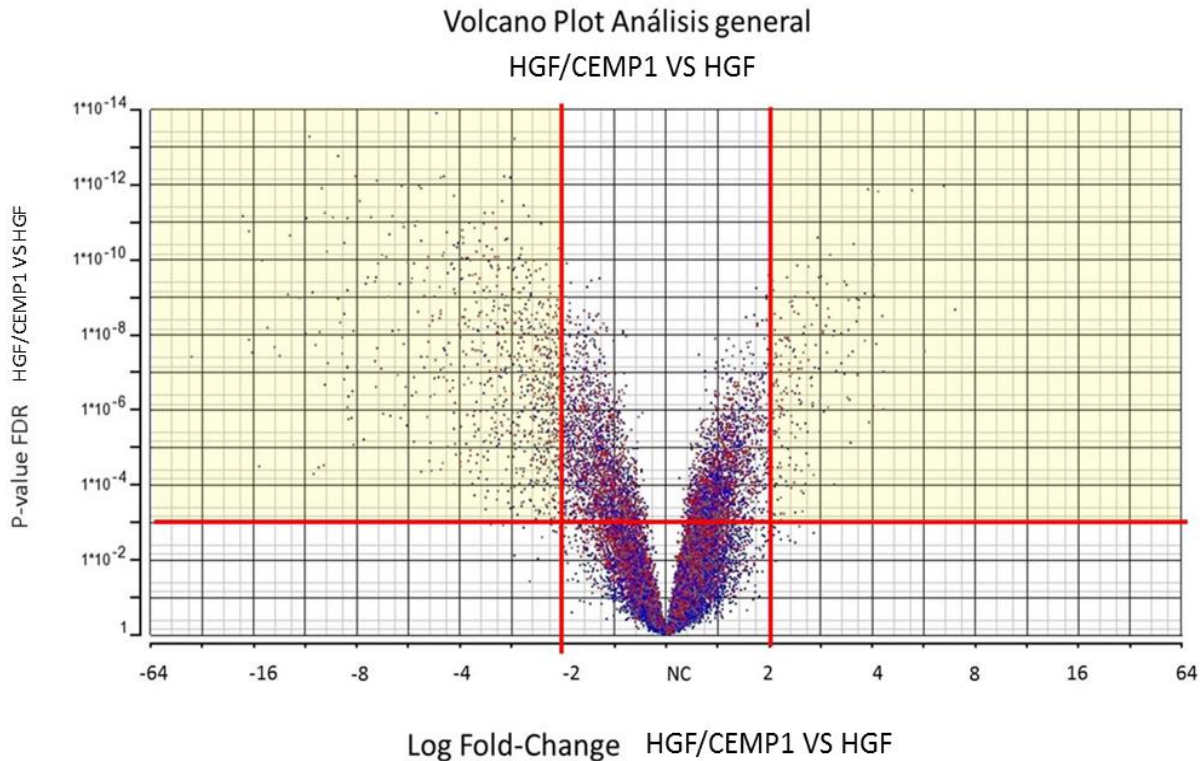


Figura 7. El volcano plot muestra de forma simple la representación de cada gen con un punto. En la zona sombreada se muestran los transcritos DE con mayor significancia (LogFch >2 o <-2, con un valor de P >0.001)

6.6. Análisis funcionales.

Se utilizaron DAVID e IPA. Con DAVID, 39 “clústeres” funcionales fueron identificados con un enrichment score mayor de 2. Entre los más relevantes se encuentran adhesión, proliferación y desarrollo embrionario. Además se encontraron 3 clústeres que agrupan transcritos relacionados con muerte celular, la mayoría de ellos subexpresados, pertenecientes a la vía intrínseca y extrínseca, y mayormente proapoptóticos. Debido a que la regulación de la apoptosis tiene gran significancia biológica, se buscaron transcritos clave en el proceso apoptótico aun cuando éstos no pasaran los filtros de selección. Se encontró que estos transcritos proapoptóticos estaban subexpresados. Lo anterior sugiere que CEMP1 podría regular negativamente el proceso de apoptosis (figura 8). Sin embargo, se necesita trabajo adicional para comprobar esta hipótesis.

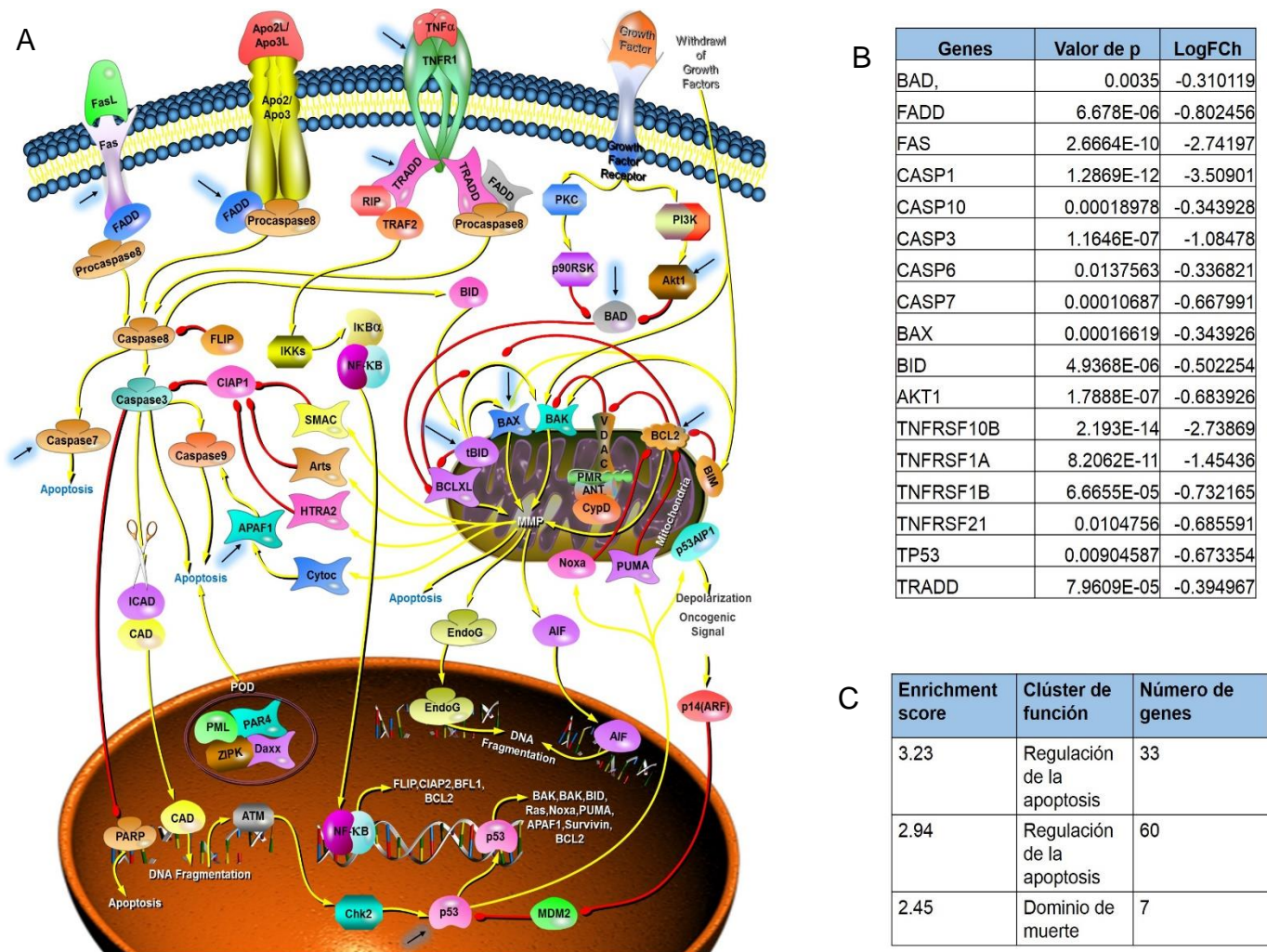


Figura 8. CEMP1 podría regular negativamente el proceso de apoptosis tanto por la vía extrínseca como por la intrínseca. Los transcritos que aparecen subexpresados en el análisis se muestran en el diagrama señalados con una flecha (A). Se enlistan genes proapoptóticos clave que se encuentran subexpresados cuando se sobreexpresa CEMP1 (B). Se enlistan los 3 clústeres que agrupan transcritos relacionados con muerte celular, la mayoría de ellos subexpresados, pertenecientes a la vía intrínseca y extrínseca, y mayormente proapoptóticos (C). Imagen modificada, tomada de http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=Cellular_Apoptosis_Pathway

También se utilizó IPA. Este programa al igual que DAVID reclutó a los transcritos en grupos funcionales, corroborando la información obtenida anteriormente. Los grupos se muestran en la tabla 1. Destacan grupos de función de desarrollo, crecimiento y proliferación y muerte celular.

Tabla 1. Análisis funcional. Se interpretaron los datos de expresión génica en el contexto de procesos biológicos y vías mediante IPA y DAVID.

Categoría	Valor de p	Transcritos
DESARROLLO CELULAR	4.4E-05-4.71E-02	PMEL, ABCB1, CLU, HBEGF, FGFR2, TPD52, HES1 (incluye EG:15205), MET, STAT4, BNIP3, F11R, CDH1, CDH2, B4GALNT1, TFAP2A, HOXA5, NEO1, EPCAM, FKBP5, CXADR, CHD7, ELOVL7, HMGB2, NCAM1
CRECIMIENTO CELULAR Y PROLIFERACIÓN	4.4E-05-4.71E-02	IL1RL1, POLA1, CLU, GPC4, HES1 (incluye EG:15205), HOXA9, BNIP3, PLCE1, TFAP2A, MCAM, HOXA5, NEO1, MYBL2, SERPINA1, FKBP5, ELOVL7, DTL, PMEL, ABCB1, PDZK1, FGFR2, HBEGF, BAMBI, TPD52, CDK1, MET, F11R, MAD2L1, ANKRD1, CDH1, CDH2, HABP2, TES, CKS1B, SPINT2, EPCAM, AK4, VAMP8, CXADR, HMGB2
MUERTE CELULAR	7.82E-05-4.71E-02	REPS2, TRIM24, CLU, HES1RBP1, BNIP3, TFAP2A, MCAM, KRT18, HOXA5, EGLN3, MYBL2, FKBP5, S100A1 (incluye EG:20193), DEPTOR, ABCB1, PDZK1, DAPK1, TOPBP1, FGFR2, HBEGF, MALT1, TPD52, CDK1, MET, MAD2L1, CDH1, CDH2, ANKRD1, DSG2, NCAM1
CICLO CELULAR	1.16E-04-3.94E-02	ABCB1, H19, TOPBP1, KRT7, POLA1, CLU, FGFR2, HBEGF, HES1 (incluye EG:15205), PDK3, CDK1, MET, MAD2L1, CDH1, CKS1B, MYBL2, CHRDL1, DTL
METABOLISMO DE LÍPIDOS	1.9E-04-4.71E-02	LIPH, ABCB1, PIK3C2B, SLC27A2, EEF1A2, CLU, SLCO2A1, RBP1, B4GALNT1, PLCE1, ELOVL2, NEO1, SERPINA1, AGPAT9, FKBP5, PTGR2, ELOVL7
MORFOLOGÍA CELULAR	3.79E-04-4.71E-02	S100A1 (incluye EG:20193), MET, BNIP3, F11R, MAD2L1, CDH1, KRT18, HBEGF, CXADR, HOXD10, NCAM1
INTERACCIONES Y SEÑALIZACIÓN CÉLULA-CÉLULA	3.79E-04-3.94E-02	MET, MAD2L1, CDH2, CDH1, MCAM, NEO1, HBEGF, EPCAM, DHFR, DSG2, CXADR, NCAM1
COMPROMISO CELULAR	3.79E-04-1.6E-02	MAD2L1, ABCB1, CDH1, CDH2, KRT18, MCAM, CLU, HBEGF
MOVIMIENTO CELULAR	3.79E-04-4.71E-02	PIK3C2B, CLU, FGFR2, HBEGF, CDK1, HOXD10, MET, F11R, CDH2, CDH1, TFAP2A, MCAM, EPCAM, NEO1, SERPINA1, CXADR, HMGB2
REPLICACIÓN, RECOMBINACIÓN Y REPARACIÓN DE ADN	3.34E-03-4.71E-02	MAD2L1, BNIP3, ABCB1, IQGAP2, DAPK1, TOPBP1, KRT7, POLA1, CLU, CDK1
METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS	3.35E-03-4.71E-02	PIK3C2B, ABCB1, LIPH, B4GALNT1, PLCE1, EEF1A2, GCNT2, NEO1, HBEGF, ALDOC
ENSAMBLE Y ORGANIZACIÓN CELULAR	3.35E-03-4.71E-02	PMEL, DAPK1, CLU, HBEGF, BNIP3, CDH1, KRT18, MCAM, TINAGL1, SNX10, SIK1, VAMP8, CXADR, HOOK1, SEMA7A, NCAM1
METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS	8.01E-03-8.01E-03	SLC17A7, DHFR
SEÑALIZACIÓN CELULAR	8.01E-03-2.39E-02	MET, SLC24A2, IQGAP2, HBEGF, CDK1
RESPUESTA CELULAR A TERAPIAS	8.01E-03-8.01E-03	MET
METABOLISMO DE FÁRMACOS	8.01E-03-3.17E-02	ABCB1, SLCO2A1, DHFR, FKBP5, ELOVL7
ELIMINACIÓN DE RADICALES LIBRES	8.01E-03-8.01E-03	CLU
EXPRESIÓN GÉNICA	8.01E-03-8.01E-03	TFAP2A, CDK1
TRANSPORTE MOLECULAR	8.01E-03-3.94E-02	GABRQ, S100A1, PIK3C2B, ABCB1, SLC24A2, PDZK1, ATP1B1, EEF1A2, SLCO2A1, NXF3, B4GALNT1, SLC17A7, CDH17, MYO5B, GABRA1, HOOK1
METABOLISMO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	1.33E-02-1.6E-02	IQGAP2, PDZK1, CDK1
PRODUCCIÓN DE ENERGÍA	1.6E-02-1.6E-02	SLCO2A1

Asimismo, a través de la lista de transcritos DE se obtuvo un mapa de calor que muestra en color la predicción de la función o enfermedad que se presenta en la muestra de acuerdo a los genes sobre o subexpresados y categoriza de mayor a menor tamaño la función o enfermedad de acuerdo a un score Z y valor de p. Este mapa va de un rango de color naranja que significa que la función predicha se está afectando positivamente (la función está activa) a un color azul que indica que la función predicha está siendo inhibida. De acuerdo a los transcritos sub y sobreexpresados la enfermedad predicha es Cáncer (valor de p $1.62E-41$ - $1.98E-06$, 599 transcritos de los cuales 141 están sobreexpresadas). Además, se destacan funciones predichas como activas, entre ellas crecimiento celular y proliferación ($2.58E-28$ - $2.05E-06$, 323 transcritos), y desarrollo celular ($6.27E-19$ - $1.56E-06$, 285 transcritos). Dentro de las funciones predichas como inhibidas vuelve a destacar muerte celular ($1.29E-26$ - $1.99E-06$, 292 transcritos). El mapa de calor y los gráficos con la información del análisis funcional se presentan en la figura 9. La función de IPA, Regulator Effects algorithm, conecta reguladores río arriba, transcritos de los sets de datos y funciones o enfermedades río abajo. El regulador río arriba con mayor score fue CTNNB1, esta catenina-beta es una parte integral de la vía canónica Wnt. Otra molécula con un score alto fue el factor de transcripción E2F1, el cual media proliferación y apoptosis.

Dentro del análisis se muestran transcritos que se mantienen presentes en más de una categoría y que además son consistentes tanto en DAVID como en IPA. Además, estas transcritos están relacionadas con oncogénesis, proliferación y crecimiento celular, muerte celular y desarrollo embrionario. Por lo tanto, dado su interés biológico, CDH1, CDH2, FGFR2, HBEGF, HMGB2, HOXA5 Y MET se eligieron para realizar la fase de validación.

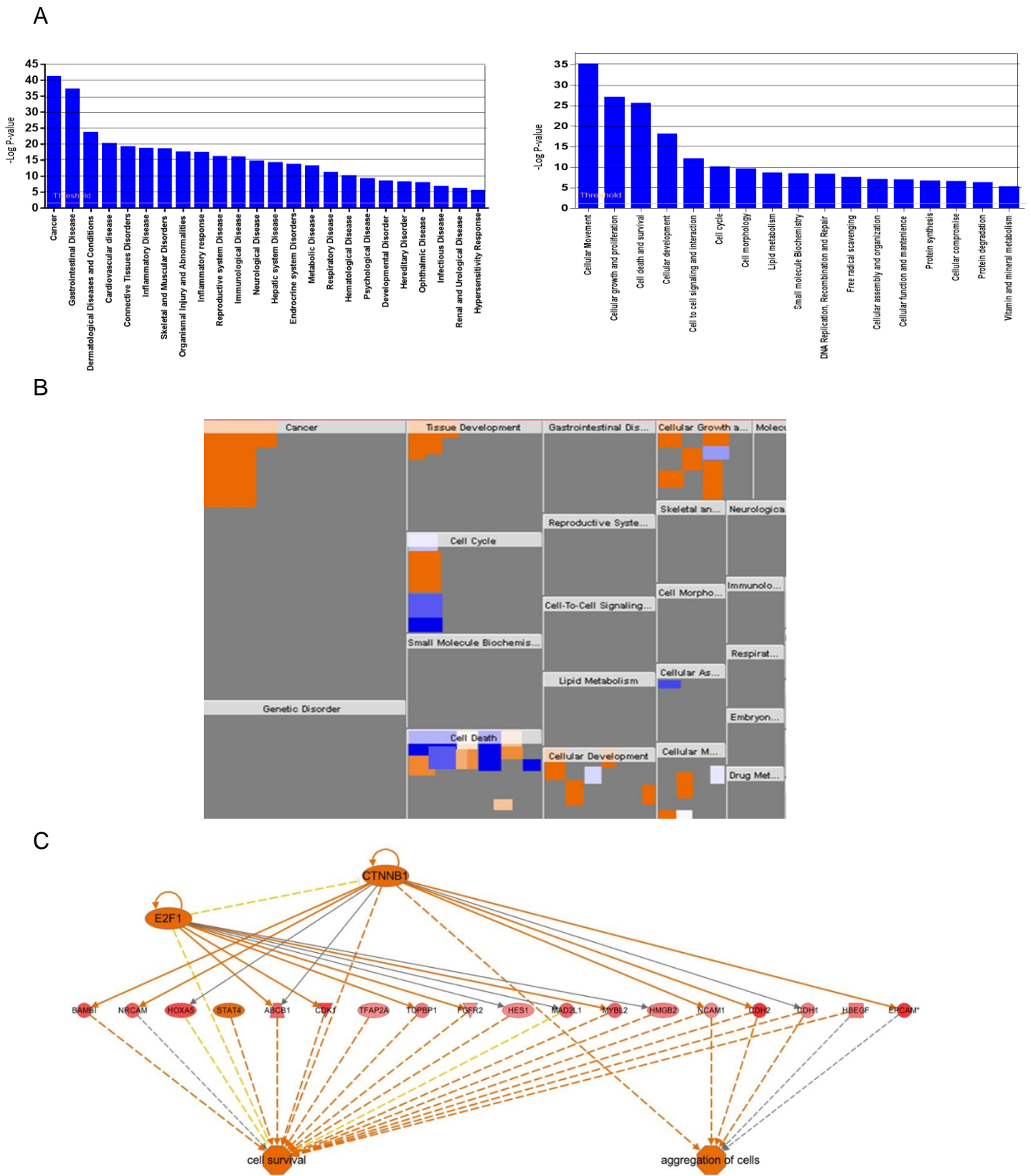


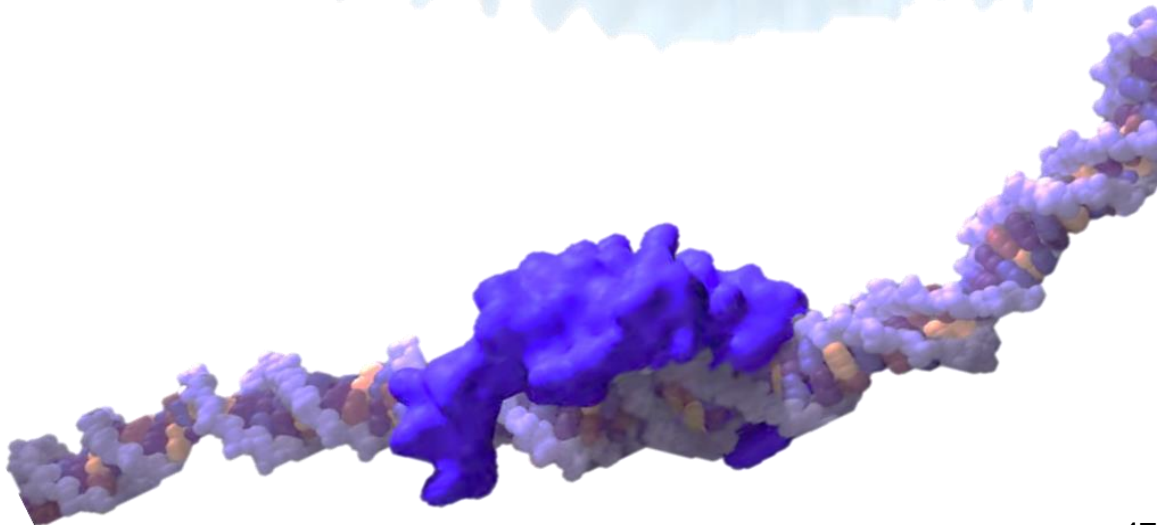
Figura 9. A. Análisis con IPA predice enfermedades o funciones de acuerdo a los transcritos diferencialmente expresados. B. En el mapa de calor, cáncer es el grupo predominante y de nuevo aparecen funciones como crecimiento celular y proliferación, muerte celular, supervivencia y desarrollo celular. C. Se muestran los reguladores río arriba con los mayores scores.



2. FASE DE VALIDACIÓN.

Tabla de contenido.

1. RESULTADOS DE LA FASE DE VALIDACIÓN.....	48
1.1. VALIDACIÓN A NIVEL TRANSCRIPCIONAL.....	48
1.2. VALIDACIÓN A NIVEL TRADUCCIONAL.....	51



1. RESULTADOS DE LA FASE DE VALIDACIÓN.

1.1. Validación a nivel transcripcional mediante qRT-PCR.

Se realizó un ensayo independiente para validar los resultados de los microarreglos buscando la expresión de los transcritos que se eligieron en los análisis funcionales, éstos fueron seleccionados ya que se mantuvieron constantes durante los diferentes análisis y sobre todo por su importancia biológica. Además de que están sobreexpresados en el análisis general, están involucrados en oncogénesis, proliferación y crecimiento celular, muerte celular y desarrollo embrionario.

Como se mencionó antes, el análisis de serie de tiempos no arrojó ningún patrón de expresión que nos indicara diferencias en los tiempos elegidos para el estudio (3, 7 y 14 días), por lo tanto, se especuló que era posible que los cambios en expresión se dieran a tiempos más cortos. De este modo, con el fin de obtener más información al respecto de en qué momento se presentan los cambios en la expresión se utilizaron 3 réplicas biológicas de HGF y 3 de HGF/CEMP1. Estos fueron cultivados a la 0, 3, 6, 12, 24 y 48 horas y a los 3, 7 y 14 días. El ARN total fue extraído y se usó para obtener el ADNc para ensayos de qRT-PCR con tecnología Taqman para los transcritos más relevantes, los cuales son enlistados en la tabla 2.

Se logró demostrar en un experimento independiente que estos transcritos se expresan con un patrón similar, lo que indica que los resultados de expresión obtenidos en los microarreglos son reproducibles utilizando un segundo método. Es evidente que el cambio en la expresión de los transcritos validados se da en las primeras horas después de la transfección y que hay un pico de expresión máximo a los 3 días en la mayoría de los transcritos a excepción de

HOXA5 que mostró su mayor expresión a las 24 horas (figura 10). CDH1 mostró un patrón de expresión que se correlaciona de manera altamente positiva al patrón de CEMP1 ($r = 0.93$).

