



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud

División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología  
Ciencias Odontológicas Básicas

**CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LA ORGANIZACIÓN  
NUCLEOLAR EN FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS ANTES Y  
DESPUÉS DE LA TRANSFECCIÓN DE CEMP1.**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

**M. en C. CARLOS ESTEBAN VILLEGAS MERCADO**

TUTOR:

**DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA FACULTAD DE CIENCIAS**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA (Facultad de Ciencias UNAM)  
DRA. ELBA ROSA LEYVA HUERTA (Facultad de Odontología UNAM)  
DR. JESUS ANGEL ARENAS ALATORRE (Instituto de Física UNAM)**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

Abril 2018



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.

**Agradecimientos y dedicatoria:**

## Índice

<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Abstract</b> .....	3
<b>3. Introducción</b> .....	5
<b>4. Antecedentes</b> .....	7
A. Periodonto.....	7
A.1 Encía.....	9
A.2 Ligamento periodontal.....	12
A.3 Cemento radicular.....	14
A.3.1 Proteína del cemento 1 (CEMP1).....	18
A.4 Hueso alveolar.....	26
B. Enfermedad periodontal.....	29
C. Tratamientos Periodontales.....	33
C.1 Tratamiento clínico y Quirúrgico.....	33
C.2 Medicina regenerativa en periodontología.....	36
C.2.1 Injertos óseos.....	37
C.2.2 Barreras.....	38
C.2.3 Mediadores biológicos.....	38
C.2.4 Terapia celular.....	39
C.2.5 Terapia génica.....	41
C.2.6 Impresión tridimensional.....	42
<b>5. La importancia del estudio de la ultraestructura nucleolar en periodontología</b> .....	43
A. Nucléolo.....	43
B. ultraestructura nucleolar en periodontología.....	48
<b>6. Planteamiento del problema</b> .....	50
<b>7. Justificación</b> .....	51
<b>8. Hipótesis</b> .....	51
<b>9. Objetivos</b> .....	52
A. Objetivo general.....	52
B. Objetivos específicos.....	52

<b>10. Metodología</b> .....	53
A. Cultivo Celular.....	53
B. Construcción del vector de expresión pdDNA40 y su transfección en células HGF.....	53
C. Procesamiento de muestras (fijación e inclusión).....	55
D. Tinción de cortes semifinos con azul de toluidina.....	55
E. Tinción de cortes ultrafinos con uranilo-plomo.....	56
F. Detección de RNPs con el efecto regresivo del EDTA.....	56
G. Identificación de DNA mediante Amina-Osmio.....	57
<b>11. Resultados</b> .....	58
A. Microscopia óptica.....	58
B. Microscopia electrónica de transmisión.....	61
<b>12. Discusión</b> .....	71
<b>13. Conclusión</b> .....	78
<b>14. Abreviaturas</b> .....	79
<b>15. Referencias bibliográficas</b> .....	82

## 1. Resumen

La transfección de la Proteína del Cemento 1 (CEMP1) en Fibroblastos Gingivales Humanos (HGF por sus siglas en inglés) incrementa notablemente el metabolismo celular y produce la sobreexpresión de moléculas relacionadas con biomineralización a nivel transcripcional y traduccional. Por estos motivos, las células HGF transfectadas con el gen de CEMP1 (HGF-CEMP1) se consideran cementoblastos putativos. Esto representa un avance significativo en la investigación periodontal debido a que la neoformación de cemento radicular es un evento clave en la regeneración periodontal. Aunado a esto, es bien conocido que los cambios importantes en el metabolismo celular y la expresión de proteínas están relacionados a la estructura nucleolar y a la función de este organelo implicado en la biogénesis ribosomal. El propósito de este trabajo es determinar el efecto de la transfección de CEMP1 en la ultraestructura nucleolar de HGF. Las células fueron procesadas siguiendo la técnica convencional para microscopia electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés), se fijaron en glutaraldehído, postfijaron con tetraóxido de osmio y se embebieron en resina epóxica. Los cortes ultrafinos se contrastaron con la técnica de acetato de uranilo y citrato de plomo. Para la detección de ribonucleoproteínas (RNPs) se utilizó el método de contraste basado en el efecto regresivo del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Además, se utilizó la técnica de amina de osmio para la tinción específica de DNA. Los datos mostrados en este trabajo sugieren que la transfección génica de CEMP1 en HGF no produce cambios en la ultraestructura nucleolar general, dado que los componentes de este organelo (centros fibrilares, componente fibrilar denso y

componente granular) no muestran diferencias entre en las células transfectadas y en los grupos control. La transfección del gen de CEMP1 en los HGF permite que estas células modifiquen su fenotipo, logrando la mineralización de matriz extracelular, esto sin producir alteraciones en la ultraestructura del nucléolo que indiquen estrés celular, daño en el funcionamiento celular o transformaciones neoplásicas. Lo que se evidencia por la presencia de los diferentes compartimientos nucleolares y la correcta organización de los mismos.

## 2. Abstract

Transfection of Cementum Protein 1 (CEMP1) into Human Gingival Fibroblasts (HGF) notably increases cell metabolism and overexpresses molecules related to biomineralization at transcriptional and translational level. Therefore, HGF transfected with CEMP1 gene (HGF-CEMP1) are considered as putative cementoblasts. This represents a significant advance in periodontal research since cementum neoformation is a key event in periodontal regeneration. In addition, it is well known that important changes in cell metabolism and proteins expression are related to nucleolar structure and the function of this organelle, which is implicated in ribosome biogenesis. The aim of this study is to determine the effect of transfecting CEMP1 gene into HGF at the ultrastructure of the nucleolus. Cells were processed by the conventional technique for transmission electron microscopy (TEM), fixed with glutaraldehyde, postfixed with osmium tetroxide and embedded in epoxy resin. Semi-thin sections were stained with toluidine blue and observed by light microscopy. Ultra-thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate technique. For ribonucleoproteins (RNPs) detection the staining method based on the regressive effect of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was used. In addition, the osmium ammine technique was used for specific staining of DNA. Data shown in this study suggest that CEMP1 gene transfection into HGF cells does not produce changes in the general nucleolar ultrastructure since the different components of the organelle are present as fibrillar centers, dense fibrillar component and granular component do not show differences between the

transfected cells and in the control groups. The transfection of CEMP1 gene into HGF cells allows these cells to modify their phenotype, achieving mineralization of the extracellular matrix. This without producing alterations in the nucleolar ultrastructure that indicate cellular stress, cellular damage or neoplastic transformation. This is evidenced by the presence of the different nucleolar compartments and the correct organization of them.

### 3. Introducción

La enfermedad periodontal o periodontitis es una de las patologías que más afecta a la cavidad oral. La periodontitis representa la mayor causa de pérdida de órganos dentarios en adultos a nivel mundial (1) (2). Esto debido, principalmente, a la progresión silenciosa de la enfermedad y a que las terapias periodontales disponibles remueven los agentes causales para el avance de la enfermedad, pero no son capaces de regenerar los tejidos dañados o perdidos de una forma eficiente y predecible (3). El mayor obstáculo para lograr regeneración periodontal es la limitación para estimular la formación de nuevo cemento radicular, lo cual es un evento crucial para la regeneración de las estructuras periodontales (4) (5) (6) (7).

La proteína CEMP1 parece ser un regulador clave del proceso de cementogenesis dado que regula el depósito, composición y morfología de los cristales de hidroxiapatita (8) (9). Estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de CEMP1 para promover el anclaje celular y la diferenciación de cementoblastos y células progenitoras. La transfección de CEMP1 en HGF (HGF-CEMP1) da como resultado células con un fenotipo “mineralizante”. Estas células son consideradas como cementoblastos putativos debido a que sintetizan matriz extracelular mineralizada (hidroxiapatita biológica), tienen una mayor actividad de la fosfatasa alcalina, expresan proteínas relacionadas al proceso de biomineralización así como proteínas cemento-específicas e incrementan su tasa de proliferación (10). El estudio con microarreglos de expresión genética demostró que CEMP1 puede modular la expresión de diversos genes relacionados con el desarrollo celular,

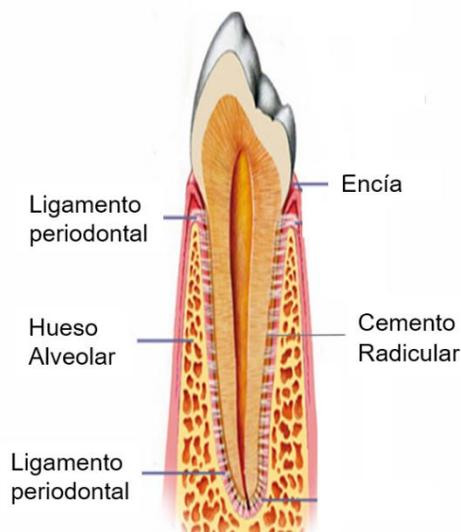
crecimiento celular, ciclo celular así como la muerte celular en HGF transfectados con CEMP1 (11). De esta forma, se conoce el efecto de CEMP1 en HGF a nivel transcripcional, sin embargo aún se desconoce a nivel ultraestructural.

Se decidió analizar la ultraestructura nucleolar debido a que el nucléolo es un organelo multifuncional y dinámico que participa en numerosos procesos vitales para las células, es decir tiene la capacidad de adaptar su morfología en respuesta a las necesidades celulares, estímulos, patologías, infecciones virales, estrés celular e incluso alteraciones en algunos mecanismos epigenéticos. Por esto el nucléolo es considerado como un indicador importante del estado fisiológico de las células (12). La ultraestructura nucleolar puede ser utilizada como un marcador morfológico del estado celular tanto en condiciones fisiológicas, patológicas o condiciones experimentales (13). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es determinar si la transfección de CEMP1 en HGF sanos afecta directamente la arquitectura nucleolar a nivel ultraestructural y por lo tanto las funciones celulares.

## 4. Antecedentes

### A. Periodonto

Los órganos dentarios se encuentran rodeados por los tejidos periodontales o periodonto (del latín *peri*, que significa “alrededor” y del griego *odonto* que significa “diente”). El periodonto está constituido por dos tejidos mineralizados, el hueso alveolar y el cemento radicular y dos tejidos conectivos blandos, el ligamento periodontal, y la encía (14) (15) como se observa en la Figura 1. Estos tejidos en su conjunto brindan el anclaje, soporte y recubrimiento a las raíces dentales. Los dos tejidos mineralizados, el cemento y el hueso alveolar, son los puntos de contacto a los que el ligamento periodontal ancla a los dientes con los maxilares y la encía recubre el periodonto y brinda protección a los tejidos subyacentes.



**Figura 1.-** Tejidos que componen el periodonto, Encía, Ligamento periodontal, Cemento Radicular y Hueso alveolar. Tomada y modificada de <http://www.sedico.net/>

El periodonto es un órgano único, constituido por tejidos notablemente diferentes entre sí, que varían en su composición celular y proteica, grado de mineralización y de actividad metabólica, así como susceptibilidad a patologías (16). Cada uno de los tejidos del periodonto tiene una estructura altamente especializada, y son sus características estructurales las que definen directamente su función. De hecho, el adecuado funcionamiento del periodonto solo se logra mediante la integridad estructural y la correcta interacción entre sus componentes (17) ya que cada uno de los componentes del periodonto influye sobre las actividades celulares de las estructuras adyacentes (18). La interdependencia de los tejidos periodontales destaca la importancia del funcionamiento en conjunto de sus componentes, trabajando como una unidad.

Entre las funciones del periodonto, la principal es la de anclar los órganos dentarios a los maxilares. Además, el periodonto es el encargado de transmitir las fuerzas oclusales al hueso, mantener los tejidos gingivales en un estado funcional y a los dientes en su posición normal. También se lleva a cabo una función formativa, durante la remodelación del cemento y el hueso alveolar para compensar el desgaste fisiológico y en la reparación de los tejidos en lesiones. El periodonto lleva a cabo la función nutricional, ya que el ligamento periodontal provee de elementos nutricionales al hueso alveolar, cemento y encía mediante los vasos sanguíneos y proporciona drenaje linfático. El ligamento periodontal también proporciona sensibilidad propioceptiva y táctil, para coordinarse con la función neuromuscular a través de las vías aferentes del hipotálamo (14).

## A. 1 Encía

La encía es la porción de la mucosa oral que cubre el hueso alveolar y el cuello de los dientes (15). Es de color rosado (rosa coral o salmón), frecuentemente posee una apariencia similar a una cáscara de naranja (punteada) y está delimitada apicalmente por la mucosa oral (14). La encía se divide en dos regiones, la encía libre (o marginal) y la encía insertada. Está compuesta por una capa de epitelio gingival y tejido conectivo subyacente denominado *lamina propia*. La principal función de la encía es proveer una barrera protectora capaz de resistir los daños producidos por bacterias, productos químicos y traumas a los que la cavidad oral está expuesta diariamente (16).

La encía libre mide aproximadamente 1.5 milímetros (mm) en sentido corono-apical, rodea pero no se adhiere a cada diente. En un estado de salud periodontal, la encía llena completamente los espacios entre dientes con la encía interdental o papila gingival. En molares y premolares la encía interdental consiste de dos papilas una vestibular y una bucal interconectadas por el col o collado. El col está constituido por epitelio no queratinizado y es una estructura particularmente susceptible a sustancias nocivas o traumas, por lo que es el sitio donde más frecuentemente se da el ataque patológico al aparato de soporte de los dientes (14).

La unión dentogingival es una adaptación de la mucosa oral compuesta por tejidos epiteliales y conectivos. El componente epitelial se divide en tres componentes funcionales, bucal, del surco y epitelio de unión, y el componente conectivo se divide

en compartimentos superficial y profundo. El epitelio de unión juega un papel crucial porque esencialmente sella los tejidos periodontales del ambiente oral. Su integridad es esencial para el mantenimiento del periodonto sano (17) .

En la encía sana, la colágena representa aproximadamente tres quintas partes del total de proteínas, la colágena tipo I es la que se encuentra en mayor proporción, también se encuentran la colágena tipo III y V. Éstas presentan diferencias en su composición bioquímica respecto a las que se encuentran presentes en la piel. La organización estructural y la función de la encía también dependen de un grupo heterogéneo de proteínas no colágenas encontradas en la porción de tejido conectivo que la constituye. El sistema de fibras elásticas es parcialmente responsable por las propiedades elásticas de la encía y representa aproximadamente el 6% del total de proteínas de la encía. También se han identificado numerosas moléculas de adhesión en la matriz extracelular de la encía, entre las que se incluyen fibronectina, laminina, tenascina, osteonectina y glucosaminoglicanos como el dermatan sulfato, condroitín 4 sulfato, heparán sulfato y ácido hialurónico.

La naturaleza metabólicamente activa de la encía provee de un continuo remodelamiento del tejido conectivo en respuesta a varios factores locales y ambientales (como la presencia o ausencia de dientes, inflamación o drogas) el recambio de colágena en la encía no es tan rápido como el del ligamento periodontal pero es significativamente más rápido que el encontrado en otros tejidos como la piel, tendones o el paladar.

Otra particularidad de la encía es que la presencia o ausencia de dientes induce cambios significativos en su composición bioquímica ya que la colágena extraída de zonas edéntulas difiere de la que se extrae de zonas con dientes. Las colágenas tipo I y III extraídas de zonas edéntulas son más parecidas a las encontradas en la piel. Otros cambios que se pueden encontrar en la composición proteica de la encía son producto de procesos inflamatorios. Ya que se ha documentado la aparición de tipos de colágena adicionales así como cambios en los porcentajes de los tipos de colágena ya presentes. Las proteínas no colágenas también se ven afectadas por procesos inflamatorios, las proteínas solubles en ácido con pesos atómicos de 32 a 75 kilo Daltons (kDa) desaparecen, los glicosaminoglicanos y proteoglicanos se reducen. La desaparición de proteínas colágenas específicas, no colágenas y proteoglicanos durante el proceso inflamatorio afecta la integridad de la encía (16).

## **A. 2 Ligamento periodontal**

El ligamento periodontal es un tejido conectivo blando especializado, situado entre el cemento que recubre las raíces dentales y el hueso del proceso alveolar. Tiene un grosor de 0.15 a 0.4 mm; la porción más angosta se encuentra en el tercio medio de la raíz y con la edad presenta una disminución progresiva en el grosor. El principal componente del ligamento periodontal son haces gruesos de fibras densas estrechamente entrelazadas y flexibles.

Es un tejido conectivo particularmente bien adaptado a su principal función, el anclaje de los dientes en los alveolos y al mismo tiempo les permite resistir las considerables fuerzas de masticación. Debido a su inervación, el ligamento periodontal tiene la capacidad de actuar como un receptor sensitivo necesario para el posicionamiento adecuado de la mandíbula durante la masticación. La red vascular y linfática del ligamento periodontal provee de nutrientes y remueve los productos metabólicos del ligamento periodontal y parte de la encía. Otra función primordial del ligamento periodontal es ser un reservorio celular para la homeostasis y procesos de reparación/regeneración (17).

Las células que se encuentran en el ligamento periodontal, son osteoblastos, fibroblastos, cementoblastos, osteoclastos, odontoclastos, restos de Malassez, monocitos, macrófagos y células mesenquimales indiferenciadas. Los compartimentos extracelulares consisten principalmente en haces de fibras de colágena bien definidos, embebidos en un material amorfo, conocido como

sustancia fundamental. Las células del ligamento periodontal tienen un rol elemental en el mantenimiento de la homeostasis en la parte alveolar del periodonto. Estas células tienen la capacidad de sintetizar y reabsorber las macromoléculas de los tejidos conectivos, y de esta forma contribuyen a la regulación de la síntesis y resorción de la matriz extracelular del ligamento periodontal, así como el hueso alveolar y el cemento. El ligamento periodontal colinda por un lado con la capa en desarrollo del proceso alveolar, que participa en la formación de hueso; por el otro lado colinda con la capa cementogénica de la superficie radicular, que participa en la formación de nuevo cemento (14).

Una capacidad destacable del ligamento periodontal es que mantiene su grosor a pesar de estar entre dos tejidos mineralizados. Las poblaciones celulares de este tejido, durante el desarrollo y la regeneración, secretan moléculas que pueden regular la extensión de la mineralización y previenen la fusión de las raíces dentales con el hueso alveolar (anquilosis). El balance entre la actividad de la sialoproteína ósea y la osteopontina contribuye a establecer y mantener el espesor biológico del ligamento periodontal.

El ligamento periodontal también tiene la capacidad de adaptarse a cambios funcionales. Cuando incrementa la demanda funcional, el grosor del ligamento periodontal puede incrementarse hasta en un 50 % y los haces de fibras también incrementan notablemente su grosor. Inversamente una reducción en las funciones lleva a un estrechamiento del ligamento y una disminución en el número y grosor de los haces de fibras (17).

