



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---



## **FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

PROTEÍNA DEL CEMENTO 1 (CEMP1) COMO  
INDUCTOR DE FACTORES DE PLURIPOTENCIA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**C I R U J A N O   D E N T I S T A**

P R E S E N T A:

PAVEL COZEK JUÁREZ GONZÁLEZ

TUTOR: Dr. HIGINIO ARZATE

ASESORA: Mtra. SANTA RITA ARROYO CRUZ



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

Le agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Odontología por el privilegio de trabajar en sus instalaciones y con grandes docentes. Le doy un especial agradecimiento al laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados por proporcionarme los materiales y fundamentos para realizar el presente trabajo. Al Dr. Higinio Arzate por permitirme trabajar con él, en este proyecto.

Agradezco a la DGAPA por proporcionar los recursos para llevar a cabo este trabajo, con el proyecto DGAPA IN200717.





## **Dedicatorias**

Dedico principalmente a mi mamá, a mi papá y a mi hermano Olmo, que siempre han buscado la manera de apoyarme y estar siempre pendiente de mi superación personal. A mi novia, Sonia, por estar conmigo siempre y que sin su influencia este trabajo no hubiera sucedido. A mis, tías, primo(a)s y sobrinas, que siempre han estado dispuestos a ayudarme.

Le agradezco a toda la comunidad del Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos mineralizados: a la Dra. Lía por invitarme a trabajar al laboratorio y por sus consejos; a la Dra. Rita por sus enseñanzas, paciencia y por acompañarme en el proceso de esta tesis; a la Dra. Sonia y al Dr. Enrique por sus conocimientos y asesorías.

A mis amigos Jorge, Estefanía, Emmanuel, Gabriela, Claudia, Nora, Fernanda, Mónica, Vanessa, etc. Que estuvieron en diversos momentos de mi carrera y de mi vida.



## Tabla de contenido

<b>Abreviaciones.....</b>	<b>7</b>
<b>1. Resumen.....</b>	<b>10</b>
<b>2. Introducción.....</b>	<b>11</b>
<b>3. Antecedentes .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Periodonto .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2. Encía.....</b>	<b>16</b>
<b>3.3. Ligamento Periodontal.....</b>	<b>17</b>
<b>3.4. Hueso Alveolar .....</b>	<b>20</b>
<b>3.5. Cemento.....</b>	<b>22</b>
3.5.1. Cementoblastos:.....	23
3.5.2. Cementogénesis.....	24
<b>3.6. Proteínas del cemento .....</b>	<b>27</b>
3.6.1. Factor de Crecimiento Derivado del Cemento (CGF).....	27
3.6.2. Proteína de Adhesión del Cemento (PTPLA/CAP) .....	28
<b>3.7. CEMP-1.....</b>	<b>28</b>
<b>3.8. Células Troncales .....</b>	<b>31</b>
<b>3.8.1. Origen.....</b>	<b>32</b>
<b>3.8.2. Propiedades.....</b>	<b>33</b>
3.8.2.1. Auto-renovación: .....	33
3.8.2.2. Amplia capacidad proliferativa: .....	34
3.8.2.3. Potencial de diferenciación/plasticidad: .....	34
<b>3.9. Células Troncales Adultas.....</b>	<b>36</b>
3.9.1. MSCs (Células Troncales Mesenquimales) .....	37
3.9.2. BMSCs (Bone Marrow Stem Cells o Células Troncales de la Médula ósea) de los huesos orofaciales .....	38
3.9.3. Células troncales derivadas de los tejidos dentales .....	38
<b>3.10. Células troncales derivadas de la mucosa bucal .....</b>	<b>40</b>
<b>3.11. Factores de Pluripotencia .....</b>	<b>42</b>
3.11.1. Oct4(POU5F1): .....	43
3.11.2. Sox2: .....	44
3.11.3. NANOG .....	45
3.11.4. c-Myc.....	46
3.11.5. Klf4.....	47
3.11.6. SSEA4.....	48
<b>3.12. Marcadores Mesenquimales para Células Troncales.....</b>	<b>48</b>
3.12.1. Stro-1.....	49



3.12.2.	CD73 (ecto-5'-nucleotidasa):	49
3.12.3.	CD90(Thy-1):	50
3.12.4.	CD105(Endoglina):	50
3.12.5.	CD34:	51
3.12.6.	CD45:	51
3.12.7.	HLA-DR:	51
<b>3.13.</b>	<b>Factores Asociados a Mineralización</b>	<b>53</b>
3.13.1.	BSP (Sialoproteína Ósea)	53
3.13.2.	OPN (Osteopontina)	53
<b>3.14.</b>	<b>Factor Asociado a Cartílago</b>	<b>54</b>
3.14.1.	Colágena tipo II	54
<b>3.15.</b>	<b>Factor Asociado a tejido adiposo</b>	<b>54</b>
3.15.1.	LPL(Lipoproteína Lipasa)	54
<b>3.16.</b>	<b>Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)</b>	<b>55</b>
<b>4.</b>	<b>Planteamiento del Problema</b>	<b>56</b>
<b>5.</b>	<b>Justificación</b>	<b>56</b>
<b>6.</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>56</b>
<b>7.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>57</b>
7.1.	Generales	57
7.2.	Específicos	57
<b>8.</b>	<b>Metodología</b>	<b>58</b>
8.1.	Cultivo Celular:	58
8.2.	Aislamiento/Construcción de pcDNA40-CEMP1 que expresa el vector y la transfección en fibroblastos humanos derivados de la encía:	58
8.3.	Western Blot:	59
8.3.1.	Preparación de las Proteínas.	59
8.3.2.	Preparación del Gel.	60
8.3.3.	Electroforesis.	61
8.3.4.	Transferencia:	62
<b>8.4.</b>	<b>Análisis Estadístico</b>	<b>64</b>
<b>9.</b>	<b>Resultados</b>	<b>65</b>
9.1.1.	CEMP1 promueve la expresión de genes pluripotencia.	65
9.1.2.	CEMP1 induce el aumento en la expresión de factores de mineralización.	67
9.1.3.	CEMP1 regula la expresión relativa de factores asociados a cartílago y tejido adiposo.	69
<b>10.</b>	<b>Discusión</b>	<b>71</b>
<b>11.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>76</b>



<b>12.</b>	<b><i>Índice de Figuras.....</i></b>	<b>78</b>
<b>13.</b>	<b><i>Índice de Tablas .....</i></b>	<b>79</b>
<b>14.</b>	<b><i>Índice de Gráficas .....</i></b>	<b>79</b>
<b>15.</b>	<b><i>Referencias .....</i></b>	<b>80</b>



## Abreviaciones

**ALP** - Alkaline phosphatase, (Fosfatasa Alcalina).

**APS** - Ammonium Persulfate, (Persulfato de Amonio).

**BMSCs** - Bone Marrow derived Stem cell's, (Células troncales derivadas de la médula ósea).

**BSP** - Bone Sialoprotein, (Sialoproteína Ósea).

**CAP** - Cementum Attachment Protein, (Proteína de Adhesión al Cemento Radicular).

**CEMP1** - Cementum Protein 1, (Proteína del Cemento 1).

**CD105** - Cluster of Differentiation 105. Endogline, (Endogline).

**CD14** - Cluster of Differentiation 14. Cell Surface Glycoprotein anchored to GPI, (Glicoproteína de Membrana anclada por GPI).

**CD146** - Cluster of Differentiation 146. MCAM, Melanoma Cell Adhesion Molecule; (Molécula de adhesión celular de melanoma).

**CD271** - Cluster of Differentiation 271. P75 Neurotrophin receptor, (Receptor de neurotrofina).

**CD34** - Cluster of Differentiation 34. Hematopoietic Progenitor Cell Antigen, (Antígeno de células progenitoras hematopoyéticas).

**CD45** - Cluster of Differentiation 45. Leucocyte Common Antigen, (Antígeno común leucocitario).

**CD73** - Cluster of Differentiation 73. Ecto 5' nucleotidase, (ecto-5'-nucleotidasa).

**CD79a** - Cluster of Differentiation 79a. B-cell antigen receptor complex-associated protein alpha chain and MB-1, (Complejo de Receptor de Antígeno de células B asociado a proteína de cadena alfa y MB-1).