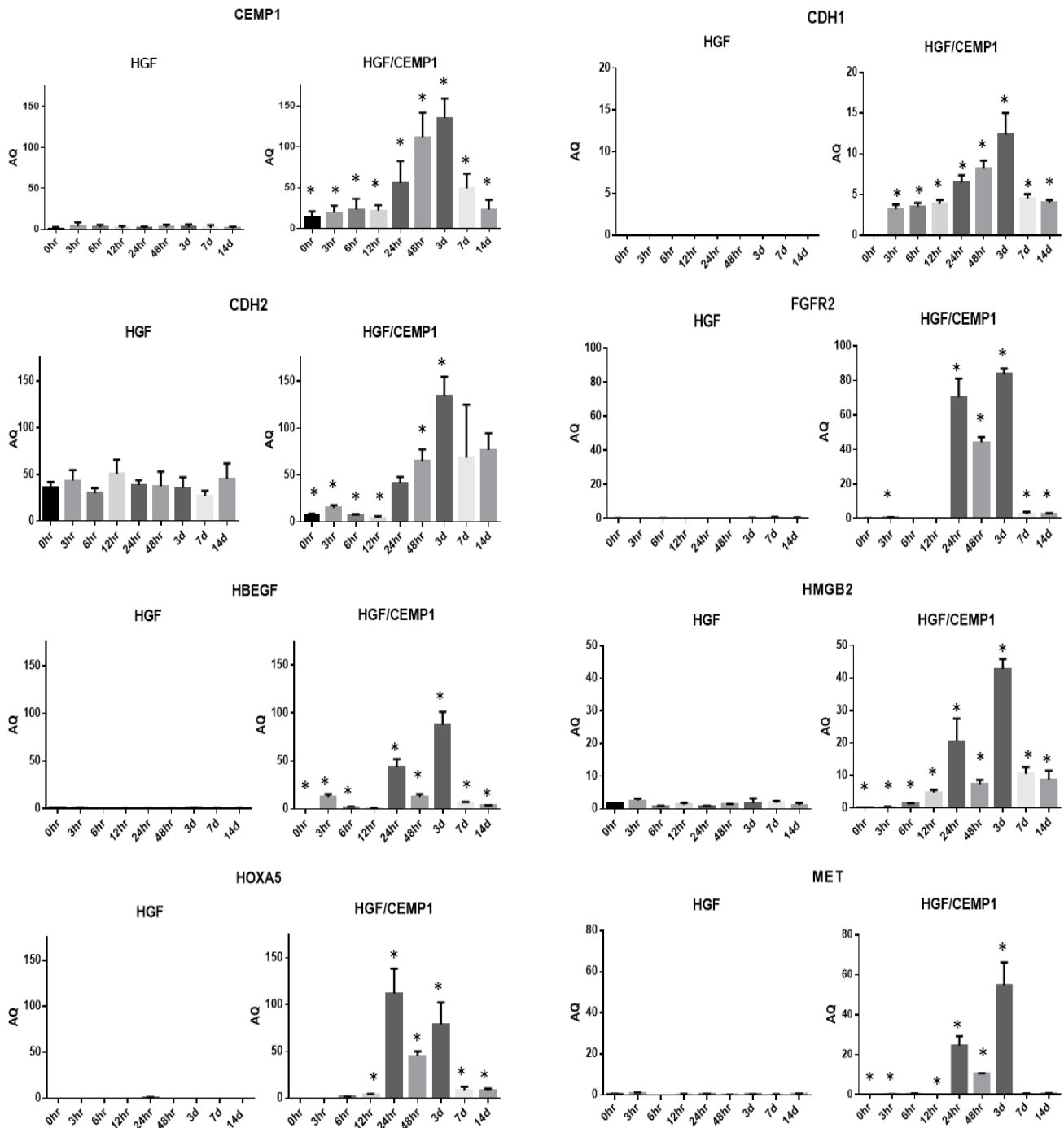


Figura 10. Validación de transcritos elegidos usando qRT-PCR. Se muestra un patrón de expresión que concuerda con el patrón de expresión mostrado en los datos de los microarreglos. Los transcritos se sobreexpresan en HGF/CEMP1 comparando contra el control. Valor de $p < 0.0001$.

Tabla 2. Transcritos sometidos a validación.

Descripción
<p>CDH1 y CDH2.</p> <p>Las cadherinas son una familia de proteínas transmembrana dependientes de calcio. Éstas intervienen en el reconocimiento celular, la morfogénesis del tejido y la supresión de tumores.⁵⁴ Las cadherinas tienen un dominio extracelular largo, que une de manera homofílica a las cadherinas sobre una célula adyacente. La CDH1 es el miembro típico de estas moléculas de adhesión dependientes de Ca²⁺ que median la adhesión célula-célula. Las cadherinas E se encuentran en epitelio promoviendo uniones adherentes célula-célula (CDH1). En contraste, la CDH2 se encuentra inicialmente en tejido neural y fibroblastos, donde se ha propuesto que median una adhesión célula-célula de forma más dinámica y menos estable. El dominio citoplásmico interacciona con moléculas intracelulares denominadas cateninas, las cuales unen el dominio citoplásmico de las cadherinas con las fibras de actina del citoesqueleto mediando integridad estructural, polaridad celular y morfogénesis epitelial. Una mutación en la CDH1 o en las cateninas, trae como consecuencia una disfuncionalidad que impide la formación del complejo cadherina-cateninas, eliminando la adhesión celular.</p> <p>La pérdida de expresión o función de la CDH1 en carcinomas epiteliales ha sido considerada como la razón de la progresión de tumores a un estado invasivo metastático. Esto puede deberse a: a) inactivación mutacional de CDH1 o de genes de cateninas, b) represión transcripcional o c) proteólisis del dominio extracelular⁵⁵. Se ha considerado también que la pérdida de la CDH1 proporciona un estímulo oncogénico por la liberación de la β-catenina de la membrana, donde ésta puede viajar al núcleo y activar genes como c-myc, ciclina D1, fibronectina, y matrilisina, los cuales son esenciales en la proliferación e invasión tumoral. Además la CDH1 sirve como un supresor de invasión y crecimiento de cánceres epiteliales y su eliminación funcional representa un paso clave en la adquisición del fenotipo invasivo⁵⁶.</p> <p>La actividad invasiva de la CDH2 resulta en parte, de una interacción funcional con el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) en la superficie celular. La CDH2 forma un complejo extracelular con el FGFR-1 involucrando su dominio Ig 1 y 2 sobre FGFR-1⁵⁷. La estabilización de este complejo por la CDH2 causa una activación sostenida de la vía MAPK/ ERK, lo cual induce un incremento en la transcripción de metaloproteasa que degrada matriz extracelular (MMP-9) y por lo tanto, un incremento en la invasividad celular. Además la CDH2 puede habilitar a las células tumorales a permear tejidos secundarios usando un mecanismo de adhesión homofílico. Por ejemplo, facilita la trans migración de células de melanoma a través de la vasculatura. Este proceso involucra la disolución de las uniones basadas en la CDH1, causando retracción de células endoteliales, permitiendo el paso de células de melanoma a través de las uniones celulares y la reunión del endotelio. Es posible que las asociaciones de las células tumorales con fibroblastos y/o células endoteliales, mediadas por CDH2, proporcionen un mecanismo en el cual las células normales pueden ser inducidas por las células tumorales a producir factores de crecimiento o proteasas que focalmente apoyan el crecimiento e invasión de las células tumorales⁵⁸. Además, el subtipo de cadherina regulada ya sea la cadherina 1 o 2 en los tumores, no únicamente activa un programa de señalización que promueve la capacidad de sobrevivencia e invasividad de las células tumorales, sino también, promueve la cooperación entre las células tumorales y el microambiente circundante, un evento crítico en la progresión de la metástasis⁵⁹.</p>
<p>FGFR2.</p> <p>El receptor 2 del factor de crecimiento fibroblástico es un miembro de la familia de receptores de tirosin cinasa, la unión del ligando lleva a la dimerización de FGFR2, autofosforilación y activación de moléculas de señalización incluyendo las cinasas Akt y Erk. FGFR2 fue identificado originalmente como una secuencia de ADN amplificada de la línea celular de cáncer gástrico Kato II y esfuerzos subsiguientes identificaron amplificaciones en 3% a 10% de cánceres gástricos primarios⁶⁰. FGFR2 juega un papel importante en el desarrollo embrionario y la reparación de tejidos, especialmente en hueso y vasos sanguíneos.</p> <p>A nivel molecular las señales desencadenadas por esta molécula median la división celular, crecimiento y diferenciación. Las isoformas C2y C3 de FGFR2 han sido asociadas a cáncer de mama. Además, amplificaciones o mutaciones puntuales de esta molécula ocurren en cáncer de pulmón, mama, próstata, ovario, endometrial y melanoma. También se ha comprobado que puede desempeñar roles diferentes dependiendo del tipo de cáncer⁶¹.</p>
<p>HBEGF.</p> <p>Es sintetizado como una glucoproteína quimiotáctica y mitogénica anclada a la membrana. Se ha demostrado que participa de manera activa en la hipertrofia cardíaca, reparación de heridas y desarrollo cardíaco. Se identificó en medio condicionado de células humanas parecidas a macrófagos. La escisión de su ectodominio resulta en su forma soluble madura, la cual influencia la mitogenicidad y factores quimiotácticos para células de músculo liso y fibroblastos. La forma transmembranal es el único receptor para la toxina de la difteria. Ambas formas participan en los procesos celulares y se ha demostrado su participación en procesos patológicos como la aterosclerosis, progresión tumoral y metástasis.</p> <p>Estudios recientes demuestran que HBEGF se sobreexpresa en un número considerable de cánceres así como líneas celulares derivadas de cáncer. Se sabe que participa de manera activa en el desarrollo de fenotipos malignos, contribuyendo a una conducta invasiva y metastásica. Es un potente mitógeno para células de cáncer de mama, ovario, células epiteliales y queratinocitos⁶²⁻⁶⁵.</p>

HMGB2.

El producto de este gen es un miembro de la familia de proteínas cromosomales del grupo de alta movilidad-no histonas. Está asociada a la cromatina y se localiza en el núcleo de las células eucariotas. Estudios *in vitro* han demostrado que esta proteína es capaz de plegar el ADN eficientemente y formar círculos de ADN. Estos estudios sugieren que su papel es facilitar las interacciones cooperativas entre las proteínas *cis* promoviendo la flexibilidad del ADN. También se ha reportado que está involucrada en el paso final de ligación en el proceso de reparación de ADN. Se ha demostrado su participación en carcinoma hepatocelular, colorectal y renal^{66,67}.

HOXA5.

Expresado durante la embriogénesis y en el riñón adulto. Es un factor de transcripción secuencia- específico, parte del sistema regulatorio del desarrollo que provee células con identidad posicional. Puede regular expresión génica, morfogénesis y diferenciación. Se ha demostrado que la pérdida de p53 se correlaciona con la pérdida de HOXA5 en cáncer de mama⁶⁸. Además, se ha mostrado que la mayoría de carcinomas de mama carecen de expresión de este factor de transcripción⁶⁹. También se ha probado su participación en el adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas en pulmón, ya que se ha inmunolocalizado en el citoplasma de las células tumorales⁷⁰.

MET

MET es un receptor de tirosin cinasa que, después de unirse a su ligando, el factor de crecimiento hepatocítico, activa un amplio rango de diferentes vías de señalización celular, incluyendo aquellas involucradas en proliferación, muerte, migración e invasión. Aunque esta molécula es importante en el control de la homeostasis de los tejidos bajo condiciones normales, se encuentra activado de manera aberrante en cánceres humanos por mutación, amplificación o sobreexpresión de proteína. Fisiológicamente MET es responsable de la dispersión fenotípica celular. Este proceso involucra la disrupción de la adhesión célula-célula mediada por cadherinas, lo que da como resultado la muerte celular, siendo una función epitelial clave en embriogénesis y reparación de heridas.

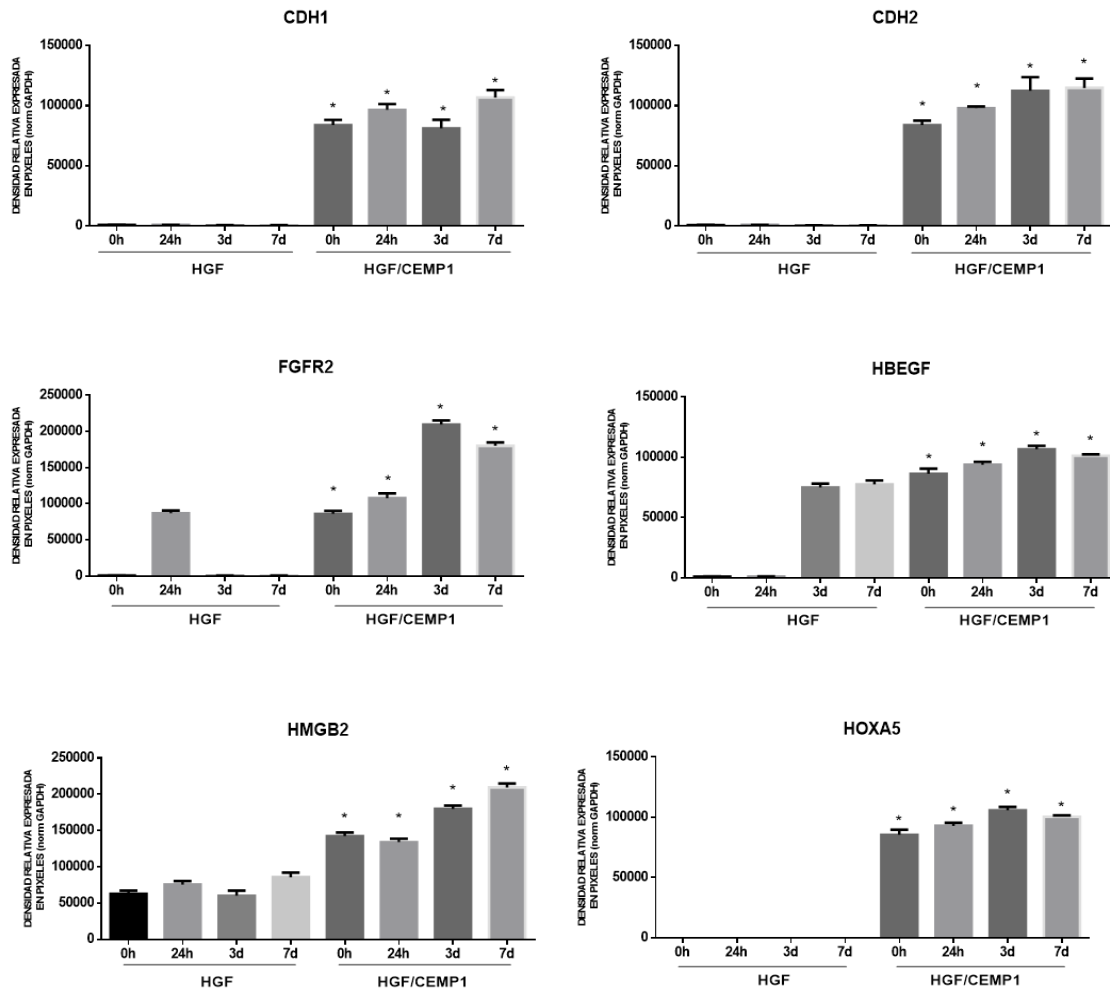
Durante el desarrollo, MET y su ligando proveen señales esenciales para la supervivencia, proliferación de hepatocitos y células trofoblásticas de placenta. Las vías que involucran a MET juegan un papel importante en el desarrollo de cáncer a través de la activación de vías oncogénicas (RAS, PI3K, STAT3, β -catenina), también mediante la activación de la angiogénesis, así como la disociación celular debido a la activación de metaloproteinasas, lo cual lleva a metástasis^{71,72}. La amplificación de MET sirve como biomarcador para adenocarcinoma de células claras, además confiere resistencia a terapias anti- EGFR (receptor del factor de crecimiento epidermal) en cáncer colorectal^{73,74}.

1.2. Validación a nivel traduccional.

Para determinar si el producto final de los transcritos validados a nivel transcripcional estaba presente en las células se realizó Western Blot de las células HGF y HGF/CEMP1 a las 0 y 24 horas, y a los 3 y 7 días de cultivo (figura 11). Estos resultados demuestran que la expresión de estas proteínas es mayor en las células que sobreexpresan CEMP1 (figura 11 A). Sin embargo, en el caso de MET, no se encontró expresión a nivel traduccional por lo que se fue necesario constatar la funcionalidad del anticuerpo. El control positivo (se utilizaron células NIH3T3) dio señal por lo que la expresión a nivel traduccional de MET en HGF/CEMP1 puede ser inhibida por algún mecanismo regulador postranscripcional. Finalmente, la prueba de correlación de Spearman fue usada para examinar la relación entre la expresión a nivel

transcripcional y traduccional de cada molécula usada para validación. CDH2 y HOXA5 fueron las que mostraron correlación positiva entre los resultados de qRT-PCR y Western Blot, además su valor de p fue significativo.

A



B

	Correlación de Spearman (r)	Valor de p (a dos colas)
CDH1	0.6274	0.1131
CDH2	0.7143	0.0576
FGFR2	0.6108	0.1180
HBEGF	0.6108	0.1180
HMGB2	0.4762	0.2431
HOXA5	0.7910	0.0357

C

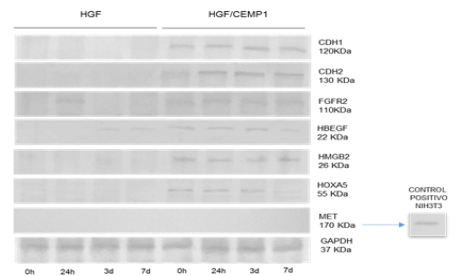
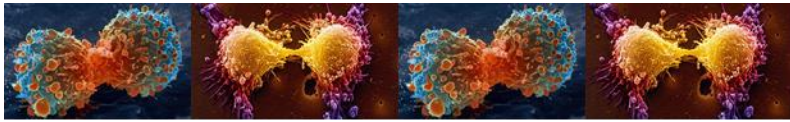


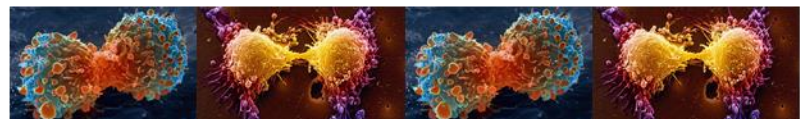
Figura 11. Validación a nivel traduccional mediante Western Blot. Fue posible validar la expresión del producto final de los genes, excepto MET. La expresión es mayor en HGF/CEMP1 * $p < 0.0001$ (A). La prueba de correlación de Spearman fue usada para examinar la relación entre la expresión a nivel transcripcional y traduccional de cada molécula usada para validación (B), Western Blot representativo de cada molécula (C).



3. ESTUDIOS FUNCIONALES

Tabla de contenido.

1. HIPÓTESIS.....	54
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	54
3. CONTEXTO.....	55
4. OBJETIVOS.....	58
5. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS FUNCIONALES.....	59



1. HIPÓTESIS

Los datos de los análisis funcionales indican que CEMP1 induce la expresión de transcritos que regulan crecimiento, proliferación y oncogénesis. Además, disminuye la expresión de transcritos relacionados con apoptosis. Asimismo, IPA agrupó los transcritos DE de acuerdo a sus posibles implicaciones, quedando como el grupo más grande cáncer. Todo lo anterior nos lleva a generar la siguiente hipótesis: **CEMP1 actúa como oncogén cuando su expresión no está adecuadamente regulada.**

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

La hipótesis anterior cobra gran relevancia cuando los esfuerzos de la comunidad científica van encaminados a tener la mayor información posible acerca del proceso de oncogénesis, de tal modo que, al entender más acerca de los mecanismos moleculares que detonan el cáncer, sea posible mejorar los métodos de diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

Se sabe que a nivel mundial el cáncer es responsable de que en 2008 fallecieran 7.6 millones de personas, aproximadamente 13% del total de fallecimientos, y se estima que para 2030, aumentará a 13.1 millones. En el continente americano fue causante de 1.2 millones de muertes en 2008; afectando a los hombres principalmente en la próstata, pulmón, colonorrectal y estómago; y las mujeres en la mama, pulmón, colonorrectal y cervicouterino^{75,76}.

En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), se estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos^{76,77}. Durante 2011 del total de egresos hospitalarios por tumores, 55.6% son por tumores malignos; en la población infantil y joven (menores de 20 años), la proporción de egresos hospitalarios por neoplasias malignas en relación con los tumores en general es más alta que en la población adulta (70.6 y 53.2%, respectivamente).

En 2012, la principal causa de defunciones por tumores malignos fue en órganos digestivos

(33.18 por cada 100 mil habitantes de 20 años y más); seguida de las neoplasias en órganos genitales (15.08 por cada 100 mil); de órganos respiratorios e intratorácicos (10.72); y de mama (8.13 defunciones por cada 100 mil). Por sexo, el comportamiento es diferente, ya que en las mujeres el cáncer de mama es la segunda causa de muerte, fallecen 15.38 de cada 100 mil ⁷⁶.

3. CONTEXTO.

El cáncer se refiere a un grupo de enfermedades que dan como resultado un fenotipo común que se caracteriza por un crecimiento y proliferación celular descontrolados. Se describe como un proceso de múltiples pasos durante el cual las células adquieren una serie de mutaciones que dan como resultado final crecimiento y división celular inmoderados, inhibición de la diferenciación celular, y evasión de la apoptosis. Eventualmente, las células tumorales son capaces estimular angiogénesis, invadir los tejidos circundantes y de migrar a otras partes del cuerpo en un proceso llamado metástasis^{78,79}.

También se dice que el cáncer es una enfermedad primariamente genética de naturaleza clonal. Las mutaciones que lo producen pueden ser heredadas, lo que hace más temprano el desarrollo de la enfermedad (línea germinal) o pueden ser adquiridas como mutaciones somáticas. Al final, no todas las células dentro del tumor adquirirán el mismo set de mutaciones subsecuentes, lo que significa que todos los tumores representan grupos de células genéticamente heterogéneos.

Se cree que las células de cáncer dependen fuertemente de ciertas mutaciones oncogénicas que de otras para su crecimiento, proliferación y supervivencia. Este concepto se conoce como adicción al oncogén, es decir, que algunos tipos de cáncer que contienen múltiples anormalidades genéticas, epigenéticas y aberraciones cromosómicas son dependientes o adictas a uno a pocos genes tanto para el mantenimiento del fenotipo de cáncer como para la

supervivencia de las células⁸⁰. Por lo tanto, tomando en cuenta la actividad de un oncogén específico que juega un papel primordial en un tipo de cáncer, se cree que puede ser usado como blanco terapéutico a pesar de la presencia de otras mutaciones e incluso a pesar de un cambiante número de cromosomas.






Se han identificado cambios fisiológicos a los cuales las células se deben someter para transformarse. Estos cambios deben anular los procesos de control que regulan el crecimiento y la división celular. Esta habilidad de sobrepasar mecanismos de control normales se explica con los llamados sellos distintivos del cáncer: autosuficiencia en factores de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, habilidad para invadir y metastatizar, metabolismo desregulado, inestabilidad genómica y aneuploidía, inflamación y evasión del sistema inmune⁸¹⁻⁸³. A pesar de que las células deben adquirir estas capacidades con la finalidad de transformarse, éstas pueden tomar diferentes rutas para la misma finalidad. Es decir, las mutaciones adquiridas pueden darles estas ventajas en diferente orden, aunque la habilidad de metastatizar es típicamente uno de los últimos pasos.

Las mutaciones que llevan al desarrollo de cáncer se dan en tres tipos de genes:

- 1. Los genes supresores de tumores.** Las mutaciones que inactivan a los genes supresores de tumores pueden ser causados por delección, por mutación puntual que lleva a producción de una proteína funcionalmente inactiva, o por una mutación que afecta la región del promotor, llevando a la pérdida o reducción en su expresión. En la mayoría de los casos las mutaciones de éstos son recesivas, es decir, que es necesario que estén mutados los dos alelos, de forma que el gen no se exprese de ninguna

manera (si uno de los alelos permaneciera inalterado podría producir la proteína supresora normal).