### **A.3 Cemento radicular**

El cemento radicular es el tejido conectivo mineralizado que cubre las raíces de los dientes, forma la interface entre la dentina radicular y las fibras del ligamento periodontal. De todos los tejidos mineralizados identificados en mamíferos, el cemento es anatómicamente el que presenta más particularidades. Está compuesto por una matriz orgánica mineralizada muy delgada (20-200  $\mu\text{m}$ ), es avascular carece de drenaje linfático e inervaciones. A pesar del bajo volumen que ocupa el cemento, este es necesario para el anclaje de los dientes al hueso alveolar, la reparación de fracturas radiculares y la adaptación funcional de los dientes (16).

La función principal del cemento radicular es realizar el anclaje a los dientes en los alveolos. Esto lo logra mediante la interacción con las fibras del ligamento periodontal, cuyas terminaciones (fibras de Sharpey) son firmemente embebidas dentro del cemento durante la cementogenesis. Otra función del cemento es asistir en el mantenimiento de las relaciones oclusales mediante la aposición de nuevo cemento en la zona apical de las raíces. El cemento también se encarga de reparar fracturas radiculares, tapar los túbulos dentinaríos expuestos y proteger los subyacentes, así como de sellar pulpas necróticas (oclusión apical) (14).

En cuanto a su composición, el cemento es similar al hueso en el arreglo estructural de su matriz orgánica, el tipo de cristales que los conforman, el proceso de desarrollo, sus capacidades de reorganización y composición química. Sin embargo, hay algunas diferencias importantes entre estos dos tejidos, por ejemplo,

el 70 % del hueso está compuesto por sales inorgánicas, mientras que en el cemento es de solo el 46 %. En el hueso solo se encuentra colágena tipo I, mientras que el cemento contiene colágena tipo I, más colágena tipo III (cerca del 5 %) en su matriz orgánica. El cemento contiene un proteoglicano interfibrilar que parece ser exclusivo de este tejido. Comparado con el hueso y el esmalte, el cemento es permeable, y funcionalmente el cemento difiere del hueso en la incapacidad de realizar remodelaciones extensas (14).

La composición bioquímica del cemento incluye un 50 % de porción mineral y un 50 % de matriz orgánica. La colágena tipo I es el componente orgánico predominante (90 %) también se encuentran las colágenas tipo III, V, VI, XII y XIV. Respecto a las proteínas no colágenas se incluyen la sialoproteína ósea, proteína de matriz dentinaria 1 (DMP-1), sialoproteína dentinaria, fibronectina, osteocalcina, osteonectina, osteopontina, tenascina, proteoglicanos, proteolípidos, factores de crecimiento (factor de crecimiento cementario) y proteínas del esmalte (17).

La localización, morfología y características histológica del cemento han sido la base para la clasificación de los distintos tipos de cemento en 4 categorías; Cemento tipo I, cemento acelular y afibrilar, es encontrado casi exclusivamente sobre el esmalte cerca de la unión cemento-esmalte, carece de fibras de colágeno y de cementocitos. Cemento tipo II, cemento acelular y fibrilar, es el cemento que contiene las fibras de Sharpey pero carece de cementocitos. El cemento tipo III, cemento celular con fibras intrínsecas, carece de fibras de Sharpey, su matriz orgánica en su lugar consiste de fibras intrínsecas secretadas por los

cementoblastos. El cemento tipo IV, cemento celular con fibras intrínsecas y extrínsecas, contiene fibras producidas por cementoblastos y por los fibroblastos del ligamento periodontal dentro de su matriz calcificada que también incluye cementocitos (14).

Cemento acelular de fibras extrínsecas. (Cemento primario o cemento acelular) se encuentra en los dos tercios cervicales de la raíz, es considerado acelular por que las células que lo forman permanecen en su superficie. Contiene un número muy alto de fibras de Sharpey, por lo que su principal función es el anclaje. Cemento celular de fibras intrínsecas, se distribuye en el tercio apical de las raíces y la zona de furca. Es producido como tejido de reparación que rellena los defectos y fracturas radiculares. Este tipo de cemento es menos mineralizado que el anterior. Cemento celular mixto estratificado, posee una estratificación que se origina por el depósito alternado de capas de cemento acelular extrínseco y de cemento celular de fibras intrínsecas (17).

“La búsqueda constante para alcanzar la regeneración periodontal verdadera, ha brindado un renovado interés en el cemento radicular debido a que en la ausencia de cemento recién formado no se puede dar el anclaje de las fibras de Sharpey, un paso crítico en la regeneración del aparato de inserción periodontal”. Por este motivo la revisión del proceso de cementogenesis recobra importancia.

El inicio de la formación del cemento está limitado en un principio por el avance de la formación radicular, donde la vaina epitelial de Hertwig (HERS por sus siglas en

inglés) envía un mensaje inductivo, posiblemente secretando algunas proteínas de la matriz del esmalte a las células ectomesenquimales de la pulpa dental. Estas células se diferencian hacia odontoblastos y producen capas de preentina. Al poco tiempo la HERS se fragmenta y células ectomesenquimales de la porción interna del folículo dental entran en contacto con la preentina. Posteriormente los cementoblastos se diferencian y depositan matriz de cemento sobre la dentina radicular en formación. El origen de los cementoblastos y la serie de eventos que llevan a su diferenciación aún no se conoce con certeza (17).

Durante el desarrollo de la raíz, las primeras células que se alinean a lo largo de la recién formada dentina (sin mineralizar) tienen características de fibroblastos. Estas células depositan colágena entre la matriz dentinaria sin mineralizar para permitir que las fibras de ambos tejidos se entremezclen. La mineralización de la dentina no alcanza la superficie hasta que el entrelazado de las fibras de colágena de ambos tejidos se ha completado. Después la mineralización se extiende hacia la matriz del cemento, estableciendo la unión dentina-cemento. Las células sobre la superficie radicular continúan depositando colágena para que los haces de fibras aumenten su longitud y grosor. Al mismo tiempo secretan proteínas de matriz no colágenas que llenan los espacios entre las fibras de colágena y regulan la mineralización del cemento en formación. Esta actividad continúa hasta que se forman aproximadamente 15-20  $\mu\text{m}$  de cemento, en ese momento los haces de fibras intrínsecas se conectan con los haces de fibra en desarrollo del ligamento periodontal (17).

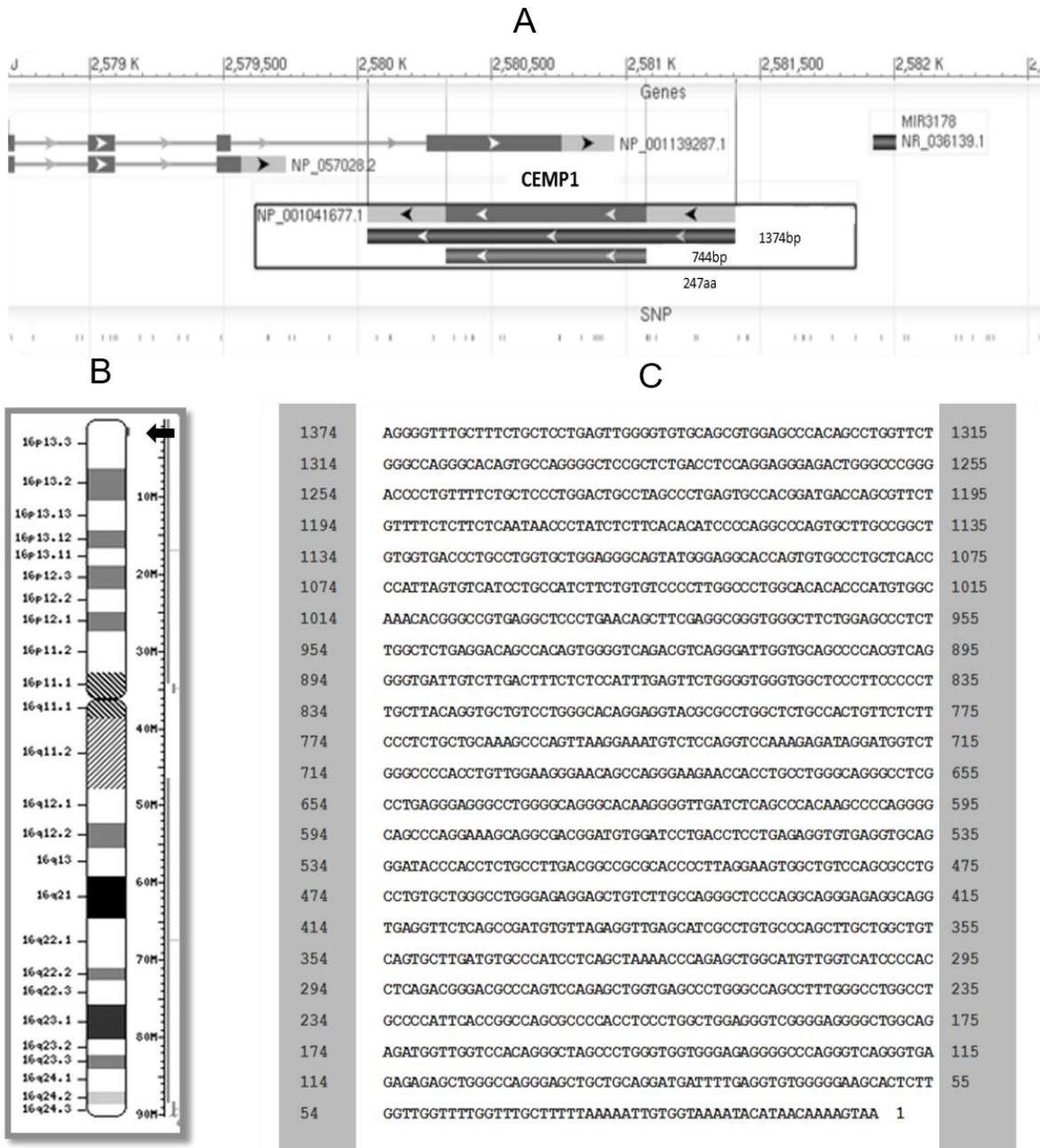
### A.3.1 Proteína del cemento 1 (CEMP1)

La Proteína de Cemento 1 (CEMP 1) se aisló de una línea celular derivada de un cementoblastoma humano (19) (20). 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 del cemento radicular (tanto acelular como celular) y en células progenitoras cementoblásticas tanto *in vivo* como *in vitro* (21). Los resultados al utilizar la CP purificada e inducir con medio mineralizante sugieren que esta proteína promueve la adhesión de HGF, células del ligamento periodontal humanas, y de células derivadas de hueso alveolar. Además, promueve la actividad de la fosfatasa alcalina y la producción de matriz extracelular mineralizada en células mesenquimales embrionarias sin un fenotipo definido (22).

En células cementoblásticas, se demostró mediante ensayos de inhibición *in vitro* utilizando el anticuerpo anti-CP, que CP regula las características morfológicas de la matriz extracelular mineralizada depositada *in vitro*, modificando la composición química de los cristales de Hidroxiapatita (relación Ca/P). Estos cambios al parecer se asocian con la expresión y función de la osteopontina, sialoproteína ósea y la fosfatasa alcalina (23). Estos resultados 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 CP (24). CEMP1 se encuentra en el cromosoma 16p13.3, su secuencia principal fue deducida de una secuencia de DNA complementario (2580036...2581409, cadena complementaria). El gen humano tiene un exón de 1374 pares de bases (pb) del cual codifican 744 pb para dar un producto final de 247 aminoácidos (Figura 2). Tiene un peso molecular estimado de 26 kDa y parece ser una proteína alcalina que 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 %) 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 DNA. Los aminoácidos 30 a 110 muestran 48 % de similitud con la colágena humana I  $\alpha$  (cadena I), un 46 % con la tipo XI y 40 % con la tipo X. También se sabe que CEMP1 tiene actividad tipo lectina y que específicamente reconoce manopiranosidos (9). El análisis de contenido de estructura secundaria de la proteína recombinante humana de CEMP1 (hrCEMP1) 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 %) (25).



**Figura 2.-** El gen de CEMP1 se encuentra en la cadena complementaria del DNA, cuenta con 1374 pb, de las cuales 744 pb codifican para una proteína de 247 aminoácidos (A). Este gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 16, en la región 13.3 (B). Se muestra la secuencia completa del gen (C).

Se ha determinado que CEMP1 es altamente expresada a nivel de proteína y RNA mensajero (mRNA) 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 alveolar (24). Se ha relacionado a esta proteína con el proceso de biomineralización, particularmente en el cemento radicular, ya que hasta el momento se ha demostrado que es una molécula específica de este tejido.

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 2 asociado a Runt (RUNX2) y CEMP1, todas ellas proteínas asociadas al proceso de mineralización y al fenotipo cementoblástico/osteoblástico y las cuales no son expresadas por HGF en condiciones fisiológicas (10). Estos resultados son consistentes con la posibilidad de que CEMP1 participa en el proceso de mineralización de cementoblastos putativos *in vitro* (26) 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  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) y promueve la nucleación de cristales de Hidroxiapatita(8).

Mediante ensayos en sistemas libres de células se demostró que hrCEMP1 promueve la nucleación de cristales de fosfato octacálcico, que es un precursor de la hidroxiapatita (27). 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 la proteína morfogénica ósea (BMP2) o medio inductor osteogénico (28, 29).

A pesar de que se ha reportado la localización nuclear de CEMP1 en cementoblastos, 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 (29).

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 tipo cartílago y tipo cemento/hueso (30). Estas células fueron capaces de expresar colágena tipo II (COL2A1) y agrecano (ACAN) (marcadores para condrocitos pre-hipertróficos) (31, 32). 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 (30). Lo anterior indica que CEMP1 podría ejercer un rol en la diferenciación de poblaciones celulares de células del ligamento periodontal, seleccionando células madre multipotentes para diferenciarse hacia diversos fenotipos celulares, o como un inductor de las poblaciones celulares heterogéneas del ligamento periodontal teniendo un efecto sobre las células en varios grados de diferenciación (33).

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 colocación 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 (34). *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 migración (34).

El rol de CEMP1 como quimioatrayente y como promotor de mineralización es apoyado por el descubrimiento de que la mineralización se reduce después de bloquear la función de CEMP1 *in vitro*. 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 (23). 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 RNA 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 (34).

Recientemente se han reportado 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, similares al hueso sano, 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 mineralizados (35).

Estudios realizados mediante la técnica de microarreglos de expresión de genoma completo mostraron que CEMP1 modula la expresión de genes relacionados con desarrollo y crecimiento celular, muerte celular, ciclo celular y moléculas asociadas con cáncer. Además, CEMP1 es capaz de transformar fibroblastos como son HGF y NIH3T3 (11).

A pesar de que el papel fisiológico de CEMP1 no ha sido completamente resuelto a la fecha, todos los datos mencionados muestran de manera clara que CEMP1 es una proteína única que tiene múltiples propiedades como inductor de mineralización, proliferación, diferenciación y crecimiento 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.

#### **A.4 Hueso alveolar**

El hueso alveolar o proceso alveolar es la porción de la mandíbula y maxilar que albergan las raíces de los órganos dentarios erupcionados. Es la estructura ósea que forma los alveolos dentales que soportan a los dientes. Está constituido por 3 componentes, el hueso alveolar propiamente, que forma las paredes de los alveolos; las placas corticales internas y externas, conformadas por hueso compacto; y el hueso trabecular o esponjoso localizado entre los otros dos componentes. Las funciones generales del hueso alveolar son albergar las raíces dentales así como absorber y distribuir las fuerzas oclusales generadas durante los contactos dentales. La función más importante es la de anclar las raíces dentales a los alveolos, mediante la inserción de las fibras de Sharpey en el hueso alveolar. (15).

El hueso alveolar es un tejido mineralizado vascularizado e innervado que continuamente se renueva y es capaz de auto repararse. Una particularidad destacable del hueso alveolar es su dependencia de los órganos dentarios ya que el proceso alveolar se desarrolla y posteriormente remodela con la formación y erupción dental. Por lo tanto la estructura y morfología del hueso alveolar dependen de los órganos dentarios, a tal grado que el hueso alveolar se pierde en ausencia de los dientes. El hueso alveolar responde a la demanda funcional que le infieren las fuerzas de masticación, debido a que los dientes constantemente tienen pequeños movimientos, el hueso de las paredes de los alveolos es constantemente remodelado y su organización estructural varía a lo largo de la pared alveolar. El

hueso alveolar tiene la capacidad de remodelación rápida, este proceso esencialmente es similar al de otros tipos de hueso. Sin embargo, la reabsorción es asincrónica, lo que permite que el ligamento periodontal solo se desancla focalmente y por periodos de tiempo cortos (17).

En general, el hueso alveolar compacto está compuesto por una fase orgánica y una mineral. La fase mineral del hueso alveolar está constituida por fosfato de calcio y representa aproximadamente 60 % del peso. La fase orgánica representa 40 % del peso, está compuesta por células, fluidos y proteínas. En el componente proteico la colágena representa el 75 %, se encuentra predominantemente colágena tipo I y pequeñas cantidades de colágena tipo III y V. También se encuentran proteínas no colágenas como la osteocalcina, fibronectina, tenascina, sialoproteína, proteoglicanos como la decorina y biglicano, glucosaminoglicanos como el condroitin-4-sulfato, dermatan sulfato, heparán sulfato y ácido hialurónico, así como factor de crecimiento B, proteínas morfogenéticas óseas y osteogenina (16).

Las placas corticales y el hueso alveolar propiamente se unen en la cresta alveolar. A la porción de hueso que delimita los alveolos dentales se le llama "Bundle Bone" porque es donde se anclan los haces de fibras periodontales. Esta porción del hueso alveolar es la más importante con respecto al anclaje de los órganos dentarios, está constituida por capas sucesivas de fibras intrínsecas organizadas de forma paralela al alveolo, mientras que las fibras de Sharpey del ligamento periodontal penetran en la matriz del hueso en una posición perpendicular a las paredes del alveolo dental (17). La porción trabecular del hueso alveolar está organizada para contrarrestar las

fuerzas funcionales a las que el hueso alveolar está expuesto normalmente. El tamaño y la orientación de las trabéculas se correlacionan con la intensidad del estímulo funcional que reciben. En esa porción también se encuentran los conductos de Volkmann, por los que pasan nervios, vasos sanguíneos y linfáticos, que son distribuidos por el hueso alveolar. Estos también nutren al ligamento periodontal mediante los poros del hueso alveolar (placa cribiforme) (14).