**CD90** - Cluster of Differentiation 90. Thymus cell antigen 1, (Antígeno de células del timo).

**CGF** - Cementum derived growth factor, (Factor de crecimiento derivado del cemento).

**c-Myc** - Cancer-myelocytomatosis.

**Col. II** - Colágena tipo II

**CSD** - Cold Shock domain, (Dominio de choque frío)

**DAB** - Diaminobencidina.

**DMP-1** - Dentin matrix protein, (Proteína de la matriz dentinaria-1).

**DMEM** - Dulbecco's Modified Eagle Medium.





**DPSCs** - Dental Pulp stem cells, (Células troncales derivados de la pulpa dental).

**EDTA** - Ethylenediaminetetraacetic acid, (Ácido Etilendiaminotetraacético).

**EGF** - Epidermal Growth Factor, (Factor de crecimiento epidérmico).

**ESC** - Embryonic Stem Cells, (Células Troncales embrionarias).

**FBS**- Fetal Bovine Serum, (Suero Fetal Bovino).

**GAPDH** - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa)

**GMSCs** - Gingiva-derived Mesenchymal Stem Cells, (Células Troncales Mesenquimales derivadas de la encía humana).

**HLA-DR** - Histocompatibility complex, class II, (Complejo mayor de histocompatibilidad clase II).

**HGF** - Human Gingival Fibroblasts, (Fibroblastos Gingivales Humanos).

**HPLC** - Human Periodontal ligament Cells, (Células derivadas del ligamento periodontal humano).

**HSPC** - Hematopoietic Stem and Progenitor Cells, (Células troncales progenitoras hematopoyéticas).

**HrCEMP1** - Recombinant Human Cementum Protein 1, (Proteína Recombinante Humana de CEMP1).

**ICM** - Inner Cell Mass, (Masa Celular interna)

**JNK-MAPK** - c-Jun N-terminal Kinase, (Quinasas c-Jun N-terminal); Mitogen activated protein kinases, (Proteínas quinasas activadas por mitógeno).

**Klf4** - Gut-enriched Krüppel-like factor.

**kDa** - Kilodaltons.

**LPL** - Lipoprotein Lipase, (lipoproteína Lipasa).

**MSCs** - Mesenchymal Stem Cells, (Células Troncales Mesenquimales).

**MO** - Microscopio Óptico.

**NANOG** - Inspirado en la Historia de la tierra de Tír Na Nog.

**Oct4** Octamer-binding transcription factor 4, (Factor de transcripción de unión al octámero 4).

**OMSCs** - Oral Mucosa Stem Cells, (Células troncales de la mucosa oral)

**OPN Osteopontin**, (Osteopontina).

**p-38** Phospho-p38 MAP kinase, (fosfo-p38 MAP quinasa).



**PBS** - Phosphate-buffered saline, (Tampón Fosfato Salino).

**PDLF** - Periodontal Ligament Fibroblasts, (Fibroblasto del ligamento periodontal).

**PDLSCs** - Periodontal Ligament Stem Cells, (Células troncales del ligamento periodontal).

**PTHrP** - Parathyroid hormone-related protein, (Proteína relacionada con la paratohormona).

**PTPLA** - Protein Tyrosine phosphatases like protein A, (proteína tirosina fosfatasa parecida a la proteína A).

**PVDF** - Polyvinylidene difluoride, (Polifluoruro de vinilideno).

**RER** - Retículo Endoplásmico Rugoso.

**SC** - Stem Cell, (Célula troncal).

**SCAP** - Stem cells from the apical papilla, (Células troncales de la papila apical).

**SDS** - Sodium dodecyl sulfate, (Dodecilsulfato sódico).

**SHED** - Stem cells from human exfoliated deciduous teeth, (células troncales de dientes deciduos humanos exfoliados).

**Sox2** - Sex determining Region Y-box 2, (Región determinante de sexo Y-box 2).

**SRY-box2** - Sex determining region Y boxes , (Cajas Y de region determinante del sexo);

**SSEA4** - Stage Specific Embryonic Antigen, (Antígeno específico del estadio embrionario 4).

**TBS** - Tris Buffered Saline, (Solución Salina con Tris).

**TBST** - Tris Buffered Saline-Tween, (Solución Salina con Tris y Tween - polisorbato).

**TEMED** - Tetramethylethylenediamine (Tetrametiletildiamina).

**TGF- $\beta$**  - Transforming Growth Factor beta, (Factor de Crecimiento transformante  $\beta$ ).

**TGPCs** - Tooth germ progenitor cells, (Células progenitoras de germen dental).

**Thy-1** - Thymus cell antigen 1, (Antígeno de células del timo 1).

**Tris-HCL** - Tris Hydroxymethyl aminomethane hydrochloride, (Hidroximetil aminometano Hidroclorado).



## 1. Resumen

El cemento radicular, es un tejido conectivo mineralizado que no contiene irrigación sanguínea, inervación ni sistema linfático y a diferencia del hueso no sufre procesos de remodelación fisiológicos como son; aposición y resorción, sino que se deposita continuamente a través de toda la vida. <sup>(1)</sup> La proteína del cemento 1 es un factor clave en el proceso de biomineralización, ya que promueve la adhesión, proliferación y diferenciación celular, además regula el depósito, composición y morfología de cristales de fosfato octacálcico, el cual es un precursor de la hidroxiapatita. <sup>(2)</sup> En este estudio se buscó determinar, si una población heterogénea de fibroblastos derivados de la encía humana transfectados con el gen que codifica para la proteína del cemento1 (CEMP1), adquieren propiedades de células troncales como lo son clonogenicidad, plasticidad, autorreplicación y si expresan moléculas asociadas a pluripotencia, y a los fenotipos de tejido mineralizado, tejido adiposo y cartílago. <sup>(3)</sup> Los fibroblastos gingivales derivados de la encía humana se obtuvieron por medio del método de explante, el plásmido pcDNA40-CEMP1 fue transfectado en HGF (HGF/CEMP1) usando Lipofectamina 2000. El lisado celular se obtuvo con amortiguador de lisis frío, la cuantificación de proteínas se realizó por método de Bradford. Posteriormente se hizo la electroforesis, la transferencia y se colocaron los anticuerpos primarios policlonales anti- OCT4, NANOG, SOX2, BSP, OPN, SSEA4, Colágena tipo II y LPL. Se usó GAPDH como producto génico constitutivo y la expresión de los productos génicos de este estudio se compararon contra la expresión de éste. El análisis estadístico se realizó por medio de la prueba estadística T de student y ANOVA utilizando el software GraphPad, En conclusión, se demostró que CEMP1 promueve la expresión de genes de pluripotencia, como Oct4, NANOG, Sox2 y SSEA4, induce el aumento en la expresión de factores de mineralización como BSP. OPN, PTPLA/CAP, regula la expresión relativa de factores asociados a cartílago como COL. II y tejido adiposo (LPL), regula negativamente la expresión de un reconocido oncogén (c-Myc) y podría ser capaz de prevenir el crecimiento tumoral.



## 2. Introducción

El periodonto es una unidad funcional, la cual está conformada por dos tejidos mineralizados (cemento radicular y hueso alveolar) y por dos tejidos conectivos blandos (el ligamento periodontal y la encía), los cuáles le dan soporte al órgano dental. <sup>(2)</sup>

El cemento radicular cubre la superficie radicular de los órganos dentarios y las células que depositan este tejido (cementoblastos) son derivadas del ectomesénquima; (saco o folículo dental) que rodea al germen dentario. Es formado por cementoblastos, que se encuentran adosados a la superficie del cemento, próximos al ligamento periodontal y por cementocitos, que son cementoblastos embebidos en la matriz calcificada que ellos mismos secretan. <sup>(1)</sup>

El cemento radicular contiene propiedades biológicas únicas ya que contiene dos proteínas que son cemento-específicas: la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento radicular (PTPLA/CAP) las cuales se han localizado y expresado en poblaciones celulares del ligamento periodontal, cementoblastos y células de espacios endosteales y células troncales mesenquimales localizadas perivascularmente en el ligamento periodontal. <sup>(2)</sup>

Estudios *in vivo* han demostrado que la proteína recombinante humana CEMP-1 (hrCEMP-1) promueve la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico en calvarias de ratas, lo que sugiere que es un factor con propiedades osteogénicas ya que juega un papel primordial durante el proceso de mineralización, así como en la regeneración de tejidos mineralizados. <sup>(4) (5)</sup>

Las evidencias experimentales demuestran que el hrCEMP-1 estimula la proliferación y migración de células derivadas del ligamento periodontal humano (HPLC) y se coexpresa con STRO1 en células troncales mesenquimales del



periodonto humano (antígeno de superficie celular característico de las células progenitoras mesenquimales presentes en la médula ósea, su nombre consiste de STRO, que se relaciona con mesénquima y “1”, que significa que fue el primer anticuerpo monoclonal identificado en células troncales mesenquimales).<sup>(6)</sup> Lo que sugiere que esta proteína está relacionada con el mecanismo de diferenciación de las células de localización perivascular en el ligamento periodontal.<sup>(7)</sup>

Asimismo, en otros estudios se demostró que la transfección del gen que codifica para CEMP1 en fibroblastos gingivales humanos, regula la expresión de moléculas asociadas a tejidos mineralizados, como lo son: osteopontina (OPN), sialoproteína ósea (BSP) y la fosfatasa alcalina (ALP).<sup>(8)</sup>

Estos hallazgos permiten establecer el potencial biológico y terapéutico de esta molécula, al estimular el proceso de regeneración tisular mediante células troncales. Además de estar involucrado en diversas vías de señalización (modulación de la expresión de genes) y ser mediador de procesos biológicos como en el ciclo celular del periodonto.<sup>(7)</sup>

La ingeniería tisular es considerada una nueva frontera en cuanto a la regeneración de tejidos y órganos dentales perdidos debido a patologías, principalmente la enfermedad periodontal. Asimismo, el auge de las células troncales ha constituido las bases para el desarrollo de la terapia celular y la medicina regenerativa, lo que permite establecer nuevas vías para la regeneración de las estructuras del periodonto.<sup>(9)</sup>