2. Protooncogenes. Los mecanismos subyacentes que se asocian con la sobreexpresión de estos para convertirse en oncogenes incluyen:

-  Mutaciones puntuales, deleciones, o inserciones que resultan en un producto génico con mayor actividad.
-  Mutaciones puntuales, deleciones, o inserciones en la región promotora de un protooncogén que resultan en una tasa de transcripción mayor.
-  Eventos de amplificación génica que llevan a la duplicación de un protooncogén.
-  Eventos de translocación cromosomal que relocalizan al protooncogén en un nuevo sitio cromosomal que resultan en una expresión más alta.
-  Translocaciones cromosomales que dan como resultado la fusión entre un protooncogén y un segundo gen, lo cual produce una proteína de fusión con actividad oncogénica⁸⁴.

En la célula, estas mutaciones se dan de manera dominante, es decir, sólo precisa estar mutado el gen en un alelo para que se produzca la sobreexpresión y de este modo la proliferación descontrolada. Muy frecuentemente los protooncogenes codifican para proteínas que funcionan estimulando la división celular, inhiben la diferenciación celular y posibilitan la supervivencia de la célula. Todos estos procesos son importantes para el desarrollo humano normal y para el mantenimiento óptimo de tejidos y órganos. Los oncogenes, sin embargo, exhiben típicamente un incremento en la producción de estas proteínas, llevando por lo tanto al incremento de las funciones y dando como resultado un fenotipo de célula transformada. Por lo tanto, los oncogenes son actualmente el mayor blanco molecular para el diseño de fármacos anticáncer.

3. Genes estabilizadores del genoma o guardianes. Estos promueven la tumorigénesis de manera totalmente diferente cuando están mutados. Esta clase incluye genes de reparación de mismatch (MMR), reparación de escisión de nucleótidos (NER) y reparación de escisión de bases (BER). Son responsables de reparar errores sutiles que suceden durante la replicación normal del ADN o que son inducidos por exposición a mutágenos. Otros genes estabilizadores controlan procesos que involucran grandes porciones de cromosomas, tales como aquellos responsables de la recombinación mitótica y la segregación cromosomal (por ejemplo, BRCA1, BLM y ATM). Estos mantienen las alteraciones genéticas al mínimo, y por lo tanto cuando están inactivados, ocurren mutaciones en otros genes a grandes tasas. Todos los genes son potencialmente afectados ya que se incrementa la tasa de mutación, pero solo mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores afectan el crecimiento celular neto y pueden por lo tanto conferir una ventaja de crecimiento selectiva a la célula mutada. Al igual que los genes supresores de tumores, generalmente ambos alelos deben estar inactivados para producir un efecto fisiológico⁸⁵.

4. OBJETIVOS.

1. Establecer si CEMP1 posee relación directa con los transcritos validados, ya que estos participan de manera activa en el proceso de oncogénesis.
2. Determinar si CEMP1 se expresa en líneas celulares de cáncer.
3. Comprobar si CEMP1 posee capacidad transformante.

5. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS FUNCIONALES.

5.1. Relación de CEMP1 con los transcritos validados.

Los análisis funcionales indican que CEMP1 que podría actuar como un oncogén ya que induce la expresión de transcritos que regulan crecimiento, proliferación y disminuye la expresión de transcritos relacionados con apoptosis. De acuerdo al análisis funcional realizado con IPA estos transcritos están relacionadas con el desarrollo y progresión de cáncer (tabla 3).

Tabla 3. Los transcritos validados se relacionan con el desarrollo y progresión de cáncer de acuerdo a IPA.

Gen (LogFCh)	Tumorigénesis	Regulación de apoptosis	Desarrollo de tejidos	Angiogénesis	Proliferación	Invasión
CDH1 2.122	+	+	+		+	
CDH2 3.577	+	+	+	+	+	+
FGFR2 2.345	+	+	+	+	+	+
HBEGF 2.840	+	+	+		+	+
HMGB2 2.011	+	+	+	+	+	+
HOXA5 4.092	+	+	+		+	
MET 2.967	+		+	+	+	

Dado que es posible que la sobreexpresión de estos transcritos esté inducida como efecto secundario del cambio en la expresión de otros transcritos y no directamente inducida por CEMP1, se realizó inhibición de la expresión de CEMP1 en las células HGF/CEMP1 mediante ARN de interferencia para determinar qué transcritos realmente ven afectada su expresión por CEMP1. Se realizaron ensayos de qRT-PCR para este fin (figura 12). CDH1 ($r= 0.9352$) y FGFR2 ($r= 0.9746$) muestran un patrón de expresión correlacionado (altamente positivo) con

el patrón de expresión de CEMP1, lo que sugiere que estos transcritos podrían estar relacionadas directamente.

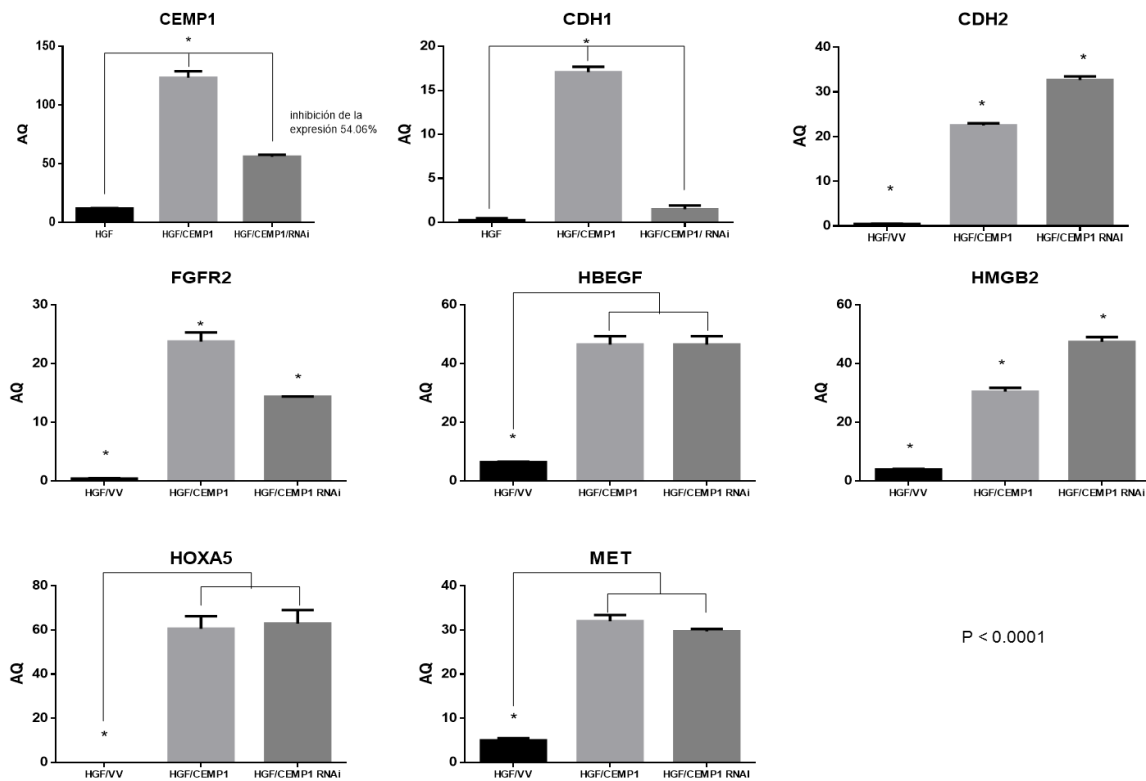


Figura 12. La inhibición de la expresión de CEMP1 afecta directamente la expresión de moléculas como CDH1 y FGFR2.

5.2. Búsquedas *in silico* de la amplificación de la región 16p13.3.

Dentro de los mecanismos subyacentes que producen la sobreexpresión de un gen se encuentra la amplificación génica por lo que se tomó la decisión de buscar si la región 16p13.3 se ha reportado amplificada anteriormente (tabla 4). La búsqueda fue exitosa ya que se encontró que esta región se ha encontrado amplificada en múltiples tipos de cáncer, incluyendo algunos que se desarrollan en tejidos orales, hígado, pulmón y mama.

Tabla 4. Reportes que muestran amplificación de la región 16p13.3. Colección bibliográfica disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/myncbi/1NUNbauTImrkz/collections/44911422/public/>

TEJIDO	TIPO DE CÁNCER	METODOLOGÍA	MUESTRAS	MUESTRAS CON AMPLIFICACIÓN 16p13.3	REFERENCIAS
TEJIDOS ORALES	CARCINOMA ADENOIDE SALIVAL QUÍSTICO	CGH	15	15	Kasamatsu A, 2005
	CARCINOSARCOMA DE GLÁNDULAS SALIVALES	CGH	1	1	Vékony H, 2009
	LESIONES ORALES POTENCIALMENTE MALIGNAS	CGH	38	8	Giaretti W, 2012
	CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS	CGH	50	>50%	Uchida K, 2011
HÍGADO	CARCINOMA HEPATOCELULAR	CGH	80	sn	Wang G, 2001
	CARCINOMA HEPATOCELULAR	RFLP	68	22%	Sakai K, 1992
PULMÓN	CARCINOMA Y ADENOCARCINOMA DE CELULAS ESCAMOSAS DE PULMÓN	CGH	14	1	Choi YW, 2006
	ADENOCARCINOMA DE PULMÓN	M-FISH , CGH	3 líneas celulares, 50 tejidos	50%	Shen H, 2008
	CARCINOMA DE PULMÓN DE CÉLULAS ESCAMOSAS	M-FISH , CGH	160	50%	Shen H, 2009
PÁNCREAS	ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO	G-banding analysis	36	21	Kowalski J. 2007
MAMA	CÁNCER DE MAMA	CGH	30	3	Gao Y, 2011
	CÁNCER DE MAMA		review	50%	Cavallaro S, 2012
	CÁNCER DE MAMA	CGH	47 tejidos, 18 líneas celulares	66%	Naylor TL 2005
	CÁNCER DE MAMA	GEX , CGH	126	23	Muranen TA, 2011
CÓLON	CÁNCER COLORECTAL		review	14	Cardoso J, 2007
TIROIDES	CARCINOMA PAPILAR TIROIDEO		review	10	Zitzelsberger H, 2011
TEJIDO LINFOIDE	LINFOMA LARGO DIFUSO DE CÉLULAS B	CGH	8.	1	Kreisel F, 2011
MESOTELIO	MESOTELIOMA EPITELIAL	CGH	2	2	Serio G, 2009
TEJIDO NERVIOSO	NEUROBLASTOMA	CGH	17	4	Scaruffi P, 2007
CÉRVIX	CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CÉRVIX	CGH	15	15	Choi YW, 2007
INTESTINO DELGADO	ADENOCARCINOMA DE INTESTINO DELGADO	CGH	48	>10%	Diosdado B, 2010
VEJIGA	CÁNCER DE VEJIGA	CGH.	5 líneas celulares	5	Matsuda R., 2011

5.3. Búsquedas *in silico* de la expresión de CEMP1 en cánceres humano

También se realizó la búsqueda de datos de expresión de CEMP1 en cáncer en repositorios de información de microarreglos con el fin de sustentar la presencia de CEMP1 en tejidos tumorales humanos. Dentro de los hallazgos en esta búsqueda destaca la presencia de datos de expresión de CEMP1 en cáncer oral, cervical, mama y próstata (tabla 5).

Tabla 5. Expresión de *CEMP1* en cáncer. Información obtenida de bases de datos de microarreglos. Los datos de esta tabla están disponibles en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/myncbi/1NUnbauTlMrkz/collections/42041061/public/>

TIPO DE CÁNCER	NOMBRE DEL ESTUDIO	MUESTRAS	SOBREEXPRESIÓN DE CEMP1	ID
CÁNCER ORAL	Cigarette smoke effect on the oral mucosa	79	6	ID: 65498196
EXPOSICIÓN AL BENCENO	Occupational benzene exposure: peripheral blood mononuclear cells (HG-U133B)	16	3	ID: 60916232
	1,2,4-benzenetriol effect on peripheral blood mononuclear cells in vitro	16	4	ID: 40532669
CÁNCER CERVICOUTERINO	Preinvasive and invasive cervical squamous cell carcinomas	38	5	ID: 53614669
	Cervical cancer tumorigenesis	61	14	ID: 52157069
	Different areas of cervical cancer tumors	33	9	ID: 32027590
CÁNCER DE MAMA	Inflammatory breast cancer: tumor	48	14	ID: 48506869
	Inflammatory breast cancer: stroma	47	6	ID: 48483869
LEUCEMIA	Imatinib effect on K562 leukemia cell line (V)	6	12	ID: 47255869
	Imatinib effect on K562 leukemia cell line (IV)	6	3	ID: 47232869
	Imatinib effect on K562 leukemia cell line (III)	6	3	ID: 47209869
	Imatinib effect on K562 leukemia cell line (II)	6	3	ID: 47186869
	Rapamycin effect on a glucorticoid-resistant T cell lymphoblastic leukemia cell line: time course	9	4	ID: 33847969
ENDOMETRIOSIS	Ovarian endometriosis	20	6	ID: 41964196
CÁNCER DE PRÓSTATA	Prostate cancer	16	12	ID: 39391416
	Metastatic prostate cancer (HG-U95C)	164	10	ID: 34888299
CÁNCER DE PULMÓN	Gefitinib effect on various non-small cell lung cancer cell lines (HG-U133A)	45	24	ID: 29741469
	Asbestos effect on epithelial and mesothelial lung cell lines: time course	27	9	ID: 35698396

Además se utilizó la base de datos de microarreglos de tejido The Human Protein Atlas⁸⁶ que incluye muestras de 20 diferentes tipos de cáncer de 216 pacientes. Los resultados muestran

que el 51% de los tejidos fueron positivos para CEMP1. Además, comparando la expresión del tejido tumoral contra tejido normal, se encontró que tejidos normales de mama, cérvix, glía, hígado, piel y testículos, no presentaron expresión de CEMP1 pero sus contrapartes tumorales si (figura 13).

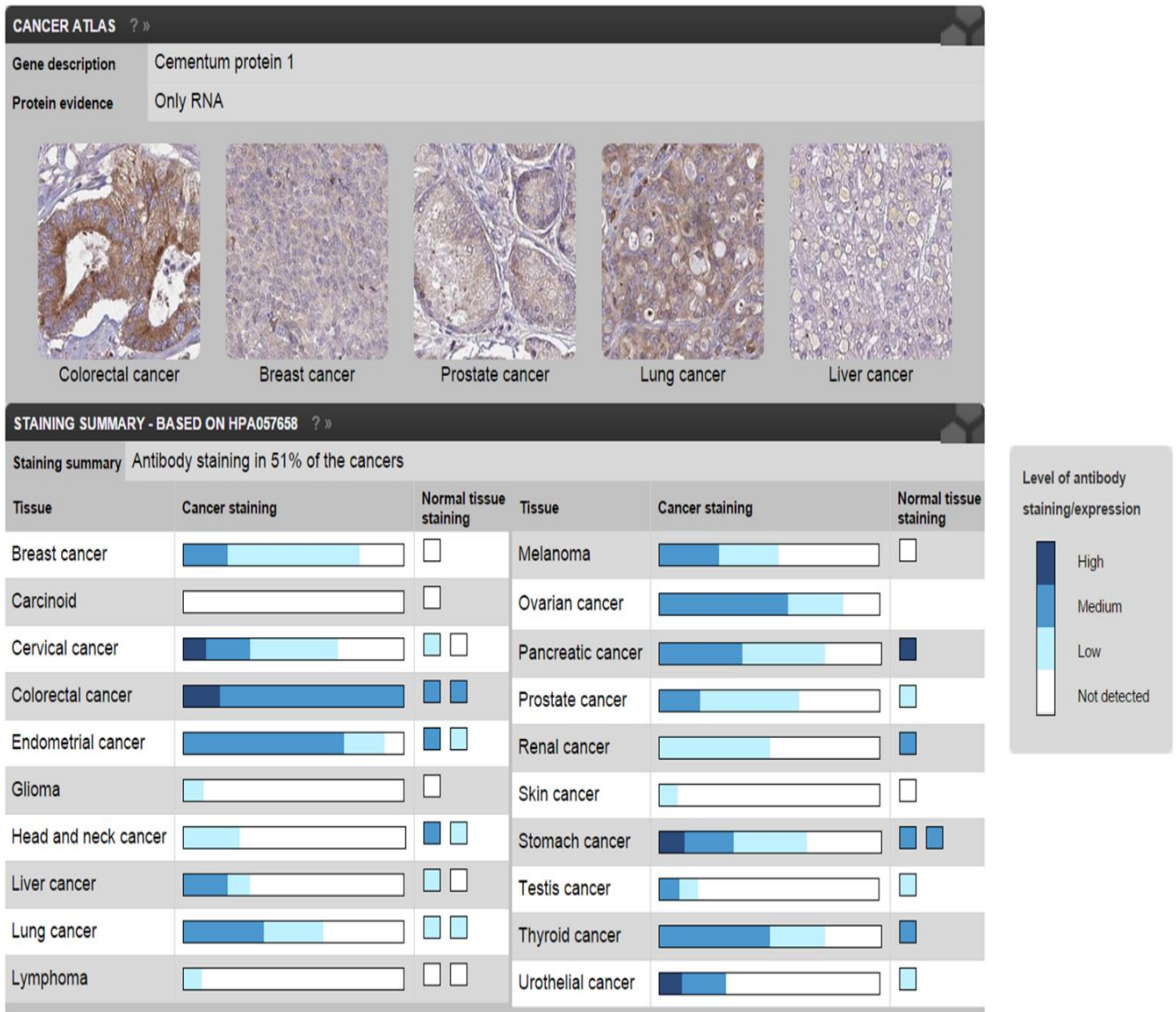


Figura 13. Esquema que representa los resultados de expresión de CEMP1 en tejidos de pacientes con cáncer (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000205923/cancer>).

5.4. Tamizaje de líneas celulares de cáncer para determinar expresión de CEMP1 por medio de qRT-PCR y Western Blot.

Dado que se encontró gran cantidad de información que soporta nuestra hipótesis de que CEMP1 puede ser un oncogén se decidió realizar un tamizaje de líneas celulares de cáncer para buscar su expresión tanto a nivel transcripcional por medio de qRT-PCR (figura 14 A) como a nivel traduccional por medio de Western Blot (figura 14 B y C). Los resultados tanto del qRT-PCR como del Western Blot muestran que la expresión de CEMP1 en las líneas celulares de cáncer utilizadas está presente; en algunas la expresión es incluso mayor a la que se presenta en la línea celular parecida a cementoblastos (CEM) donde se ha reportado previamente su expresión. También es evidente que la expresión no distingue entre células de origen epitelial y mesenquimal.

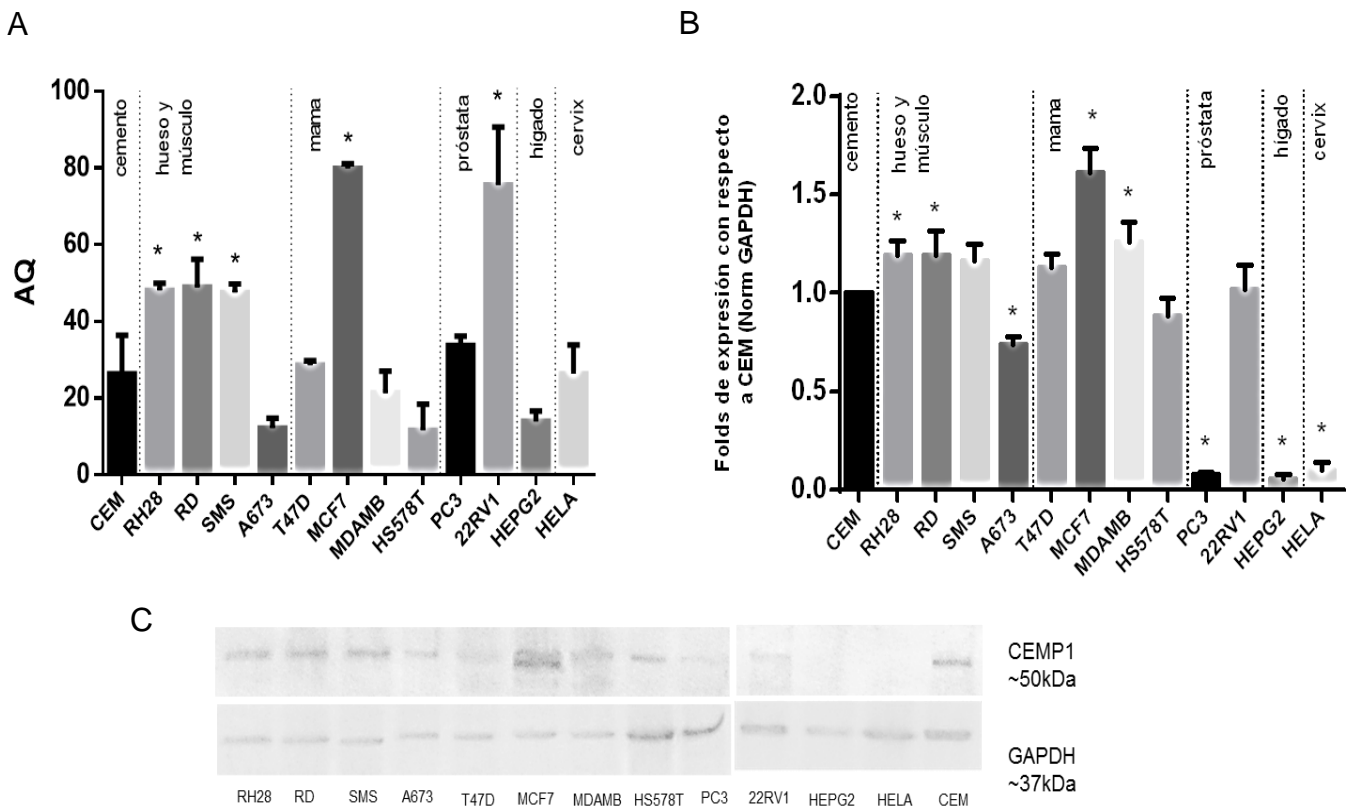


Figura 14. Resultados de expresión de CEMP1 en líneas celulares de cáncer. Se muestran los resultados de expresión a nivel transcripcional (A) y los Folds de incremento en la expresión a nivel traduccional con respecto al control positivo CEM (B). Western Blot representativo de la expresión de CEMP1 en líneas celulares de cáncer (C). * $p < 0.0001$

5.5. Ensayos de tumorigenicidad mediante formación de colonias en agar suave.

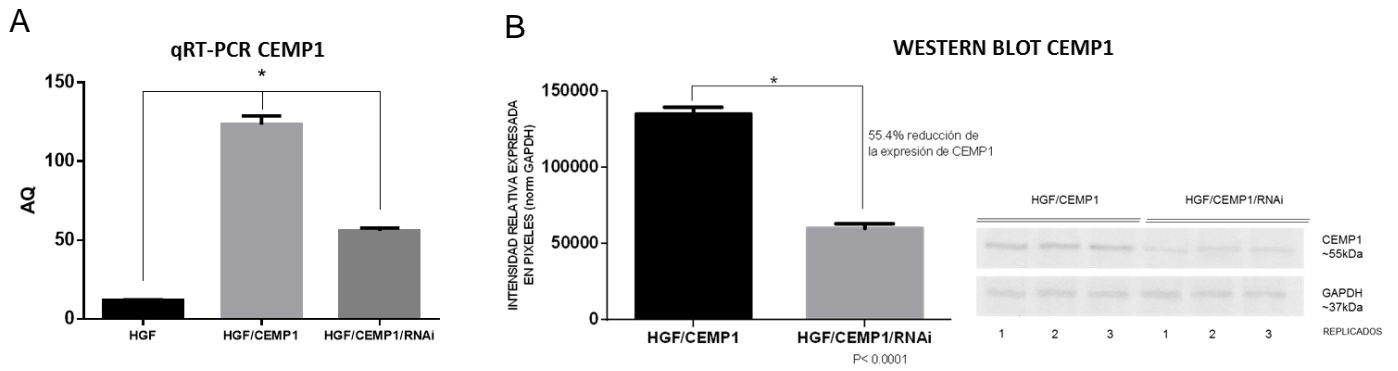
La transformación neoplásica ocurre vía una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que dan como resultado una población capaz de proliferar independientemente de las señales externas e internas que normalmente regulan el crecimiento.