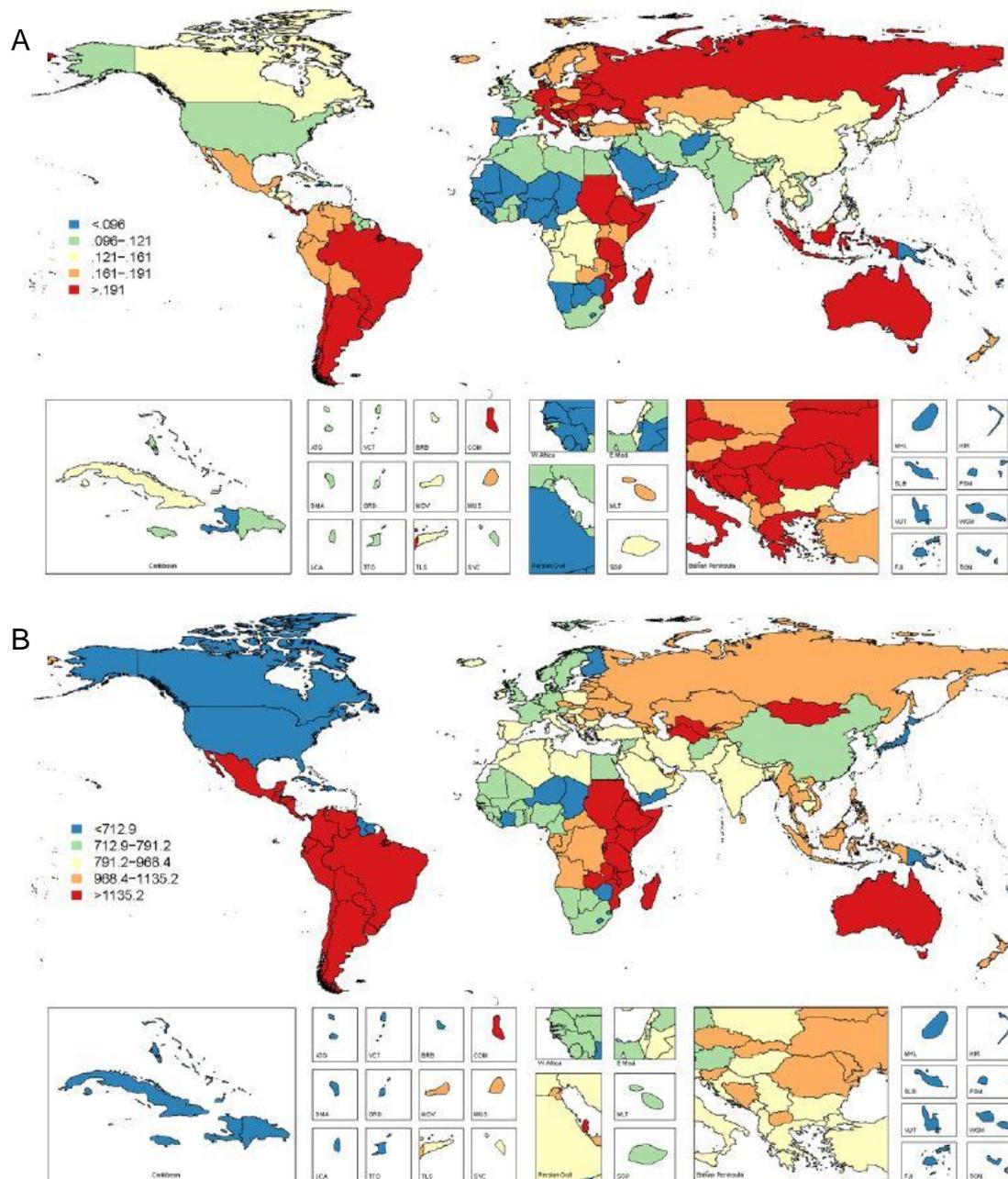
La reabsorción del hueso alveolar, como resultado de un proceso inflamatorio en el periodonto, es una causa frecuente de movilidad y posterior pérdida dental en adultos. La pérdida del hueso alveolar se puede influenciar por numerosos factores como la respuesta inmune del paciente, susceptibilidad genética, mala higiene oral y virulencia de los microorganismos presentes en el surco gingival o las bolsas periodontales (14).

## **B. Enfermedad periodontal**

La enfermedad periodontal o periodontitis se considera una infección causada por microorganismos de la microbiota oral (los agentes etiológicos más comunes de periodontitis son *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Actualmente, se considera que las características patognomónicas de la periodontitis son el resultado de la activación de la respuesta inflamatoria del paciente (la pérdida del aparato de inserción tiene lugar debido a la activación de las metaloproteinasas por mediadores pro-inflamatorios como algunas prostaglandinas y citoquinas) (36) . La periodontitis es una de las enfermedades más extendidas, de acuerdo al estudio epidemiológico a nivel mundial más reciente, en 2010 la periodontitis severa fue la sexta enfermedad con mayor prevalencia, afectando al 10.8 % de la población (743 millones de personas), mientras que la periodontitis leve a moderada afecta a la mayoría de los adultos como se observa en la Figura 3 (1).

Se han identificado desencadenantes multifactoriales que contribuyen a incrementar la severidad de la enfermedad y la susceptibilidad de los pacientes a desarrollar periodontitis, entre estos se encuentran, polimorfismos genéticos, variaciones en genes que regulan la respuesta inflamatoria (gen de interleucina 1), factores de riesgo infecciosos (población bacteriana) factores del estilo de vida (dieta, tabaquismo, enfermedades sistémicas, medicaciones, diabetes mellitus, obesidad), edad-envejecimiento, condición socioeconómica, estrés psicosocial,

inmunosupresión y factores epigenéticos (36) (37) (38). Sin embargo el factor de riesgo más importante es la falta de higiene oral.



**Figura 3.-** Prevalencia (proporción) (A) e incidencia (100 000 personas-año) (B) de periodontitis severa crónica a nivel mundial en 2010. México se encuentra entre los países con mayor incidencia de enfermedad periodontal crónica. Imagen tomada de Kassebaum *et al* 2014 (1).

El diagnóstico de la enfermedad periodontal se establece mediante la examinación clínica de la encía y la examinación radiográfica para determinar la cantidad de hueso perdido en la periferia de los órganos dentarios. Es ampliamente aceptado que la progresión de la enfermedad periodontal va de la gingivitis en una primera instancia y da paso a la periodontitis. La gingivitis se da por la adherencia y crecimiento de microorganismos en la superficie de los dientes (placa dentobacteriana). La gingivitis no afecta a los tejidos de soporte dentario bajo ella, sin embargo, si la placa dentobacteriana no es removida de la superficie de los dientes y la encía, la placa se calcifica y forma cálculo (sarro o tártaro) dental. La gingivitis crónica, presenta destrucción de las fibras gingivales y el tejido conectivo.

La gingivitis crónica causa que la encía se separe del diente, creando una bolsa periodontal y pérdida del aparato de inserción periodontal. Mientras que la presencia de cálculo dental produce una inflamación crónica de los tejidos periodontales. La enfermedad periodontal se caracteriza por un cambio en la población de microorganismos que colonizan las bolsas periodontales, en un inicio esta colonización se da por bacterias aerobias Gram positivas, conforme evoluciona la enfermedad periodontal, las poblaciones bacterianas cambian a bacterias anaerobias Gram negativas (39).

En caso de no recibir tratamiento, la enfermedad periodontal conduce a la destrucción progresiva de las estructuras de soporte de los órganos dentarios y eventualmente a la pérdida de los dientes. Actualmente la enfermedad periodontal es la causa más común a la pérdida de órganos dentarios a nivel mundial (39).

En los últimos años numerosas publicaciones han señalado que las infecciones periodontales pueden tener implicaciones sistémicas para los pacientes. Las personas con periodontitis severa presentan alteraciones en los parámetros hematológicos (incremento en suero de los reactantes de la fase aguda) y se ha correlacionado a la periodontitis con incrementos en el riesgo de mortalidad, enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares, pulmonares, diabetes mellitus, osteoporosis y el nacimiento de bebés prematuros y/o bajo peso al nacer (36) (40) (41).

## **C. Tratamientos periodontales**

Se ha implementado una amplia variedad de tratamientos periodontales. Antes el objetivo principal de estos tratamientos era detener la progresión de la enfermedad, pero conforme avanzaron las investigaciones en el campo periodontal, estas aportaron un mayor conocimiento de procesos claves, como los factores etiológicos asociados con la periodontitis, los mecanismos involucrados en la curación de heridas periodontales y la interrelación entre numerosos factores de los pacientes y los resultados de los tratamientos. Esto trajo consigo una evolución de los tratamientos y el trabajo en la búsqueda de una terapia periodontal óptima, que ahora tiene como meta lograr la regeneración de los tejidos dañados o perdidos con la progresión de la enfermedad.

### **C.1 Tratamiento clínico y quirúrgico**

Los tratamientos periodontales han evolucionado mucho, a medida en que avanza el conocimiento en el área periodontal, y que se diseñan estudios que evalúan la eficacia de las terapias en uso. En la década de los 70's el curetaje gingival y la remoción de cemento radicular por considerarlo "contaminado" eran tratamientos rutinarios que posteriormente se probó que carecían de eficacia o el fundamento sobre el que se plantearon era equivocado. Se dio un gran paso al determinarse la importancia del microbioma oral humano y reconocerse su importancia en la progresión de la enfermedad y sobre todo en el éxito de los tratamientos.

Han surgido alternativas terapéuticas muy variadas a lo largo de los años, la terapia fotodinámica se introdujo en los 90's y hasta el año 2011 artículos científicos demostraron que no había evidencia de su efectividad antimicrobiana, especialmente al compararlos con el tratamiento estándar (42). Algo similar sucedió con la aplicación de laser que en el año 2008 se demostró que no tenían eficacia superior a los tratamientos convencionales (43). Cuando se demostró la importancia de la microbiota bacteriana en la enfermedad periodontal, surgieron variantes en los tratamientos como la irrigación con antisépticos en las bolsas periodontales después del tratamiento convencional, con el fin de coadyuvar a la eliminación bacteriana, los más utilizados son povidona yodada, hipoclorito de sodio diluido y gluconato de clorhexidina (44). Sin embargo se demostró que esta variante de tratamiento no presentaba ninguna ventaja con respecto al tratamiento habitual. Siguiendo esta aproximación surgieron ideas relacionadas con la liberación local (gel de minociclina, microencapsulado de minociclina, chip de clorhexidina, doxiciclina en gel, tetraciclina y metronidazol) (45) (46) y sistémica de antimicrobianos (espiramicina y amoxicilina junto con metronidazol) (47). Estas dos aproximaciones han mostrado eficacia, sin embargo cabe destacar que son coadyuvantes del tratamiento tradicional y no sus sustitutos y que deben usarse solo en casos indicados debido al riesgo de efectos adversos como el desarrollo de resistencia bacteriana a los antimicrobianos, interacción con otros medicamentos y posibles reacciones alérgicas.

Una variante de tratamiento que si ha demostrado tener evidencia científica de su eficacia es la “desinfección de la boca completa”, esta tiene como fin prevenir la reinfección de otras bolsas periodontales aun sin tratamiento. Para lograr esto se realiza un tratamiento de raspado y alisado radicular de toda la boca el mismo día, adicionalmente se realizan enjuagues bucales con clorhexidina dos veces al día, limpieza de la lengua, aplicación de spray de clorhexidina en amígdalas, irrigación subgingival con clorhexidina tres veces por 10 minutos. Estos pasos se repiten a los 8 días (48). A pesar de que los avances tecnológicos han introducido un amplio rango de instrumentos y técnicas novedosas, los factores críticos para el éxito de una terapia periodontal no quirúrgica continúan siendo la minuciosidad del raspado radicular y la higiene oral del paciente, independientemente de la modalidad de tratamiento (44).

## **C.2 Medicina regenerativa en periodontología.**

La regeneración de los tejidos orales es regulada por múltiples tipos celulares, mecanismos de señalización e interacciones en la matriz extracelular. La meta de la medicina regenerativa e ingeniería de tejidos periodontales es restaurar los tejidos duros y blandos a través de diferentes estrategias usando células, andamios y/o moléculas de señalización (49).

Las terapias actuales hacen uso de diversos biomateriales que se utilizan de forma conjunta y que pueden dividirse en:

1. Materiales que reemplazan el hueso alveolar perdido (injertos de hueso o sustituto de hueso).
2. Materiales que cubren el área de hueso alveolar perdido, protegiéndola del crecimiento epitelial (barreras).
3. Materiales con actividad biológica que pueden ser administrados directamente en el defecto (biomoléculas y terapia celular).

Estos materiales se explican más a detalle a continuación.

### **C.2.1 Injertos óseos.**

Basados en su origen se han clasificado en autógenos, alogénicos, xenogénicos y aloplásticos (50). Los defectos periodontales a menudo se consideran susceptibles de regeneración ósea cuando las paredes óseas residuales aún se conservan y pueden proporcionar suministro sanguíneo, así como soporte mecánico para la colocación de un material de relleno de hueso en el sitio de reabsorción. Además de la función de andamiaje, el suministro de espacio y la estabilización del coágulo, los injertos óseos pueden poseer características osteoconductoras y/o osteoinductivas.

Deben cumplirse varios aspectos importantes del ensamblaje de andamios: macroestructura, tiempo de degradación, mecanismos de liberación, así como la exposición y duración de las moléculas bioactivas (51). El material utilizado no solo debe proporcionar soporte mecánico sino también promover la adherencia celular, la migración y la proliferación en la superficie para estimular la producción de la matriz extracelular (MEC). Además, la composición de la MEC necesita imitar a la MEC nativa y, en la regeneración periodontal, proporcionar un espacio para el crecimiento de células periodontales, mientras excluye el crecimiento de células epiteliales (52) (53).

### **C.2.2 Barreras.**

Las barreras físicas son usadas para guiar la regeneración tisular para excluir el crecimiento de células epiteliales. Las membranas se han usado en conjunto con los injertos óseos. Más recientemente, las membranas de tercera generación no solo actúan como barreras sino también como liberadores de agentes específicos como antibióticos y factores de crecimiento (54).

### **C.2.3 Mediadores biológicos**

Los mediadores biológicos pueden considerarse la generación más reciente y de rápido desarrollo de agentes utilizados para la ingeniería de tejidos periodontales. Podrían clasificarse ampliamente en factores de crecimiento, células troncales y agentes de terapia génica. Los factores de crecimiento utilizados en la ingeniería de tejidos periodontales incluyen derivados de la matriz del esmalte (EMD), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento y diferenciación 5 y factor de crecimiento transformante  $\beta$  (55).

#### **C.2.4 Terapia celular.**

La terapia celular se puede definir como el tratamiento de la enfermedad mediante la introducción de células nuevas en un tejido (4). Para las técnicas basadas en células en la ingeniería de tejidos, se pueden usar células somáticas y células madre. Las células somáticas se pueden obtener, cultivar y administrar en el sitio de destrucción tisular. Las células del ligamento periodontal, los cementoblastos y las células del folículo dental muestran la capacidad de mineralizar in vitro y promover la regeneración periodontal (56). Sin embargo, las células somáticas carecen de la capacidad de autorenovación y el potencial de diferenciación que tienen las células madre. Las células madre se pueden obtener a través de la médula ósea, el tejido adiposo, la pulpa dental y ligamento periodontal (57) (58).

Las células madre pluripotentes inducidas (iPS por sus siglas en inglés) se han vuelto de particular interés en medicina regenerativa (59). La utilización de la terapia basada en iPS requiere la recolección de células somáticas y la posterior terapia génica para reprogramar las células a un estado multipotente o pluripotente, seguido de la diferenciación de iPS en una población homogénea de células diferenciadas específicas del paciente. Sin embargo, hay algunas preocupaciones con respecto al uso de iPS, incluida la posible integración de genes virales en el huésped, respuestas inmunogénicas y una posible inducción de tumorigénesis (60).

Recientemente, han sugerido a las células derivadas del periostio, como una fuente celular alternativa para la regeneración ósea, ya que la recolección de estas células es menos invasiva para los pacientes y requiere un procedimiento de obtención más simple. Las células aisladas se cultivan en láminas sensibles a la temperatura hasta formar una capa de células que luego se puede implantar en un defecto (53). Los estudios preclínicos han demostrado una mejor inducción de cementogénesis y fibras de ligamento periodontal (61). Las células madre mesenquimales tienen propiedades inmunomoduladoras que pueden beneficiar un microambiente regenerativo, lo que las convierte en candidatos fuertes para las aplicaciones de ingeniería de tejidos (49).

### **C.2.5 Terapia génica.**

La terapia génica utiliza células genéticamente modificadas para administrar dosis específicas de una proteína bioactiva durante un período sostenido. Actualmente existen diversos métodos para transfectar el gen de interés en las células o interferir con la expresión celular de un gen particular.

La terapia génica también se puede realizar con diferentes técnicas, como la administración directa, la administración sistémica, la administración local y, recientemente, los micro ácidos ribonucleicos (microRNA) (62). Los microRNA son pequeños RNA no codificantes que regulan la expresión de un gen diana (63). Se ha reportado que numerosos microRNA influyen en la osteogénesis al disminuir o aumentar la regulación de genes directamente implicados en la formación ósea. Por ejemplo, miR-2861, miR-3960 y miR-378 promueven la diferenciación osteoblástica, mientras que miR-204, miR-204, miR-211 y miR-133 inhiben la diferenciación osteoblástica (64).

### **C.2.6 Impresión tridimensional.**

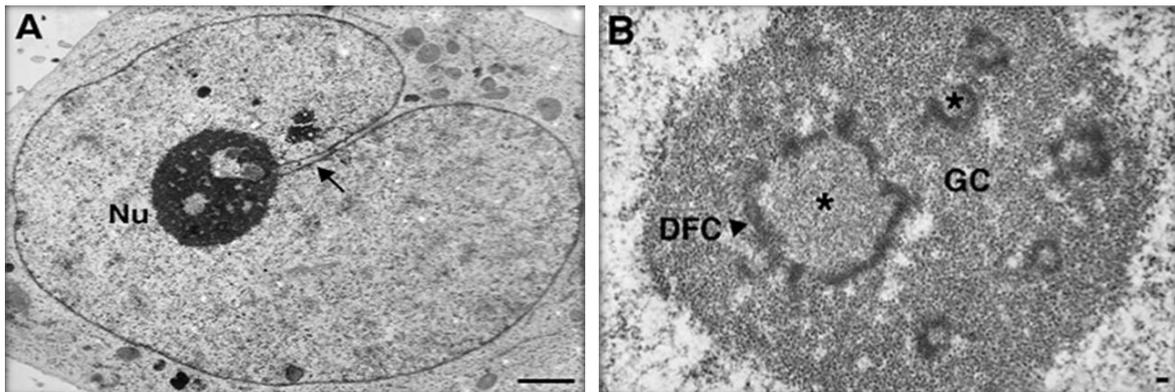
Los dispositivos biomédicos impresos tridimensionalmente se pueden usar para restaurar defectos con precisión o incluso para reconstruir órganos completos con microestructura compleja. La impresión tridimensional (3DP) utiliza la impresión para aplicar una solución aglutinante sobre un lecho de polvo y puede organizar simultáneamente múltiples tipos de células, depositar MEC y proporcionar un control ajustado sobre la deposición de moléculas bioactivas. Hasta la fecha, se han impreso péptidos, proteínas, plásmidos de ADN y células vivas (65).