En 2009, Zhang *et al.*, fueron los primeros en caracterizar a las células troncales mesenquimales derivadas de la encía humana (Human Gingiva-derived MSCs o GMSCs), las cuales exhiben las características de clonogenicidad, autorenovación y capacidad de diferenciación hacia tejido mineralizado, cartílago y tejido adiposo, similar a las células troncales derivadas de la médula ósea (BMSCs).<sup>(9)(10)</sup>



Sin embargo, las GMSCs proliferan más rápido que las BMSCs, muestran una morfología estable y no pierden sus características de células troncales mesenquimales.<sup>(9)</sup>

La multipotencia de las GMSCs, su fácil aislamiento, abundancia clínica, expansión rápida *ex vivo*, su capacidad de proliferar y de expresar marcadores tanto de células troncales embrionarias como de células troncales mesenquimales, provee de una gran ventaja para aplicaciones clínicas.<sup>(9)</sup>

Su eficiencia de expansión *in vitro* y de diferenciación es muy amplia, ya que se han obtenido células derivadas de las tres capas embrionarias *in vitro* y teratomas bilineales (ectodermo y mesodermo) *in vivo*.<sup>(9)</sup> Así mismo, los fibroblastos gingivales humanos (HGF) desempeñan un papel importante en la estructura y función de los tejidos, y en la defensa inmune del huésped.<sup>(11)</sup>

Las células troncales se han clasificado de acuerdo con el periodo en el que fueron aisladas en: embrionales o somáticas, y a su capacidad de diferenciación en: totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales.<sup>(12)(13)</sup>

Las células troncales para poder ser identificadas como tales tienen que tener un cierto fenotipo, en este caso han sido relacionadas con los genes de pluripotencialidad: Oct4 (Octamer-binding transcription factor 4 ó POU5F), NANOG (factor de transcripción homeobox), Sox2 (conocido como SRY-box 2, de sus siglas Sex determining Region Y-box 2), c-Myc (cancer-myelocytomatosis), Klf4 (gut-enriched Krüppel-like factor).<sup>(12)(13)</sup> Y los marcadores embrionales que son: CD73 (ecto-5'-nucleotidasa), CD105 (endoglina), CD34 (Cluster of Differentiation 34 relacionado a tejidos hematopoyéticos), CD45 (Antígeno común leucocitario) y CD90 (thymus cell antigen 1,Thy-1).<sup>(12)(13)</sup>

Por lo cual en este estudio se busca determinar, si una población heterogénea de fibroblastos derivados de la encía humana transfectados con el gen que codifica

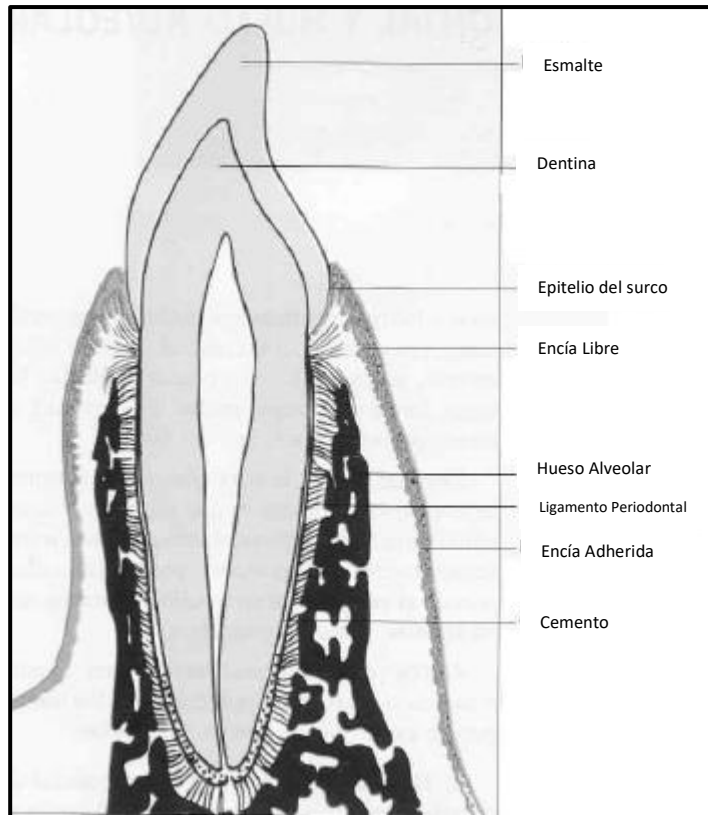


para la proteína del cemento 1 (CEMP1), adquiere propiedades de células troncales como lo son clonogenicidad, plasticidad, autorreplicación y si expresan moléculas asociadas a pluripotencia, y a los fenotipos de tejido mineralizado, tejido adiposo y cartílago.<sup>(3)</sup>

### 3. Antecedentes

#### 3.1. Periodonto

El periodonto es una unidad compleja presente en la cavidad oral, cuyo principal objetivo es brindar la unión del diente al hueso alveolar y distribuir las fuerzas masticatorias, además constituye un reservorio de células necesarias para la homeostasis del ecosistema oral. Está compuesto de tejidos duros y blandos, como el cemento, el ligamento periodontal, el hueso alveolar y la encía, los cuáles le dan soporte y protección a la estructura dental. **(Fig. 1)** <sup>(2) (14) (15) (16)</sup>



**Figura 1.** Diagrama de un corte longitudinal de un elemento dentario con los tejidos del periodonto de protección e inserción. <sup>(1)</sup>

La formación del periodonto inicia con el proceso de la formación de la raíz, donde el mesénquima apical prolifera, mientras que el epitelio dental interno y el externo se fusionan para dar lugar a la vaina epitelial de Hertwig. Las células de la vaina epitelial de Hertwig migran apicalmente hacia el ectomesénquima subyacente, dividiendo la papila del folículo dental hasta la región del futuro ligamento periodontal, donde se re-asocian para formar los restos epiteliales de Malassez. <sup>(2)</sup> <sup>(14) (15)</sup>





Se ha propuesto que las células de la vaina epitelial de Hertwig inducen la diferenciación de odontoblastos, para formar la dentina radicular y para diferenciar células del saco dental hacia cementoblastos. Por otro lado, las células de los restos de Malassez están relacionadas con el desarrollo de la inervación del ligamento periodontal, así como en la regulación de la resorción radicular y la inducción en la formación de cemento acelular. El desarrollo del periodonto está regulado por un gran número de genes, que incluyen factores de crecimiento, sus receptores y componentes de la matriz extracelular. <sup>(2)</sup> <sup>(15)</sup>

### 3.2. Encía

La encía es la parte de la mucosa bucal que rodea al diente y cubre el hueso alveolar. Forma parte de los tejidos de soporte periodontal y, al formar una conexión con el diente a través del surco gingival, protege a los tejidos de soporte subyacentes frente al entorno bucal. Puesto que dependen de los dientes, cuando éstos se extraen las encías desaparecen. <sup>(16)</sup>



**Figura 2.** Encía normal de un adulto joven. Las flechas marcan la línea mucogingival entre la encía insertada y la mucosa alveolar. <sup>(13)</sup>

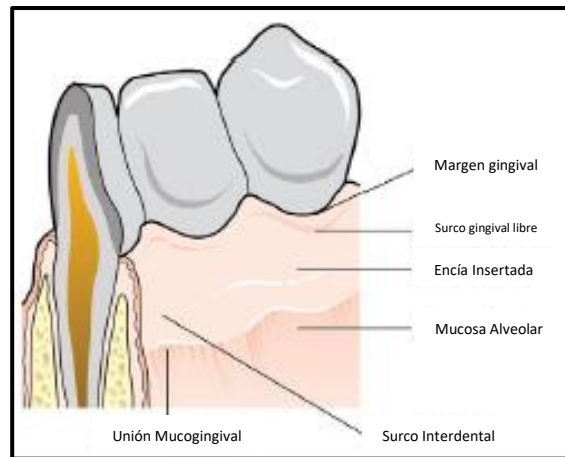
Está compuesta de una capa epitelial y un tejido conectivo subyacente denominado lámina propia. La encía adquiere su forma y textura definitivas con la erupción de los dientes. La unión entre el diente y la mucosa bucal o unión mucogingival es única y especialmente vulnerable. **(Fig. 2)** <sup>(15)</sup>



La encía sana es rosa, firme, de márgenes finos y con una forma festoneada que le permite ajustarse al contorno de los dientes. Su color puede variar según la cantidad de pigmentación por melanina en el epitelio, el grado de queratinización de este y la vascularización y naturaleza fibrosa del tejido conjuntivo subyacente. (16)

Se pueden distinguir dos partes de la encía: la encía libre y la encía adherida.

- La encía Insertada o mucosa funcional se extiende desde el surco gingival hasta la unión mucogingival, donde se encuentra con la mucosa alveolar. (16)
- La encía libre es cóncava y se ha descrito como un “nicho” o “col” que une las papilas faciales y linguales.