El crecimiento libre de anclaje es uno de los indicadores de transformación celular, y se considera una de las maneras más adecuadas *in vitro* para detectar la capacidad de un oncogén de transformar una célula. Debido a esto se realizaron ensayos de agar suave con el fin de determinar si los HGF/CEMP1 se transforman por efecto de CEMP1 y son capaces de vivir libres de anclaje.

El ensayo de agar suave llevado a cabo con HGF y HGF/CEMP1 muestra que CEMP1 tiene la capacidad de transformar a las células y les permite vivir libre de anclaje (Figura 15). Cuando se introduce un ARN de interferencia contra CEMP1 que logra disminuir su expresión a nivel transcripcional en un 54.06% (figura 15 A) y a nivel traduccional en un 55.4% (figura 15 B), la formación de colonias disminuye (figura 15 C, D y E), comprobando nuevamente la participación del gen en este proceso.

Para comprobar la capacidad de CEMP1 de transformar células a un fenotipo tumoral, se transfectaron fibroblastos embrionarios de ratón NIH3T3 como segundo modelo (figura 16). Se comprobó la sobreexpresión de CEMP1 a nivel transcripcional y traduccional (figura 16 A y B). Estas células también fueron capaces de vivir en un medio no apto y formar colonias (figura 16 C, D y E), esto nos prueba nuevamente que CEMP1 tiene capacidad transformadora.

INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CEMP1 EN CÉLULAS HGF/CEMP1



ENSAYO DE TUMORIGENICIDAD MEDIANTE FORMACIÓN DE COLONIAS EN AGAR SUAVE.

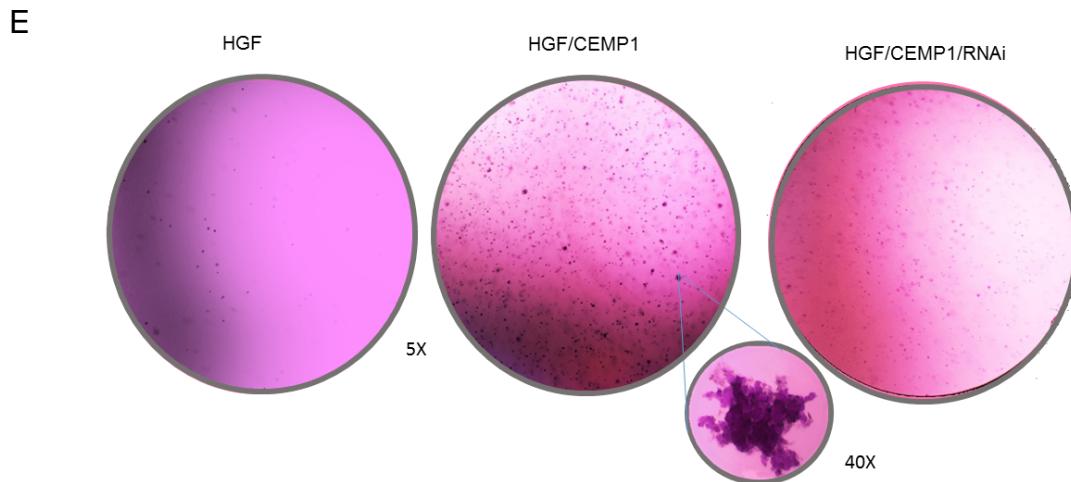
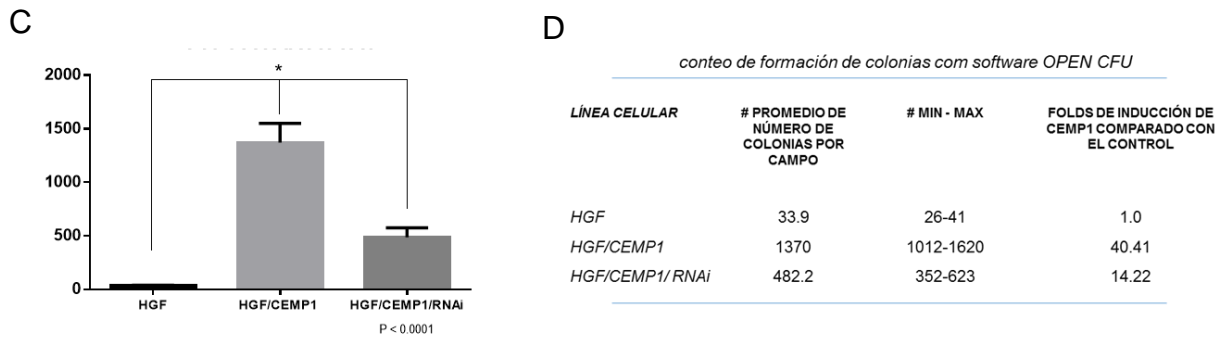
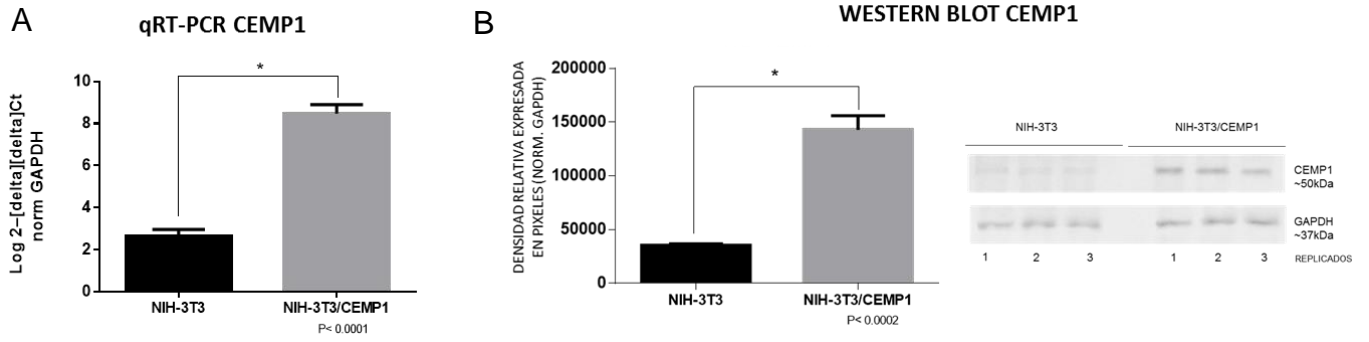


Figura 15. Formación de colonias en agar suave. Se comprobó la inhibición de CEMP1 mediante ARN de interferencia tanto a nivel transcripcional como traduccional (A y B). Se realizaron ensayos usando células HGF, HGF/CEMP1 y las que contienen el ARN de interferencia HGF/CEMP1/ARNi. Se presenta el gráfico de número de colonias *p<0.0001 (C), los datos del conteo y los folds de incremento de formación de colonias inducidos por CEMP1 respecto al control (D) y las imágenes representativas del ensayo de agar suave (E).

SOBREEXPRESIÓN DE CEMP1 EN CÉLULAS NIH3T3



ENSAYO DE TUMORIGENICIDAD MEDIANTE FORMACIÓN DE COLONIAS EN AGAR SUAVE.

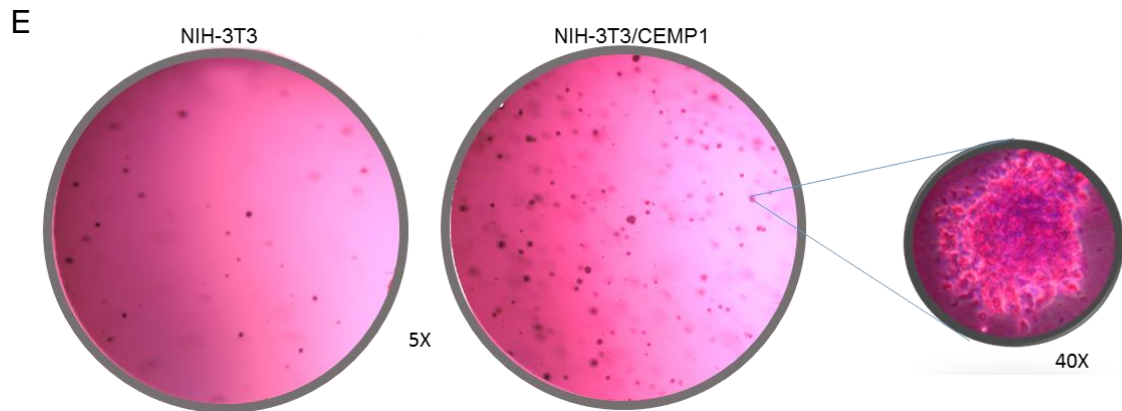
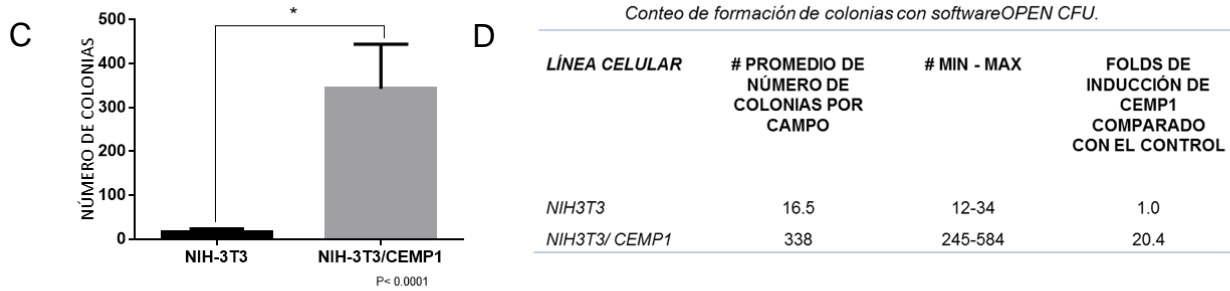


Figura 16. Formación de colonias en agar suave. Se comprobó la sobreexpresión de CEMP1 en células NIH3T3, tanto a nivel transcripcional como traduccional (A y B). Como control se utilizaron células NIH3T3 transfectadas con el vector vacío. Se presenta también el gráfico de número de colonias, *p<0.0001 (C). Se muestra el conteo y los folds de incremento de formación de colonias inducidos por CEMP1 respecto al control (D). Imágenes representativas (E).



4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Tabla de contenido.

1. DISCUSIÓN.....	69
2. CONCLUSIONES.....	76
3. ABREVIATURAS.....	78
4. TABLA SUPLEMENTARIA.....	81
5. BIBLIOGRAFÍA GENERAL.....	103



1. DISCUSIÓN.

Un inconveniente del uso de estudios con knockout de genes es que la sola mutación por pérdida de función no siempre es suficiente para deducir funciones celulares. En cambio, los estudios de sobreexpresión ciertamente tienen una rica historia de éxitos y proveen varias ventajas: es una herramienta versátil que puede ser aplicada en varias vías, tanto en genes normales como mutados; pueden identificarse pasos que delimitan tasas regulatorias; tiene efecto dominante, por lo que puede realizarse en organismos diploides; provee interacciones funcionales aún para genes redundantes y es posible identificar interacciones complementarias a las que se obtienen cuando se hacen estudios de pérdida de función⁸⁷.

En este estudio usamos microarreglos de expresión para evaluar los efectos biológicos de la sobreexpresión CEMP1 en fibroblastos gingivales humanos. Los datos de los estudios funcionales mostraron una cantidad importante de genes asociados con desarrollo celular, proliferación, crecimiento celular y muerte celular fueron encontrados en los principales resultados de los microarreglos usando dos herramientas de análisis funcionales, DAVID e IPA. Estas funciones celulares específicas están todas asociadas con algunos aspectos del desarrollo del cáncer, sugiriendo que CEMP1 puede ser un oncogén.

Esta posibilidad se fundamenta además por el hecho de que CEMP1 fue aislada por primera vez de un cementoblastoma humano, una neoplasia de origen ectomesenquimal odontogénico. Los cementoblastomas son lesiones relativamente raras, son consideradas tumores benignos que surgen de cementoblastos neoplásicos e histológicamente son similares a los osteoblastomas, con la diferencia de que los cementoblastomas están físicamente unidos a la raíz del órgano dentario. Crecen muy lentamente, sin embargo, pueden alcanzar tamaños

considerables, dando como resultado grandes masas de cemento o tejido parecido a cemento
88,89.

CEMP1 fue originalmente identificada como una proteína cemento-específica y su expresión se ha reportado restringida a cementoblastos, algunas subpoblaciones de células del ligamento periodontal y células troncales mesenquimales localizadas paravascularmente en el ligamento periodontal ^{15,21}. La transfección del gen *CEMP1* en fibroblastos gingivales humanos induce la expresión de proteínas asociadas a un fenotipo cementoblástico/osteoblástico, a la mineralización de la matriz extracelular y además aumenta su tasa de proliferación ²³. Los resultados de nuestros análisis funcionales muestran que sin un medio inductor, CEMP1 es capaz de estimular la expresión de proteínas que intervienen en crecimiento celular y proliferación, lo que sugiere que CEMP1 es un potente mitógeno ya que en ensayos de sobreexpresión, en ausencia o presencia de un medio inductor estimula el proceso de proliferación *in vitro*.

Además se mostró que CEMP1 afecta la expresión de transcritos relacionadas con el proceso de apoptosis. Sabemos que la apoptosis es un proceso celular ordenado que ocurre tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, por tanto, el entendimiento de los mecanismos subyacentes que controlan este proceso es importante ya que juega un papel clave en la patogénesis de múltiples enfermedades. En el caso del cáncer, la apoptosis se ve afectada, resultando en células que no morirán. Pueden ocurrir defectos a lo largo de las diversas vías de control, llevando a la transformación maligna de las células afectadas, metástasis y resistencia a fármacos. Sin embargo, a pesar de ser la desregulación de la apoptosis parte importante del problema, también tiene un papel significativo en el tratamiento del cáncer ya que es estratégicamente un blanco terapéutico popular⁹⁰. Por lo tanto, debido a que CEMP1 muestra una regulación negativa de la apoptosis, podría formar parte de estas vías de control.

De manera que se hace indispensable aclarar su participación y serán necesarios más estudios para esclarecer su papel en el proceso apoptótico.

Nuestros resultados también muestran que la expresión de CEMP1 en fibroblastos que crecen en un medio no mineralizante causa un cambio tanto en células humanas como en células de ratón hacia un fenotipo tumorigénico tal como lo muestran los ensayos de agar suave *in vitro*. Como se mencionó anteriormente, dentro de los mecanismos de oncogénesis se encuentra la amplificación génica, lo que da como resultado final una mayor expresión de una proteína dada. En el caso particular de CEMP1, su región codificante se encuentra ubicado en el cromosoma 16, en la región p13.3. La amplificación de esta región ha sido reportada en múltiples tumores sólidos, como en tejidos orales, mama y cáncer de pulmón. En tumores pediátricos ha sido reportado en glioblastoma multiforme y osteosarcoma⁹¹⁻⁹³. Se ha mostrado que la ganancia en esta región está asociada con una tasa pobre de sobrevida en pacientes con cáncer de mama, y un estudio citogénico en tumores de pulmón ha probado que la ganancia en esta región está asociada con pobre diferenciación y estadios tardíos de la enfermedad⁹⁴⁻⁹⁶. Además, la ganancia en 16p y la pérdida en 16q es capaz de identificar un grupo de cáncer de mama masculino con baja propensión a desarrollar metástasis a ganglios linfáticos⁹⁷. En estudios previos PDK1 fue identificado como un oncogén candidato en esta región cromosómica⁹⁴, pero es de esperarse que haya otros oncogenes causantes de la enfermedad adicionales a este, entre los que podría estar CEMP1.

A la fecha no hay mucha información acerca de la participación de CEMP1 en cáncer y por primera vez se reporta como oncogén. En el Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/search?q=CEMP1>) solo se reportan 21 muestras que presentan mutaciones en la región codificante de *CEMP1* de un total de 12564 muestras. De estas mutaciones la mayoría (80.95%) corresponden a sustituciones con cambio de sentido.

En el caso de los transcritos elegidos para validación, éstos se encuentran relacionados con oncogénesis, muerte celular, desarrollo de tejidos, proliferación, angiogénesis e invasión. Particularmente, en el carcinoma de mama primario, HOXA5 ha sido implicado como un gen supresor de tumor ya que su expresión se pierde en la mayoría de líneas celulares de cáncer de mama y tumores primarios; también se encuentra subexpresado en la mayoría de cáncer de pulmón de células no pequeñas, lo cual está asociado a poca supervivencia de los pacientes^{69,98}. Sin embargo ha sido reportado que HOXA5 está altamente expresado en líneas celulares de cáncer gástrico y en tejidos y líneas celulares de carcinoma oral de células escamosas⁹⁹. Otro transcrito de validación, HBEGF es un potente mitógeno para queratinocitos, hepatocitos, células de músculo liso y fibroblastos, y su expresión esta elevada en cánceres humanos, incluyendo carcinoma gástrico, hepatocelular y de mama, melanoma, cáncer de colon, cáncer pancreático, glioma y glioblastoma⁶⁵. Se ha visto que la sobreexpresión de HBEGF es inducida por los oncogenes Ras y Raf ⁶². Nuestros resultados mostraron que la expresión de HBEGF es también inducida por CEMP1 en las células transfectadas. Sin embargo, como en el caso de HOXA5 son necesarios más datos con el fin de demostrar si esta expresión es dada como resultado de la sobreexpresión de CEMP1 directamente o como efecto secundario de la sobreexpresión de otros transcritos.

En el caso de HMGB2, esta molécula está altamente expresada durante la embriogénesis, pero tiene una expresión limitada en órganos adultos, principalmente en tejido linfoides y testículos. La sobreexpresión de HMGB2 ha sido reconocida en varios tipos de tumores incluyendo cáncer de piel¹⁰⁰, carcinoma hepatocelular¹⁰¹, carcinoma de vejiga y ha sido significativamente correlacionado con progresión tumoral maligna y angiogénesis ¹⁰².

Al igual que HMGB2, FGFR2 es responsable de una gran variedad de procesos biológicos durante el desarrollo embrionario. También participa en proliferación celular, diferenciación,

migración, angiogénesis y está relacionado de manera cercana a la tumorigénesis. La expresión aberrante de FGFR2 puede también contribuir a la proliferación de algunos cánceres malignos como cáncer gástrico¹⁰³, cáncer de próstata¹⁰⁴ y carcinoma esofágico¹⁰⁵. Ha sido demostrado que FGFR2 facilita la supervivencia celular en cáncer de próstata, mama y cáncer gástrico¹⁰⁶. Otra de las moléculas utilizadas para validación fue MET, la cual no pudo validarse a nivel traduccional, sin embargo, su papel en cáncer es amplio, ya que participa en angiogénesis e invasión, además interviene en la activación de las vías de RAS, PI3K, STAT3 y Wnt/Catenina-beta.

En el caso de las cadherinas, estas juegan un papel importante en la adhesión celular, formando uniones adherentes. CDH1 y CDH2 son expresadas en la mayoría de los tejidos normales y la pérdida total o reducción de su expresión en células de cáncer ha sido bien documentada. Sin embargo, la sobreexpresión de CDH2 se ha comprobado en carcinoma hepatocelular¹⁰⁷. En el caso de CDH1 se ha encontrado sobreexpresada en células metastáticas de mama y próstata en hueso^{108,109}. Al igual que CDH1, se mostró previamente que CEMP1 se expresa en cáncer de mama y próstata con metástasis a hueso, así como en las líneas celulares MCF7 y PC3¹¹⁰. Además, CEMP1 induce la expresión de moléculas relacionadas con el proceso de biomineralización y se ha comprobado que es capaz de activar a RUNX2²³. Se ha sugerido que la expresión aberrante del factor de transcripción Runx2/Cbfa1, miembro de la familia Runt y regulador esencial en la diferenciación de osteoblasto/condrocito, podría contribuir en la progresión y metástasis del cáncer en humanos. Investigaciones recientes demostraron que dicho factor de transcripción puede modular la expresión de BSP en células de cáncer de próstata, y promover el cáncer osteolítico de mama en la enfermedad metastática ósea¹¹⁰. También, hay que recordar que en el ensayo de serie de tiempos CDH1 mostró un patrón de expresión similar a CEMP1 y la inhibición de expresión

de CEMP1 mediante ARN de interferencia resultó en una disminución significativa de la expresión de CDH1. Esto podría ser un indicativo de coparticipación de ambas moléculas en el proceso metastático.

Además, al buscar marcadores de fenotipo fibroblástico en los datos del análisis de expresión diferencial, se encontró que la vimentina, la proteína de activación de fibroblastos y la procolágena $\alpha 2$, estaban subexpresadas en las células HGF/CEMP1. Esto lleva a preguntarse si las células han perdido su fenotipo. De hecho, esto podría explicarse si se relaciona con la sobreexpresión de CDH1 en las células que sobreexpresan CEMP1 ya que se ha propuesto un modelo reversible de la transición epitelio-mesénquima (TEM) para describir la activación momentánea al que células de carcinoma se someten durante la metástasis ¹¹¹. En este modelo, las células de carcinoma activan el programa de TEM para lograr una invasión local y la diseminación a órganos distantes. Una vez que han alcanzado dichos órganos, estas células mesénquimales pueden revertir vía la transición mesénquima-epitelio (TME) a una identidad epitelial y con esto ganar habilidad proliferativa y la capacidad de formar crecimientos epiteliales en sitios distantes ¹¹². Este mecanismo de TME le permite a las células de cáncer metastáticas llegar a formar parte del tejido blanco de manera inerte y, por tanto, superar las ineficiencias a la que la mayoría de las células cancerosas diseminadas sucumben. Es decir, que no es posible que una célula que logró migrar y metastatizar lo haga sin que haya factores que regulen las uniones intercelulares por lo que en esa zona debe haber expresión de cadherinas para que se dé la formación del nicho celular en el sitio de metástasis. Es por esto, que así como en la TEM es necesario el silenciamiento de CDH1, en la TME CDH1 se sobreexpresa ¹¹³. Esto refuerza la hipótesis de que CEMP1 puede jugar un papel muy importante en el proceso metastático, sin embargo, más trabajo es necesario para responder a esta interrogante.

A pesar de todo, no hay que perder de vista que los reportes previos acerca de CEMP1 prueban de manera contundente que CEMP1 juega un rol clave durante el proceso de cementogénesis y que es clave en la biomineralización, ya que promueve la nucleación de cristales de fosfato octacálcico y además da como resultado la regeneración de hueso en defectos de tamaño crítico en calvarias de ratas Wistar. Los resultados también demuestran que CEMP1 tiene potencial osteoinductivo, posibilita la formación y maduración de nuevo tejido osteoide y podría ser usado para regeneración de tejidos mineralizados, incluyendo hueso³⁴. Otras moléculas ya se han usado para este fin, mayormente factores de crecimiento (TGF- β y BMPs) y han mostrado éxito clínico prometedor para regeneración de tejidos, sin embargo su uso es aun controversial debido a su potencial oncogénico, varios estudios en diferentes tipos de cáncer han reportado la sobreexpresión de estas moléculas¹¹⁴. Sin embargo también se ha comprobado que la expresión de algunas oncogenes como MYC y FOS es crucial para la regeneración después de una hepatectomía y otras moléculas como c-jun son usadas con el fin de regenerar axones periféricos y miocitos¹¹⁵⁻¹¹⁷. Por lo tanto es imperativo establecer la concentración óptima y el tiempo de acción de las moléculas, esto con el fin de tener un resultado clínico exitoso, sin efectos secundarios como lo es el desarrollo de un tumor. Aún hay poca información sobre la participación de CEMP1 en el proceso de cáncer, por lo que es necesario hacer la caracterización total del oncogén con el fin de determinar en qué fases del proceso de carcinogénesis puede participar y finalmente, realizar ensayos en modelos animales con el fin de probar completamente su papel como oncogén.

2. CONCLUSIONES.

Con respecto al análisis:

Se obtuvieron 1025 genes en el análisis de expresión diferencial, los cuales se utilizaron para obtener anotaciones funcionales. 39 clústeres de función fueron obtenidos con un Enrichment score mayor de 2 con condiciones de alta astringencia (lo que da como resultado menos clústers de función con genes asociados más fuertemente de acuerdo a DAVID) y una p ajustada < 0.001 . Dentro de los genes con mayor cambio, se encuentran genes reguladores del desarrollo, algunos que participan en tumorigénesis y reguladores de apoptosis, así como genes que estimulan la proliferación celular (HOXA5, CDH2, CDH1 HBEGF, FGFR2, HMGB2 y MET).