Además, el trazado 3D es una técnica para fabricar andamios de tejidos blandos, como hidrogeles, con células incorporadas que conservan su actividad normal (65). Una posible limitación del hidrogel como andamio incluye la inhibición de las interacciones célula-célula, lo que puede influir en la señalización celular. Por el contrario, la impresión 3D de células vivas, ya sea en agregados celulares o sembradas en andamios 3DP, puede potenciar la señalización celular y promover la formación de tejido (66).

## 5. La importancia del estudio de la ultraestructura nucleolar en periodontología.

### A. Nucléolo

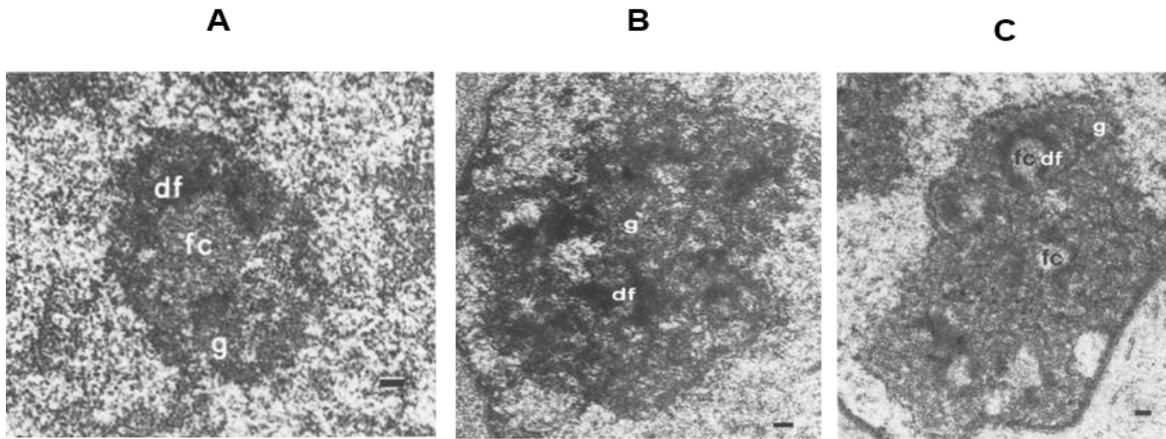
El nucléolo es un organelo celular localizado en el interior del núcleo de las células (figura 4). Este organelo está presente en todas las células eucariontes, carece de membranas que lo delimiten y es altamente dinámico ya que tiene la capacidad de modificar la organización y cantidad de sus componentes de acuerdo a las necesidades y condiciones celulares (67) (68). La función principal del nucléolo, la primera que se identificó y la más estudiada es la biogénesis ribosomal, sin embargo en la actualidad es considerado un organelo multifuncional que participa en numerosos procesos vitales para el funcionamiento celular (69) (70).



**Figura 4.-** Microfotografía del Nucléolo mediante microscopía electrónica de transmisión (A). Los nucléolos están constituidos por los Centros Fibrilares (FC por sus siglas en inglés) (asterisco), el Componente Fibrilar Denso (DFC por sus siglas en inglés (cabeza de flecha) y el Componente Granular (GC por sus siglas en inglés) (B). Imagen tomada de Hernandez-Verdun 2006 (71).

Los nucléolos están constituidos por tres componentes o subcompartimentos fácilmente observables mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés): los Centros Fibrilares (FC), el Componente Fibrilar Denso (DFC) y el Componente Granular (GC) como se observa en la figura 4 B. Los FC son zonas del nucléolo con apariencia fibrilar donde se localizan los genes activos de RNA ribosomal (rRNA), así como la maquinaria celular necesaria para su transcripción, están rodeados (en las tres dimensiones ) por una zona mucho mayor y más electrodensa, el DFC, la cual a su vez está rodeada por una zona de apariencia granular GC (72) (73).

Desde el punto de vista ultraestructural, los nucléolos se clasifican en 3 categorías: nucléolos con forma de anillo, nucléolos reticulados y nucléolos compactos (Figura 5). Dado que la ultraestructura nucleolar está estrechamente ligada a la función, los nucléolos de cada categoría tienen características metabólicas particulares, de este modo los nucléolos con forma de anillo se caracterizan por ser de células con un nivel bajo de síntesis ribosomal. Son nucléolos pequeños, usualmente conformados por un solo FC grande, rodeado de poco DFC y GC. Los nucléolos reticulados se encuentran en células que acaban de recibir un nuevo estímulo que aumente su síntesis ribosomal, en este tipo de nucléolos el DFC es muy prominente mientras que los FCs son pequeños y pocos, el GC es poco extenso. Los nucléolos compactos se encuentran en células metabólicamente activas, el DFC forma una larga red que envuelve varios FCs y el GC cubre un área grande en la periferia del nucléolo (74).



**Figura 5.-** Clasificación ultraestructural de los nucléolos. (A) Nucléolo con forma de anillo, (B) nucléolo reticulado, (C) nucléolo compacto. Imagen tomada de Schwarzacher y Wachtler 1983 (75).

El nucléolo es la fábrica de ribosomas de la célula. Las células requieren de una cantidad inmensa de ribosomas, se estima que cada célula contiene varios millones de ellos. Esto representa una enorme inversión en actividad biosintética y un inmenso flujo de material dentro y fuera del nucléolo. Una célula activa se divide en menos de 24 horas y debe producir suficientes ribosomas para cada célula hija, lo que significa que la síntesis ribosomal es de cientos de ribosomas por segundo (73).

El proceso de biogénesis ribosomal es energéticamente alto, ya que requiere del ensamble de más de 200 factores, muchas ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares (snoRNPs) y cuatro diferentes rRNA (68). El DNA ribosomal (rDNA) se transcribe y el pre-rRNA 47S es escindido, procesado y ensamblado con aproximadamente 80 proteínas ribosomales y el RNA 5S, para formar las subunidades ribosomales 40S y 60S (76). La transcripción de los genes ribosomales

que es realizada por la RNA polimerasa I (RNA Pol I), tiene lugar en la zona de transición entre el FC y el DFC. El procesamiento del rRNA continúa en el DFC, donde se acumulan los pre-rRNAs y se realizan las modificaciones postranscripcionales. La maduración del pre-rRNA da lugar a la formación de los rRNAs 18S, 5.8S y 28S. Los gránulos del CG son considerados partículas pre-ribosomales en varias etapas de maduración. La síntesis de las subunidades ribosomales se da en el GC hasta que completan su proceso de maduración y salen del nucléolo por difusión simple (77).

El ensamblaje de los nucléolos ocurre alrededor de las Regiones Organizadoras Nucleolares (NORs). Las NORs son regiones cromosomales con múltiples copias de rDNA que transcriben el pre-rRNA 47S (70). El número de NORs varía entre especies, desde 1 en las levaduras haploides hasta 10 en células somáticas humanas. Las NORs están localizados en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (cromosomas 13, 14, 15, 21, 22). Por lo tanto, hay 10 NORs en las células diploides humanas y 10 posibles nucléolos por célula, sin embargo, no todos los NORs están activos simultáneamente, lo que permite variaciones en el número de nucléolos. Se han demostrado que el número de nucléolos varía ampliamente en poblaciones de la misma línea celular (68). La localización de los nucléolos dentro del núcleo depende a su vez de la ubicación de las NORs, las cuales a su vez dependen de factores epigenéticos como metilación del DNA, acetilaciones y metilaciones de histonas y factores de remodelación de la cromatina, por lo que

recientemente se sugirió que estos factores tienen una gran influencia en el número y localización nucleolar (77).

Los nucléolos varían en tamaño y forma entre diferentes especies y también entre tipos celulares. El tamaño nucleolar/área es un parámetro que se sabe fluctúa mucho en las células humanas, desde menos de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro o hasta más de 10  $\mu\text{m}$ , esta variación se ha asociado en células sanas a características propias de cada línea celular, aunque factores como la actividad celular tienen una influencia significativa en el tamaño nucleolar, ya que algunos autores aseguran que el tamaño del nucléolo es el reflejo de su eficiencia en la biogénesis ribosomal, sin embargo en células neoplásicas el crecimiento nucleolar se asocia a incrementos en la actividad de Pol I, así como aumentos en la expresión de factores de unión río arriba (UBF por sus siglas en inglés), DNA topoisomerasa I y Fibrilarina. Adicionalmente la reducción de proteínas encargadas del control de la proliferación como p53 y pRb también causan un incremento en el área nucleolar (68).

## **B. Ultraestructura nucleolar en periodontología**

En años recientes se ha demostrado que el nucléolo participa en diversas funciones celulares más allá de la síntesis ribosomal. Esto a raíz de la observación de la presencia de varias moléculas que no tienen conexión con la síntesis ribosomal en los nucléolos (72). Las funciones en las que participa el nucléolo incluyen; la regulación del ciclo celular y proliferación celular mediante el secuestro selectivo y liberación controlada de diversas moléculas reguladoras (12), detección y reparación de daños al DNA (67), el control del envejecimiento celular, regulación de la actividad de la telomerasa y metabolismo de los telómeros (78), activación de la apoptosis celular mediante la regulación de proteínas onco-supresoras como pRb y p53, las cuales se concentran en el nucléolo (73), activación de vías de supervivencia tumoral y participación en la formación de telómeros (70), la biosíntesis de las partículas de reconocimiento de señal (SRP) y ensamblaje de algunos virus (79), (72), el control de vías de exportación nuclear, el procesamiento de pre-mRNA y RNAs no codificantes, modificaciones a snoRNPs y la coordinación de la respuesta celular al estrés (67). El nucléolo también participa en el mantenimiento de la homeostasis celular durante el estrés celular agudo, dado que la síntesis de rRNA es un proceso que consume altas cantidades de energía, la detención de la transcripción de los genes de rRNA es una forma efectiva de economizar energía (80).

Después de muchos años en los que se creía que el nucléolo tenía una función bien entendida y limitada a la biogénesis ribosomal, ahora varios resultados novedosos han apuntado a un amplio rango de actividades biológicas en el nucléolo, lo que las unifica es el involucramiento de RNA a varios niveles, usualmente en la biogénesis o ensamblaje de la maquinaria proteínica/RNA. Por lo tanto Shaw y Brown consideran que el nucléolo debería ser considerado como un centro de procesamiento de RNA en lugar de una mera fábrica de ribosomas (81).

La ultraestructura nucleolar en humanos es altamente dinámica, y este dinamismo está relacionado directamente con la función de este organelo. Una característica notable de los nucléolos es su capacidad para adaptar la morfología de sus componentes en respuesta a las necesidades celulares, estímulos, patologías, infecciones virales, estrés e incluso alteraciones en los mecanismos epigenéticos que afecten a la célula. Por este motivo el nucléolo es considerado un importante indicador del estado fisiológico de las células (12) y se ha postulado que la ultraestructura nucleolar puede ser utilizada como un marcador morfológico del estado celular bajo condiciones fisiológicas, patológicas o experimentales (13).

La ultraestructura nucleolar podría indicarnos si las células que se emplean o pretenden emplear en terapia celular periodontal tienen características normales y brindarnos información sobre su estado fisiológico antes de utilizarlas en la clínica.

## **6. Planteamiento del Problema**

La enfermedad periodontal afecta a una gran cantidad de la población a nivel mundial, se considera que es la principal causa de pérdida de órganos dentarios por lo que las consecuencias de padecer esta enfermedad tienen un impacto directo en la salud y autoestima muchas personas. Desafortunadamente las terapias existentes solo son capaces de remover el agente causal y detener la progresión de la enfermedad, pero no son capaces de regenerar los tejidos dañados o perdidos. La principal limitante ha sido la incapacidad de lograr la síntesis de nuevo cemento radicular para permitir la regeneración del aparato de inserción. Recientemente se ha explorado la posibilidad de utilizar terapia génica y/o celular para conseguir la regeneración periodontal, sin embargo una gran limitante ha sido encontrar células capaces de sintetizar cemento radicular, ya que los cementoblastos son células encontradas en muy bajo número y para obtenerlas con la finalidad de utilizarlas en terapia autóloga sería necesaria la extracción de un órgano dentario sano.

Se ha demostrado que los Fibroblastos Gingivales Humanos transfectados con CEMP1 presentan características de cementoblastos putativos, ya que modifican su fenotipo y expresan moléculas relacionadas al proceso de biomineralización. Esta línea celular tiene potencial para utilizarse en terapias periodontales.

## **7. Justificación**

Para poder utilizar una línea celular en una terapia periodontal autóloga es necesario contar con información sobre dos cuestiones fundamentales, su eficacia y su seguridad. En estudios previos ya se ha demostrado que la transfección de CEMP1 en HGF los transforma en cementoblastos putativos, sin embargo se carece de información al respecto de los cambios finos que sufren los HGF al ser transfectados. Para obtener información al respecto estudiamos la ultraestructura nucleolar antes y después de la transfección. El nucléolo es considerado un marcador morfológico del estado celular bajo condiciones fisiológicas, patológicas y experimentales, debido a que participa en varios procesos clave de regulación celular y cuenta con la característica de ser un organelo dinámico con la capacidad de que sus componentes se reorganicen en respuesta a los estímulos y necesidades de las células.

De este modo el análisis de la organización ultraestructural de los nucléolos en los fibroblastos gingivales antes y después de la transfección de CEMP1 brindará información valiosa con respecto al funcionamiento celular y a la seguridad y estabilidad de esta línea celular.

## **8. Hipótesis**

La transfección del gen codificante de la proteína CEMP1 puede inducir cambios en el arreglo nucleolar en fibroblastos gingivales humanos.

## **9. Objetivos**

### **A. Objetivo General**

Comparar la organización nucleolar de fibroblastos gingivales humanos antes y después de la transfección de CEMP1.

### **B. Objetivos Específicos**

- ◆ Caracterizar la organización nucleolar de los Fibroblastos Gingivales Humanos (HGF).
- ◆ Caracterizar la organización nucleolar de los Fibroblastos Gingivales Humanos transfectados con CEMP1 (HGF-CEMP1).
- ◆ Caracterizar la organización nucleolar de los Fibroblastos Gingivales Humanos transfectados con un vector vacío (HGF-VV).
- ◆ Caracterizar la organización nucleolar de los Cementoblastos Humanos (HCEM)
- ◆ Identificar ribonucleoproteínas en las líneas celulares de estudio mediante la técnica de contraste preferencial EDTA.
- ◆ Identificar DNA y su relación con el nucléolo en las líneas celulares de estudio mediante la técnica de contraste específico Amina de Osmio.

## **10. Metodología**

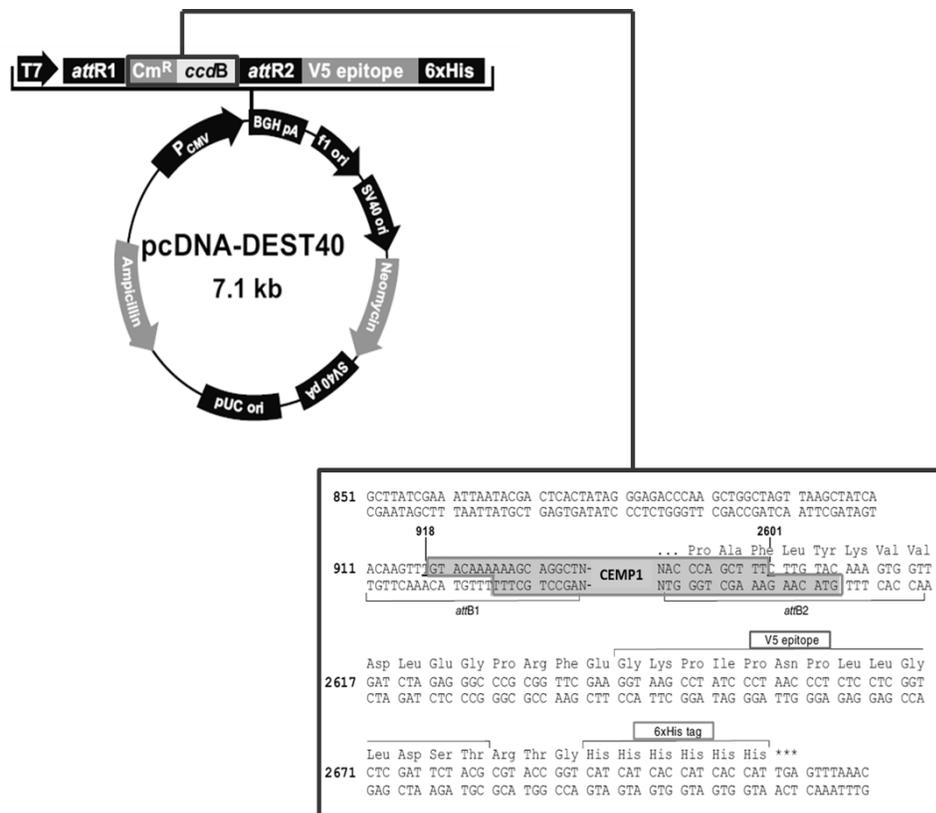
### **A. Cultivo Celular**

Los HGF y cementoblastos (CEM) se aislaron y crecieron como se describe por Narayanan y Page (82) y Arzate *et al* (19) respectivamente. Se utilizaron células de las cuatro líneas celulares entre el segundo y quinto pasaje para los experimentos. Las células se crecieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium por sus siglas en ingles) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % y medio mineralizante (10 % de FBS, 10 mM  $\beta$ -glicerofosfato y 50  $\mu$ g/ml ácido ascórbico recién preparado) por 14 días, en una atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de aire con humedad del 100 %. Los cultivos celulares se sincronizaron y procesaron de forma simultánea para evitar variaciones por tiempo de procesamiento y/o reactivos utilizados.

### **B. Construcción del vector de expresión pdDNA40-CEMP1 y su transfección en células HGF.**

La transfección con CEMP1 en fibroblastos gingivales se realizó como se describió previamente por Carmona-Rodríguez (10). Se clonó la región codificante del gen *CEMP1* (GenBank Accession No. NM\_001048212) en el vector pENTR/SD/D (Invitrogen, Carlsbad, CA). El DNA complementario (cDNA) de esta construcción pENTR/SD/D-CEMP1 se ligó al vector pcDNA40 (+) usando los sitios de restricción EcoR1 (Figura 6). 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 HGF transfectadas con el vector vacío (HGF-VV), 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. Después de este tiempo, los cultivos expandidos de HGF que expresaban CEMP1 de forma estable fueron mantenidas en medio DMEM suplementado de la forma descrita anteriormente.