**Figura 3.** Diagrama que muestra las características anatómicas de la encía. (15)

Es donde contactan los dientes, el “col” adopta la forma de los dientes en su parte apical al área de contacto. La región interdental tiene una importancia especial, porque es el lugar de mayor depósito de bacterias y su estructura la hace especialmente vulnerable. (Fig. 3) (16)

### 3.3. Ligamento Periodontal

El ligamento periodontal es el tejido blando altamente vascularizado y celular, que rodea a las raíces de los dientes y conecta el cemento radicular con la pared del alvéolo. En sentido coronal, el ligamento periodontal se continúa con la lámina propia de la encía y está delimitado respecto de ella por los haces de fibras colágenas, que conectan la cresta ósea alveolar con la raíz (las fibras de la cresta alveolar). (15) (14)

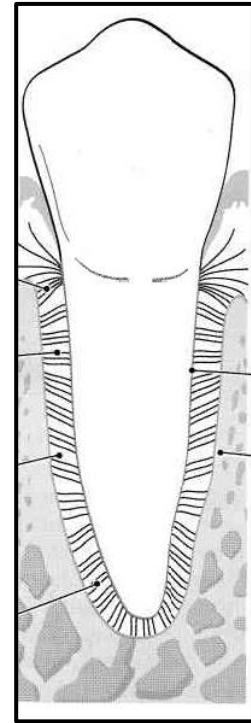


El ligamento periodontal se ubica en el espacio situado entre las raíces y la lámina dura o hueso alveolar fasciculado. El hueso alveolar rodea al diente hasta un nivel situado a aproximadamente 1mm hacia apical de la conexión cementoadamantina.

Se ha investigado mucho sobre la estructura, función, composición del ligamento periodontal por razones funcionales y clínicas. <sup>(15)</sup> **Fig. 4**

Sus funciones son las siguientes:

- Es el tejido de inserción entre el diente y el hueso alveolar. Por lo tanto, se encarga de resistir las fuerzas de desplazamiento y protege los tejidos dentales de las cargas oclusales excesivas.
- Se encarga de mantener al diente en una posición funcional durante el proceso de erupción dental y los cambios de posición se producen en el diente después de una extracción, atrición o carga oclusal excesiva.
- Sus células forman, mantienen y reparan el hueso alveolar y el cemento.
- Sus mecanorreceptores intervienen en el control neurológico de la masticación.
- Tiene un rico aporte vascular con anastomosis con las de los espacios medulares del hueso y la encía, además de facilitar estas funciones. <sup>(16)</sup>



*Figura 4. Diagrama de las fibras del ligamento periodontal. <sup>(14)</sup>*

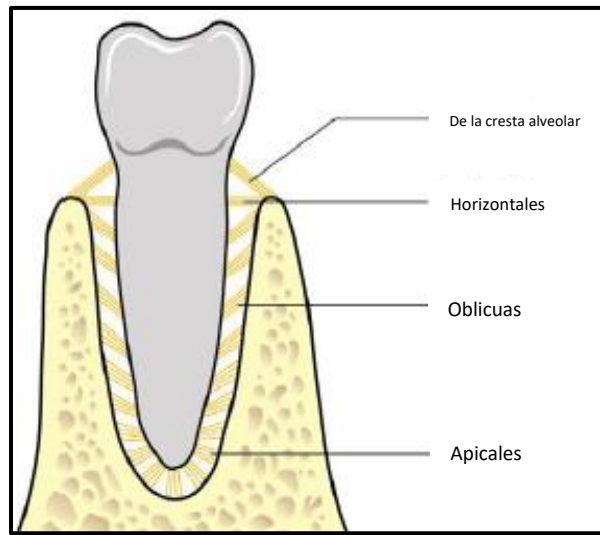
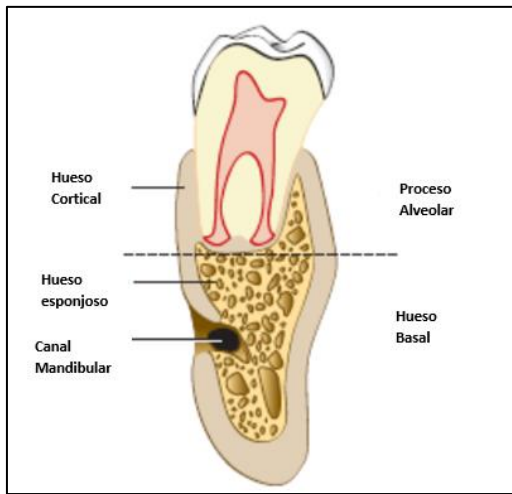


Figura 5. Haces de fibras del ligamento periodontal <sup>(15)</sup>

El ligamento consta de haces de fibras de colágeno bien organizados de unos 5 $\mu$ m de diámetro, en una matriz de sustancia fundamental por la que circulan vasos y nervios. Los haces de fibras, insertadas por un extremo en el cemento y por el otro en la pared del alvéolo como fibras de Sharpey. <sup>(15)</sup> Los haces de fibras, insertadas por un extremo en el cemento y por el otro en la pared del alvéolo como fibras de Sharpey, suelen describirse en grupos identificables según su orientación predominante. **(Fig. 5)** <sup>(16)</sup>

1. Las fibras de la cresta alveolar circulan del cemento del cuello del diente a la cresta alveolar.
2. Las fibras horizontales van del cemento a la cresta alveolar.
3. Las fibras oblicuas forman el componente principal del ligamento y van desde el hueso en sentido ligeramente apical para insertarse en el cemento, de forma que parecen suspender el diente en su alvéolo.
4. Las fibras apicales van del ápice radicular a la base del alvéolo. También pueden incluirse las fibras interradiculares que se encuentran en la furcación de dientes multiradiculares y circulan como fibras transeptales de raíz a raíz coronales a la cresta alveolar. <sup>(14)</sup>

### 3.4. Hueso Alveolar



**Figura 6.** Corte Longitudinal de mandíbula humana con el diente en su sitio. La línea punteada marca la separación entre el hueso basal y el hueso alveolar. (14)

La apófisis alveolar se define como la parte de los maxilares superior e inferior que forma y sostiene los alvéolos de los dientes. La apófisis alveolar está compuesta de hueso que se forma tanto por células del folículo dental (saco dentario), el hueso alveolar fasciculado, como por células que son independientes del desarrollo dentario.

**(Fig. 6)** (14) (16)

Junto con el cemento radicular y el ligamento periodontal, el hueso alveolar constituye el aparato de inserción del diente, cuya función

principal consiste en distribuir y absorber las fuerzas generadas por la masticación y otros contactos dentarios. (14)

El hueso alveolar tiene su origen embriológico en la condensación inicial del ectomesénquima alrededor del germen del diente inicial. Está formado por hueso alveolar propio (en el que se insertan las fibras de Sharpey), hueso compacto (formado por la cortical vestibular y oral) y hueso esponjoso, localizado entre ellos. (15) (16)

Además de sostener los dientes, el hueso maxilar y mandibular también sirve para insertar los músculos, como armazón a la médula ósea y actúa como reservorio de iones, en concreto de calcio. (16)

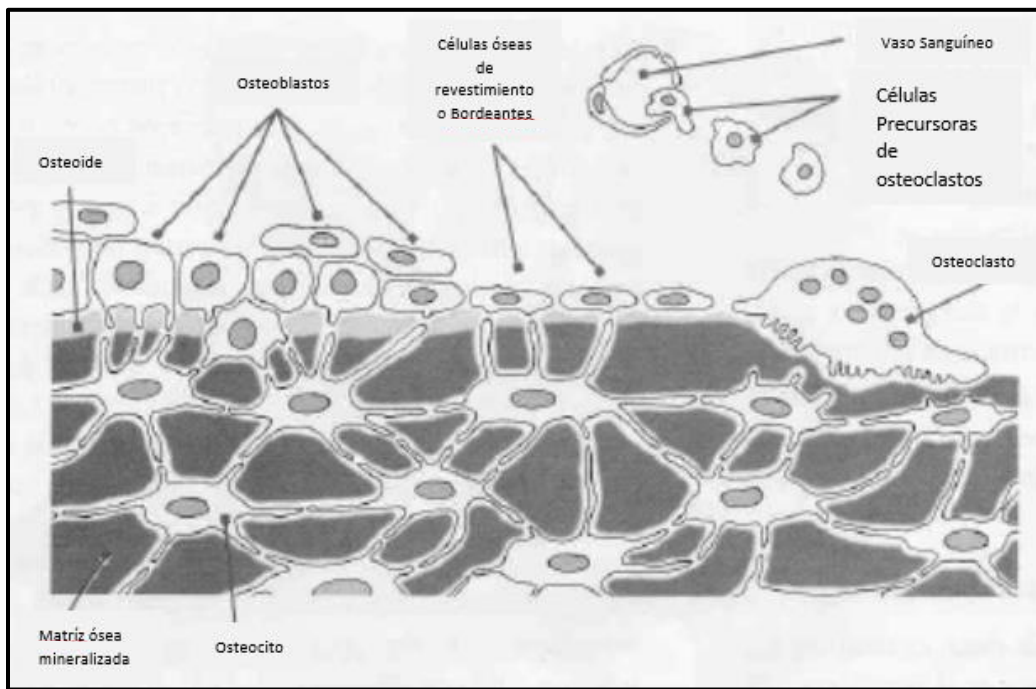
El hueso es un tejido conjuntivo mineralizado y, por peso consta de alrededor de un 60% de materia inorgánica, un 25% de materia orgánica y un 15% de agua. Por volumen, estas proporciones son del 36, 36 y 28% respectivamente. La fase mineral consta de hidroxiapatita, cristales pequeños en forma de aguja o finas láminas de unos 8 nm de grosor y de longitud variable. Alrededor del 90% de la materia orgánica



es colágeno de tipo I. Además, hay pequeñas cantidades de otras proteínas, como osteonectina, osteocalcina, osteopontina y proteoglucanos. <sup>(15)</sup> <sup>(16)</sup>