Con respecto a la validación:

Se lograron validar los resultados de los microarreglos en un ensayo independiente, tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional. Logramos demostrar en un experimento independiente que estos genes son expresados de manera diferencial entre el control y el experimental y que los cambios en la expresión se dan desde las primeras horas después de la transfección.

Con respecto a los estudios funcionales:

CEMP1 es expresada en líneas celulares de cáncer tanto de origen epitelial como mesenquimatoso; en algunas líneas la expresión es aún mayor que en células del tejido en el que se expresa normalmente, tanto a nivel transcripcional como traduccional (las de mayor nivel de expresión son MCF7 y 22RV1). Esto apoya la hipótesis de que CEMP1 podría ser un

oncogén y que en situaciones en las que gana función podría participar en el proceso de oncogénesis.

Con el fin de determinar qué transcritos pueden estar directamente relacionados con CEMP1 se logró interferir su expresión en un 54.06% en las células HGF/CEMP1. De este modo, se mostró que CDH1 y FGFR2 parecen tener una relación directa con CEMP1, ya que su expresión cae cuando CEMP1 baja su nivel de expresión.

Con respecto al ensayo de transformación

Las células que sobreexpresan CEMP1 tienen la capacidad de proliferar formando colonias. Se asume que esto es el resultado de una célula individual, la cual ha sido capaz de proliferar libre de anclaje lo que sugiere que CEMP1 que tiene capacidad transformante y esto prueba que CEMP1 puede actuar como un oncogén cuando su expresión no es correctamente regulada.

3. ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
1 A673	Línea celular de rabdomiosarcoma
2 ACAN	Agrecano
3 ADN	Ácido desoxirribonucleico
4 ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
5 ALP	Fosfatasa alcalina
6 AQ	Cuantificación absoluta
7 ARN	Ácido ribonucleico
8 ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia
9 ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
10 BMP	Proteína morfogénica ósea
11 BMP2	Proteína morfogénica ósea 2
12 bp	Pares de base
13 BSP	Sialoproteína ósea
14 Ca/P	Calcio/ fosfato
15 CAP	Proteína de adhesión del cemento radicular
16 CDH1	cadherina 1
17 CDH2	cadherina 2
18 CEM	Línea celular parecida a cementoblastos
19 CEMP1	Proteína del cemento 1
20 CGF	Factor de crecimiento derivado del cemento
21 CGH	Hibridación genómica comparativa
22 COL2A1	Colágena tipo 2A1
23 CONACyT	Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología
24 CP	Proteína derivada de cementoblastoma
25 CTNNB1	Catenina (proteína asociada a cadherinas), Beta 1
26 DAVID	The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
27 DE	Diferencialmente expresados
28 DGAPA	Dirección General de Asuntos de Personal Académico
29 DMP-1	Proteína de la matriz dentinaria-1
30 dsADN	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
31 dUTP	Deoxiuridin Trifosfato
32 E2F1	Proteína asociada a retinoblastoma 1
33 EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
34 ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
35 FDR	Tasa de falso descubrimiento
36 FGFR2	Receptor 2 del factor de crecimiento fibroblástico
37 FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
38 FOS	Homólogo del oncogen viral de osteosarcoma murino FBJ

39	GO	Ontología génica
40	HBEGF	Factor de crecimiento parecido a EGF de unión a heparina
41	HELA	Línea celular de cáncer cervical epitelial
42	HEPG2	Línea celular de carcinoma hepatocelular
43	HGF	Fibroblastos gingivales humanos
44	HGF/CEMP1	Fibroblastos gingivales humanos que sobreexpresan CEMP1
45	HMGB2	Proteína del grupo de alta motilidad box 2
46	HOXA5	Homeobox A5
47	hrCEMP1	Proteína del cemento 1 recombinante humana
48	HS587T	Línea celular de carcinoma de mama
49	ID	Identificador
50	INMEGEN	Instituto Nacional de Medicina Genómica
51	IPA	Ingenuity Pathway Analysis
52	KDa	Kilodalton
53	LogfCh	Fold-change logarítmico
54	MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
55	MCF7	Línea celular de carcinoma ductal de mama
56	MDAM	Línea celular de cáncer de mama
57	MET	Receptor del factor de crecimiento hepatocítico
58	MMP-9	Metaloproteínasa de matriz 9
59	MYC	Homólogo del oncogén viral de mielocitomatosis aviar
60	NIH3T3	Línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón
61	NIH3T3/CEMP1	Línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón que sobreexpresan CEMP1
62	OCN	Osteocalcina
63	OPN	Osteopontina
64	PC3	Línea celular de carcinoma de próstata
65	PCA	Análisis de componentes principales
66	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
67	PDK1	Cinasa piruvato deshidrogenasa 1
68	PI3K	fosfatidilinositol 3 cinasa
69	qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
70	r	valor de la prueba de correlación de Spearman
71	RAF	Homólogo del oncogén viral de leucemia murina
72	RAS	Homólogo del oncogén viral de sarcoma de rata
73	RD	Línea celular de rabdomyosarcoma humano
74	RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
75	RH28	Línea celular de rabdomyosarcoma alveolar
76	RIN	RNA integrity number
77	RMA	Robust multiarray average
78	RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa
79	RUNX2	Factor de transcripción asociado a Runt 2
80	SMS	Línea celular de rabdomyosarcoma embrionario

81	SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
82	SOX9	Proteína de la región Y determinante de sexo box 9
83	STAT3	Transductor de señal y activador de transcripción 3
84	STRO-1	Marcador 1 de superficie de células estromales
85	T47D	Línea celular de carcinoma ductal de mama
86	TEM	Transición epitelio-mesénquima
87	TME	Transición mesénquima- epitelio
88	UICC	Unión Internacional Contra el Cáncer
89	UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
90	μl	Microlitro
91	22RV1	Línea celular de carcinoma de próstata

4. TABLA SUPLEMENTARIA.

Tabla suplementaria 1. Transcritos DE.

	ID del transcrito	Símbolo	RefSeq	Valor de p	LogFch
1	8165661		---	2.96E-12	-8.57817
2	7951271	MMP1	NM_002421	1.79E-18	-8.23808
3	8165665		---	2.10E-13	-7.68055
4	8165648	C7orf11	AK290098	1.78E-16	-7.58448
5	8165690		---	2.45E-13	-7.5635
6	8137008	C7orf11	AK290098	7.94E-16	-7.48283
7	8165646		---	8.70E-09	-7.32441
8	8165644		---	3.05E-14	-7.31922
9	7951284	MMP3	NM_002422	4.29E-18	-7.15132
10	8165705		---	4.48E-13	-7.13555
11	8165674	SH3KBP1	AY423734	3.10E-13	-7.01634
12	7895026		---	1.06E-15	-6.71093
13	8102792	PCDH18	NM_019035	8.11E-15	-6.64088
14	8045835	GALNT5	NM_014568	6.11E-20	-6.58754
15	8165686		---	5.32E-15	-6.58725
16	7946563		---	5.12E-16	-6.58362
17	7895246		---	2.66E-14	-6.57761
18	8134263	COL1A2	NM_000089	9.63E-12	-6.53994
19	8112916		---	1.70E-08	-6.52806
20	8174970		---	1.70E-08	-6.52806
21	7896438		---	8.30E-14	-6.46761
22	7946565		---	1.53E-08	-6.39936
23	7892972		---	1.31E-13	-6.38419
24	8152512	TNFRSF11B	NM_002546	5.58E-18	-6.35117
25	7965410	DCN	NM_001920	1.15E-15	-6.33446
26	7953603	C1S	NM_201442	1.43E-18	-6.31714
27	8056257	FAP	NM_004460	3.05E-17	-6.2119
28	8056222	DPP4	NM_001935	9.84E-18	-6.19859
29	8059905	COL6A3	NM_004369	5.68E-12	-6.18947
30	7895203		---	1.55E-16	-6.12989
31	8151341	TRPA1	NM_007332	9.92E-13	-6.06223
32	7893619		---	1.53E-15	-6.05452
33	7893956		---	1.14E-11	-6.04449
34	8120967	NT5E	NM_002526	3.84E-16	-6.03816
35	8067839	KGFLP1	NR_003674	3.01E-16	-5.89811
36	7895985		---	4.40E-13	-5.8947
37	7896369		---	2.10E-12	-5.85589
38	7919815	CTSK	NM_000396	2.01E-15	-5.82001
39	7906900	DDR2	AY423733	7.22E-14	-5.79596
40	8165650	FTSJD2	AK000348	9.66E-11	-5.78869
41	7892630		---	7.49E-12	-5.75954
42	8078270	RPL15	NM_002948	2.39E-14	-5.72045

43	7892820		---	1.77E-12	-5.70225
44	8161423	KGFLP1	NR_003674	1.05E-16	-5.69765
45	8161455	KGFLP1	NR_003674	1.05E-16	-5.69765
46	8155487	KGFLP1	NR_003674	1.05E-16	-5.69765
47	8021081	SLC14A1	NM_001128588	6.44E-19	-5.69415
48	8131803	IL6	NM_000600	1.56E-15	-5.68211
49	7991335	ANPEP	NM_001150	1.39E-15	-5.57803
50	8165692		---	2.24E-07	-5.53756
51	8165700		---	3.13E-11	-5.51398
52	8165682		---	8.16E-11	-5.49472
53	8165698		---	2.72E-12	-5.46848
54	7911339		---	2.72E-12	-5.46848
55	7893573		---	3.52E-10	-5.43631
56	7954090	EMP1	NM_001423	2.22E-14	-5.37234
57	8165669	LOC440552	AB064665	4.30E-09	-5.31166
58	8088180	WNT5A	NM_003392	2.48E-18	-5.27968
59	8152522	ENPP2	NM_006209	4.70E-16	-5.2749
60	8019588	KRTAP1-5	NM_031957	2.54E-11	-5.26536
61	8111210		---	1.39E-14	-5.25288
62	8094301	SLIT2	NM_004787	1.65E-16	-5.24127
63	8112914	DHFR	BC000192	4.97E-14	-5.23492
64	8089038		---	4.97E-14	-5.23492
65	8131844	GPNMB	NM_001005340	1.44E-18	-5.1478
66	8083494	MME	NM_007288	2.28E-16	-5.13702
67	7982377	GREM1	NM_013372	4.21E-14	-5.1117
68	8165653	HNRNPM	AK293612	1.54E-09	-5.11121
69	7907222	PRRX1	NM_006902	5.84E-19	-5.09417
70	7995681	MMP2	NM_004530	2.90E-17	-5.06558
71	8152617	HAS2	NM_005328	3.88E-12	-5.06468
72	7894974		---	1.11E-10	-5.02842
73	8165676		---	2.94E-11	-5.02696
74	7892803		---	3.62E-12	-5.02539
75	7893264		---	2.84E-11	-4.99385
76	7985317	KIAA1199	NM_018689	9.60E-13	-4.9593
77	7895578		---	5.55E-14	-4.95762
78	8051583	CYP1B1	NM_000104	6.25E-13	-4.94814
79	7895954		---	2.30E-12	-4.93686
80	8001800	CDH11	NM_001797	4.80E-16	-4.90859
81	8141016	TFPI2	NM_006528	1.80E-14	-4.90178
82	8033257	C3	NM_000064	8.67E-18	-4.88763
83	7932254	ITGA8	NM_003638	2.00E-15	-4.86918
84	7895417		---	1.49E-10	-4.85943
85	8130867	THBS2	NM_003247	5.12E-20	-4.85499
86	8015179	KRTAP1-5	NM_031957	1.01E-10	-4.84387
87	7906878	DDR2	NM_001014796	5.41E-16	-4.83984
88	7894527		---	7.57E-15	-4.81133
89	7952268	THY1	NM_006288	7.04E-17	-4.78131
90	8113120	TOB2	BC028919	3.58E-16	-4.76594

91	8165707	TOB2	BC028919	3.58E-16	-4.76594
92	8157487	PAPPA	NM_002581	5.36E-17	-4.74704
93	8165709		---	1.27E-16	-4.74147
94	8006433	CCL2	NM_002982	1.43E-10	-4.73911
95	7983630	FGF7	NM_002009	2.06E-16	-4.6688
96	8095080	PDGFRA	NM_006206	5.68E-15	-4.6423
97	7894698		---	2.43E-10	-4.63967
98	7897801	RNU5E	NR_002754	3.81E-13	-4.62423
99	7922976	PTGS2	NM_000963	2.61E-14	-4.60946
100	7947512	PAMR1	NM_015430	3.51E-22	-4.60726
101	8023497	ATP8B1	NM_005603	2.65E-11	-4.58914
102	7971077	POSTN	NM_006475	1.50E-08	-4.57372
103	7893339		---	1.67E-11	-4.56875
104	7895382		---	6.19E-10	-4.56563
105	7893564		---	7.58E-14	-4.49873
106	7962058	TMTC1	NM_175861	7.36E-15	-4.48878
107	8122334	CCRL1	NM_178445	1.63E-13	-4.47678
108	7957260	GLIPR1	NM_006851	5.16E-14	-4.45293
109	7983360	B2M	NM_004048	1.22E-17	-4.43821
110	8043995	IL1R1	NM_000877	1.77E-14	-4.42182
111	7896064		---	5.82E-12	-4.40489
112	7908459	CFH	NM_000186	4.34E-17	-4.4047
113	7894990		---	1.40E-12	-4.3697
114	8127563	COL12A1	NM_004370	1.61E-12	-4.33165
115	7896529		---	5.44E-13	-4.31597
116	8106743	VCAN	NM_004385	4.70E-13	-4.30385
117	8113800	FBN2	NM_001999	1.95E-12	-4.29863
118	8082100	PARP14	NM_017554	8.11E-11	-4.28449
119	8105302	FST	NM_006350	3.18E-15	-4.28274
120	8068713	MX1	NM_002462	3.12E-09	-4.26917
121	7945371	IFITM3	NM_021034	3.11E-15	-4.25888
122	8060503	SNORD57	NR_002738	7.26E-12	-4.25878
123	7911341		---	5.59E-10	-4.25527
124	7952341	ASAM	NM_024769	3.24E-19	-4.2295
125	8155169	RECK	NM_021111	1.02E-15	-4.22887
126	8165658	VIPR2	U18810	3.28E-09	-4.22835
127	7995783	MT2A	NM_005953	1.83E-10	-4.21135
128	8134257	GNG11	NM_004126	1.03E-13	-4.20037
129	7896169		---	6.51E-15	-4.19461
130	8163257	LPAR1	NM_057159	3.34E-18	-4.19334
131	7902452	AK5	NM_174858	4.55E-14	-4.19099
132	7934906	ACTA2	NM_001141945	4.15E-14	-4.17697
133	8034512	SNORD41	NR_002751	3.75E-16	-4.17195
134	8046922	COL3A1	NM_000090	1.03E-10	-4.1693
135	7937335	IFITM1	NM_003641	1.07E-14	-4.16339
136	7958913	OAS2	NM_002535	1.86E-09	-4.1516
137	7896370		---	2.44E-10	-4.15072
138	7895252		---	2.73E-10	-4.12019

139	7893497		---	1.31E-10	-4.11536
140	8005547	SNORD3A	NR_006880	1.40E-13	-4.11471
141	8005553	SNORD3A	NR_006880	1.40E-13	-4.11471
142	8013323	SNORD3A	NR_006880	1.40E-13	-4.11471
143	8013325	SNORD3A	NR_006880	1.40E-13	-4.11471
144	8013329	SNORD3A	NR_006880	1.40E-13	-4.11471
145	8078155	GALNTL2	NM_054110	6.36E-12	-4.1144
146	7892610		---	1.86E-11	-4.11375
147	8009502	KCNJ2	NM_000891	1.83E-12	-4.10474
148	7932985	NRP1	NM_003873	6.17E-17	-4.09127
149	8081235	COL8A1	NM_001850	2.13E-14	-4.09017
150	8165694		---	9.52E-14	-4.08522
151	7911335		---	9.52E-14	-4.08522
152	8045688	TNFAIP6	NM_007115	2.42E-14	-4.06754
153	7896095		---	3.38E-11	-4.06318
154	8041383	LTBP1	NM_206943	3.62E-14	-4.0629
155	8021635	SERPINB2	NM_001143818	5.20E-12	-4.06055
156	8143127	FAM180A	AY358803	2.41E-12	-4.05035
157	7892598		---	6.24E-10	-4.0437
158	7965322	KITLG	NM_000899	6.61E-12	-4.03289
159	7966122	TMEM119	NM_181724	2.30E-17	-4.01988
160	7936835	CPXM2	NM_198148	2.23E-17	-4.00766
161	8017843	SLC16A6	NM_004694	6.92E-14	-4.00316
162	7928429	PLAU	NM_002658	1.48E-16	-4.0003
163	8051501	EIF2AK2	NM_002759	2.57E-11	-3.98938
164	7895283		---	3.40E-09	-3.97498
165	8135734	C7orf58	NM_024913	5.36E-16	-3.91485
166	8165808	XG	NM_001141919	4.27E-13	-3.91474
167	8045539	KYNU	NM_003937	2.99E-12	-3.9111
168	8176360	CD99	NM_002414	1.23E-16	-3.90891
169	7896269		---	4.24E-13	-3.90031
170	8083092	ZBTB38	NM_001080412	1.86E-10	-3.89758
171	7904506	NBPF20	AK095030	7.53E-14	-3.88568
172	8115851	STC2	NM_003714	2.53E-12	-3.86552
173	7999634	NPIP	NM_006985	3.45E-14	-3.85531
174	8165794	CD99	NM_002414	1.65E-16	-3.85453
175	8107204		---	4.99E-14	-3.84204
176	8149551	PSD3	NM_015310	4.00E-13	-3.84138
177	7919412	NBPF16	NM_001102663	6.03E-15	-3.83482
178	7896722		---	6.71E-10	-3.81704
179	7914127	IFI6	NM_002038	3.77E-16	-3.79023
180	8095697	CXCL1	NM_001511	5.37E-10	-3.78704
181	8003667	SERPINF1	NM_002615	8.21E-15	-3.78596
182	7904486	NBPF20	AK294414	4.60E-13	-3.77201
183	7979133	NID2	NM_007361	2.21E-14	-3.76458
184	8043375		---	5.02E-07	-3.76076
185	8149825	STC1	NM_003155	2.36E-08	-3.75994
186	7973336	MMP14	NM_004995	6.19E-13	-3.7242

187	7896310		---	1.42E-12	-3.71744
188	8023727	DSEL	NM_032160	1.68E-12	-3.70828
189	8132557	AEBP1	NM_001129	1.67E-14	-3.70233
190	7980908	FBLN5	NM_006329	1.05E-15	-3.70219
191	7993359	NPIP	NM_006985	1.23E-14	-3.70133
192	7895275		---	9.49E-12	-3.7001
193	7892817		---	5.72E-08	-3.69863
194	7894661		---	5.97E-10	-3.69846
195	8163328	PTGR1	NM_001146108	2.81E-15	-3.69677
196	8162179	GAS1	NM_002048	2.37E-14	-3.69083
197	7993349	NPIP	NM_006985	1.27E-14	-3.68275
198	8137264	TMEM176A	NM_018487	2.32E-14	-3.68201
199	7938225	OLFML1	NM_198474	2.75E-11	-3.67266
200	7894725		---	1.84E-13	-3.66952
201	8165680		---	2.45E-07	-3.65881
202	8037283	PSG4	NM_002780	3.88E-14	-3.64443
203	8030362	SNORD33	NR_000020	2.56E-14	-3.6325
204	8088919	ROBO1	NM_133631	4.66E-16	-3.62849
205	8107100	RGMB	NM_001012761	1.73E-15	-3.62463
206	7960744	C1R	NM_001733	4.37E-14	-3.61897
207	7949588	CD248	NM_020404	3.97E-11	-3.60888
208	8175531	CDR1	NM_004065	1.55E-14	-3.60454
209	7938035	TRIM22	NM_006074	1.01E-12	-3.60375
210	8135594	CAV1	NM_001753	1.04E-09	-3.60253
211	8083887	CLDN11	NM_005602	5.76E-15	-3.60197
212	8058857	IGFBP5	NM_000599	5.69E-09	-3.60091
213	8068697	MX2	NM_002463	4.81E-09	-3.59588
214	8075728	MYH9	NM_002473	1.09E-16	-3.58445
215	7932733	MKX	NM_173576	2.44E-16	-3.56582
216	8180376		---	7.03E-11	-3.56373
217	8103563	DDX60	NM_017631	4.90E-09	-3.55464
218	7956878	IRAK3	NM_007199	1.93E-11	-3.54095
219	8098060	RXFP1	NM_021634	3.16E-11	-3.53757
220	7904574	NBPF10	NM_001039703	2.86E-15	-3.53462
221	8111772	DAB2	NM_001343	1.92E-12	-3.53429
222	8165667		---	6.37E-07	-3.53137
223	7896752		---	6.37E-07	-3.53137
224	7909400	CD46	NM_002389	3.59E-16	-3.52063
225	7997520	HSBP1	NM_001537	3.54E-14	-3.52017
226	7902541	IFI44L	NM_006820	6.39E-09	-3.51026
227	7951397	CASP1	NM_033292	1.29E-12	-3.50901
228	8103601	DDX60L	NM_001012967	3.15E-10	-3.50802
229	7966690	TBX3	NM_016569	8.20E-15	-3.50512
230	7917516	GBP1	NM_002053	1.18E-12	-3.50413
231	8023575	CCBE1	NM_133459	3.29E-13	-3.49259
232	8066117	SAMHD1	NM_015474	1.25E-08	-3.48665
233	7904562	NBPF14	AK294944	1.17E-11	-3.48224
234	8157650	PTGS1	NM_000962	2.97E-11	-3.48158

235	7893608		---	7.19E-09	-3.47736
236	7904500	NBPF12	ENST00000436832	8.58E-12	-3.47508
237	7893958		---	9.84E-10	-3.46565
238	7969861	ITGBL1	NM_004791	1.16E-15	-3.45334
239	8081867	C3orf1	NM_016589	4.25E-14	-3.4503
240	7973871		---	1.32E-11	-3.43459
241	8165696		---	1.32E-11	-3.43459
242	7911337		---	1.32E-11	-3.43459
243	8169717	GRIA3	NM_007325	1.08E-13	-3.42962
244	7895752		---	2.13E-09	-3.42498
245	8097256	FGF2	NM_002006	2.58E-13	-3.41783
246	8151952	NIPAL2	NM_024759	1.95E-12	-3.40635
247	8130556	SOD2	NM_001024465	6.20E-13	-3.40374
248	7975989	C14orf156	NM_031210	3.81E-12	-3.39421
249	8165703	UIMC1	AF284753	1.35E-11	-3.38707
250	7911343	UIMC1	AF284753	1.35E-11	-3.38707
251	8109490	SGCD	NM_000337	2.83E-12	-3.37426
252	7952129	RPS25	NM_001028	8.36E-16	-3.36925
253	7980152	LTBP2	NM_000428	5.07E-17	-3.36014
254	8149534	ASAH1	NM_004315	3.30E-18	-3.35447
255	8086752	SNORD13	NR_003041	7.55E-09	-3.35166
256	7895276		---	1.27E-13	-3.34665
257	7894896		---	2.07E-07	-3.34649
258	8115099	PDGFRB	NM_002609	1.60E-13	-3.33351
259	8017850	WIPI1	NM_017983	4.19E-13	-3.32403
260	8149330	CTSB	NM_147780	8.34E-17	-3.32371
261	8084891	FAM43A	NM_153690	1.22E-13	-3.32272
262	7916493	PPAP2B	NM_003713	1.84E-16	-3.31821
263	7917240	CTBS	NM_004388	1.63E-14	-3.31691
264	7915592	RNU5F	M77840	8.83E-09	-3.3097
265	7965040	PHLDA1	NM_007350	1.07E-14	-3.29949
266	7972055	KCTD12	NM_138444	1.40E-13	-3.29666
267	8090018	PARP9	NM_031458	3.20E-07	-3.29525
268	8059376	SERPINE2	NM_001136529	3.65E-14	-3.28744
269	7904569	NBPF14	ENST00000310701	5.24E-13	-3.28727
270	8062312	MYL9	NM_006097	6.41E-16	-3.28187
271	8104663	CDH6	NM_004932	1.32E-09	-3.28033
272	8155530	KGFLP2	NR_003670	8.68E-16	-3.27451
273	8041781	EPAS1	NM_001430	9.32E-17	-3.27448
274	8007100	IGFBP4	NM_001552	6.35E-14	-3.27199
275	8086451	HIGD1A	NM_001099669	2.87E-12	-3.26892
276	8002303	NQO1	NM_000903	1.53E-12	-3.26602
277	8083594	PTX3	NM_002852	5.00E-09	-3.26582
278	8130993	FAM20C	NM_020223	5.13E-14	-3.26521
279	8163637	TNC	NM_002160	3.29E-10	-3.26185
280	7908351	PLA2G4A	NM_024420	5.74E-13	-3.25936
281	8131614	AHR	NM_001621	1.42E-15	-3.25844
282	7948656	FTH1	NM_002032	2.63E-13	-3.25218