**Figura 6.-** Vector utilizado para realizar la transfección del gen de CEMP1 en Fibroblastos Gingivales Humanos.

### **C. Procesamiento de Muestras (fijación e inclusión)**

Las células se tripsinizaron e inmediatamente se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % y paraformaldehído al 4 % durante cuatro horas, posteriormente se lavaron en tres ocasiones por 10 minutos con buffer de fosfato de sodio (PBS). La mitad de cada una de las muestras se postfijo con tetra-óxido de osmio en una dilución 1:1 de PBS durante 3 horas, mientras que la otra mitad continuó su procesamiento omitiendo este paso. Se lavaron las muestras en las mismas condiciones y se dio paso a la deshidratación en concentraciones ascendentes de etanol (30 %-100 %). Se utilizó óxido de propileno como agente intermediario en tres ocasiones por 5 minutos y se dio paso a la pre-inclusión en una solución de óxido de propileno-resina epóxica en una proporción 1:1 y se sellaron. Se dejaron por 48 hrs, posteriormente las muestras se destaparon para dar paso a la evaporación del óxido de propileno. Como paso final las muestras se incluyeron en resina Epon 812 pura y se colocaron en una estufa de calor seco a 60° C por 48 horas.

### **D. Tinción de cortes semifinos con azul de toluidina**

Los cortes semifinos de 250 nanómetros (nm) de cada una de las líneas celulares de estudio se colocaron en portaobjetos limpios y se adhirieron al vidrio mediante calor. Se colocó una gota del reactivo azul de toluidina y se calentó. Se lavaron con agua desionizada y se secaron. Estos cortes fueron observados mediante microscopia óptica con un microscopio Axiostar de Carl Zeiss y un objetivo de 40X y fotografiados con una cámara Nikon E-800.

## **E. Tinción de cortes ultrafinos con uranilo-plomo**

Se centrifugan los reactivos a 12 mil rpm por 10 minutos. Se coloca una película Parafilm sobre una caja Petri para cada reactivo con el fin de establecer la superficie de trabajo limpia. Se coloca un algodón con agua para humedecer cada una de las cajas Petri, en la que se va a llevar a cabo el contraste del citrato de plomo se colocan lentejas de hidróxido de sodio para evitar precipitaciones. Los cortes ultrafinos previamente colocados sobre una rejilla de cobre para TEM recubierta con Formvar se contrastan por inmersión en 40 microlitros ( $\mu$ l) de acetato de uranilo acuoso por 20 min, posteriormente se enjuagan abundantemente con agua desionizada por goteo y se secan con papel filtro. Se pasan a 40  $\mu$ l de citrato de plomo de la misma manera por inmersión durante 10 min. Se enjuagan y secan de la misma forma.

## **F. Detección de RNPs con el efecto regresivo del EDTA**

El contraste con EDTA se realizó siguiendo las mismas indicaciones generales que en el caso del contraste con uranilo-plomo. Los tiempos de contraste utilizados fueron de acetato de uranilo acuoso 3 min., EDTA 12 minutos y citrato de plomo 3 minutos. Se realizaron lavados y secados de las rejillas posteriores al contraste con cada uno de los reactivos como se describió anteriormente.

## **G. Identificación de DNA mediante Amina-Osmio**

Para esta técnica se utilizaron cortes con un grosor de 90-120 nm de grosor, los cortes se montaron en rejillas de oro sin membrana de soporte. Estas rejillas que contenían los cortes se colocaron en ácido clorhídrico 5 normal (HCl 5N) por inmersión durante una hora en una cámara húmeda y en refrigeración, posteriormente se lavaron cuidadosamente y se colocaron en la solución de amina de osmio por inmersión durante 24 horas. Finalmente se lavaron y secaron para examinarlas en el microscopio electrónico.

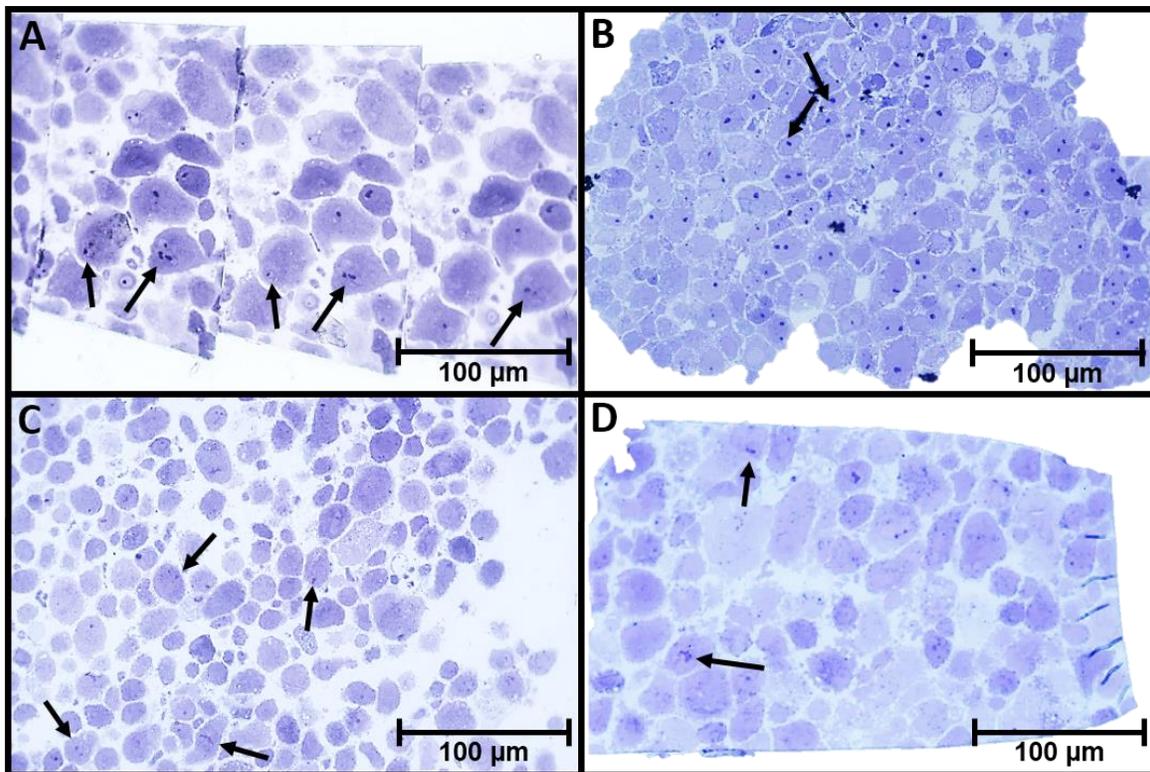
## **11. Resultados**

### **A. Microscopia Óptica**

El contraste de cortes semifinos con azul de toluidina nos permitió comprobar la integridad de las células procesadas, así como corroborar que el proceso de fijación de las muestras preservó su integridad estructural. Esta técnica de contraste nos permitió realizar una aproximación inicial a los nucléolos de las líneas celulares estudiadas. Mediante observaciones en el microscopio óptico se pudieron revisar características como el número de nucléolos por célula (de 1 a 4), la forma de estos nucléolos (redonda, piriforme, ovalada, alargada, irregular) así como su posición con respecto al núcleo (central, cerca de la envoltura nuclear, en contacto con la envoltura nuclear). Se revisaron 100 células, de cortes no consecutivos y de diferentes bloques de cada línea celular para documentar las características antes mencionadas.

En la figura 7 se muestran microfotografías de cortes semifinos teñidos con azul de toluidina en las cuales se puede comprobar que en las cuatro líneas celulares analizadas los nucléolos están presentes. En la tabla 1 se resume la información de las observaciones con microscopia óptica de las cuatro líneas celulares. En HGF se encontraron nucléolos con todas las formas determinadas, sin embargo la mayoría de los nucléolos tiene forma redondeada, con respecto a la posición nucleolar se encontró una distribución muy equitativa entre las tres categorías, el 57 % de estas células presento un nucléolo y el 32 % tuvo 2, en esta línea celular no se encontraron

cuatro nucléolos por célula. En las células transfectadas con CEMP1 al igual que en HGF, se encontraron nucléolos de todas las formas y la más común fue la redondeada, se encontraron nucléolos en las tres posiciones aunque los más comunes fueron los encontrados cerca de la envoltura nuclear y respecto al número la mayoría de HGF-CEMP1 presentó un nucléolo y tampoco en esta línea celular se encontraron células con cuatro nucléolos.



**Figura 7.-** Cortes semifinos de HGF (A), HGF-CEMP1 (B), HGF-VV (C) y CEM (D) teñidos con azul de toluidina. Nucléolos observados en todas las líneas celulares. Cortes seriados que muestran un nucléolo a varios niveles de corte (flechas) (A). Células con las características más encontradas en HGF-CEMP1 (flecha) (B), un nucléolo por célula, redondeado y cerca o en contacto con la envoltura nuclear. En C y D, las flechas muestran diferentes formas nucleolares encontradas.

	HGF	CEM	HGF-CEMP1	HGF-VV
	<b>FORMA</b>			
<b>REDONDO</b>	42.2 %	27.48 %	47.36 %	32.76 %
<b>PIRIFORME</b>	12.98 %	20.61 %	5.26 %	5.64 %
<b>OVALADO</b>	16.88 %	14.5 %	16.6 %	21.46 %
<b>IRREGULAR</b>	18.83 %	22.9 %	24.56 %	35.02 %
<b>ALARGADO</b>	9.09 %	14.5 %	6.14 %	5.08 %
	<b>POSICIÓN</b>			
<b>CENTRAL</b>	35.06 %	26.71 %	30.7 %	15.81 %
<b>CERCA ENV. NUC.</b>	32.46 %	48.85 %	45.61 %	49.15 %
<b>CONTACTO ENV. NUC.</b>	32.46 %	24.42 %	23.68 %	35.02 %
	<b>NÚMERO</b>			
<b>1</b>	57 %	72 %	87 %	46 %
<b>2</b>	32 %	26 %	12 %	37 %
<b>3</b>	11 %	1 %	1 %	11 %
<b>4</b>	0 %	1 %	0 %	6 %

**Tabla 1.-** Características nucleolares observadas mediante microscopía óptica.

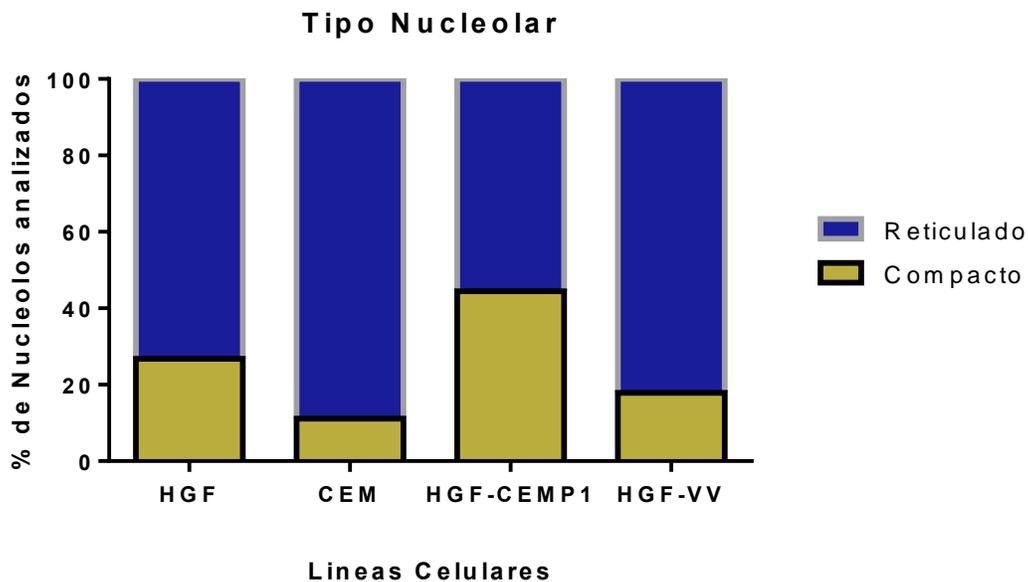
## **B. Microscopia Electrónica**

Para analizar la ultraestructura fina se utilizó microscopia electrónica de transmisión para obtener información a partir de microfotografías de hasta 120 000 aumentos, que permitieron revisar a detalle la ultraestructura nucleolar. Para hacer un análisis más completo, con información ultraestructural general, así como particular, sobre ciertas estructuras de interés biológico, usamos una variedad de técnicas de contraste; general (contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo) preferenciales, (contraste preferencial con EDTA para identificar RNPs) y específicas (contraste con amina-osmio para DNA). Se tomaron múltiples microfotografías de cada línea celular con cada técnica. La información del análisis de las microfotografías de microscopia electrónica se resume en la tabla 2.

La microscopia electrónica de transmisión permitió establecer a qué tipo de nucléolo presentaba cada célula de acuerdo a la clasificación ultraestructural de los nucléolos. En las cuatro líneas celulares solo se encontraron nucléolos de tipo reticulado y de tipo compacto, sin embargo cabe destacar el efecto de la transfección de CEMP1 en el incremento de porcentaje de nucléolos de tipo compacto con un incremento de 17.62 % al pasar de 26.82 % en HGF a 44.44 % en HGF-CEMP1 (grafica 1).

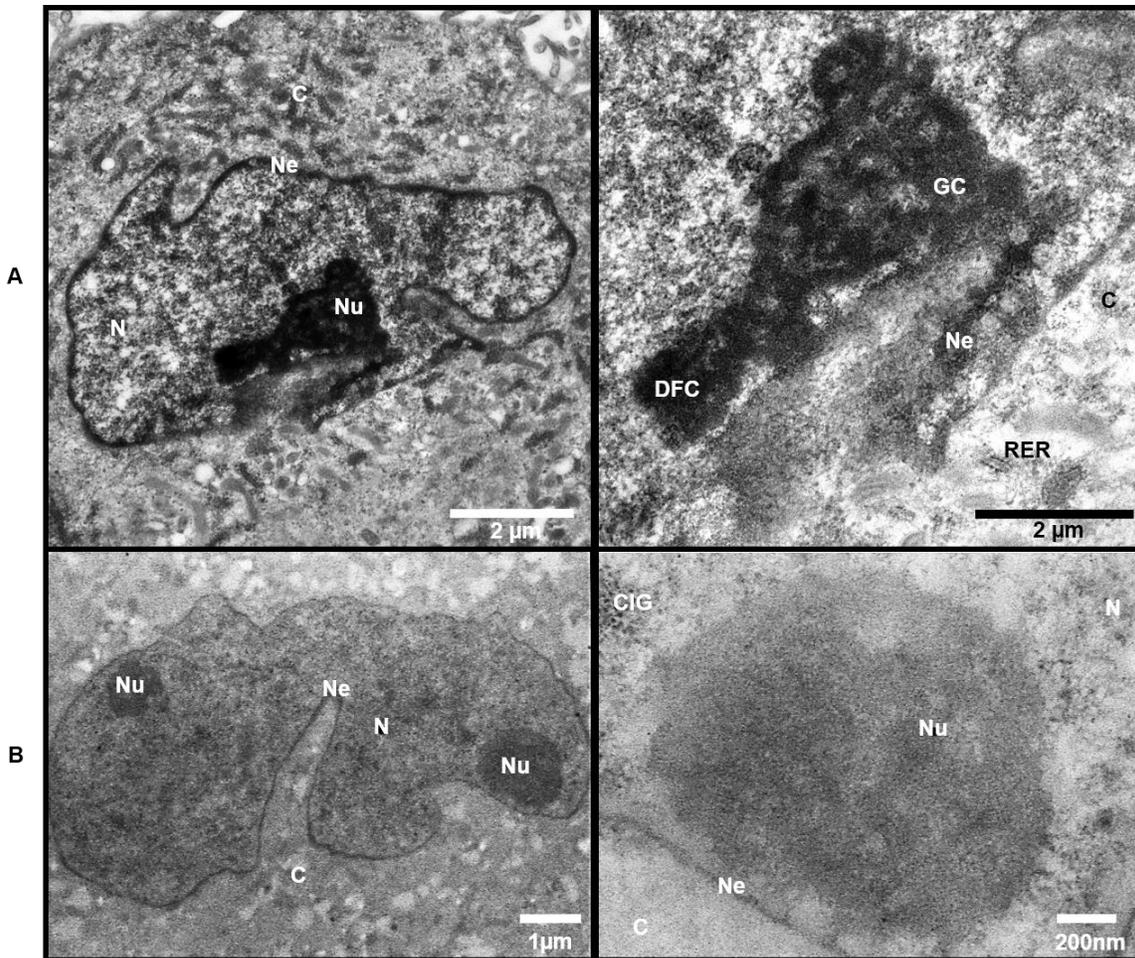
	HGF	CEM	HGF-CEMP1	HGF-VV
	<b>TIPO DE NUCLÉOLO</b>			
<b>RETICULADOS</b>	73.17 %	88.88 %	55.55 %	82.14 %
<b>COMPACTOS</b>	26.82 %	11.11 %	44.44 %	17.85 %
	<b>FORMA</b>			
<b>REDONDOS</b>	24.39 %	16.66 %	44.44 %	21.42 %
<b>PIRIFORMES</b>	9.75 %	2.77 %	3.70 %	0
<b>OVALADOS</b>	24.39 %	19.44 %	7.40 %	17.85 %
<b>IRREGULAR</b>	31.70 %	55.55 %	37.03 %	53.57 %
<b>ALARGADOS</b>	9.75 %	5.55 %	7.40 %	7.14 %
	<b>POSICIÓN</b>			
<b>CENTRAL</b>	58.53 %	52.77 %	44.44 %	42.85 %
<b>CERCA ENV. NUC.</b>	26.82 %	27.77 %	29.62 %	42.85 %
<b>EN CONTACTO ENV. NUC.</b>	14.63 %	19.44 %	25.92 %	14.28 %
	<b>NUMERO DE NUCLÉOLOS</b>			
<b>1</b>	70 %	73.07 %	96	71.42 %
<b>2</b>	23.33 %	15.38 %	0	23.80 %
<b>3</b>	6.66 %	7.69 %	4	4.76 %
<b>4</b>	0	3.84 %	0	0
	<b>PRESENCIA DE INTERSTICIOS</b>			
	19.51 %	44.44 %	66.66 %	28.57 %

**Tabla 2.-** Características nucleolares observadas mediante microscopia electrónica de transmisión.



**Grafica 1.-** Tipo nucleolar encontrado en todas las líneas celulares mediante microscopía electrónica de transmisión. Después de la transfección con CEMP1 el porcentaje de nucleolos de tipo compacto casi duplica al de los encontrados en HGF. Es destacable que este incremento convierte HGF-CEMP1 en la línea celular con el mayor porcentaje de nucleolos compactos de todas las líneas analizadas.