Pueden identificarse cinco tipos de células en el hueso. Se encuentran células formadoras de hueso (osteoblastos) en la superficie del hueso. Las células grandes multinucleares (osteoclastos) se encargan de reabsorber hueso. Además, se encuentran células osteoprogenitoras, que aparecen como células largas y delgadas que son una población de células madre para formar osteoblastos. <sup>(1)</sup> <sup>(16)</sup>

Se sitúan cerca de los vasos sanguíneos de la médula y el ligamento periodontal. Cuando el hueso no sufre deposición ni resorción activa, su superficie latente está recubierta por células relativamente indiferenciadas conocidas como células de revestimiento óseo, que pueden ser osteoblastos inactivos. **(Fig. 7)** <sup>(1)</sup> <sup>(16)</sup>



**Figura 7.** Diagrama que muestra las interacciones entre las interrelaciones entre las diferentes células del tejido óseo. <sup>(1)</sup>



### 3.5. Cemento

El cemento fue descrito por primera vez en 1835, es un tejido conectivo único, mineral y avascularizado que cubre la superficie radicular de los dientes. No sufre procesos de remodelación, pero sí de aposición, lo cual se mantiene durante toda la vida. <sup>(2)</sup>

El cemento es derivado de la capa celular ectomesenquimática del saco o folículo dental que rodea al germen dentario. Desde el punto de vista estructural, el cemento es comparable al hueso, ya que su dureza y composición química son prácticamente similares; además ambos crecen por aposición, poseen laminillas, y cuando el cemento presenta células, éstas se alojan en lagunas, como los osteocitos. <sup>(1)</sup>

El cemento radicular es formado por los cementoblastos, pero aún existe controversia acerca de su origen. Provee de una interfase por la que la superficie radicular es anclada a las fibras colágenas de Sharpey del ligamento periodontal. <sup>(4)</sup>

El cemento, al cubrir la porción radicular de los dientes, se relaciona con la dentina por su cara interna; con el ligamento periodontal, por su cara externa; por su extremo coronario con el esmalte y con la pulpa dental por su extremo apical. <sup>(1)</sup>

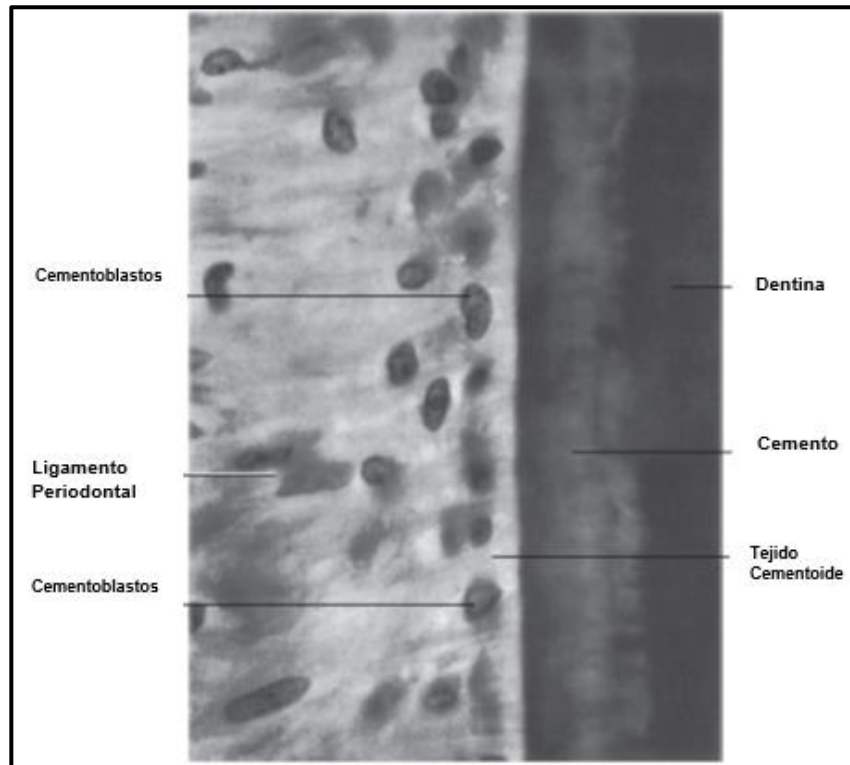
El cemento radicular no es uniforme y además difiere en composición química. Cerca del 50% es matriz inorgánica constituida por fosfatos de calcio que se organizan en forma de cristales de hidroxiapatita y el resto corresponde a la matriz orgánica consistente, sobre todo de colágenas tipo I (95%) y tipo III (5%), las cuales en su conjunto desempeñan un papel estructural; así como glicoproteínas, proteoglicanos y proteínas no colagénicas como la amelogenina, ameloblastina, enamulina, fosfatasa alcalina (ALP), sialoproteína ósea (BSP), proteína de la matriz dentinaria-1 (DMP-1), osteopontina, fibronectina, osteocalcina y el factor de crecimiento derivado del cemento (CGF). <sup>(1)</sup><sup>(14)</sup><sup>(16)</sup>

El cemento está formado por elementos celulares, en especial los cementoblastos, cementocitos y por una matriz extracelular calcificada. <sup>(1)</sup><sup>(16)</sup>



### 3.5.1. Cementoblastos:

Los cementoblastos se encuentran adosados a la superficie del cemento, del lado del ligamento periodontal (zona cementógena del periodonto). En un diente funcional, los cementoblastos se consideran integrantes estructurales de dicho ligamento.



*Figura 8. Distintos tipos celulares del cemento. <sup>(14)</sup>*

Los cementoblastos pueden encontrarse en estado activo (con el MO se observan como células cúbicas, muy basófilas) o inactivo (aparecen aplanados, con núcleo de heterocromatina). **(Fig. 8)** <sup>(1)</sup>

En las raíces en desarrollo suele haber una capa continua de cementoblastos activos en toda su extensión. En los dientes con raíces completamente formadas, en cambio, se encuentran cementoblastos activos a partir del tercio medio o sólo en el tercio apical, es decir, en las zonas donde hay deposición de cemento secundario (zonas cementógenas). <sup>(1)</sup>





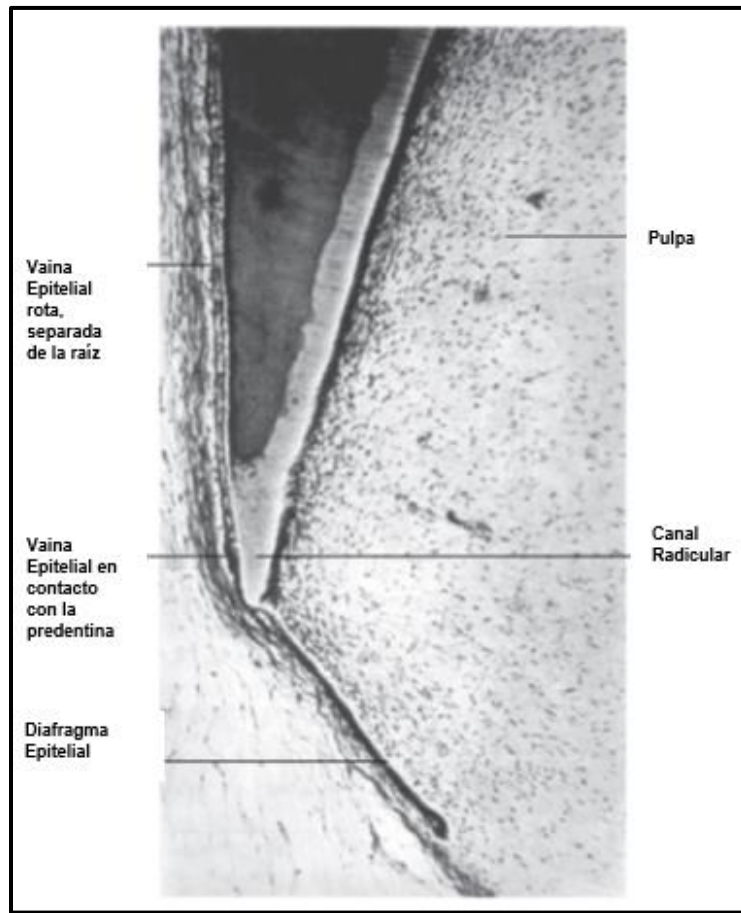
Entre los cementoblastos activos y el cemento mineralizado, existe una delgada capa de sustancia cementoide, cemento inmaduro o precemento, que representa la deposición más reciente de matriz orgánica donde aún no se han precipitado las sales minerales. <sup>(1)</sup>