283	7940565	FADS2	NM_004265	4.61E-15	-3.25191
284	8046695	ITGA4	NM_000885	6.55E-14	-3.24523
285	7895472		---	1.40E-10	-3.24162
286	7925452	GREM2	NM_022469	1.41E-10	-3.23796
287	8128991	LAMA4	NM_001105206	2.56E-13	-3.23697
288	7909730	KCNK2	NM_001017425	4.68E-09	-3.2332
289	7983228	MAP1A	NM_002373	6.35E-13	-3.23318
290	7965403	LUM	NM_002345	3.72E-10	-3.23169
291	8040080	RSAD2	NM_080657	1.74E-08	-3.23049
292	8030171	FTL	NM_000146	2.76E-13	-3.22234
293	8095688	CXCL6	NM_002993	2.47E-11	-3.21887
294	7894374		---	1.16E-10	-3.21753
295	8096335	HERC6	NM_017912	1.72E-07	-3.21645
296	8162216	SHC3	NM_016848	2.13E-16	-3.21414
297	8072735	APOL1	NM_145343	1.51E-12	-3.2139
298	8139891	SBDS	NM_016038	1.74E-14	-3.21233
299	7893371		---	2.38E-13	-3.21168
300	7894666		---	1.25E-08	-3.20559
301	7962537	SLC38A2	NM_018976	3.14E-11	-3.20544
302	7977775	DAD1	NM_001344	8.07E-15	-3.20365
303	7910385		---	1.39E-10	-3.20143
304	7946567		---	3.84E-10	-3.20124
305	8081548	PVRL3	NM_015480	1.84E-12	-3.20073
306	8020495	CABLES1	NM_138375	3.03E-13	-3.19918
307	7947425	CD59	NM_203330	1.96E-15	-3.19513
308	8112139	IL6ST	NM_002184	1.26E-11	-3.19225
309	8081431	ALCAM	NM_001627	7.70E-15	-3.18363
310	8016646	COL1A1	NM_000088	2.63E-09	-3.18169
311	7902353	LHX8	NM_001001933	5.09E-11	-3.17529
312	8056102	CD302	NM_014880	1.14E-11	-3.17489
313	7909271	IL24	NM_006850	1.85E-06	-3.16795
314	8095021	SPATA18	NM_145263	1.22E-14	-3.16091
315	7919438	NBPF16	NM_001102663	3.05E-14	-3.16005
316	7964119	STAT2	NM_005419	2.24E-11	-3.15349
317	8096050	FGF5	NM_004464	7.81E-12	-3.14407
318	7988467	FBN1	NM_000138	1.42E-12	-3.14015
319	7904874	RP11-94I2.2	NM_183372	3.09E-13	-3.13509
320	8016390	COPZ2	NM_016429	3.16E-12	-3.12943
321	7894068		---	2.03E-11	-3.12445
322	8097288	FAT4	NM_024582	1.15E-10	-3.12381
323	8046333	CYBRD1	NM_024843	1.15E-16	-3.11275
324	8055688	RND3	NM_005168	3.82E-14	-3.10745
325	8102468	PRSS12	NM_003619	1.13E-14	-3.10195
326	8140668	SEMA3A	NM_006080	8.94E-08	-3.09838
327	7902553	IFI44	NM_006417	2.41E-08	-3.08062
328	7895677		---	1.46E-07	-3.08021
329	8107044	ERAP2	NM_022350	2.25E-12	-3.07484
330	7958895	OAS3	NM_006187	8.47E-09	-3.07466

331	8092661	MASP1	NM_001879	3.50E-14	-3.0712
332	8138527	MGC87042	BC066301	1.30E-09	-3.0684
333	7961829	BCAT1	NM_005504	3.10E-12	-3.06798
334	7906061	SYT11	NM_152280	5.58E-16	-3.06708
335	7895277		---	1.02E-08	-3.06673
336	8092055	SLC7A14	NM_020949	5.10E-13	-3.06558
337	7896044		---	4.35E-11	-3.06391
338	7895729		---	1.43E-07	-3.06156
339	8090098	MYLK	NM_053025	2.23E-15	-3.06036
340	7940028	SERPING1	NM_000062	2.47E-14	-3.05623
341	7966315	ARPC3	NM_005719	1.40E-13	-3.05154
342	7906400	IFI16	NM_005531	4.74E-11	-3.0513
343	8112980	EDIL3	NM_005711	4.86E-12	-3.05042
344	7976443	IFI27	NM_001130080	7.48E-10	-3.04767
345	7977270	LOC388022	AK131040	8.51E-09	-3.04501
346	8154245	PDCD1LG2	NM_025239	4.52E-08	-3.04217
347	7946661	DKK3	NM_015881	2.33E-12	-3.04
348	8168749	SRPX2	NM_014467	1.09E-14	-3.03942
349	7976567	BDKRB1	NM_000710	8.48E-12	-3.03919
350	7894722		---	5.94E-09	-3.02538
351	8097098	USP53	NM_019050	3.80E-09	-3.0192
352	7904999	NBPF16	NM_001102663	1.90E-14	-3.01668
353	7982597	THBS1	NM_003246	2.49E-10	-3.01405
354	8104901	IL7R	NM_002185	5.54E-06	-3.01044
355	8151310	EYA1	NM_000503	1.43E-13	-3.00045
356	7940153	FAM111A	NM_022074	2.43E-10	-2.99689
357	7950644	NDUFC2	NM_004549	3.14E-12	-2.99349
358	7892565		---	1.15E-09	-2.98971
359	7958884	OAS1	NM_016816	9.15E-07	-2.98264
360	8138602	DFNA5	NM_004403	3.41E-12	-2.98082
361	7970329	GAS6	NM_000820	9.53E-13	-2.97933
362	8096361	HERC5	NM_016323	1.08E-08	-2.97708
363	8110569	SQSTM1	NM_003900	4.93E-15	-2.9701
364	7952325	HSPA8	NM_006597	1.83E-11	-2.96325
365	8165672	RFC1	L23320	1.04E-05	-2.95917
366	8163202	SVEP1	NM_153366	4.23E-11	-2.95096
367	7993580	NPIP	NM_006985	2.53E-15	-2.94124
368	8030007	EMP3	NM_001425	2.00E-13	-2.93973
369	7970763	FLT1	NM_002019	1.07E-10	-2.9391
370	8101260	ANTXR2	NM_058172	4.91E-14	-2.93708
371	7895001		---	1.14E-08	-2.93182
372	7919351	RP11-9412.2	NM_183372	3.22E-13	-2.92248
373	8055624	ZEB2	NM_014795	7.99E-14	-2.91637
374	7902495	NEXN	NM_144573	2.47E-07	-2.91536
375	7926368	VIM	NM_003380	2.22E-11	-2.90617
376	7912808	NBPF16	NM_001102663	2.08E-12	-2.89982
377	8105267	ITGA2	NM_002203	8.52E-11	-2.89528
378	7893086		---	4.55E-11	-2.89246

379	8100541	IGFBP7	NM_001553	7.04E-13	-2.88427
380	7937330	IFITM2	NM_006435	5.93E-14	-2.88351
381	7999769	NPIP	NM_006985	3.09E-16	-2.87069
382	8067279	CTSZ	NM_001336	9.16E-21	-2.86678
383	7895088		---	2.00E-10	-2.85779
384	8140556	HGF	NM_000601	1.83E-10	-2.85778
385	7894074		---	9.03E-14	-2.84371
386	7920271	S100A4	NM_019554	3.74E-15	-2.84168
387	7919271	RP11-94I2.2	NM_183372	6.80E-13	-2.8387
388	7949503	EFEMP2	NM_016938	3.64E-15	-2.8384
389	8113709	LOX	NM_002317	1.45E-09	-2.83615
390	7894496		---	1.43E-12	-2.83447
391	8150906	IMPAD1	NM_017813	3.79E-10	-2.8186
392	8069269	COL6A1	NM_001848	8.66E-13	-2.81558
393	8089145	ABI3BP	NM_015429	8.33E-10	-2.8111
394	8136849	GSTK1	NM_001143679	2.72E-15	-2.80781
395	7895818		---	2.84E-08	-2.80714
396	8077970	FBLN2	NM_001004019	5.87E-11	-2.80545
397	8120602	OGFRL1	NM_024576	1.64E-12	-2.79402
398	7973352	LRP10	NM_014045	2.33E-15	-2.79243
399	7951372	CASP4	NM_033306	1.12E-13	-2.79187
400	8134869	PCOLCE	NM_002593	4.94E-13	-2.79168
401	8145793	SNORD13	NR_003041	5.15E-09	-2.79155
402	7892776		---	3.89E-09	-2.79087
403	8010426	KIAA1618	NM_020954	2.31E-12	-2.78076
404	8161044	TPM2	NM_003289	7.36E-12	-2.7744
405	8014316	CCL5	NM_002985	7.76E-12	-2.77421
406	8121601	FAM26E	NM_153711	2.26E-08	-2.77063
407	7910022	CNIH3	NM_152495	6.42E-12	-2.76694
408	8056285	IFIH1	NM_022168	2.98E-07	-2.75992
409	7895490		---	7.47E-06	-2.75458
410	7932796	SVIL	NM_021738	8.37E-11	-2.75166
411	8100347	SCFD2	NM_152540	3.48E-12	-2.75029
412	7929032	FAS	NM_000043	2.67E-10	-2.74197
413	8141791	POLR2J3	NM_001097615	4.45E-14	-2.7408
414	8149733	TNFRSF10B	NM_003842	2.19E-14	-2.73869
415	7942586	RPS3	NM_001005	1.23E-10	-2.73825
416	7894447		---	7.67E-08	-2.73684
417	8113214	GLRX	NM_002064	7.19E-10	-2.73182
418	8059470	IRS1	NM_005544	8.16E-13	-2.7297
419	7979033	SAV1	NM_021818	1.07E-12	-2.72736
420	7900228	NDUFS5	NM_004552	1.44E-13	-2.72524
421	7919800	CTSS	NM_004079	4.68E-11	-2.72181
422	8133300	PMS2L2	NR_003614	9.12E-13	-2.72016
423	8166184	CA5B	NM_007220	1.97E-11	-2.71873
424	8087337	LAMB2	NM_002292	1.05E-12	-2.71733
425	7976073	FLRT2	NM_013231	4.79E-10	-2.71449
426	8145865	GPR124	NM_032777	1.11E-13	-2.71126

427	8138542	IL6	NM_000600	4.46E-14	-2.70684
428	7974316	FRMD6	NM_001042481	1.41E-08	-2.7027
429	8146921	RDH10	NM_172037	5.65E-10	-2.70092
430	8069301	COL6A2	NM_001849	1.03E-12	-2.69315
431	7968883	C13orf31	NM_153218	5.61E-09	-2.69137
432	7989335	ANXA2	NM_001002858	9.04E-11	-2.69077
433	8051814	ZFP36L2	NM_006887	6.15E-10	-2.689
434	8102619	ANXA5	NM_001154	4.88E-11	-2.68881
435	7933194	CXCL12	NM_000609	2.64E-13	-2.68862
436	8027932	COX6B1	NM_001863	5.63E-16	-2.68353
437	8161362	KGFLP2	NR_003670	4.09E-15	-2.68017
438	8140239	PMS2L1	NR_003613	1.18E-11	-2.67682
439	7999614	NPIP	NM_006985	1.54E-14	-2.67602
440	8139758	CHCHD2	NM_016139	2.27E-14	-2.67394
441	8140971	SAMD9L	NM_152703	9.97E-07	-2.67241
442	8048940	SP100	NM_001080391	1.69E-09	-2.67036
443	8124531	HIST1H3I	NM_003533	3.50E-09	-2.66635
444	8161024	RMRP	NR_003051	5.00E-16	-2.6622
445	8125500	PSMB8	NM_004159	1.06E-10	-2.65938
446	8178855	PSMB8	NM_004159	1.06E-10	-2.65938
447	8180049	PSMB8	NM_004159	1.06E-10	-2.65938
448	7932584	PRTFDC1	NM_020200	1.27E-11	-2.6521
449	7957551	SOCS2	NM_003877	1.14E-11	-2.64828
450	8103822	VEGFC	NM_005429	3.10E-13	-2.64526
451	7902527	PTGFR	NM_001039585	1.02E-13	-2.64131
452	7976795	MEG3	NR_003530	2.67E-11	-2.64114
453	8005475	TRIM16L	NM_001037330	1.04E-11	-2.63937
454	8019183	ACTG1	NM_001614	8.76E-12	-2.63731
455	8047078	MFSD6	NM_017694	1.07E-11	-2.6363
456	8095680	IL8	NM_000584	6.76E-08	-2.63381
457	8129254	MAN1A1	NM_005907	1.48E-14	-2.61915
458	7954063	RPL13AP20	NR_003932	1.78E-13	-2.61433
459	8132250	BMPER	NM_133468	3.06E-11	-2.61121
460	8108180		---	1.91E-12	-2.60981
461	8056491	SCN9A	NM_002977	1.71E-08	-2.60741
462	7935251	TCTN3	NM_015631	6.82E-12	-2.59932
463	7953040	CACNA1C	NM_199460	7.68E-16	-2.59838
464	7956658	SLC16A7	NM_004731	1.38E-14	-2.59702
465	8083090	ZBTB38	NM_001080412	1.03E-08	-2.59679
466	7893777		---	2.54E-07	-2.59577
467	8042439	ANTXR1	NM_032208	2.01E-13	-2.59569
468	7904976	NBPF16	NM_001102663	6.59E-13	-2.59207
469	8005166	UBB	NM_018955	2.51E-12	-2.5875
470	8112918		---	4.04E-08	-2.58577
471	7902127	SGIP1	NM_032291	6.09E-13	-2.58478
472	7972157	EDNRB	NM_001122659	1.08E-05	-2.5833
473	8088979	VGLL3	NM_016206	3.46E-10	-2.58218
474	7973867		---	6.01E-07	-2.57996

475	7929052	IFIT3	NM_001031683	6.29E-07	-2.57574
476	8082075	DTX3L	NM_138287	3.72E-08	-2.57353
477	7972946	RASA3	NM_007368	8.21E-18	-2.57348
478	8026875	SNORA68	NR_000012	2.47E-12	-2.57281
479	7935058	MYOF	NM_013451	2.45E-09	-2.56929
480	8063536	TFAP2C	NM_003222	1.12E-15	-2.56783
481	7894125		---	4.31E-11	-2.5653
482	7920697	GBA	NM_000157	1.19E-12	-2.55449
483	7948332	LPXN	NM_004811	1.78E-07	-2.55415
484	7978833	RPL36AL	NM_001001	2.50E-11	-2.55341
485	7918379	GSTM3	NM_000849	3.83E-12	-2.55324
486	8073775	FBLN1	NM_006486	1.07E-13	-2.55323
487	8074606	USP18	NM_017414	6.50E-07	-2.54953
488	8009040	MRC2	NM_006039	2.61E-11	-2.54594
489	7968789	C13orf15	NM_014059	5.08E-13	-2.54587
490	7936968	ADAM12	NM_003474	3.09E-09	-2.54553
491	8172022	TMEM47	NM_031442	7.34E-12	-2.54494
492	8006531	SLFN5	NM_144975	6.02E-13	-2.53762
493	8053406	RETSAT	NM_017750	1.65E-16	-2.53751
494	7929511	ENTPD1	NM_001776	4.50E-07	-2.53734
495	7955719	HIGD1A	NM_001099668	4.10E-09	-2.53058
496	7930304	GSTO1	NM_004832	6.68E-12	-2.52547
497	8017651	SMURF2	NM_022739	2.65E-07	-2.52535
498	8107421	AP3S1	NM_001284	1.81E-16	-2.52313
499	8140258	PMS2L5	NR_027775	7.50E-12	-2.51924
500	7892876		---	2.93E-06	-2.51736
501	7970569	SACS	NM_014363	2.53E-10	-2.51466
502	8072454	RNF185	NR_024210	1.38E-11	-2.51253
503	7970602	PARP4	NM_006437	8.02E-10	-2.5099
504	8114920	DPYSL3	NM_001387	8.81E-13	-2.50819
505	8095110	KIT	NM_000222	1.33E-08	-2.50788
506	8140269	PMS2L5	NR_027775	6.32E-12	-2.50709
507	8115895	KIAA1191	NM_020444	4.92E-13	-2.50619
508	7943218	PANX1	NM_015368	1.63E-15	-2.50479
509	8135488	LRRN3	NM_001099660	1.24E-09	-2.49303
510	7953012	WNT5B	NM_032642	2.87E-14	-2.48618
511	7944765		---	1.53E-09	-2.47732
512	7895153		---	3.56E-07	-2.47699
513	7913380	NBPF3	NM_032264	8.17E-11	-2.47163
514	8107321	C5orf26	AB048207	5.10E-10	-2.4704
515	7892650		---	1.33E-11	-2.45709
516	8097773	MAB21L2	NM_006439	1.25E-11	-2.45492
517	7971590	CAB39L	NM_030925	8.48E-10	-2.45325
518	8180300		---	9.61E-12	-2.45006
519	7895263		---	2.68E-09	-2.44846
520	8057599	TFPI	NM_006287	1.96E-09	-2.44782
521	8111993	FGF10	NM_004465	3.20E-08	-2.44737
522	8103415	C4orf18	NM_001128424	2.53E-11	-2.44451

523	8133938	CROT	NM_001143935	2.30E-06	-2.44407
524	7892668		---	3.95E-09	-2.44285
525	7892682		---	0.000133	-2.43993
526	7993458	C16orf45	NM_033201	1.13E-12	-2.43869
527	7925929	AKR1C3	NM_003739	3.80E-10	-2.43767
528	8094778	UCHL1	NM_004181	3.16E-11	-2.43713
529	8047401		---	1.80E-08	-2.43635
530	8031646	LOC100288114	AK302988	1.27E-08	-2.43221
531	7938390	ADM	NM_001124	5.53E-06	-2.43047
532	7895444		---	5.92E-08	-2.42974
533	8060897	PLCB4	NM_000933	6.24E-06	-2.42832
534	7927606	PRKG1	NM_001098512	5.62E-12	-2.42631
535	8172425	SLC38A5	NM_033518	7.45E-11	-2.42159
536	8116579	FOXQ1	NM_033260	1.10E-11	-2.41386
537	7993404	NPIP	NM_006985	1.65E-14	-2.41309
538	7944850	TBRG1	NM_032811	4.30E-14	-2.41294
539	7972336	DZIP1	NM_198968	8.39E-12	-2.40913
540	8041508	QPCT	NM_012413	2.14E-13	-2.40665
541	8133155	TPST1	NM_003596	1.04E-11	-2.40567
542	7985016	SNX33	NM_153271	6.18E-14	-2.40559
543	8143054	AKR1B1	NM_001628	2.43E-09	-2.40532
544	8140280	PMS2L2	NR_003614	1.06E-12	-2.40302
545	8165866	STS	NM_000351	1.13E-12	-2.40293
546	8090433	MGLL	NM_007283	1.64E-13	-2.40281
547	8088848	PDZRN3	NM_015009	1.13E-10	-2.40035
548	8143144	PTN	NM_002825	3.10E-13	-2.39518
549	8107909	SLC22A4	NM_003059	2.67E-08	-2.39128
550	8140864	CYP51A1	NM_000786	3.38E-14	-2.39047
551	8155121	NPR2	NM_003995	1.68E-13	-2.38716
552	8147777	CTHRC1	NM_138455	1.13E-12	-2.38697
553	8056763		---	2.17E-09	-2.38619
554	8068266	IFNAR1	NM_000629	3.35E-08	-2.38547
555	7892836		---	7.27E-10	-2.38501
556	7968670	UFM1	NM_016617	1.16E-12	-2.38298
557	7993546	NPIP	NM_006985	4.14E-15	-2.38153
558	7927146	CSGALNACT2	NM_018590	8.34E-12	-2.38019
559	7958019	DRAM1	NM_018370	2.03E-07	-2.37872
560	7929065	IFIT1	NM_001548	1.61E-07	-2.37769
561	8047300	AOX1	NM_001159	3.17E-12	-2.37679
562	7938100	SMPD1	NM_000543	4.30E-12	-2.3751
563	7962000	PTHLH	NM_198965	2.76E-09	-2.37506
564	8140579	CACNA2D1	NM_000722	8.00E-08	-2.37493
565	8172043	SRPX	NM_006307	1.58E-11	-2.37454
566	8151334	MSC	NM_005098	2.26E-15	-2.37354
567	8174103	GK	NM_001128127	5.03E-08	-2.37037
568	7939052	FIBIN	NM_203371	3.48E-09	-2.36974
569	7894108		---	1.21E-08	-2.3696
570	8005191	NCRNA00188	BC027986	3.38E-11	-2.36842

571	7951207	TMEM123	NM_052932	3.11E-15	-2.36688
572	8133106	SNORA22	NR_002961	5.14E-10	-2.36649
573	8112967	TMEM167A	NM_174909	7.39E-13	-2.36567
574	8138289	ETV1	NM_004956	1.43E-07	-2.36102
575	7939642	CREB3L1	NM_052854	1.43E-12	-2.35957
576	7978312	RIPK3	NM_006871	1.65E-10	-2.35832
577	7926239	OPTN	NM_001008211	3.46E-14	-2.35368
578	7895599		---	7.06E-08	-2.35119
579	7895885		---	2.66E-10	-2.35107
580	8040792	EMILIN1	NM_007046	6.55E-14	-2.34955
581	8156826	TGFBR1	NM_004612	5.99E-12	-2.34849
582	8167185	TIMP1	NM_003254	4.35E-13	-2.34521
583	8047487	FZD7	NM_003507	6.55E-14	-2.34484
584	7948493	SLC15A3	NM_016582	1.66E-09	-2.34392
585	8120719	CD109	NM_133493	4.73E-12	-2.34222
586	8070701	CSTB	NM_000100	3.42E-16	-2.34043
587	8113250	ERAP1	NM_001040458	3.07E-11	-2.33676
588	8160559	DDX58	NM_014314	7.15E-06	-2.33432
589	8086467	ANO10	NM_018075	2.30E-11	-2.32991
590	8071649	BMS1	BC043345	1.95E-10	-2.32873
591	8138553	FAM126A	NM_032581	1.96E-10	-2.32652
592	8061227	SLC24A3	NM_020689	2.96E-11	-2.32354
593	8171172	MXRA5	NM_015419	9.01E-08	-2.32283
594	7927323	FAM21B	NM_018232	3.23E-10	-2.3216
595	8146550	SDCBP	NM_005625	8.89E-15	-2.31555
596	8174474	ACSL4	NM_022977	1.61E-09	-2.31443
597	7894315		---	0.000194	-2.30873
598	7934122	SAR1A	NM_001142648	1.28E-13	-2.30719
599	8078450	CRTAP	NM_006371	7.31E-14	-2.30646
600	7957298	NAV3	NM_014903	1.79E-06	-2.30317
601	8152703	FBXO32	NM_058229	1.02E-08	-2.30296
602	8004184	XAF1	NM_017523	9.92E-07	-2.3003
603	8164217	FAM129B	NM_022833	4.36E-15	-2.29782
604	7969129	PHF11	NM_001040443	1.33E-10	-2.29486
605	8115234	ANXA6	NM_001155	1.78E-11	-2.29184
606	8096635	NFKB1	NM_003998	1.01E-07	-2.29093
607	7980955	NDUFB1	NM_004545	4.55E-13	-2.29036
608	7907893	MR1	NM_001531	1.35E-10	-2.28934
609	8154733	ACO1	NM_002197	7.64E-11	-2.28888
610	7893918		---	9.05E-06	-2.28428
611	8147469	PGCP	NM_016134	7.01E-14	-2.27982
612	8120402	BAG2	NM_004282	4.56E-09	-2.27803
613	7895810		---	2.41E-08	-2.27705
614	7908041	LAMC1	NM_002293	7.82E-12	-2.27538
615	8023855	CYB5A	NM_148923	2.77E-13	-2.27129
616	8000131	NPIPL3	NM_130464	2.01E-12	-2.26485
617	8140967	SAMD9	NM_017654	1.11E-06	-2.26369
618	8000676	NPIPL3	NM_130464	1.69E-12	-2.26207