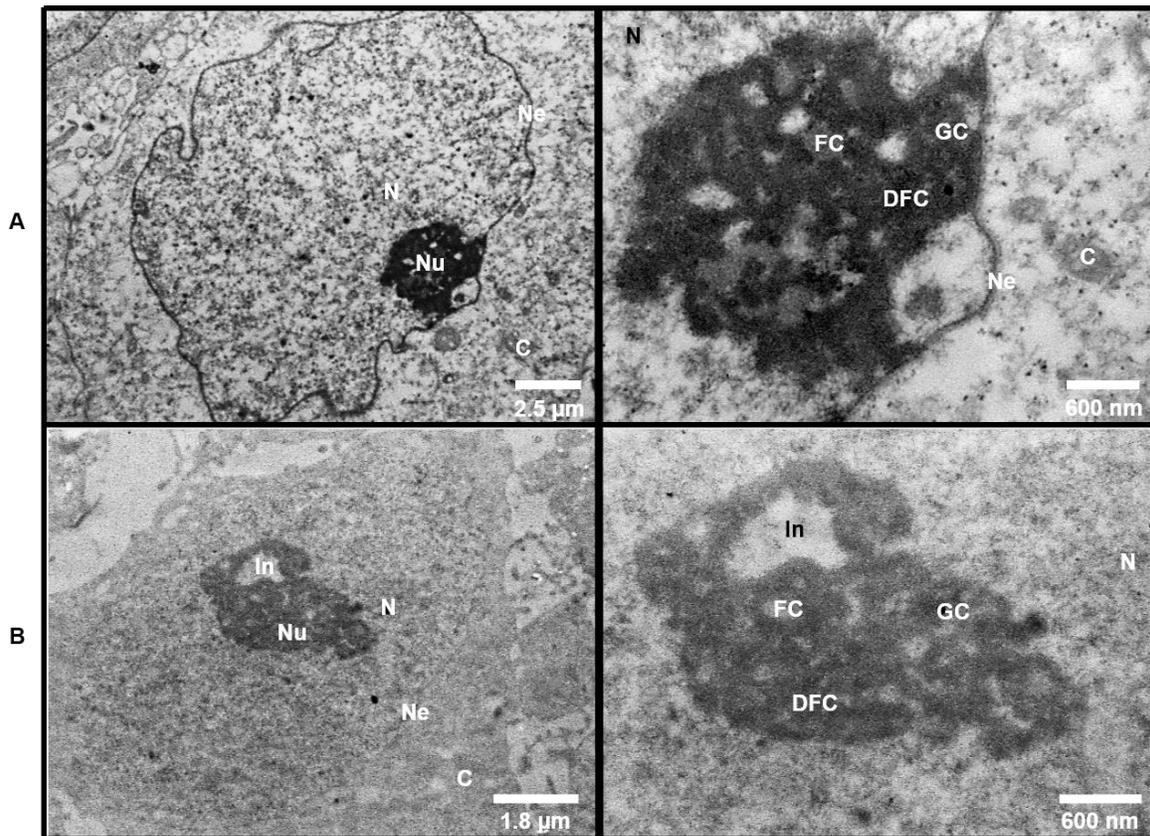
En la línea celular de HGF un 73.17 % de los nucleolos revisados presentaron nucleolo de tipo reticulado (figura 8), en cuanto a la forma de los nucleolos, esta línea celular mostro la distribución más homogénea entre las categorías revisadas. Con respecto a la localización cerca del 60 % de los nucleolos de esta línea celular están en contacto con la envoltura nuclear. En esta línea celular se encontró el menor porcentaje de nucleolos con algún intersticio. En el conteo de nucleolos por célula, en esta línea celular el 30 % mostraron 2 y 3 nucleolos, siendo la línea celular con mayor porcentaje de células con múltiples nucleolos.



**Figura 8.-** Microfotografías electrónicas de HGF contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo (A) y EDTA (B). Nucléolo de tipo reticulado en contacto con la envoltura nuclear (A). N Núcleo; Nu, Nucléolo; Ne, Envoltura Nuclear; C; Citoplasma, DFC, Componente Fibrilar Denso, GC; Componente Granular, RER; Retículo Endoplásmico Rugoso, CIG; Cúmulo de Gránulos Intercromatinianos.

La línea celular HGF-CEMP1, mostró características que la hacen destacar del resto de líneas estudiadas, la más significativa es el tipo de nucléolos que predomina, mostrando el mayor porcentaje de nucléolos de tipo compacto con un 44.44 % (grafica 1, figura 9 A), con respecto a la forma aquí predomina la redonda para los nucléolos, con respecto a la posición, a pesar de que casi la mitad de sus nucléolos están en contacto con la envoltura nuclear, fue la línea celular donde se encontraron

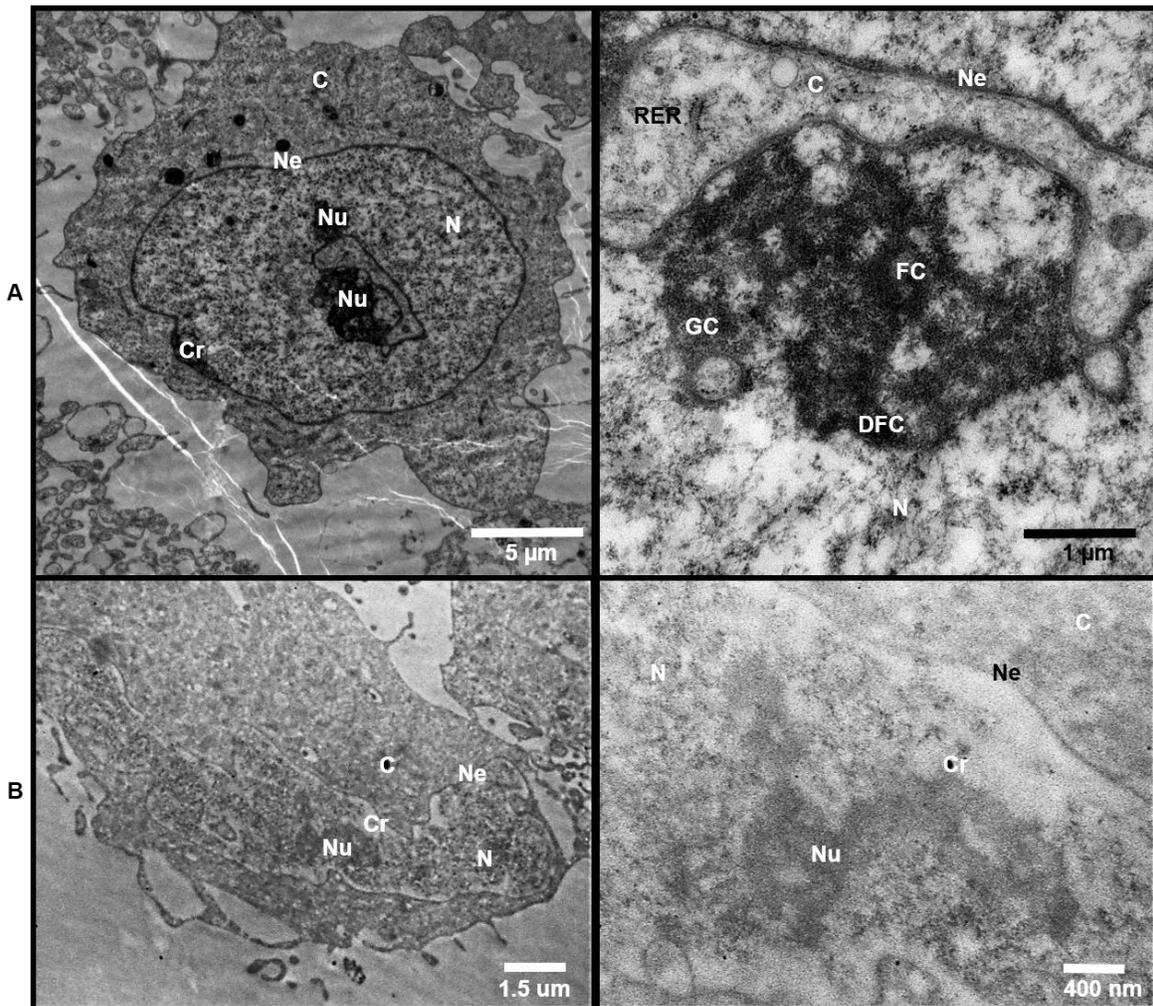
más nucléolos en posición central. Otra de las particularidades que distingue esta línea celular es la presencia de intersticios en sus nucléolos, con un 66.66 % de los nucléolos con al menos un intersticio (figura 9 B). En esta línea celular se encontró menos variabilidad en el número de nucléolos por célula con un 96 % de las células con un nucléolo.



**Figura 9.-** Microfotografías electrónicas de HGF-CEMP1 contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo (A) y EDTA (B). HGF-CEMP1 presenta nucléolos de tipo compacto con múltiples centros fibrilares (A) e intersticios (A y B). N; Núcleo, Nu; Nucléolo, Ne; Envoltura Nuclear, C; Citoplasma, FC; Centro Fibrilar, DFC; Componente Fibrilar Denso, GC; Componente Granular, In; Intersticio, C; Citoplasma.

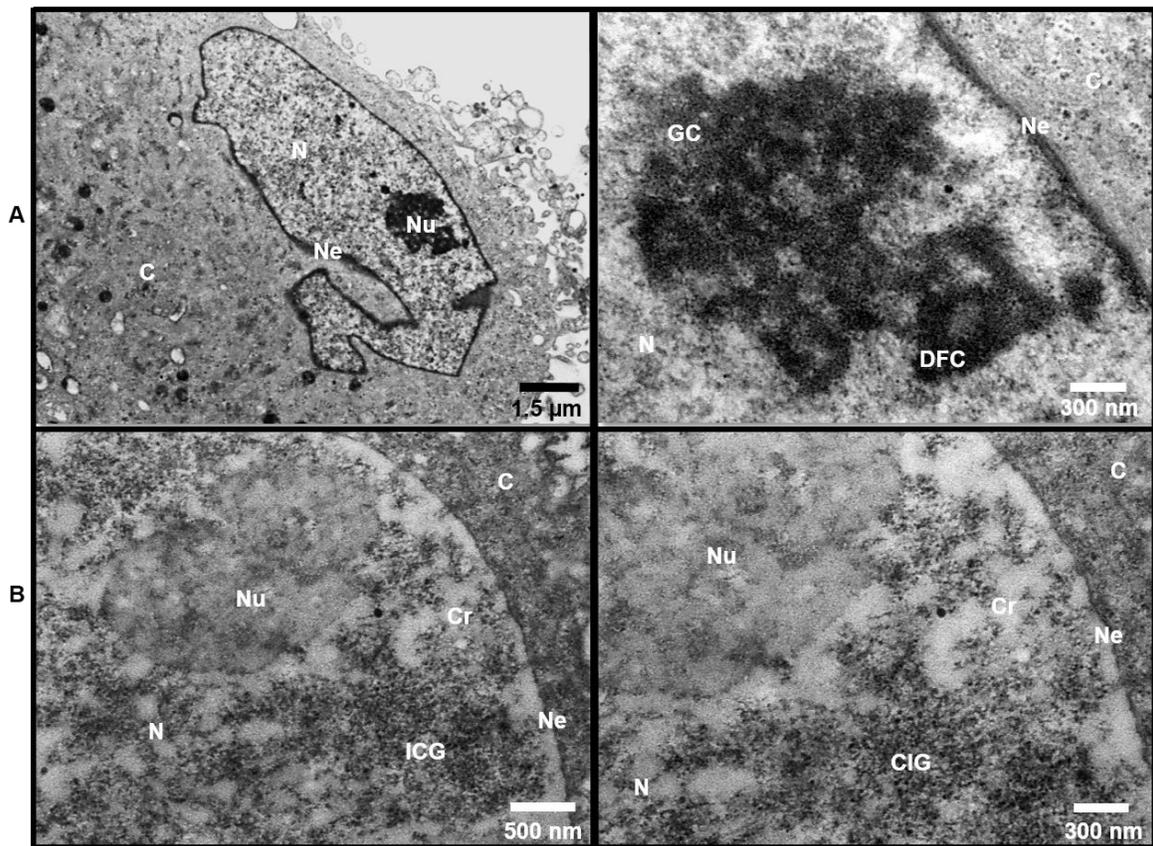
En CEM, como se muestra en la tabla 2, se encontró el mayor porcentaje de nucléolos de tipo reticulado con un 88.88 %, la mayoría de estos nucléolos son de

forma irregular, y más de la mitad están en contacto con la envoltura nuclear (figura 10 A), es también la segunda línea celular en presentar más intersticios en los nucléolos con un 44.44 %, en esta línea celular se encontró el mayor porcentaje de células con 3 nucléolos, y fue la única en presentar 4 nucléolos por célula, como se muestra en la tabla 2.



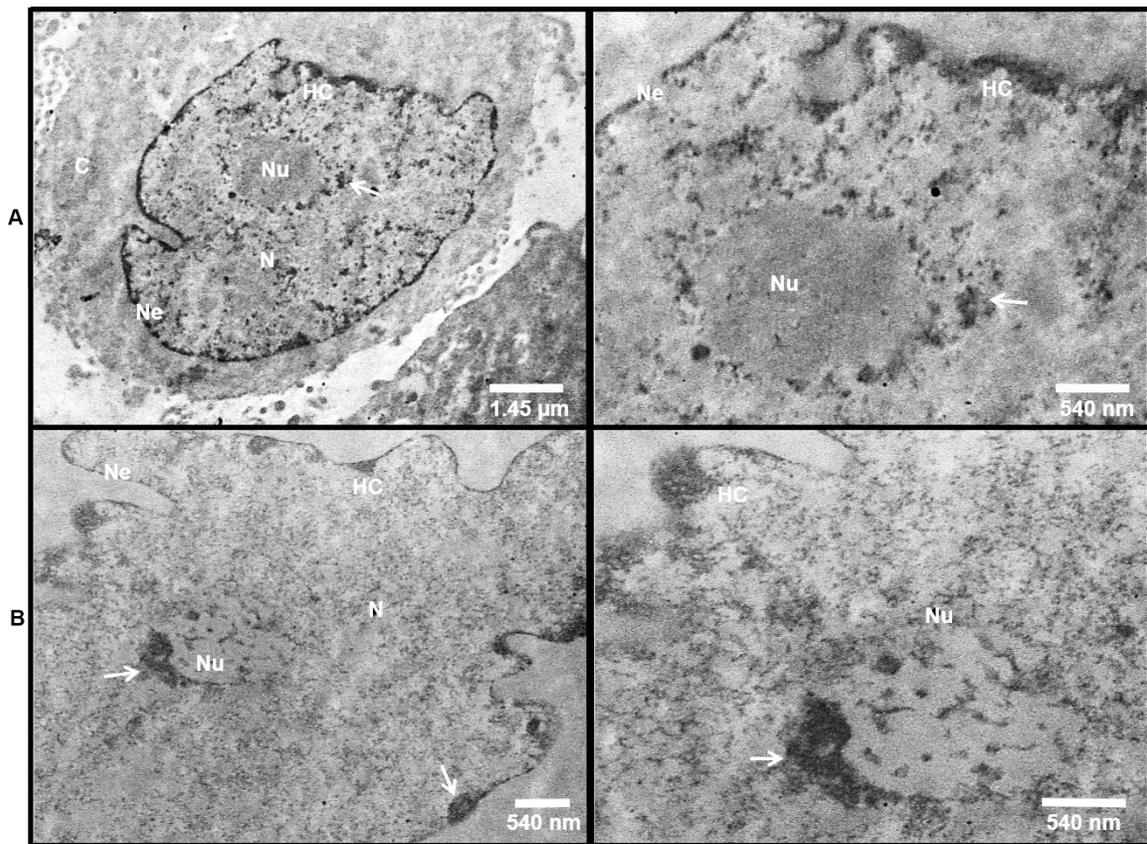
**Figura 10.-** Microfotografías electrónicas de CEM contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo (A) y EDTA (B). CEM presenta nucléolos de tipo reticulado en contacto con la envoltura nuclear. Los nucléolos presentan intersticios (A). N; Núcleo, Nu; Nucléolo, Ne; Envoltura Nuclear, C; Citoplasma, FC; Centro Fibrilar, DFC; Componente Fibrilar Denso, GC; Componente Granular, In; Intersticio, C; Citoplasma.

Al revisar la línea celular HGF-VV (Figura 11), encontramos que un gran porcentaje de los nucléolos revisados son de tipo reticulado (82.14 %), con respecto a la forma de estos nucléolos, como se muestra en la tabla 2, la mayoría presentan forma irregular (53.57 %), en cuanto a la posición de estos se encontraron porcentajes iguales de localización en contacto y cerca de la envoltura nuclear, siendo esta línea celular la única con esta característica.



**Figura 11.-** Microfotografías electrónicas de HGF-VV contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo (A) y EDTA (B). HGF-VV presenta nucléolos reticulados y con formas irregulares (A). N; Núcleo, Nu; Nucléolo, EN; Envoltura Nuclear, C; Citoplasma, CF; Centro Fibrilar, CFD; Componente Fibrilar Denso, CG; Componente Granular, CGI; Cúmulos de Gránulos Intercromatinianos, Cr; Cromatina, C; Citoplasma.

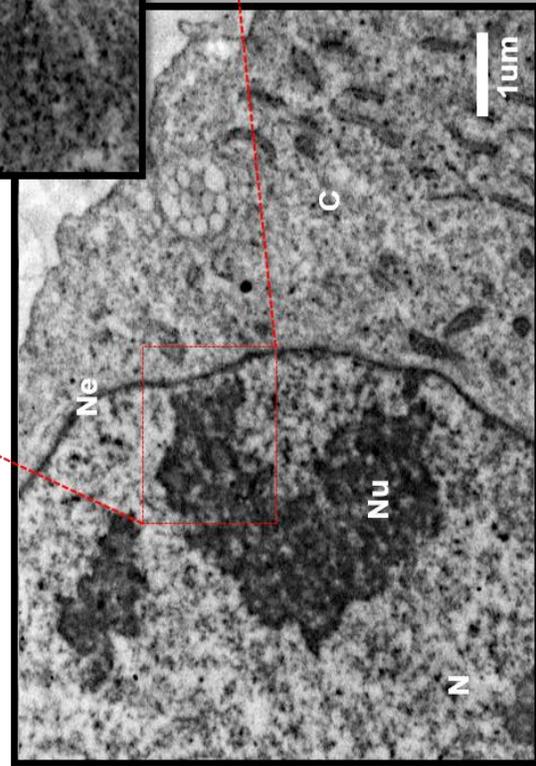
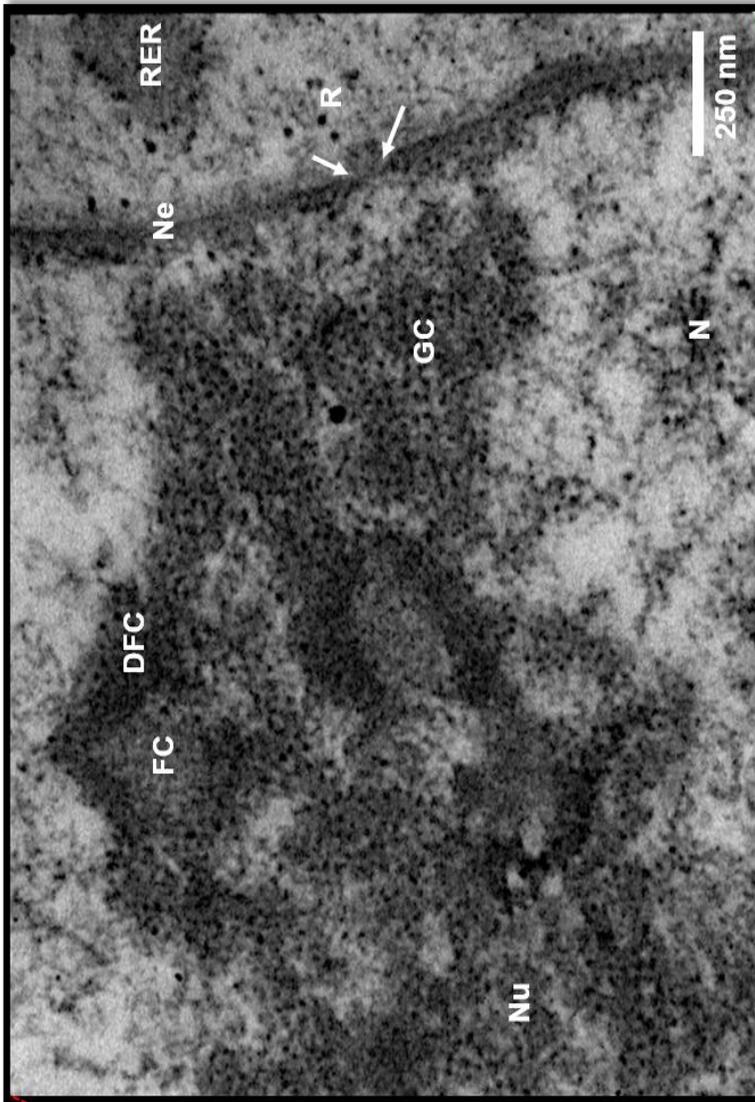
En la Figura 12 se muestran microfotografías HGF y HGF-CEMP1 contrastadas con la técnica de amina-osmio, donde se observa la interacción del DNA y los nucléolos, en ambas líneas celulares se observan grandes cantidades de cromatina compacta en la zona cercana a la envoltura nuclear y menores cantidades interactuando con el nucléolo en un arreglo perinucleolar. En HGF-CEMP1, se localizaron pequeñas fibras de cromatina compacta dentro del nucléolo, pero a pesar de esto, la cromatina compacta aún conserva la misma distribución que en HGF.