En los cementoblastos humanos se ha descrito la presencia de numerosos granos de glucógeno, así como de filamentos intermedios y de actina. Las células se asocian mediante uniones comunicantes y desmosomas muy simples. <sup>(1)</sup>

Las membranas de los cementoblastos poseen receptores para la hormona del crecimiento y para el EGF (factor de crecimiento epidérmico), para la acción de la PTHrP (proteína relacionada con la paratohormona), la cual parece tener un importante papel en la regulación de la cementogénesis. <sup>(1)</sup>

### 3.5.2. Cementogénesis

La formación de dentina y cemento en la raíz de un diente en desarrollo depende de la presencia de la vaina radicular de Hertwig. Esta vaina se origina por proliferación de las células del epitelio dental interno y externo en el asa cervical del órgano del esmalte, una vez que se ha completado la aposición del esmalte en toda la extensión de la corona. La vaina epitelial crece extendiéndose en sentido apical y en su extremo distal forma el diafragma epitelial, más marcado en el caso de los dientes multirradiculares. **(Fig. 9)** <sup>(1) (14)</sup>



**Figura 9.** Origen de la vaina epitelial de Hertwig. Posición del diafragma epitelial. <sup>(1)</sup><sup>(14)</sup>

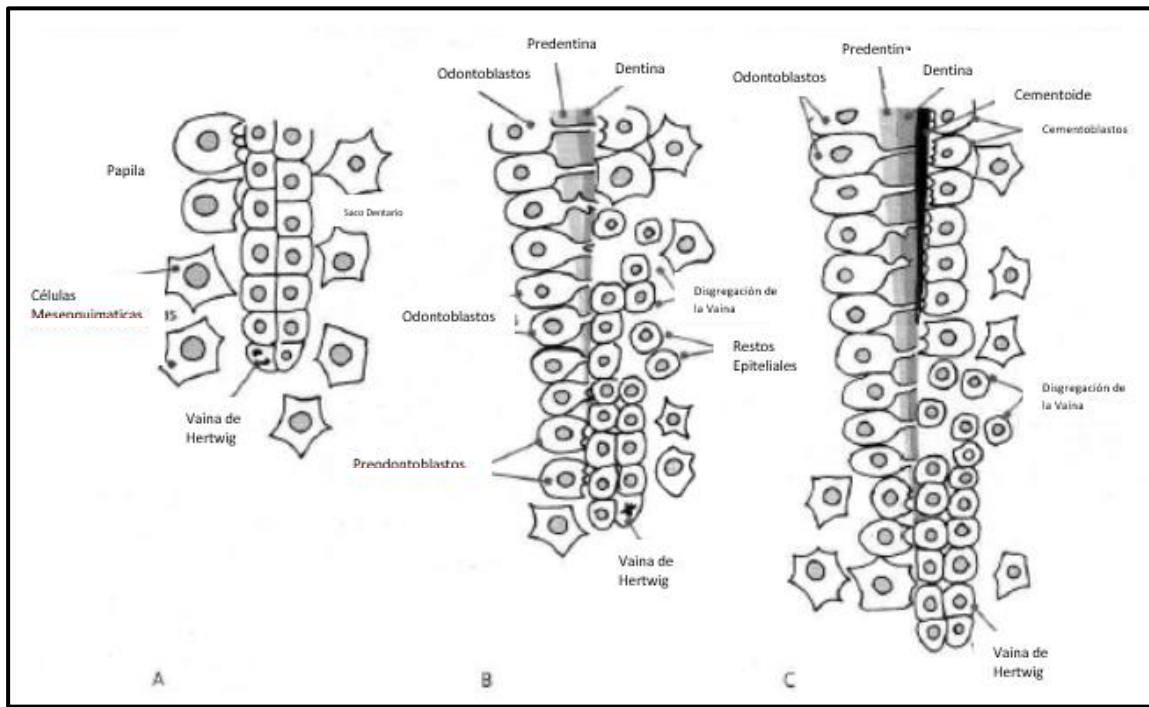
A medida que la vaina crece y rodea a la papila en expansión, induce a las células situadas en la periferia de ésta a diferenciarse en odontoblastos, los que una vez maduros secretan la matriz orgánica de la dentina radicular. <sup>(1)</sup><sup>(14)</sup>

Al avanzar el proceso de mineralización, se interrumpe para las células epiteliales la fuente de nutrición proveniente de la papila dentaria, por lo que la vaina radicular se fragmenta, formando una red fenestrada. Las células provenientes de la disgregación de la vaina de Hertwig, persisten en el adulto constituyendo los restos epiteliales de Malassez. <sup>(1)</sup><sup>(14)</sup>

A través de la red que forma la vaina epitelial, migran las células ectomesenquimáticas indiferenciadas provenientes del folículo o saco dentario, y se

colocan en estrecha aposición con la capa hialina que cubre la superficie de la dentina radicular. <sup>(1)</sup> <sup>(16)</sup>

Estas células ectomesénquimales aumentan de tamaño y desarrollan todos los orgánulos citoplasmáticos característicos de las células sintetizadoras y secretoras de proteínas, diferenciándose en cementoblastos. Estos comienzan a depositar la matriz orgánica del cemento. **(Fig. 10)** <sup>(1)</sup> <sup>(4)</sup>



**Figura 10.** A, B, C. Etapas de la Cementogénesis. <sup>(1)</sup>

La matriz orgánica se mineraliza por la formación de vesículas matriciales en los momentos iniciales y por propagación de los cristales de hidroxapatita desde la superficie dentinaria de la raíz. <sup>(1)</sup> <sup>(14)</sup>

Las zonas más anchas dispuestas entre ellas son las laminillas, que corresponden a nuevas capas de cemento. Las fibras colágenas de cada laminilla (fibras intrínsecas del cemento, producidas por los cementoblastos) se orientan paralelamente a la superficie radicular, pero la dirección en cada laminilla es diferente de las laminillas vecinas. <sup>(1)</sup>



Al mismo tiempo que se produce la aposición del cemento, van quedando incluidas en él las fibras colágenas del ligamento periodontal en formación. Que constituyen las fibras extrínsecas del cemento o fibras perforantes y que llegan a mineralizarse total o parcialmente al estar dentro de este tejido. <sup>(1)</sup>

Desde la perspectiva histológica se clasifica como celular o acelular, dependiendo de la presencia o ausencia de cementocitos en su estructura. Otra clasificación incluye cemento con fibras intrínsecas o extrínsecas, dependiendo de la presencia de fibras colágenas. <sup>(2)</sup>

En los últimos años se han descrito dos proteínas aisladas de la matriz del cemento radicular (propuestas como tejido específicas), la proteína del cemento 1(CEMP-1) y la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP). <sup>(2)</sup>

### 3.6. Proteínas del cemento

#### 3.6.1. Factor de Crecimiento Derivado del Cemento (CGF)

Es una proteína que se encuentra en la matriz mineral del cemento radicular, se sabe que regula la concentración de calcio y la hidrólisis de fosfatos inorgánicos citosólicos. <sup>(2)(17)</sup> Este factor es el mayor componente en el cemento, asciende hasta un 70% de la actividad mitogénica extraída de este tejido. Actúa sinérgicamente con el factor de crecimiento epidermal e induce muchas vías de señalización asociadas a mitogénesis, activa la cascada de señalización de la proteína cinasa C(PKC), y la expresión de proto-oncogenes. <sup>(2)(17)(18)</sup>

Adicionalmente, este factor puede promover la migración y el crecimiento de células progenitoras, presentes en estructuras alternas hacia la matriz dentinaria y participa en su diferenciación en cementoblastos. <sup>(17)</sup>



### 3.6.2. Proteína de Adhesión del Cemento (PTPLA/CAP)

Fue la primera proteína aislada del cemento radicular, caracterizada y purificada a partir de extractos de cemento maduro de bovino y humano, su actividad biológica está asociada a una especie proteica de 55kDa. La isoforma designada como PTPLA-CAP surge del aislamiento de una variante cDNA para la proteína tirosina tipo fosfatasa (prolina en lugar de arginina catalítica), miembro-a del cemento. Contiene 15 aminoácidos codificados dentro del intrón entre los exones 2 y 3 de PTPLA. Las proteínas PTPLA tienen un rol en el desarrollo, diferenciación y mantenimiento de varios tipos de tejidos. <sup>(19) (17)</sup>

Se ha determinado que CAP participa en el reclutamiento y la diferenciación celular durante la formación del cemento radicular. Se expresa en células del folículo dental, promoviendo su adhesión y diferenciación. Además, las células periodontales crecidas *in vitro* en presencia de CAP son capaces de formar un tejido mineralizado. <sup>(2)</sup>

Su papel biológico ha involucrado un papel quimiotáctico de células del ligamento periodontal y del hueso alveolar hacia la superficie radicular. Incrementa la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP), así como la expresión de proteínas asociadas al proceso de biomineralización. <sup>(2)</sup>

### 3.7. CEMP-1

La matriz extracelular del cemento contiene moléculas específicas, entre estas moléculas únicas se encuentra CEMP1.