619	7895518		---	3.59E-08	-2.26162
620	7954810	LRRK2	NM_198578	8.19E-11	-2.25899
621	8150877	SNORD54	NR_002437	1.25E-09	-2.25844
622	7894439		---	4.30E-07	-2.25715
623	7895873		---	7.17E-08	-2.25616
624	8110932	SEMA5A	NM_003966	5.57E-09	-2.25419
625	7939120	RCN1	NM_002901	6.98E-10	-2.25367
626	7935553	LOXL4	NM_032211	5.22E-12	-2.25058
627	7951408	CARD16	NM_052889	1.18E-12	-2.24973
628	7903786	CSF1	NM_000757	2.67E-15	-2.24958
629	7994026	NPIPL3	NM_130464	1.79E-13	-2.24683
630	7971296	EPST11	NM_001002264	5.58E-07	-2.2426
631	8122222	PDE7B	NM_018945	1.60E-11	-2.24176
632	7917912	DPYD	NM_000110	3.14E-11	-2.23536
633	8138224	NDUFA4	NM_002489	2.55E-14	-2.23407
634	7959893	GPR133	NM_198827	1.06E-07	-2.23252
635	7896228		---	0.000179	-2.23031
636	7896423		---	8.18E-07	-2.22585
637	7950005	MARGPRF	NM_001098515	4.81E-12	-2.22469
638	7939341	CD44	NM_000610	3.59E-11	-2.22453
639	7910923	FMN2	NM_020066	7.01E-07	-2.22293
640	8017964	ABCA6	NM_080284	8.83E-08	-2.22054
641	7907830	QSOX1	NM_002826	2.46E-12	-2.21969
642	8025498	SNORA70	NR_000011	4.38E-09	-2.21776
643	8000998	VKORC1	NM_024006	7.76E-11	-2.2176
644	7892688		---	5.59E-09	-2.21558
645	8089544	CCDC80	NM_199511	2.82E-09	-2.21517
646	7943749	LAYN	NM_178834	7.80E-10	-2.21329
647	8161056	TLN1	NM_006289	5.09E-12	-2.21186
648	7892941		---	2.25E-09	-2.21065
649	7942123	CCND1	NM_053056	6.88E-10	-2.2103
650	8081288	TMEM45A	NM_018004	1.01E-07	-2.20574
651	8117435	BTN3A2	NM_007047	3.85E-12	-2.2042
652	8064432	FKBP1A	NM_000801	4.02E-09	-2.20339
653	7928551	RPS24	NM_033022	1.95E-13	-2.20185
654	7991234	MFGE8	NM_005928	3.85E-13	-2.20168
655	7963212	SLC11A2	NM_000617	2.01E-14	-2.20113
656	8061013	ISM1	NM_080826	2.10E-11	-2.20105
657	7965979	ALDH1L2	NM_001034173	1.46E-08	-2.20018
658	7893908		---	4.33E-05	-2.19692
659	8004510	CD68	NM_001251	2.33E-12	-2.19341
660	7896554		---	4.62E-09	-2.19309
661	7917532	GBP2	NM_004120	7.94E-13	-2.19259
662	7976560	BDKRB2	NM_000623	2.58E-12	-2.19137
663	8128565	POPDC3	NM_022361	1.89E-12	-2.18955
664	7894355		---	4.30E-06	-2.18811
665	8057898	HECW2	NM_020760	5.76E-09	-2.17808
666	8162276	NFIL3	NM_005384	1.85E-09	-2.17806

667	7893131		---	2.00E-06	-2.17706
668	8046726	SSFA2	NM_001130445	3.06E-11	-2.17667
669	8000205	NPIPL3	NM_130464	3.32E-12	-2.17545
670	8152297	ANGPT1	NM_001146	7.80E-09	-2.17469
671	7993511	NOMO3	NM_001004067	9.35E-15	-2.17431
672	8013523		---	6.18E-09	-2.17252
673	7924450	DUSP10	NM_007207	1.16E-09	-2.17229
674	7969651	DNAJC3	NM_006260	4.52E-10	-2.17101
675	8086406	SEC22C	NM_004206	1.48E-11	-2.1667
676	8150901	PENK	NM_006211	9.09E-08	-2.1664
677	8049044	ARMC9	NM_025139	2.70E-11	-2.16503
678	8143772	RARRES2	NM_002889	7.59E-07	-2.16456
679	7943413	BIRC3	NM_001165	5.42E-09	-2.16356
680	7902074	LEPR	NM_002303	4.20E-08	-2.162
681	7949971	CPT1A	NM_001876	1.58E-09	-2.15873
682	8108217	TGFBI	NM_000358	3.10E-10	-2.15733
683	7966068		---	2.94E-08	-2.15644
684	7896094		---	1.83E-09	-2.15413
685	7950731	PRCP	NM_199418	5.20E-12	-2.15041
686	7969060	FNDC3A	NM_001079673	1.86E-11	-2.14941
687	8104738	SUB1	NM_006713	2.22E-11	-2.1444
688	7994659	MVP	NM_017458	4.80E-11	-2.14085
689	8110427		---	3.32E-09	-2.13529
690	7955277	TMBIM6	NM_003217	4.07E-12	-2.13506
691	8112961	RPS23	NM_001025	2.08E-10	-2.13386
692	8086517	CDCP1	NM_022842	1.42E-08	-2.13206
693	7976816	SNORD114-3	NR_003195	2.82E-09	-2.13172
694	8023043	PSTPIP2	NM_024430	2.95E-10	-2.13095
695	7917182	ELTD1	NM_022159	7.14E-08	-2.12922
696	7893305		---	4.25E-05	-2.12879
697	8014233	SLFN11	NM_001104587	1.44E-11	-2.12605
698	7961083	CLEC2B	NM_005127	6.60E-09	-2.12491
699	8166632	GK	NM_001128127	1.03E-09	-2.12479
700	7986509	C15orf51	ENST00000423248	6.32E-10	-2.12127
701	7986512	LOC100289668	ENST00000426730	6.32E-10	-2.12127
702	7986527	C15orf51	AK125787	6.32E-10	-2.12127
703	7999791	NOMO3	NM_001004067	5.19E-15	-2.12053
704	8047709	PARD3B	NM_152526	2.81E-08	-2.11961
705	8123104	FNDC1	NM_032532	3.10E-09	-2.11901
706	7971150	LHFP	NM_005780	3.69E-13	-2.11865
707	8007441	RPL27	NM_000988	6.03E-13	-2.11719
708	8010086	C17orf95	NM_001080510	2.57E-10	-2.11607
709	8163896	STOM	NM_004099	3.80E-13	-2.11464
710	8088339	ARF4	NM_001660	7.48E-14	-2.11366
711	8068522	TTC3	NM_003316	1.02E-10	-2.11111
712	8052698	C1D	NM_006333	1.93E-09	-2.11066
713	8020179	CHMP1B	NM_020412	3.16E-10	-2.11001
714	8007919	LRRRC37A4	NR_002940	1.11E-07	-2.11001

715	8010287	C1QTNF1	NM_030968	8.21E-13	-2.10933
716	8146914	TERF1	NM_017489	3.91E-09	-2.10872
717	7986350	ARRDC4	NM_183376	4.60E-06	-2.10854
718	7895090		---	1.89E-05	-2.10666
719	8133531	PMS2L5	NR_027775	3.63E-13	-2.10528
720	8148049	NOV	NM_002514	1.97E-08	-2.10345
721	7937275	RIC8A	NM_021932	7.36E-10	-2.10261
722	7896439		---	9.86E-09	-2.10206
723	7955694	IGFBP6	NM_002178	5.03E-12	-2.10153
724	8127544	EEF1A1	NM_001402	1.73E-09	-2.10133
725	7895972		---	1.10E-07	-2.10099
726	8054611	NCRNA00152	NR_024204	3.48E-10	-2.10054
727	8142345	DOCK4	NM_014705	2.81E-10	-2.09559
728	7944285	ARCN1	NM_001655	1.84E-13	-2.09439
729	8111387	ADAMTS12	NM_030955	4.06E-09	-2.09419
730	7976812	SNORD113-4	NR_003232	7.51E-08	-2.09271
731	8010978	LOC100130876	ENST00000435467	4.82E-11	-2.09189
732	8000636	NPIPL3	NM_130464	5.52E-08	-2.09121
733	8151032	GGH	NM_003878	1.46E-10	-2.08905
734	8163672	PAPPA	NM_002581	2.51E-09	-2.08819
735	8121949	LAMA2	NM_000426	4.72E-08	-2.08771
736	7903777	GSTM5	NM_000851	1.13E-10	-2.08675
737	7943398	YAP1	NM_001130145	9.87E-14	-2.08637
738	8012953	TRIM16	NM_006470	5.31E-10	-2.08198
739	8005200	SNORD49B	NR_003043	3.23E-06	-2.08173
740	8172266		---	2.94E-07	-2.0809
741	8171297	MID1	NM_000381	6.25E-09	-2.08041
742	7896725		---	1.67E-05	-2.07944
743	8092053	SLC7A14	NM_020949	1.04E-07	-2.0794
744	8083656	MFSD1	NM_022736	5.31E-07	-2.0784
745	8166278	SCML1	NM_001037540	6.92E-10	-2.07464
746	8095854	11-sep	NM_018243	3.58E-09	-2.0739
747	8143790	TMEM176B	NM_014020	1.74E-12	-2.07204
748	7995552	CYLD	NM_015247	1.45E-09	-2.07122
749	8180359		---	1.98E-11	-2.07027
750	7913237	CAMK2N1	NM_018584	1.31E-12	-2.07009
751	7965436	EEA1	NM_003566	3.79E-08	-2.0696
752	8022559	ANKRD29	NM_173505	2.54E-14	-2.06942
753	7934570	KCNMA1	NM_001014797	2.65E-09	-2.06773
754	7968297	POMP	NM_015932	1.12E-10	-2.06551
755	8009353	PITPNC1	NM_181671	4.20E-09	-2.0626
756	8064868	RP5-1022P6.2	NM_019593	2.48E-07	-2.06232
757	7983512	SQRDL	NM_021199	5.18E-07	-2.06164
758	8083282	HPS3	NM_032383	6.26E-09	-2.0615
759	7893074		---	2.11E-06	-2.06055
760	7927233	FAM21C	NM_015262	2.84E-09	-2.06037
761	8019762		---	7.87E-12	-2.05625
762	7997940	SNORD68	NR_002450	9.54E-10	-2.05516

763	8023955	BSG	NM_001728	5.85E-15	-2.05503
764	8021946	COLEC12	NM_130386	9.63E-11	-2.0549
765	7895149		---	5.63E-10	-2.05379
766	8046906	GULP1	NM_016315	7.39E-11	-2.05353
767	8094625	KLHL5	NM_015990	1.98E-06	-2.05144
768	7974771	C14orf135	NM_022495	5.07E-07	-2.05108
769	7894837		---	1.00E-06	-2.04978
770	8141490	PMS2L1	NR_003613	1.24E-09	-2.0492
771	7895290		---	2.29E-06	-2.04882
772	7958644	ATP2A2	NM_170665	5.12E-08	-2.0477
773	7963187	LIMA1	NM_001113546	6.64E-12	-2.04545
774	8073068	APOBEC3C	NM_014508	1.78E-09	-2.0453
775	7987439	GPR176	NM_007223	2.44E-12	-2.04505
776	8094609	FAM114A1	BC040452	2.16E-09	-2.04476
777	7963313	GALNT6	NM_007210	1.74E-13	-2.04406
778	7932885	ARHGAP12	NM_018287	3.06E-09	-2.04181
779	7928909	FAM35A	NM_019054	2.81E-08	-2.04177
780	8015187	KRTAP1-1	NM_030967	1.15E-06	-2.0408
781	7925918	AKR1C1	NM_001353	1.11E-08	-2.03966
782	8007620	GRN	NM_002087	9.60E-13	-2.0366
783	8113073	ARRDC3	NM_020801	8.64E-10	-2.03406
784	8032863	C19orf10	NM_019107	8.50E-16	-2.03289
785	8058765	FN1	NM_212482	5.47E-07	-2.03248
786	8080578	CACNA2D3	NM_018398	7.64E-12	-2.02761
787	8056201	RBMS1	NM_016836	7.67E-08	-2.02687
788	7929012	STAMBPL1	NM_020799	3.55E-10	-2.02593
789	8063177	SLC2A10	NM_030777	3.69E-12	-2.0248
790	7975459	SIPA1L1	NM_015556	7.29E-09	-2.02479
791	8055952	NR4A2	NM_006186	5.43E-05	-2.0229
792	7903294	HIAT1	NM_033055	2.05E-11	-2.02274
793	8100318	SGCB	NM_000232	1.96E-09	-2.02206
794	7896082		---	6.49E-08	-2.01993
795	7999766	NPIP	NM_006985	1.26E-11	-2.0177
796	8164200	ANGPTL2	NM_012098	1.42E-11	-2.01207
797	8058927	TMBIM1	NM_022152	2.89E-14	-2.01052
798	8104760	TARS	NM_152295	1.00E-10	-2.00952
799	7927560	FAM21A	NM_001005751	9.90E-10	-2.00945
800	8164580	PTGES	NM_004878	6.70E-09	-2.00827
801	7902345	TYW3	NM_138467	1.20E-13	-2.00745
802	8008646	SCPEP1	NM_021626	1.58E-11	-2.00629
803	8151056	CYP7B1	NM_004820	6.51E-08	-2.00602
804	7914557	SYNC	NM_030786	2.15E-07	-2.0048
805	8022612	ZNF521	NM_015461	4.20E-09	-2.00355
806	8047381	CFLAR	NM_003879	5.56E-11	-2.00266
807	8103722	HSP90AA6P	AY956762	3.94E-07	2.00101
808	8166243	REPS2	NM_004726	7.06E-15	2.00229
809	8154100	VLDLR	NM_003383	4.76E-09	2.00333
810	8094556	PGM2	NM_018290	2.37E-09	2.00511

811	8103728	HMGB2	NM_001130688	7.65E-12	2.01072
812	7928046	TSPAN15	NM_012339	3.93E-13	2.0122
813	7893882		---	1.30E-05	2.01348
814	8144378	AGPAT5	NM_018361	1.34E-09	2.01451
815	8166511	PDK3	NM_005391	1.30E-12	2.0239
816	8146130	GINS4	NM_032336	4.79E-09	2.02448
817	8116835	GCNT2	NM_145649	1.08E-11	2.02509
818	8180269		---	1.37E-08	2.02599
819	7896341		---	1.47E-10	2.02617
820	8171624	GPR64	NM_001079858	1.95E-11	2.0344
821	8166525	POLA1	NM_016937	2.53E-07	2.03446
822	8021418	MALT1	NM_006785	1.37E-07	2.03473
823	8178826			6.21E-13	2.0368
824	8180022			6.21E-13	2.0368
825	8040587	EFR3B	NM_014971	5.26E-11	2.04075
826	8022640	DHFR	NM_000791	1.78E-05	2.04409
827	8083360	MED12L	NM_053002	2.68E-11	2.04525
828	7893334		---	9.76E-06	2.04594
829	8123920	ELOVL2	NM_017770	2.98E-10	2.04895
830	7893933		---	1.13E-07	2.05179
831	7983650	SLC27A2	NM_003645	2.21E-14	2.05204
832	8140709	KIAA1324L	NM_001142749	4.92E-09	2.05325
833	7943892	NCAM1	NM_181351	4.52E-10	2.0591
834	8156199	DAPK1	NM_004938	4.20E-09	2.0663
835	8070665	SIK1	NM_173354	2.00E-09	2.06674
836	8123864	TFAP2A	NM_003220	6.41E-13	2.07299
837	8174207	NXF3	NM_022052	3.94E-11	2.07494
838	7905581	S100A1	NM_006271	2.57E-12	2.07922
839	8097953		---	1.28E-07	2.07938
840	8078412	CNOT10	NM_015442	3.79E-08	2.08037
841	8016994	RNF43	NM_017763	4.91E-11	2.08134
842	8121911	C6orf173	NM_001012507	5.24E-07	2.08595
843	7903032	MTF2	NM_007358	9.13E-09	2.08934
844	7894836		---	2.40E-06	2.09464
845	8090772	TOPBP1	NM_007027	2.53E-09	2.09557
846	8173164		---	1.40E-08	2.10868
847	8168589	ZNF711	NM_021998	3.14E-11	2.10886
848	8125149	SLC44A4	NM_025257	1.20E-12	2.10906
849	8178653	SLC44A4	NM_025257	1.20E-12	2.10906
850	8179861	SLC44A4	NM_025257	1.20E-12	2.10906
851	7975632	PTGR2	NM_152444	1.54E-11	2.10917
852	8094938	NIPAL1	NM_207330	2.31E-10	2.11157
853	8124196	DCDC2	NM_016356	3.84E-07	2.11363
854	7938291	SNORA3	NR_002580	1.43E-11	2.12062
855	7996837	CDH1	NM_004360	3.97E-11	2.12253
856	8157139		---	3.54E-13	2.12287
857	8149927	CLU	NM_001831	3.80E-12	2.13394
858	8043197	VAMP8	NM_003761	5.66E-11	2.13732

859	8163116	EPB41L4B	NM_019114	3.79E-15	2.14325
860	7895590		---	4.24E-06	2.14327
861	7899627	TINAGL1	NM_022164	2.08E-13	2.15232
862	7964484	B4GALNT1	NM_001478	3.40E-14	2.15977
863	8026339	SNRPG	NM_003096	1.18E-05	2.16089
864	8138805	CPVL	NM_019029	3.64E-11	2.1637
865	7962146	FAM60A	NM_001135811	3.30E-09	2.16578
866	7952339	SNORD14C	NR_001453	1.39E-06	2.17346
867	7893637		---	1.52E-05	2.17466
868	7924119	INTS7	NM_015434	1.15E-06	2.17501
869	7895247		---	1.11E-09	2.17721
870	8164013	STRBP	NM_018387	6.42E-11	2.17943
871	7894384		---	4.49E-06	2.18553
872	7921713	F11R	NM_016946	2.52E-13	2.18943
873	7896671		---	4.93E-07	2.19728
874	7896489		---	7.98E-07	2.19902
875	7896243		---	2.29E-12	2.19924
876	7952205	MCAM	NM_006500	3.72E-13	2.20463
877	7984704	NEO1	NM_002499	1.02E-10	2.20699
878	8022711	DSC2	NM_024422	4.11E-13	2.23992
879	7896175		---	8.43E-08	2.24008
880	8160321	SLC24A2	NM_020344	1.67E-10	2.2441
881	8020384	KIAA1772	AK293321	1.95E-11	2.24693
882	8136473	TRIM24	NM_015905	1.09E-11	2.24818
883	7892719		---	3.60E-10	2.24962
884	7925677	ZNF669	NM_024804	6.42E-13	2.24971
885	8006187	ATAD5	NM_024857	3.68E-11	2.25106
886	7894089		---	5.89E-07	2.25384
887	8170538	GABRQ	NM_018558	7.23E-13	2.25724
888	8028311	SPINT2	NM_021102	8.94E-13	2.26302
889	8020779	DSG2	NM_001943	2.60E-11	2.26352
890	7899134	CCDC21	NM_022778	6.00E-13	2.26423
891	7925432		---	9.36E-10	2.26497
892	7895981		---	1.08E-06	2.27031
893	7909568	DTL	NM_016448	3.07E-06	2.27102
894	7896553		---	1.11E-06	2.27828
895	8147057	CHMP4C	NM_152284	5.70E-14	2.27886
896	7892903		---	1.73E-09	2.2907
897	8104613	LOC391742	ENST00000330110	1.36E-09	2.30786
898	8023526	LOC100132992	ENST00000446244	1.17E-11	2.32687
899	7929388	PLCE1	NM_016341	1.28E-09	2.32731
900	7903092	FBNP1L	NM_001024948	4.99E-12	2.334
901	7936734	FGFR2	NM_000141	7.99E-12	2.34485
902	7893782		---	6.67E-07	2.34708
903	7893766		---	7.08E-10	2.35633
904	8046536	HOXD10	NM_002148	1.38E-11	2.36193
905	8060395	RAD21L1	NM_001136566	2.21E-08	2.36463
906	8084880	HES1	NM_005524	6.86E-11	2.38042

907	8176191	HMGN1	NM_004965	1.85E-15	2.38075
908	7962194	H3F3C	NM_001013699	1.68E-10	2.41815
909	8067652	EEF1A2	NM_001958	8.73E-15	2.41888
910	8020164	GNAL	NM_182978	1.71E-11	2.4249
911	8041853	EPCAM	NM_002354	2.11E-13	2.42865
912	7953965		---	5.15E-07	2.4332
913	8023267	MYO5B	NM_001080467	1.73E-12	2.43923
914	8147883	ENY2	NM_020189	8.44E-08	2.44007
915	8138749	HOXA9	NM_152739	1.30E-12	2.4401
916	8158771	AIF1L	NM_031426	7.33E-13	2.44871
917	8013660	ALDOC	NM_005165	2.68E-07	2.45295
918	8038367	SLC17A7	NM_020309	5.99E-14	2.45409
919	8151475	TPD52	NM_001025252	3.83E-14	2.45731
920	8044021	IL1RL1	NM_016232	4.68E-10	2.46224
921	7927998	HKDC1	NM_025130	8.86E-08	2.46635
922	8127991		---	7.80E-13	2.47301
923	7918064	COL11A1	NM_001854	9.10E-10	2.47527
924	7985159	CRABP1	NM_004378	1.16E-12	2.47626
925	8145532	EPHX2	NM_001979	7.15E-13	2.5089
926	8122734	PPP1R14C	NM_030949	2.31E-12	2.51443
927	8152845	FAM49B	BC017297	1.40E-11	2.52015
928	8159992	ERMP1	NM_024896	5.23E-12	2.52032
929	7962183	AK3L1	NM_001005353	1.21E-09	2.52347
930	7894331		---	6.92E-10	2.52603
931	8151423	JPH1	NM_020647	3.05E-13	2.53493
932	8145611	FZD3	NM_017412	5.40E-15	2.54378
933	8062766	MYBL2	NM_002466	6.35E-12	2.55557
934	8004043	ENO3	NM_001976	1.39E-12	2.57789
935	8013356		---	8.50E-09	2.58162
936	8054800		---	2.44E-08	2.59452
937	7982084	SNORD115-11	NR_003303	6.47E-12	2.59892
938	7923662	PIK3C2B	NM_002646	9.58E-11	2.60421
939	8131957	SNX10	NM_013322	2.85E-13	2.60507
940	8150204		---	2.64E-11	2.60697
941	7930561	HABP2	NM_004132	7.41E-12	2.6073
942	7990345	SEMA7A	NM_003612	2.10E-12	2.61546
943	7892832		---	9.95E-07	2.62936
944	8146579	CHD7	NM_017780	2.35E-13	2.63049
945	8112274	ELOVL7	NM_024930	2.47E-14	2.63207
946	7894877		---	3.36E-07	2.65133
947	7926896	CKS1B	NM_001826	3.52E-11	2.65439
948	8135576	TES	NM_015641	8.94E-08	2.65503
949	8096959	ANK2	NM_001148	1.74E-09	2.65729
950	8067955	CXADR	NM_001338	1.76E-13	2.65829
951	7896650		---	1.06E-05	2.661
952	8147990		---	3.42E-08	2.68524
953	7895511		---	7.46E-05	2.69037
954	7893073		---	1.65E-12	2.69605