**Figura 12.-** Microfotografía electrónica de HGF (A) and HGF-CEMP1 (B) contrastadas con amina de osmio. Los nucléolos son negativos a la tinción. Cúmulos de Heterocromatina (HC) están distribuidos en la zona de la envoltura nuclear y alrededor del nucléolo (flechas).

En la Figura 13 se muestra un nucléolo de HGF-CEMP1 que presenta los 3 componentes estructurales que conforman a un nucléolo funcional en una adecuada organización. Con la evidencia ultraestructural que proporciona esta imagen se demuestra que la transfección de CEMP1 en los fibroblastos gingivales humanos no modifica la organización estructural de los componentes nucleolares, ya que el nucléolo fotografiado presenta FC, DFC y GC que por su acomodo estructural indican que pertenecen a un nucléolo capaz de realizar la síntesis de ribosomas de manera normal y carece de los acomodos ultraestructurales documentados en caso de alteraciones en el funcionamiento celular, estrés celular o tumorigenicidad. La interacción de los componentes ultraestructurales del nucléolo en cuestión es propia de un nucléolo que pertenece a una célula metabólicamente activa, capaz de llevar a cabo la síntesis de ribosomas. Incluso se puede comprobar la diferencia de tamaño entre los gránulos de la región granular y los ribosomas libres (fusión de las sub-unidades 40S y 60S) presentes en el citoplasma.

En esta imagen se muestra la localización del nucléolo en contacto con la envoltura nuclear en la cercanía de un poro nuclear y con retículo endoplásmico rugoso en el lado citoplasmático. Lo que permite observar al interaccion entre el nucleolo y el RER, el organelo citoplasmatico en el que los ribosomas llevan a cabo su funcion.



**Figura 13.-** Microfotografía electrónica de HGF-CEMP1 contrastada con acetato de uranio y citrato de plomo. Se muestra la biogénesis ribosomal en un nucléolo compacto con todos sus componentes ultraestructurales (FC, DFC, GC). El nucléolo está en contacto con la envoltura nuclear, en la cercanía de un poro nuclear y en el lado citoplasmático se observan ribosomas libres y el retículo endoplásmico rugoso. N; Núcleo, Nu; Nucléolo, Ne; Envoltura Nuclear, C; Citoplasma, FC; Centro Fibrilar, DFC; Componente Fibrilar Denso, GC; Componente Granular, C; Citoplasma, Flechas; Poro Nuclear.

## 12. Discusión.

En este estudio, se comprobó que la transfección de CEMP1 en HGF no produce cambios en el nucléolo. Se utilizó microscopía óptica y electrónica para analizar el nucléolo antes y después de la transfección. Con la finalidad de obtener información adicional, se utilizaron técnicas de contraste tales como la tinción estándar para TEM, tinción preferencial para RNPs y tinción de amina de osmio. Todas éstas con el fin de evaluar aspectos nucleolares como el arreglo ultraestructural, los componentes nucleolares y su interacción con el ADN. Después de la transfección de CEMP1 en HGF, los componentes nucleolares preservaron su organización e interacción. Esto sugiere que la función nucleolar de síntesis ribosomal se lleva a cabo correctamente, y más importante, que sus características ultraestructurales no son similares a aquellas encontradas en células con daño, estrés o desregulación de procesos celulares en los que el nucléolo participa.

Con la finalidad de usar la ultraestructura nucleolar como indicador fisiológico, es indispensable conocer la relación entre estructura y función dentro del nucléolo, así como la organización normal de sus componentes. Esto se requiere para discernir entre diferencias estructurales que podrían indicar alteraciones en algunos procesos celulares. La organización nucleolar está directamente relacionada la actividad de síntesis ribosomal (83). Los FCs son sitios de almacenamiento de proteínas, necesarios para la transcripción del DNA ribosomal (rDNA) por la RNAPol I. Los FCs

se encuentran rodeados por el DFC. La zona de transición entre estos dos componentes es donde se da la transcripción del rDNA. En el DFC se realiza el ensamble inicial de las subunidades ribosomales y contiene cadenas de rRNA asociadas con el templete de DNA. Estos pre-rRNA están relacionados con proteínas y RNA pequeños nucleolares (snoRNAs); mientras en el GC se pueden encontrar los complejos preribosomales que se han movido del sitio de síntesis de preRNA. Estos presentan diferentes estados de ensamble y maduración, ya que el GC actúa como compartimiento de almacenamiento hasta que la liberación de los complejos preribosomales son requeridos (84).

Varios autores han documentado cambios estructurales que ocurren en el nucléolo en respuesta a alteraciones en procesos celulares. Una de las principales características de las células de cáncer es la hipertrofia nucleolar (85) (68). Durante la apoptosis, se ha reportado que la segregación nucleolar lleva a la formación de acúmulos que contienen gránulos Intercromatinianos y pericromatinianos, así como fibras pericromatinianas (84). En el arresto transcripcional de ADNr dado por diferentes condiciones o inducido por bajas dosis de Actinomicina D, ocurre una segregación del nucléolo caracterizada por la separación de componentes nucleolares, los cuales permaneces superpuestos pero ya no entremezclados (86). En el caso de estrés celular causado por patógenos (en enfermedades cardiacas), se ha observado un incremento en el tamaño nucleolar con un mayor número de FCs y del DFC (87). Mientras que en el estrés celular causado por daño al DNA, ocurre una segregación de componentes nucleolares caracterizados por la

condensación y subsecuente separación del FC y GC y la formación de capuchas nucleolares alrededor del remanente nucleolar (88). Cuando se presentan alteraciones en los mecanismos epigenéticos que regulan la expresión de genes ribosomales, se manifiesta la segregación del GC y pérdida de FC y del DFC (89).

Estudios previos han también investigado cambios estructurales después de la transfección de genes. Por ejemplo, Batra et al, en 1991, transfectó el gen Muc1 en células pancreáticas. Su estudio se enfocó en cambios ultraestructurales en el citoplasma, encontrando un incremento en el retículo endoplásmico rugoso (RER) con la aparición de varios gránulos centrales de diferentes tamaños en el área del aparato de Golgi, relacionada con el incremento de la actividad secretora (90). Barbasian *et al*, en 1998, Usó el análisis de imagen nucleolar y nuclear para buscar cambios morfométricos en líneas celulares humanas epiteliales de mama transfectadas con un oncogén. En su estudio, los cambios nucleolares (área nucleolar/proporción área nuclear) se relacionaron al fenotipo tumorigénico (91). Sin embargo, ningún estudio previo que emplee ultraestructura nucleolar para determinar si los procesos celulares son afectados después de la transfección génica fue encontrado en la literatura.

Dado que la información provista por la ultraestructura nucleolar es muy valiosa, el análisis de los componentes nucleolares después de la transcripción de CEMP1 se vuelve muy relevante. Nosotros pudimos corroborar que los nucléolos de HGF-

CEMP1 presentan los tres componentes nucleolares (FCs, DFCs y GC) en una correlación correcta; indicando una capacidad total para la síntesis ribosomal y un funcionamiento celular adecuado. Ya que no se encontró ninguna de las modificaciones estructurales relacionadas con daño a DNA, estrés celular o alteraciones en los mecanismos nucleolares epigenéticos, se puede inferir que la transfección de CEMP1 no causa daño en las células HGF.

En algunas células, en particular las líneas celulares transformadas de mamíferos, líneas celulares derivadas de tumores y en especímenes de biopsias se ha reportado una estructura con forma de disco situada sobre el nucléolo, cubriendo una porción de su superficie como una “capa”. Esta estructura recibe el nombre de Compartimento Peri Nucleolar (PNC por sus siglas en ingles), se ha asociado la aparición de esta estructura con el inicio y progresión de tumores (12). Cabe destacar que esta estructura no se detectó en ninguno de los nucléolos analizados de las 4 líneas celulares, en la línea HGF-CEMP1 se puso especial atención en buscar PNC y no se encontró, por lo que podemos inferir que la transfección de CEMP1 en HGF no produce indicadores nucleolares ultraestructurales relacionados con tumorigenicidad inicial y en progresión.

Lograr la regeneración periodontal involucre muchos retos. Los más difíciles son la estimulación simultánea y coordinada para que se dé la formación de tejido mineralizado, fibroso y epitelial (6), la restauración de la altura del hueso alveolar a

la unión amelo cementaria, la regeneración de tejido conectivo gingival destruido por el proceso inflamatorio, la formación de nuevo cemento acelular en las superficies previamente expuestas, la síntesis de fibras de Sharpey y su inserción en el cemento radicular y el restablecimiento del sellado epitelial en la porción coronal de la raíz (92). Debido al grado de complejidad que representan estos hechos, es de esperarse que sean necesarias diversas moléculas y tipos celulares, además, es muy probable que se requiera la combinación de técnicas como la terapia celular y la regeneración tisular guiada. Finalmente, nuevos biomateriales que funcionen como andamios celulares serán importantes con el fin de encontrar la terapia que ofrezca los mejores resultados.

A la fecha se ha explorado diferentes aproximaciones buscando regeneración periodontal. Muchos se han enfocado en investigar el potencial de células madre posnatales derivadas del órgano dentario (93), células madre del ligamento periodontal (PDLSCs por sus siglas en inglés) (57) (94), células madre derivadas de pulpa dental (DPSCs por sus siglas en inglés) (95, 96), células madre derivadas de dientes deciduos exfoliados (SHED por sus siglas en inglés) (97), células madre derivadas del folículo dental (DFSCs por sus siglas en inglés) (98) (99) (100), células madre de la papila dental apical (DAPSCs por sus siglas en inglés) (101), y células madre derivadas del alveolo dental (DSSCs por sus siglas en inglés) (102). Además, se han usados células madre pluripotentes inducidas (iPS por sus siglas en inglés) (59) (103) (104) (105).

Generalmente, conforme las células se diferencian hacia distintos tipos celulares pierden potencial de desarrollo y consecuentemente la mayoría, si no todas, las células adultas no se pueden transdiferenciar (106). Parece ser que existen numerosos bloqueos epigenéticos que aseguran a las células en un tipo celular específico y limitan la capacidad celular de desdiferenciarse y transdiferenciarse (107).

Los factores de transcripción (TF) se han utilizado para forzar la conversión de un tipo celular a otro. Los primeros usos de TF para conducir la transdiferenciación fueron la transfección de *Myod1* (MyoD), para convertir células hacia mioblastos (108) y *Cebpa* y *Cebpb* para convertir células B en macrófagos (109). Sin embargo la demostración más dramática del poder de los TFs fue la conversión de fibroblastos hacia células madre embrionarias de ratón (mESCs) usando solo cuatro TFs: OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC (59). Desde este hallazgo, se han descubierto muchos otros protocolos de transdiferenciación (110), aunado al uso de moléculas pequeñas para convertir el tipo celular, por ejemplo la conversión de fibroblastos a neuronas (111) o fibroblastos a mESCs. (112). Intrigantemente muchas de las moléculas pequeñas usadas en esos protocolos directamente interfieren con el control epigenético, como DZNep (inhibidor de metilación), VPA (inhibidor de la histona deacetilasa), o Tranilcipromina (inhibidor de la histona desmetilasa y la monoaminoxidasa), indicando que el control epigenético es el mayor factor en la determinación del tipo celular (112). Dado el cambio fenotípico que produce CEMP1

en los HGF al ser transfectados, es probable que CEMP1 modifique el control epigenético de los fibroblastos.

La literatura sugiere que la aproximación más segura en la terapia celular es el trasplante autólogo. La aplicación clínica de fibroblastos autólogos en pacientes se ha llevado a cabo con excelentes resultados en el tratamiento de recesión gingival (113). Un estudio usando terapia con células autólogas en un modelo animal ha logrado regeneración periodontal (114), sin embargo, se requirió la extracción de dos órganos dentarios sanos para obtener las células necesarias, lo que considerablemente limita su aplicación en pacientes. Esta limitación podría ser evitada usando el modelo propuesto en este trabajo.

El modelo de HGF transfectadas con CEMP1 es prometedor porque en estudios previos con CEMP1 se ha demostrado su papel como regulador local de la diferenciación celular y de la mineralización de la matriz extracelular (23). CEMP1 tiene la habilidad de seleccionar células progenitoras presentes en el ligamento periodontal y diferenciarlas hacia fenotipo cementoblástico (14). Además, CEMP1 es capaz de seleccionar células madre multipotentes para diferenciarlas en varios tipos celulares (33). Asimismo, CEMP1 promueve la migración de células STRO1 positivas y provee un posible mecanismo para el reclutamiento de células mesénquimales a través de la migración hacia la señal de CEMP1 (34). HGF-CEMP1 podría ser usada en terapia celular autóloga, con la ventaja adicional que

para la obtención de tejido, no es necesario sacrificar órganos dentales sanos, porque una muestra de papila interdental podría proveer de una gran cantidad de células a través de un procedimiento simple y no invasivo para el paciente. Estas células podrían expandirse *in vitro* y transfectarse con CEMP1 para ser transformadas en cementoblastos putativos.

Sin embargo, se necesita más trabajo de investigación para llegar a la aplicación clínica de este modelo. Este estudio representa la aproximación inicial, pero se requiere aún información importante, como es la determinación del número óptimo de células necesarias para alcanzar la regeneración tisular y el establecimiento de un andamio adecuado que facilite la permanencia de las células en los defectos periodontales. Claramente, el siguiente paso podría ser probar su efectividad asociada en modelos animales con un seguimiento a largo plazo. Si estos resultados resultan positivos, podrían direccionarse posteriores estudios clínicos.

### **13. Conclusión**

La transfección de CEMP1 en HGF no produce cambios en la ultraestructura del nucléolo, lo que sugiere que la biogénesis ribosomal es llevada a cabo de la misma forma que en las células no transfectadas. Este aspecto debe ser tomado en cuenta para futuras aplicaciones en terapia celular autóloga.

## 14. Abreviaturas

CEMP1: Proteína Del Cemento 1.

HGF: Fibroblastos Gingivales Humanos.

HGF-CEMP1: Fibroblastos Gingivales Humanos transfectados con la Proteína del Cemento 1.

TEM: Microscopia Electrónica De Transmisión.

RNPs: Ribonucleoproteínas.

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético.

DNA: Ácido Desoxirribonucleico.

mm: milímetros.

kDa: Kilo Daltons.

DMP-1: Proteína de Matriz Dentinaria 1.

µm: micrómetro.

HERS: Vaina Epitelial De Hertwig.

CP: Proteína Derivada de Cementoblastoma.

Ca/P: Relación Calcio-Fosforo.

pb: pares de bases.

hrCEMP1: Proteína Recombinante Humana de CEMP1.

RNA: Ácido Ribonucleico.

mRNA: RNA Mensajero.

ALP: Fosfatasa Alcalina.

OCN: Osteocalcina.

BSP: Sialoproteína Ósea.

OPN: Osteopontina.

CAP: Proteína de Adhesión del Cemento Radicular.

RUNX2: Factor de Transcripción 2 Asociado a Runt

MEC: Matriz Extracelular.

BMP2: Proteína Morfogénica Ósea.

COL2A1: Colágena Tipo II.

ACAN: Agrecano.

STRO-1: Marcador 1 de Superficie de Células Estromales.

MAPK: siglas en ingles de Mitoge-Activated Protein Kinases

ERK-1: siglas en ingles de Extracellular Signal-Regulated Kinases 1

ERK-e: siglas en ingles de Extracellular signal-Regulated Kinases e

PTPLA/CAP: Proteína de Adhesión del Cemento Radicular.

NIH3T3: línea celular de Fibroblastos Embrionarios de Ratón.

EMD: Derivados de la Matriz del Esmalte.

PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.

BMP: Proteínas Morfogénicas Óseas.

iPS: Células Madre Pluripotentes Inducidas.

microRNA: Micro Acido Ribonucleicos.

3DP: Impresión Tridimensional.

FC: Centros Fibrilares.

DFC: Componente Fibrilar Denso.

GC: Componente Granular.

rRNA: RNA Ribosomal.

snoRNPs: Ribonucleoproteínas Pequeñas Nucleolares

rDNA: DNA Ribosomal.

pre-rRNA: pre-RNA Ribosomal.

RNA Pol I: RNA Polimerasa I.

NORs: Regiones Organizadoras Nucleolares.

UBF: Factores de Unión Rio Arriba.

SRP: Partículas de Reconocimiento de Señal.

DMEM: siglas en ingles de Dulbecco's Modified Eagle Medium.

FBS: Suero Fetal Bovino.

cDNA: Cadena Complementaria de DNA

CEM: Cementoblastos.

HGF-VV: Fibroblastos Gingivales Humanos Transfectados con el Vector Vacío.

PBS: Buffer de Fosfato de Sodio.

nm: nanómetros.

µl: microlitros.

HCl 5N: Ácido Clorhídrico 5 Normal.