El gen humano de la proteína del cemento 1 (CEMP1) contiene 1 exón, se extiende 1.4kb, y mapea el brazo corto del cromosoma 16 (16p 13.3) El gen CEMP1 codifica para una proteína de 247 aminoácidos con un masa molecular de 25.9 kDa, la cual después de modificaciones postraduccionales, incrementa a 50 kDa. Análisis físico-químicos de CEMP-1 revelaron que es una proteína alcalina con un punto isoeléctrico de 9.73. <sup>(6)</sup>



La proteína del cemento 1 o CEMP 1 se ha localizado y expresado en poblaciones celulares del ligamento periodontal, cementoblastos, células de espacios endosteales y células troncales mesenquimales localizadas perivascularmente en el ligamento periodontal; por lo que podría ser considerada como un marcador de cementoblastos y regulador de actividades biológicas de células del ligamento periodontal. Estudios *in vitro*, han demostrado que es un regulador clave en el proceso de biomineralización, ya que promueve la adhesión y diferenciación celular, así como regula el depósito, composición y morfología de cristales de fosfato octacálcico (precursor de hidroxiapatita). <sup>(2)</sup>

CEMP-1 parece ser un regulador clave de la cementogénesis, ya que regula la velocidad de deposición, composición y morfología de los cristales de hidroxiapatita. <sup>(8)</sup>

Además, regula la expresión de proteínas que participan en la formación y maduración de tejido mineral como la fosfatasa alcalina (ALP), osteopontina (OPN) y sialoproteína ósea (BSP) en cementoblastos, mediante la activación de vías de señalización caracterizadas como lo es la de p-38 y JNK-MAPK; así como también participa activamente en la mineralización de la matriz extracelular de los cementoblastos. <sup>(2)</sup>

Investigaciones muestran que el CEMP-1 humano recombinante o (hrCEMP-1) estimula la proliferación y migración células humanas del ligamento periodontal (HuPLC) y conduce a la migración de anticuerpos-1<sup>+</sup> de células troncales mesenquimales, lo que sugiere que esta proteína está relacionada con el mecanismo de reclutamiento perivascular de células troncales. Estudios *in vivo* han mostrado que, hrCEMP-1 promueve la regeneración ósea en calvarias de ratas con defectos de gran tamaño, lo que sugiere que es un mediador para sanación de heridas y regeneración periodontal. CEMP-1 sostiene propiedades biológicas y farmacológicas y juega un papel primordial durante el proceso de mineralización, así como en la regeneración de tejidos mineralizados. <sup>(6)</sup>



En otros estudios *in vitro* se comprobó que CEMP-1 promueve la proliferación celular, promueve el incremento en la actividad de ALP cuando actúa sobre las HuPLCs. Además, el CEMP-1 puede inducir la diferenciación de las HuPLCs hacia un fenotipo parecido al mineralizante. <sup>(6)</sup>

En otros estudios se demostró que CEMP1 puede modular la expresión de muchos genes relacionados con el desarrollo, crecimiento, ciclo y muerte celular en HGFs (fibroblastos gingivales humanos, traducidos del inglés human gingival fibroblasts) transfectados con CEMP1. <sup>(8)</sup>

Además, la transfección del gen que codifica para CEMP1 en fibroblastos gingivales adultos humanos, resultan en la diferenciación de estas células a un fenotipo de células parecidas a las mineralizantes. <sup>(20)</sup>

Durante las últimas décadas, las células troncales se han convertido en centro de atención en la biología y en la medicina. Por un lado, su estudio ha ayudado a entender procesos biológicos fundamentales, como la diferenciación celular y la regeneración tisular; por otro lado, su versatilidad funcional, tanto *in vivo* como *in vitro*, y la capacidad de cultivarlas y manipularlas *ex vivo*, han constituido las bases para el desarrollo de la terapia celular y la medicina regenerativa. <sup>(12)</sup>

Los tejidos y órganos usados para estas estrategias de medicina regenerativa en odontología son la glándula salival, lengua y músculos craneofaciales, así como el cartílago del cóndilo de la articulación temporomandibular. <sup>(9)</sup>

### 3.8. Células Troncales

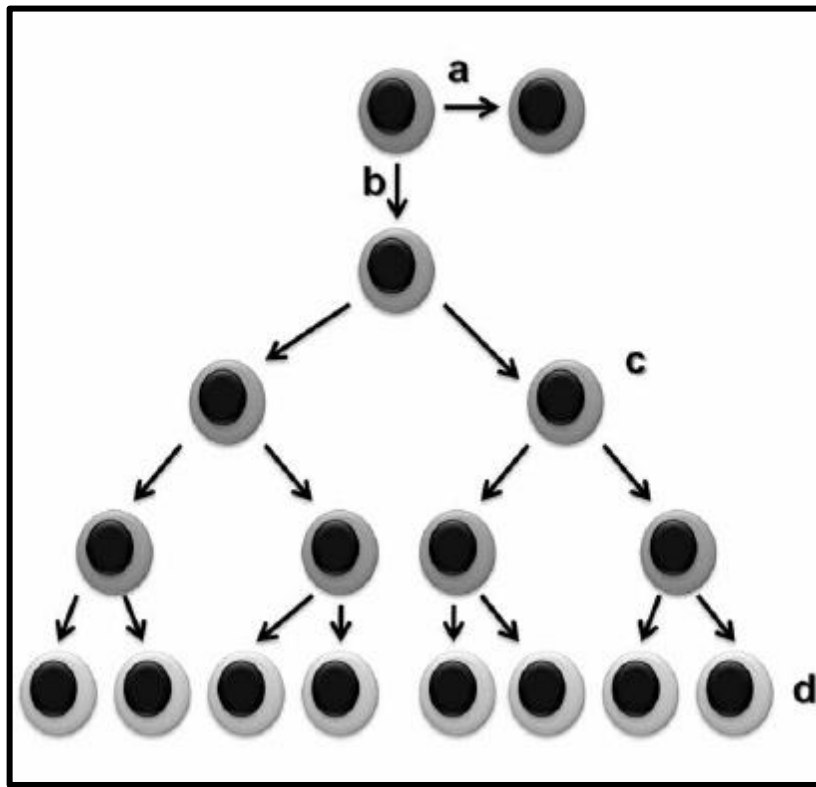


Figura 11. Definición funcional de célula troncal. <sup>(12)</sup>

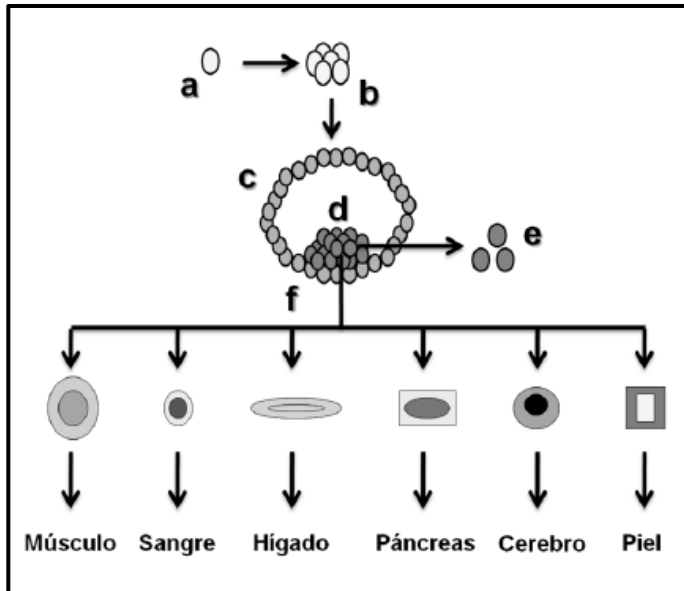
Las células troncales son células inmaduras, no diferenciadas, con una alta capacidad de autorreplicación y que pueden diferenciarse en uno o más tipos de células especializadas con funciones específicas en el organismo. **(Fig. 11)** <sup>(12)</sup>

Estas células están presentes a todo lo largo de la escala filogenética animal, organizando y dirigiendo el desarrollo y la regeneración de tejidos y órganos. <sup>(12)</sup>

Las células troncales no poseen características morfológicas que puedan utilizarse para su identificación; por lo tanto, actualmente la forma de reconocer a estas células incluye tanto el análisis inmunofenotípico (es decir, la expresión de moléculas de membrana-antígenos-o moléculas intracelulares), como el análisis de la expresión de ciertos genes que pueden actuar como marcadores. Sin embargo, son los ensayos funcionales, tanto *in vivo* como *in vitro*, los que determinan, sin lugar a duda, la identidad de toda célula troncal. <sup>(12)</sup>