955	7926875	BAMBI	NM_012342	4.06E-11	2.70382
956	7981512		---	5.37E-12	2.70908
957	7927710	CDC2	NM_001786	1.26E-07	2.71622
958	8102560	MAD2L1	NM_002358	4.97E-09	2.71981
959	8083034	CLSTN2	NM_022131	2.95E-13	2.72121
960	8057771	STAT4	NM_003151	7.78E-11	2.72572
961	8112327	CKS1B	NM_001826	5.63E-11	2.72609
962	7905428	TUFT1	NM_020127	1.09E-10	2.73139
963	7945680	H19	NR_002196	1.25E-10	2.73461
964	8055198		---	3.97E-11	2.78756
965	7906574	SUMO1P3	NR_002190	5.42E-09	2.78865
966	7904843	PDZK1	NM_002614	3.32E-11	2.81034
967	7892847		---	2.26E-10	2.82184
968	8136200	CPA4	NM_016352	1.94E-09	2.82687
969	7907160	ATP1B1	NM_001677	2.83E-11	2.83345
970	8114572	HBEGF	NM_001945	6.07E-09	2.84013
971	8125919	FKBP5	NM_001145775	2.43E-10	2.84818
972	7981068	SERPINA1	NM_001002236	9.59E-13	2.84851
973	7894440		---	1.13E-06	2.86035
974	8142270	NRCAM	NM_001037132	8.50E-13	2.88204
975	7933327	FAM25B	NM_001137556	1.89E-12	2.88727
976	7933423	FAM25B	NM_001137556	1.89E-12	2.88727
977	7927363	FAM25B	NM_001137556	1.89E-12	2.88727
978	8045531		---	3.27E-10	2.90758
979	8052654	PEL1	NM_020651	1.79E-17	2.91082
980	7962212	PKP2	NM_004572	1.36E-14	2.95391
981	8135601	MET	NM_001127500	1.80E-09	2.96678
982	8090823	SLCO2A1	NM_005630	2.75E-12	2.98646
983	8140782	ABCB1	NM_000927	5.81E-11	2.99581
984	8142524	TSPAN12	NM_012338	4.61E-10	2.99722
985	8106354	IQGAP2	NM_006633	5.38E-12	3.04115
986	8083455		---	2.27E-10	3.05449
987	8109663	GABRA1	NM_000806	2.36E-10	3.14744
988	8159963		---	1.10E-09	3.15556
989	7901765	HOOK1	NM_015888	4.88E-14	3.15945
990	7978544	EGLN3	NM_022073	1.49E-14	3.18908
991	7955613	KRT7	NM_005556	5.25E-11	3.19643
992	8092541	LIPH	NM_139248	1.32E-13	3.21454
993	8091243	PCOLCE2	NM_013363	4.73E-14	3.22316
994	8096704	NPNT	NM_001033047	2.45E-12	3.25696
995	8096116	AGPAT9	NM_032717	1.74E-11	3.29125
996	8099721	KIAA0746	NM_015187	1.44E-13	3.32894
997	7952335	SNORD14E	NR_003125	4.36E-08	3.3401
998	7969574	KRT18	NM_000224	6.29E-09	3.38972
999	8148059	DEPDC6	NM_022783	8.11E-10	3.39177
1000	7934979	ANKRD1	NM_014391	3.11E-11	3.39572
1001	8167878		---	7.08E-12	3.41591
1002	8154725	KRT18	NM_000224	1.71E-09	3.47259

1003	8174513	CHRD1	NM_145234	7.28E-15	3.49495
1004	7927307	ANXA8L2	NM_001630	1.53E-13	3.52554
1005	8098204	CPE	NM_001873	3.05E-10	3.5513
1006	8022674	CDH2	NM_001792	3.27E-12	3.57654
1007	7927367	ANXA8	NM_001040084	9.72E-14	3.63489
1008	8175217	GPC4	NM_001448	7.02E-14	3.65644
1009	8094789	LIMCH1	NM_014988	6.66E-18	3.67078
1010	7963970	SILV	NM_006928	4.15E-16	3.71521
1011	7893789		---	2.28E-14	3.74419
1012	7933312	ANXA8L1	NM_001098845	1.60E-13	3.80759
1013	8083146	PLS1	NM_001145319	2.16E-18	3.98829
1014	7951339		---	1.57E-10	4.02849
1015	8138735	HOXA5	NM_019102	4.48E-13	4.09173
1016	8180256		---	1.35E-13	4.12637
1017	8091078	RBP1	NM_002899	8.56E-14	4.1626
1018	8058662		---	2.65E-13	4.19304
1019	8166784	TSPAN7	NM_004615	1.21E-16	4.19629
1020	7980828	CCDC88C	NM_001080414	1.02E-11	4.24633
1021	7973743	BNIP3	ENST00000355069	2.30E-12	4.54422
1022	8122365	GPR126	NM_020455	6.58E-16	4.73982
1023	8156056		---	1.80E-13	5.05995
1024	8151795	CDH17	NM_004063	7.24E-19	5.12641
1025	8098439	EPCAM	NM_002354	9.43E-15	5.69947

5. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- 1 Oltvai, Z. N. & Barabasi, A. L. Systems biology. Life's complexity pyramid. *Science* 298, 763-764, doi:10.1126/science.1078563 (2002).
- 2 Bosshardt, D. D. & Selvig, K. A. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol* 2000 13, 41-75 (1997).
- 3 Cho, M. I. & Garant, P. R. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol* 2000 24, 9-27 (2000).
- 4 Hammarstrom, L., Alatti, I. & Fong, C. D. Origins of cementum. *Oral Dis* 2, 63-69 (1996).
- 5 Harrison, J. W. & Roda, R. S. Intermediate cementum. Development, structure, composition, and potential functions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 79, 624-633 (1995).
- 6 Saygin, N. E., Giannobile, W. V. & Somerman, M. J. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontol* 2000 24, 73-98 (2000).
- 7 Schroeder, H. E. Biological problems of regenerative cementogenesis: synthesis and attachment of collagenous matrices on growing and established root surfaces. *Int Rev Cytol* 142, 1-59 (1992).
- 8 Thomas, H. F. Root formation. *Int J Dev Biol* 39, 231-237 (1995).
- 9 Zeichner-David, M. in *Periodontol* 2000 Vol. 41 196-217 (2006).
- 10 BC., G. Archaeological tooth and bone seasonal increments: the need for standardized terms and techniques". 2: 9-16 (1993).
- 11 GB., D. The discovery of cementum. *J Dent Res* 18: 213-303 (1939).
- 12 HJ., B. Intermediate cementum. *Br dent J* 102: 345-350 (1957).
- 13 Schroeder, H. E. Human cellular mixed stratified cementum: a tissue with alternating layers of acellular extrinsic- and cellular intrinsic fiber cementum. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 103, 550-560 (1993).
- 14 Garant, P. R. [Influences of porcine enamel matrix proteins on MC3T3-E1 osteoblast proliferation and differentiation]. *Periodontol* 2000 18, 226-228 (2000).
- 15 Arzate, H. et al. Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein. *Journal of dental research* 81, 541-546 (2002).
- 16 Arzate, H., Olson, S. W., Page, R. C., Gown, A. M. & Narayanan, A. S. Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *Faseb j* 6, 2990-2995 (1992).
- 17 Arzate, H., Alvarez-Perez, M. A., Aguilar-Mendoza, M. E. & Alvarez-Fregoso, O. Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells in vitro. *J Periodontal Res* 33, 249-258 (1998).
- 18 Arzate, H. et al. Electron microscopy, micro-analysis, and X-ray diffraction characterization of the mineral-like tissue deposited by human cementum tumor-derived cells. *J Dent Res* 79, 28-34 (2000).
- 19 Arzate, H., Chimal-Monroy, J., Hernandez-Lagunas, L. & Diaz de Leon, L. Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *J Periodontal Res* 31, 144-148 (1996).
- 20 Alvarez Perez, M. A., Pitaru, S., Alvarez Fregoso, O., Reyes Gasga, J. & Arzate, H. in *J Struct Biol* Vol. 143 1-13 (2003).
- 21 Alvarez-Perez, M. A., Narayanan, S., Zeichner-David, M., Rodriguez Carmona, B. & Arzate, H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone* 38, 409-419, doi:10.1016/j.bone.2005.09.009 (2006).
- 22 Romo Arévalo, E. Caracterización estructural de la proteína del cemento 1 (CEMP1) y su relación con la función biológica. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, (2014).
- 23 Carmona-Rodriguez, B. et al. Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 763-769, doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.204 (2007).
- 24 Kemoun, P. et al. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res* 329, 283-294, doi:10.1007/s00441-007-0397-3 (2007).
- 25 Villarreal-Ramirez, E. et al. Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): primary role in biomineralization. *Biochem Biophys Res Commun* 384, 49-54, doi:10.1016/j.bbrc.2009.04.072 (2009).
- 26 Romo-Arévalo, E. et al. In Vitro Effects of Cementum Protein 1 (CEMP1) on Calcium Phosphate Crystal Formation and its Role During the Mineralization Process. *MRS Online Proceedings Library* 1244, null-null, doi:doi:10.1557/PROC-1244-5 (2009).

- 27 Murakami, Y., Kojima, T., Nagasawa, T., Kobayashi, H. & Ishikawa, I. Novel isolation of alkaline phosphatase-positive subpopulation from periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 74, 780-786, doi:10.1902/jop.2003.74.6.780 (2003).
- 28 Komaki, M. et al. Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *J Cell Physiol* 227, 649-657, doi:10.1002/jcp.22770 (2012).
- 29 Hoz, L. et al. in *Cell Biol Int* Vol. 36 129-136 (2012).
- 30 Muir, H. The chondrocyte, architect of cartilage. *Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules*. *Bioessays* 17, 1039-1048, doi:10.1002/bies.950171208 (1995).
- 31 Dean, D. D. et al. in *Cells Tissues Organs* Vol. 171 117-127 (2002 S. Karger AG, Basel, 2002).
- 32 Xu, J., Wang, W., Kapila, Y., Lotz, J. & Kapila, S. Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev* 18, 487-496, doi:10.1089/scd.2008.0113 (2009).
- 33 Paula-Silva, F. W. et al. Calcium hydroxide promotes cementogenesis and induces cementoblastic differentiation of mesenchymal periodontal ligament cells in a CEMP1- and ERK-dependent manner. *Calcif Tissue Int* 87, 144-157, doi:10.1007/s00223-010-9368-x (2010).
- 34 Serrano, J. et al. Bone regeneration in rat cranium critical-size defects induced by Cementum Protein 1 (CEMP1). *PLoS One* 8, e78807, doi:10.1371/journal.pone.0078807 (2013).
- 35 Pirrung, M. C. & Southern, E. M. The genesis of microarrays. *Biochem Mol Biol Educ* 42, 106-113, doi:10.1002/bmb.20756 (2014).
- 36 Hatfield, G. W., Hung, S. P. & Baldi, P. Differential analysis of DNA microarray gene expression data. *Mol Microbiol* 47, 871-877 (2003).
- 37 Khan, J., Bittner, M. L., Chen, Y., Meltzer, P. S. & Trent, J. M. DNA microarray technology: the anticipated impact on the study of human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1423, M17-M28, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0304-419X\(99\)00004-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-419X(99)00004-9) (1999).
- 38 van Hal, N. L. W. et al. The application of DNA microarrays in gene expression analysis. *Journal of Biotechnology* 78, 271-280, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00204-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00204-2) (2000).
- 39 Xiang, C. C. & Chen, Y. cDNA microarray technology and its applications. *Biotechnology Advances* 18, 35-46, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00035-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00035-X) (2000).
- 40 López, M. & Paloma, M. *Microarrays y Biochips de ADN, Informe de Vigilancia Tecnológica. GENOMA ESPAÑA / CIBT-FGUAM.*, (Genoma España y la Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid España, 2002).
- 41 Narayanan, A. S. & Page, R. C. Biochemical characterization of collagens synthesized by fibroblasts derived from normal and diseased human gingiva. *J Biol Chem* 251, 5464-5471 (1976).
- 42 Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408, doi:10.1006/meth.2001.1262 (2001).
- 43 Schroeder, A. et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7, 3, doi:10.1186/1471-2199-7-3 (2006).
- 44 Irizarry, R. A. et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249-264, doi:10.1093/biostatistics/4.2.249 (2003).
- 45 Tai, Y. C. & Speed, T. P. *Statistical analysis of microarray time course data.*, Chapter 20 (BIOS Scientific Publishers Limited, 2005).
- 46 Lu, Y., Liu, P. Y., Xiao, P. & Deng, H. W. Hotelling's T² multivariate profiling for detecting differential expression in microarrays. *Bioinformatics (Oxford, England)* 21, 3105-3113, doi:10.1093/bioinformatics/bti496 (2005).
- 47 Smyth, G. K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3, Article3, doi:10.2202/1544-6115.1027 (2004).
- 48 Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing.
- 49 Huang da, W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols* 4, 44-57, doi:10.1038/nprot.2008.211 (2009).
- 50 Huang da, W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research* 37, 1-13, doi:10.1093/nar/gkn923 (2009).
- 51 Barrett, T. et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic acids research* 41, D991-995, doi:10.1093/nar/gks1193 (2013).
- 52 Geissmann, Q. OpenCFU, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects. *PLoS One* 8, e54072, doi:10.1371/journal.pone.0054072 (2013).

- 53 Mukaka, M. M.
- 54 Van Aken, E., De Wever, O., Correia da Rocha, A. S. & Mareel, M. Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch* 439, 725-751 (2001).
- 55 Wang, H. D., Ren, J. & Zhang, L. CDH1 germline mutation in hereditary gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 10, 3088-3093 (2004).
- 56 Peifer, M. & Polakis, P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* 287, 1606-1609 (2000).
- 57 Suyama, K., Shapiro, I., Guttman, M. & Hazan, R. B. A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell* 2, 301-314 (2002).
- 58 Hsu, M. Y., Meier, F. & Herlyn, M. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* 70, 522-536, doi:10.1046/j.1432-0436.2002.700906.x (2002).
- 59 Sánchez, L. S., Vázquez, J. V. H. & Marure, R. L. Papel de las cadherinas en la metástasis. *Revista de Educación Bioquímica* 24, 97-103 (2005).
- 60 Hattori, Y. et al. K-sam, an amplified gene in stomach cancer, is a member of the heparin-binding growth factor receptor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5983-5987 (1990).
- 61 Matsuda, Y., Ueda, J. & Ishiwata, T. Fibroblast growth factor receptor 2: expression, roles, and potential as a novel molecular target for colorectal cancer. *Patholog Res Int* 2012, 574768, doi:10.1155/2012/574768 (2012).
- 62 McCarthy, S. A., Samuels, M. L., Pritchard, C. A., Abraham, J. A. & McMahon, M. Rapid induction of heparin-binding epidermal growth factor/diphtheria toxin receptor expression by Raf and Ras oncogenes. *Genes Dev* 9, 1953-1964 (1995).
- 63 Miyamoto, S., Yagi, H., Yotsumoto, F., Kawarabayashi, T. & Mekada, E. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a novel targeting molecule for cancer therapy. *Cancer Sci* 97, 341-347, doi:10.1111/j.1349-7006.2006.00188.x (2006).
- 64 Miyazono, K. Ectodomain shedding of HB-EGF: a potential target for cancer therapy. *J Biochem* 151, 1-3, doi:10.1093/jb/mvr120 (2012).
- 65 Ongusaha, P. P. et al. HB-EGF is a potent inducer of tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res* 64, 5283-5290, doi:10.1158/0008-5472.can-04-0925 (2004).
- 66 Kwon, J. H. et al. Overexpression of high-mobility group box 2 is associated with tumor aggressiveness and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 16, 5511-5521, doi:10.1158/1078-0432.ccr-10-0825 (2010).
- 67 Shin, Y. J., Kim, M. S., Lee, J., Kang, M. & Jeong, J. H. High-mobility group box 2 (HMGB2) modulates radioresponse and is downregulated by p53 in colorectal cancer cell. *Cancer Biol Ther* 14, 213-221, doi:10.4161/cbt.23292 (2013).
- 68 Stasinopoulos, I. A. et al. HOXA5-twist interaction alters p53 homeostasis in breast cancer cells. *J Biol Chem* 280, 2294-2299, doi:10.1074/jbc.M411018200 (2005).
- 69 Raman, V. et al. HOXA5 regulates expression of the progesterone receptor. *J Biol Chem* 275, 26551-26555, doi:10.1074/jbc.C000324200 (2000).
- 70 Abe, M. et al. Disordered expression of HOX genes in human non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 15, 797-802 (2006).
- 71 Organ, S. L. & Tsao, M. S. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol* 3, S7-s19, doi:10.1177/1758834011422556 (2011).
- 72 Sierra, J. R. & Tsao, M. S. c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. *Ther Adv Med Oncol* 3, S21-35, doi:10.1177/1758834011422557 (2011).
- 73 del Carmen, M. G., Birrer, M. & Schorge, J. O. Clear cell carcinoma of the ovary: a review of the literature. *Gynecol Oncol* 126, 481-490, doi:10.1016/j.ygyno.2012.04.021 (2012).
- 74 Bardelli, A. et al. Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer Discov* 3, 658-673, doi:10.1158/2159-8290.cd-12-0558 (2013).
- 75 Geografía, I. N. D. E. Y. Estadística de mortalidad. Base de datos. (2013).
- 76 Secretaría de Salud [SSA], S. d. P. y. P. d. I. S. S. Los 5 tipos de cáncer que más afectan a mexicanos. Recuperado el 10 de enero de 2014, de: , <<http://www.spps.salud.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>> (2013).
- 77 [UICC]., U. f. I. C. C. World Cancer Day 2014. Recuperado el 9 de enero de 2014, de: , <<http://www.worldcancerday.org/>> (2014).
- 78 Balmain, A. Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. *Nat Rev Cancer* 1, 77-82, doi:10.1038/35094086 (2001).

- 79 Futreal, P. A. et al. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 4, 177-183, doi:10.1038/nrc1299 (2004).
- 80 Weinstein, I. B. & Joe, A. K. Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 3, 448-457, doi:10.1038/ncponc0558 (2006).
- 81 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70 (2000).
- 82 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 83 Kumar, V., Abbas, A. & Aster, J. Robbins Basic Pathology. 9th edition edn, 161-198 (Elsevier Saunders, 2013).
- 84 Chial, H. 1 (1) (Nature Education, 2008).
- 85 Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799, doi:10.1038/nm1087 (2004).
- 86 Uhlen, M. et al. in *Nat Biotechnol* Vol. 28 1248-1250 (2010).
- 87 Prelich, G. Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics* 190, 841-854, doi:10.1534/genetics.111.136911 (2012).
- 88 Brannon, R. B., Fowler, C. B., Carpenter, W. M. & Corio, R. L. Cementoblastoma: an innocuous neoplasm? A clinicopathologic study of 44 cases and review of the literature with special emphasis on recurrence. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 93, 311-320 (2002).
- 89 Neves, F. S. et al. Benign cementoblastoma: case report and review of the literature. *Minerva Stomatol* 58, 55-59 (2009).
- 90 Wong, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 30, 87, doi:10.1186/1756-9966-30-87 (2011).
- 91 Naylor, T. L. et al. High resolution genomic analysis of sporadic breast cancer using array-based comparative genomic hybridization. *Breast cancer research : BCR* 7, R1186-1198, doi:10.1186/bcr1356 (2005).
- 92 Man, T. K. et al. Genome-wide array comparative genomic hybridization analysis reveals distinct amplifications in osteosarcoma. *BMC cancer* 4, 45, doi:10.1186/1471-2407-4-45 (2004).
- 93 Laura, G. et al. Genome-wide copy number analysis in pediatric glioblastoma multiforme. *Am J Cancer Res* 4, 293-303 (2014).
- 94 Choucair, K. A. et al. The 16p13.3 (PDPK1) Genomic Gain in Prostate Cancer: A Potential Role in Disease Progression. *Transl Oncol* 5, 453-460 (2012).
- 95 Maurer, M. et al. 3-Phosphoinositide-dependent kinase 1 potentiates upstream lesions on the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in breast carcinoma. *Cancer research* 69, 6299-6306, doi:10.1158/0008-5472.can-09-0820 (2009).
- 96 Shen, H., Zhu, Y., Wu, Y. J., Qiu, H. R. & Shu, Y. Q. Genomic alterations in lung adenocarcinomas detected by multicolor fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization. *Cancer genetics and cytogenetics* 181, 100-107, doi:10.1016/j.cancergencyto.2007.11.012 (2008).
- 97 Lacle, M. M. et al. Analysis of copy number changes on chromosome 16q in male breast cancer by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 26, 1461-1467, doi:10.1038/modpathol.2013.94 (2013).
- 98 Raman, V. et al. Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature* 405, 974-978, doi:10.1038/35016125 (2000).
- 99 Rodini, C. O. et al. Homeobox gene expression profile indicates HOXA5 as a candidate prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 40, 1180-1188, doi:10.3892/ijo.2011.1321 (2012).
- 100 Sharma, A., Ray, R. & Rajeswari, M. R. Overexpression of high mobility group (HMG) B1 and B2 proteins directly correlates with the progression of squamous cell carcinoma in skin. *Cancer Invest* 26, 843-851, doi:10.1080/07357900801954210 (2008).
- 101 Kostova, N., Zlateva, S., Ugrinova, I. & Pasheva, E. The expression of HMGB1 protein and its receptor RAGE in human malignant tumors. *Mol Cell Biochem* 337, 251-258, doi:10.1007/s11010-009-0305-0 (2010).
- 102 Wang, W. et al. Overexpression of high mobility group box 1 and 2 is associated with the progression and angiogenesis of human bladder carcinoma. *Oncol Lett* 5, 884-888, doi:10.3892/ol.2012.1091 (2013).
- 103 Nakamura, K. et al. A novel molecular targeting compound as K-samII/FGF-R2 phosphorylation inhibitor, Ki23057, for Scirrhus gastric cancer. *Gastroenterology* 131, 1530-1541, doi:10.1053/j.gastro.2006.08.030 (2006).

- 104 Chen, W., Wang, G. M., Guo, J. M., Sun, L. A. & Wang, H. NGF/gamma-IFN inhibits androgen-independent prostate cancer and reverses androgen receptor function through downregulation of FGFR2 and decrease in cancer stem cells. *Stem Cells Dev* 21, 3372-3380, doi:10.1089/scd.2012.0121 (2012).
- 105 Zhang, C. et al. Fibroblast growth factor receptor 2-positive fibroblasts provide a suitable microenvironment for tumor development and progression in esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res* 15, 4017-4027, doi:10.1158/1078-0432.ccr-08-2824 (2009).
- 106 Feng, S., Zhou, L., Nice, E. C. & Huang, C. in *Histol Histopathol* (2014).
- 107 Fan, M. et al. Increased expression of EphA2 and E-N cadherin switch in primary hepatocellular carcinoma. *Tumori* 99, 689-696, doi:10.1700/1390.15457 (2013).
- 108 Saha, B. et al. Overexpression of E-cadherin protein in metastatic breast cancer cells in bone. *Anticancer Res* 27, 3903-3908 (2007).
- 109 Saha, B. et al. Overexpression of E-cadherin and beta-catenin proteins in metastatic prostate cancer cells in bone. *Prostate* 68, 78-84, doi:10.1002/pros.20670 (2008).
- 110 González-Alva, P., Gómez-Plata, E. & Arzate, H. Localización de las proteínas específicas del cemento radicular CEMP1 y CAP en células neoplásicas. *Journal of Oral Research* 2 (2013).
- 111 Thiery, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442-454, doi:10.1038/nrc822 (2002).
- 112 Yang, J. & Weinberg, R. A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 14, 818-829, doi:10.1016/j.devcel.2008.05.009 (2008).
- 113 Wells, A., Yates, C. & Shepard, C. R. E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas. *Clin Exp Metastasis* 25, 621-628, doi:10.1007/s10585-008-9167-1 (2008).
- 114 Lee, B. K. Growth factors in oral and maxillofacial surgery: potentials and challenges. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 39, 255-256, doi:10.5125/jkaoms.2013.39.6.255 (2013).
- 115 Webster, M. T. & Fan, C. M. c-MET regulates myoblast motility and myocyte fusion during adult skeletal muscle regeneration. *PLoS One* 8, e81757, doi:10.1371/journal.pone.0081757 (2013).
- 116 Lerch, J. K., Martinez-Ondaro, Y. R., Bixby, J. L. & Lemmon, V. P. cJun promotes CNS axon growth. *Mol Cell Neurosci* 59, 97-105, doi:10.1016/j.mcn.2014.02.002 (2014).
- 117 Morello, D., Lavenu, A. & Babinet, C. Differential regulation and expression of jun, c-fos and c-myc proto-oncogenes during mouse liver regeneration and after inhibition of protein synthesis. *Oncogene* 5, 1511-1519 (1990).