PNC: Compartimento Peri Nucleolar.

RER: Retículo Endoplásmico Rugoso.

PDLSCs: Células Madre del Ligamento Periodontal.

DPSCs: Células Madre Derivadas de Pulpa Dental.

SHED: Células Madre Derivadas de Dientes Deciduos Exfoliados

DFSCs: Células Madre Derivadas Del Folículo Dental.

DAPSCs: Células Madre De La Papila Dental Apical.

DSSCs: Células Madre Derivadas Del Alveolo Dental.

TF: Factor de Transcripción.

mESCs: Células Madre Embrionarias De Ratón.

## 15. Referencias bibliográficas

1. Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res*. 2014;93(11):1045-53.
2. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005;366(9499):1809-20.
3. Caton J, Bostanci N, Remboutsika E, De Bari C, Mitsiadis TA. Future dentistry: cell therapy meets tooth and periodontal repair and regeneration. *J Cell Mol Med*. 2011;15(5):1054-65.
4. Rios HF, Lin Z, Oh B, Park CH, Giannobile WV. Cell- and gene-based therapeutic strategies for periodontal regenerative medicine. *J Periodontol*. 2011;82(9):1223-37.
5. Zeichner-David M. Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited. *Periodontol 2000*. 2006;41:196-217.
6. Magan A, Ripamonti U. Biological aspects of periodontal tissue regeneration: cementogenesis and the induction of Sharpey's fibres. *Sadj*. 2013;68(7):304-6, 8-12, 14 passim.
7. Arzate H, Zeichner-David M, Mercado-Celis G. Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontol 2000*. 2015;67(1):211-33.
8. Villarreal-Ramirez E, Moreno A, Mas-Oliva J, Chavez-Pacheco JL, Narayanan AS, Gil-Chavarria I, et al. Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): primary role in biomineralization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;384(1):49-54.
9. Romo-Arevalo E, Arzate H, Montoya-Ayala G, Rodriguez-Romero A. High-level expression and characterization of a glycosylated human cementum protein 1 with lectin activity. *FEBS Lett*. 2016;590(1):129-38.
10. Carmona-Rodriguez B, Alvarez-Perez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, Molina-Guarneros J, et al. Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;358(3):763-9.
11. Bermudez M, Imaz-Rosshandler I, Rangel-Escareno C, Zeichner-David M, Arzate H, Mercado-Celis GE. CEMP1 Induces Transformation in Human Gingival Fibroblasts. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127286.
12. Pederson T. The nucleolus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(3).
13. Smetana K. The nucleolus through the years. *Journal of Applied Biomedicine*. 2011;9(3):119-27.
14. Hassell TM. Tissues and cells of the periodontium. *Periodontol 2000*. 1993;3:9-38.
15. Cho MI, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol 2000*. 2000;24:9-27.
16. Mariotti A. The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues. *Periodontol 2000*. 1993;3:39-63.
17. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*. 2006;40:11-28.

18. Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol* 2000. 2006;40:29-49.
19. Arzate H, Alvarez-Perez MA, Aguilar-Mendoza ME, Alvarez-Fregoso O. Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells in vitro. *J Periodontal Res*. 1998;33(5):249-58.
20. Arzate H, Alvarez-Perez MA, Alvarez-Fregoso O, Wusterhaus-Chavez A, Reyes-Gasga J, Ximenez-Fyvie LA. Electron microscopy, micro-analysis, and X-ray diffraction characterization of the mineral-like tissue deposited by human cementum tumor-derived cells. *J Dent Res*. 2000;79(1):28-34.
21. Arzate H, Jimenez-Garcia LF, Alvarez-Perez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein. *J Dent Res*. 2002;81(8):541-6.
22. 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*. 1996;31(2):144-8.
23. Alvarez Perez MA, Pitaru S, Alvarez Fregoso O, Reyes Gasga J, Arzate H. Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line. *J Struct Biol*. 2003;143(1):1-13.
24. Alvarez-Perez MA, 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*. 2006;38(3):409-19.
25. Romo Arévalo E. Caracterización estructural de la proteína del cemento 1 (CEMP1) y su relación con la función biológica. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
26. Kemoun P, Laurencin-Dalicioux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Conte-Auriol F, 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*. 2007;329(2):283-94.
27. Romo-Arévalo E, Villarreal-Ramírez E, Chávez-Pacheco JL, Piña-Barba C, Aguilar-Franco M, Arzate H. In Vitro Effects of Cementum Protein 1 (CEMP1) on Calcium Phosphate Crystal Formation and its Role During the Mineralization Process. *MRS Online Proceedings Library*. 2009;1244:null-null.
28. Murakami Y, Kojima T, Nagasawa T, Kobayashi H, Ishikawa I. Novel isolation of alkaline phosphatase-positive subpopulation from periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol*. 2003;74(6):780-6.
29. Komaki M, Iwasaki K, Arzate H, Narayanan AS, Izumi Y, Morita I. Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *J Cell Physiol*. 2012;227(2):649-57.
30. Hoz L, Romo E, Zeichner-David M, Sanz M, Nunez J, Gaitan L, et al. Cementum protein 1 (CEMP1) induces differentiation by human periodontal ligament cells under three-dimensional culture conditions. *Cell Biol Int*. 36. England 2012. p. 129-36.
31. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. *Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules*. Bioessays. 1995;17(12):1039-48.
32. Dean DD, Lohmann CH, Sylvia VL, Cochran DL, Liu Y, Boyan BD, et al. Effect of porcine fetal enamel matrix derivative on chondrocyte proliferation, differentiation,

and local factor production is dependent on cell maturation state. *Cells Tissues Organs*. 171. Switzerland: 2002 S. Karger AG, Basel; 2002. p. 117-27.

33. Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S. Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2009;18(3):487-96.

34. Paula-Silva FW, Ghosh A, Arzate H, Kapila S, da Silva LA, Kapila YL. Calcium hydroxide promotes cementogenesis and induces cementoblastic differentiation of mesenchymal periodontal ligament cells in a CEMP1- and ERK-dependent manner. *Calcif Tissue Int*. 2010;87(2):144-57.

35. Serrano J, Romo E, Bermudez M, Narayanan AS, Zeichner-David M, Santos L, et al. Bone regeneration in rat cranium critical-size defects induced by Cementum Protein 1 (CEMP1). *PLoS One*. 2013;8(11):e78807.

36. Tonetti MS. Advances in periodontology. *Prim Dent Care*. 2000;7(4):149-52.

37. Larsson L. Current Concepts of Epigenetics and Its Role in Periodontitis. *Curr Oral Health Rep*. 2017;4(4):286-93.

38. Slots J. Periodontology: past, present, perspectives. *Periodontol 2000*. 2013;62(1):7-19.

39. Khan SA, Kong EF, Meiller TF, Jabra-Rizk MA. Periodontal Diseases: Bug Induced, Host Promoted. *PLoS Pathog*. 2015;11(7):e1004952.

40. Kuo LC, Polson AM, Kang T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. *Public Health*. 2008;122(4):417-33.

41. Weidlich P, Cimoës R, Pannuti CM, Oppermann RV. Association between periodontal diseases and systemic diseases. *Braz Oral Res*. 2008;22 Suppl 1:32-43.

42. Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Marzo G, Monaco A. Photodynamic therapy in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci*. 2013;28(2):669-82.

43. Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Monaco A. Efficacy of Er:YAG laser in the treatment of chronic periodontitis: systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci*. 2012;27(3):661-73.

44. Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Surgical and nonsurgical periodontal therapy. Learned and unlearned concepts. *Periodontol 2000*. 2013;62(1):218-31.

45. Bonito AJ, Lux L, Lohr KN. Impact of local adjuncts to scaling and root planing in periodontal disease therapy: a systematic review. *J Periodontol*. 2005;76(8):1227-36.

46. Hanes PJ, Purvis JP. Local anti-infective therapy: pharmacological agents. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003;8(1):79-98.

47. Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldan S. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2002;29 Suppl 3:136-59; discussion 60-2.

48. Quirynen M, Bollen CM, Vandekerckhove BN, Dekeyser C, Papaioannou W, Eysen H. Full- vs. partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections: short-term clinical and microbiological observations. *J Dent Res*. 1995;74(8):1459-67.

49. Larsson L, Decker AM, Nibali L, Pilipchuk SP, Berglundh T, Giannobile WV. Regenerative Medicine for Periodontal and Peri-implant Diseases. *Journal of Dental Research*. 2016;95(3):255-66.
50. Pilipchuk SP, Plonka AB, Monje A, Taut AD, Lanisdro A, Kang B, et al. Tissue Engineering for Bone Regeneration and Osseointegration in the Oral Cavity. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2015;31(4):317-38.
51. Hollister SJ. Scaffold design and manufacturing: from concept to clinic. *Adv Mater*. 2009;21(32-33):3330-42.
52. Webber MJ, Khan OF, Sydlik SA, Tang BC, Langer R. A perspective on the clinical translation of scaffolds for tissue engineering. *Ann Biomed Eng*. 2015;43(3):641-56.
53. Bartold PM, Gronthos S, Ivanovski S, Fisher A, Hutmacher DW. Tissue engineered periodontal products. *J Periodontal Res*. 2016;51(1):1-15.
54. Sam G, Pillai BR. Evolution of Barrier Membranes in Periodontal Regeneration-"Are the third Generation Membranes really here?". *J Clin Diagn Res*. 2014;8(12):Ze14-7.
55. Pilipchuk SP, Plonka AB, Monje A, Taut AD, Lanis A, Kang B, et al. Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity. *Dent Mater*. 2015;31(4):317-38.
56. Pagni G, Kaigler D, Rasperini G, Avila-Ortiz G, Bartel R, Giannobile WV. Bone repair cells for craniofacial regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(12):1310-9.
57. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;364(9429):149-55.
58. Kaukua N, Shahidi MK, Konstantinidou C, Dyachuk V, Kaucka M, Furlan A, et al. Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. *Nature*. 2014;513(7519):551-4.
59. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
60. Hong SG, Winkler T, Wu C, Guo V, Pittaluga S, Nicolae A, et al. Path to the clinic: assessment of iPSC-based cell therapies in vivo in a nonhuman primate model. *Cell Rep*. 2014;7(4):1298-309.
61. Lin Z, Rios HF, Cochran DL. Emerging regenerative approaches for periodontal reconstruction: a systematic review from the AAP Regeneration Workshop. *J Periodontol*. 2015;86(2 Suppl):S134-52.
62. Lu CH, Chang YH, Lin SY, Li KC, Hu YC. Recent progresses in gene delivery-based bone tissue engineering. *Biotechnol Adv*. 2013;31(8):1695-706.
63. Hobert O. Gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Science*. 2008;319(5871):1785-6.
64. Fang S, Deng Y, Gu P, Fan X. MicroRNAs regulate bone development and regeneration. *Int J Mol Sci*. 2015;16(4):8227-53.
65. Chia HN, Wu BM. Recent advances in 3D printing of biomaterials. *J Biol Eng*. 2015;9:4.
66. Obregon F, Vaquette C, Ivanovski S, Hutmacher DW, Bertassoni LE. Three-Dimensional Bioprinting for Regenerative Dentistry and Craniofacial Tissue Engineering. *J Dent Res*. 2015;94(9 Suppl):143s-52s.

67. Lam YW, Trinkle-Mulcahy L. New insights into nucleolar structure and function. *F1000Prime Rep.* 2015;7:48.
68. Farley KI, Surovtseva Y, Merkel J, Baserga SJ. Determinants of mammalian nucleolar architecture. *Chromosoma.* 2015;124(3):323-31.
69. Thiry M, Lamaye F, Lafontaine DL. The nucleolus: when 2 became 3. *Nucleus.* 2011;2(4):289-93.
70. Hernandez-Verdun D, Roussel P, Thiry M, Sirri V, Lafontaine DL. The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2010;1(3):415-31.
71. Hernandez-Verdun D. The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. *Histochem Cell Biol.* 2006;126(2):135-48.
72. Pederson T. *Molecular Biology.* Worcester, MA, USA: Elsevier Inc.; 2013. 324-7 p.
73. Shaw PJ. Nucleolus. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS):* John Wiley & Sons, Ltd: Chichester; 2010.
74. Schwarzacher HG, Wachtler F. The nucleolus. *Anat Embryol (Berl).* 1993;188(6):515-36.
75. Schwarzacher HG, Wachtler F. Nucleolus organizer regions and nucleoli. *Hum Genet.* 1983;63(2):89-99.
76. Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D. Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol.* 2008;129(1):13-31.
77. Bartova E, Horakova AH, Uhlirova R, Raska I, Galiova G, Orlova D, et al. Structure and epigenetics of nucleoli in comparison with non-nucleolar compartments. *J Histochem Cytochem.* 2010;58(5):391-403.
78. Pederson T. The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(17):3871-6.
79. Louvet E, Yoshida A, Kumeta M, Takeyasu K. Probing the stiffness of isolated nucleoli by atomic force microscopy. *Histochem Cell Biol.* 2014;141(4):365-81.
80. Grumt I. The nucleolus-guardian of cellular homeostasis and genome integrity. *Chromosoma.* 2013;122(6):487-97.
81. Shaw P, Brown J. Nucleoli: composition, function, and dynamics. *Plant Physiol.* 2012;158(1):44-51.
82. Narayanan AS, Page RC. Biochemical characterization of collagens synthesized by fibroblasts derived from normal and diseased human gingiva. *J Biol Chem.* 1976;251(18):5464-71.
83. Olson MO, Dundr M. Nucleolus: Structure and function. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. ; 2015
84. Biggiogera M, Bottone MG, Scovassi AI, Soldani C, Vecchio L, Pellicciari C. Rearrangement of nuclear ribonucleoprotein (RNP)-containing structures during apoptosis and transcriptional arrest. *Biol Cell.* 2004;96(8):603-15.
85. Derenzini M, Trere D, Pession A, Govoni M, Sirri V, Chieco P. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *J Pathol.* 2000;191(2):181-6.
86. Hernandez-Verdun D. Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem Cell Biol.* 2006;125(1-2):127-37.

87. Rosello-Lleti E, Rivera M, Cortes R, Azorin I, Sirera R, Martinez-Dolz L, et al. Influence of heart failure on nucleolar organization and protein expression in human hearts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;418(2):222-8.
88. Boulon S, Westman BJ, Hutten S, Boisvert FM, Lamond AI. The nucleolus under stress. *Mol Cell.* 2010;40(2):216-27.
89. Hernandez-Hernandez A, Soto-Reyes E, Ortiz R, Arriaga-Canon C, Echeverria-Martinez OM, Vazquez-Nin GH, et al. Changes of the nucleolus architecture in absence of the nuclear factor CTCF. *Cytogenet Genome Res.* 2012;136(2):89-96.
90. Batra SK, Kern HF, Worlock AJ, Metzgar RS, Hollingsworth MA. Transfection of the human Muc 1 mucin gene into a poorly differentiated human pancreatic tumor cell line, Panc1: integration, expression and ultrastructural changes. *J Cell Sci.* 1991;100 ( Pt 4):841-9.
91. Barbisan LF, Russo J, Mello ML. Nuclear and nucleolar image analysis of human breast epithelial cells transformed by benzo[a]pyrene and transfected with the c-Ha-ras oncogene. *Anal Cell Pathol.* 1998;16(4):193-9.
92. Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(6):474-84.
93. Bassir SH, Wisitrasameewong W, Raanan J, Ghaffarigarakani S, Chung J, Freire M, et al. Potential for Stem Cell-Based Periodontal Therapy. *J Cell Physiol.* 2016;231(1):50-61.
94. Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold PM, et al. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells.* 2008;26(4):1065-73.
95. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(25):13625-30.
96. Graziano A, d'Aquino R, Cusella-De Angelis MG, De Francesco F, Giordano A, Laino G, et al. Scaffold's surface geometry significantly affects human stem cell bone tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2008;214(1):166-72.
97. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(10):5807-12.
98. Yokoi T, Saito M, Kiyono T, Iseki S, Kosaka K, Nishida E, et al. Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. *Cell Tissue Res.* 2007;327(2):301-11.
99. Park JY, Jeon SH, Choung PH. Efficacy of periodontal stem cell transplantation in the treatment of advanced periodontitis. *Cell Transplant.* 2011;20(2):271-85.
100. Guo W, Chen L, Gong K, Ding B, Duan Y, Jin Y. Heterogeneous dental follicle cells and the regeneration of complex periodontal tissues. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(5-6):459-70.
101. Xu L, Tang L, Jin F, Liu XH, Yu JH, Wu JJ, et al. The apical region of developing tooth root constitutes a complex and maintains the ability to generate root and periodontium-like tissues. *J Periodontol Res.* 2009;44(2):275-82.

102. Nakajima R, Ono M, Hara ES, Oida Y, Shinkawa S, Pham HT, et al. Mesenchymal stem/progenitor cell isolation from tooth extraction sockets. *J Dent Res.* 2014;93(11):1133-40.
103. Duan X, Tu Q, Zhang J, Ye J, Sommer C, Mostoslavsky G, et al. Application of induced pluripotent stem (iPS) cells in periodontal tissue regeneration. *J Cell Physiol.* 2011;226(1):150-7.
104. Hynes K, Menicanin D, Han J, Marino V, Mrozik K, Gronthos S, et al. Mesenchymal stem cells from iPS cells facilitate periodontal regeneration. *J Dent Res.* 2013;92(9):833-9.
105. Yang H, Aprecio RM, Zhou X, Wang Q, Zhang W, Ding Y, et al. Therapeutic effect of TSG-6 engineered iPSC-derived MSCs on experimental periodontitis in rats: a pilot study. *PLoS One.* 2014;9(6):e100285.
106. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell.* 2004;116(5):639-48.
107. Sarig R, Tzahor E. The cancer paradigms of mammalian regeneration: can mammals regenerate as amphibians? *Carcinogenesis.* 2017;38(4):359-66.
108. Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Cheng PF, Weintraub H, Lassar AB. MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science.* 1988;242(4877):405-11.
109. Xie H, Ye M, Feng R, Graf T. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell.* 2004;117(5):663-76.
110. Xu J, Du Y, Deng H. Direct lineage reprogramming: strategies, mechanisms, and applications. *Cell Stem Cell.* 2015;16(2):119-34.
111. Li X, Zuo X, Jing J, Ma Y, Wang J, Liu D, et al. Small-Molecule-Driven Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Functional Neurons. *Cell Stem Cell.* 2015;17(2):195-203.
112. Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science.* 2013;341(6146):651-4.
113. Milinkovic I, Aleksic Z, Jankovic S, Popovic O, Bajic M, Cakic S, et al. Clinical application of autologous fibroblast cell culture in gingival recession treatment. *J Periodontal Res.* 2015;50(3):363-70.
114. Nunez J, Sanz-Blasco S, Vignoletti F, Munoz F, Arzate H, Villalobos C, et al. Periodontal regeneration following implantation of cementum and periodontal ligament-derived cells. *J Periodontal Res.* 2012;47(1):33-44.