### 3.8.1. Origen



**Figura 12.** El cigoto (a) es una célula troncal totipotencial (da origen al embrión y a las estructuras extraembrionarias). Al autorreplicarse, genera varias células idénticas a ella. (b), las cuales constituyen el estadio de mórula. En el estadio de blastocisto (c), las células de la masa celular interna (d) corresponden a células troncales embrionarias pluripotenciales (pueden formar células de cualquier tejido embrionario). Dichas células troncales embrionarias dan lugar a células troncales de la línea germinal (e), o bien, a células troncales somáticas (f) de las tres capas embrionarias: Ectodermo, endodermo y mesodermo. <sup>(12)</sup>

A lo largo del desarrollo de los mamíferos se generan diversos tipos de células troncales. La primera célula troncal es el huevo fertilizado o cigoto, la cual es una célula troncal totipotencial, capaz de producir tanto al embrión como a las estructuras que no formarán parte de él, pero que son esenciales para su desarrollo, como la placenta, el saco vitelino y el cordón umbilical. **(Fig. 12)** <sup>(12)</sup>

Hasta el estadio de mórula (8 células), cada célula es idéntica a las otras; es decir todas son células troncales totipotenciales. Conforme avanza el desarrollo, el embrión alcanza el estadio de blastocisto, en el que cada una de las células que forma parte de la masa celular interna es capaz de formar células de cualquier tejido del organismo, de ahí que se les considere células troncales pluripotenciales (células troncales embrionarias, ESC, de Embryonic Stem Cells). <sup>(12)</sup>

A partir de las ESC se producen diferentes células troncales somáticas, incluyendo aquellas que dan origen al sistema nervioso central, a los nervios periféricos, la sangre, el hígado, el páncreas, los músculos, los huesos, la piel, el corazón, etc. <sup>(12)</sup>

Las células troncales dentales están formadas por tejido ectomesenquimático, derivado de la cresta neural durante el desarrollo embrionario contrario a la médula



ósea y a las células troncales del cordón umbilical, las cuales son derivadas del mesodermo. <sup>(21)</sup>

El periodonto y los dientes forman parte de las estructuras cráneo faciales que están derivadas del ectomesénquima. Aunado a esto, las células troncales dentales pueden servir como mejor opción para la reparación de tejidos derivados de la cresta neural como el periodonto. <sup>(21)</sup>

En sus estudios, Egusa, (2012) y Mao en el mismo año, señalaron que los tejidos orales, los cuales son de fácil acceso para el dentista, son una fuente rica de células troncales. <sup>(9) (10)</sup>

Entre las opciones disponibles para obtener estas células troncales, las células troncales de la mucosa oral (OMSCs) son las de interés debido a su localización, facilidad de cultivar y la habilidad que tiene de diferenciarse en múltiples tipos de células. <sup>(21)</sup>

Hay dos fuentes primarias de células troncales: células troncales adultas y células troncales embrionarias (ES). <sup>(9)</sup>

### **3.8.2. Propiedades**

#### **3.8.2.1. Auto-renovación:**

La división celular (meiótica y mitótica) puede ocurrir en modo asimétrico o simétrico. La división asimétrica de una célula troncal da lugar a otra célula troncal (haciendo una copia exacta de la original), y a una segunda célula llamada célula progenitora que difiere un poco de la célula madre. Estas dos células difieren en sus propiedades y tienen diferentes destinos. Cuando una célula troncal recién generada reemplaza a la original después de cada división, permite que haya una autorenovación ilimitada, mientras que la otra célula progenitora es responsable de la producción de otro tipos de células diferenciadas en un tejido. <sup>(22)</sup>



La división simétrica puede incrementar el número de células troncales, las cuales pueden ser usadas para expansión *ex vivo* de células troncales, para aplicaciones terapéuticas o cuando están asociadas a un crecimiento no controlado de tumores malignos. La división simétrica produce dos células progenitoras en lugar de dos células troncales, lo que puede provocar el agotamiento de células troncales en los tejidos. <sup>(22)</sup>

#### 3.8.2.2. Amplia capacidad proliferativa:

Mientras que las células diferenciadas tienen una capacidad proliferativa limitada debido a la pérdida de secuencias teloméricas después de cada división mitótica, las células troncales están dotadas con un potencial proliferativo incrementado. <sup>(12)</sup>  
<sup>(22)</sup>

La capacidad proliferativa cambia dependiendo su estado jerárquico; las células en estado prematuro tienen una capacidad proliferativa más larga, por el contrario, el potencial proliferativo de una célula troncal adulta, de un tejido específico está reducido, pero es suficiente aún para mantener la capacidad regenerativa. <sup>(12)</sup> <sup>(22)</sup>

#### 3.8.2.3. Potencial de diferenciación/plasticidad:

El término plasticidad se refiere a la capacidad de una célula troncal de un tejido específico para dar origen a células de otros tejidos. La potencia de las células troncales para diferenciarse en distintos tipos de células difiere de acuerdo a su disposición jerárquica. **(Fig. 13)** <sup>(12)</sup> <sup>(22)</sup>

- a) La primer célula generada en la ontogenia es **totipotencial**, esto es que son capaces de formar todos los tipos celulares del organismo, incluyendo células que forman tejidos extraembrionalmente como el trofoblasto. Las células totipotenciales pueden derivarse de los blastómeros, estas células pueden dar origen a un organismo viable y completo. <sup>(12)</sup> <sup>(22)</sup>



b) La **pluripotencia** es la habilidad de producir células de todas las capas germinales. Ejemplos de células pluripotenciales incluyen las células embrionarias o las células germinales, porque estas pueden producir células ectodérmicas, endodérmicas y mesodérmicas. Para probar la pluripotencia se realizan varios estudios:

- La formación de un teratoma.
- La formación de una quimera.
- Ensayos *in vitro*, diferenciación espontánea de células.
- Prueba de la expresión de marcadores de pluripotencia, como Oct 4, Sox 2, Klf4, cMyc, etc., por medio de inmunohistoquímica, por microensayos de DNA, etc. <sup>(22)</sup>

c) El potencial de diferenciación **multipotencial** de las células troncales está comprometido, ósea que está restringido para producir solo un espectro limitado de tipos de células, derivados de la misma capa germinal. Por ejemplo, las células del ectodermo pueden derivar a todas los tipos de células derivados del neuroectodermo y de la superficie del ectodermo.

d) La unipotencialidad o el potencial de diferenciación **unipotencial** es usualmente asociado a precursores de linajes celulares individuales.

e) Las células troncales consideradas prematuras como unipotentes pueden tener un potencial de diferenciación más amplio. Por ejemplo, las células troncales mamarias dan origen a células mioepiteliales, alveolares y ductales. <sup>(12) (22)</sup>

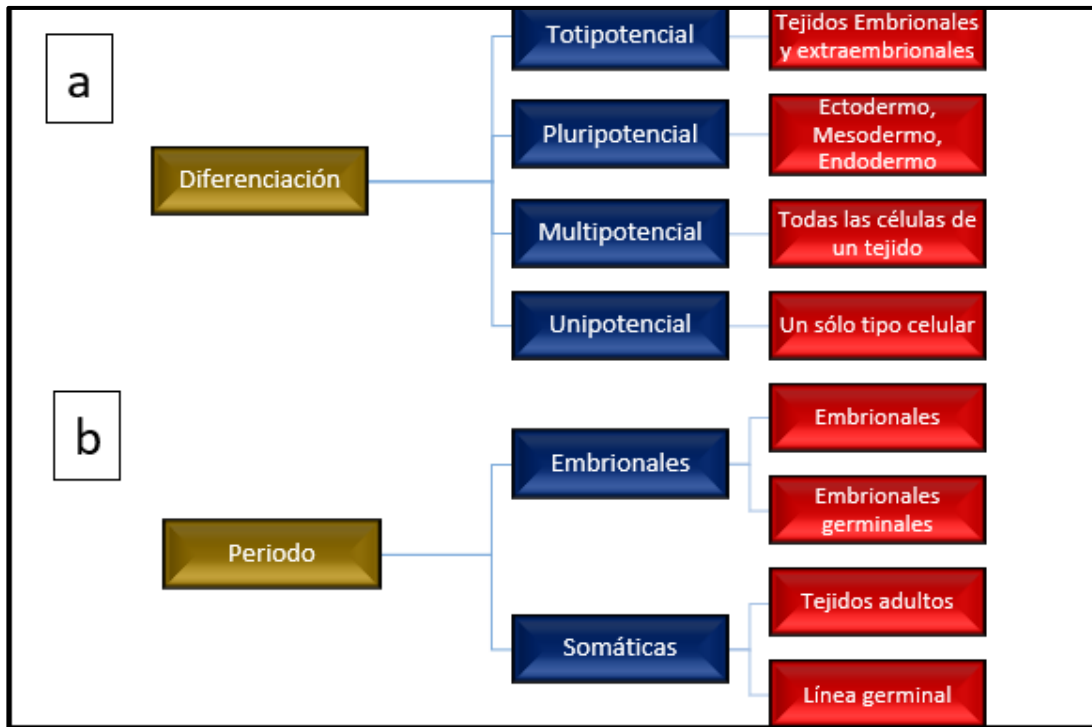
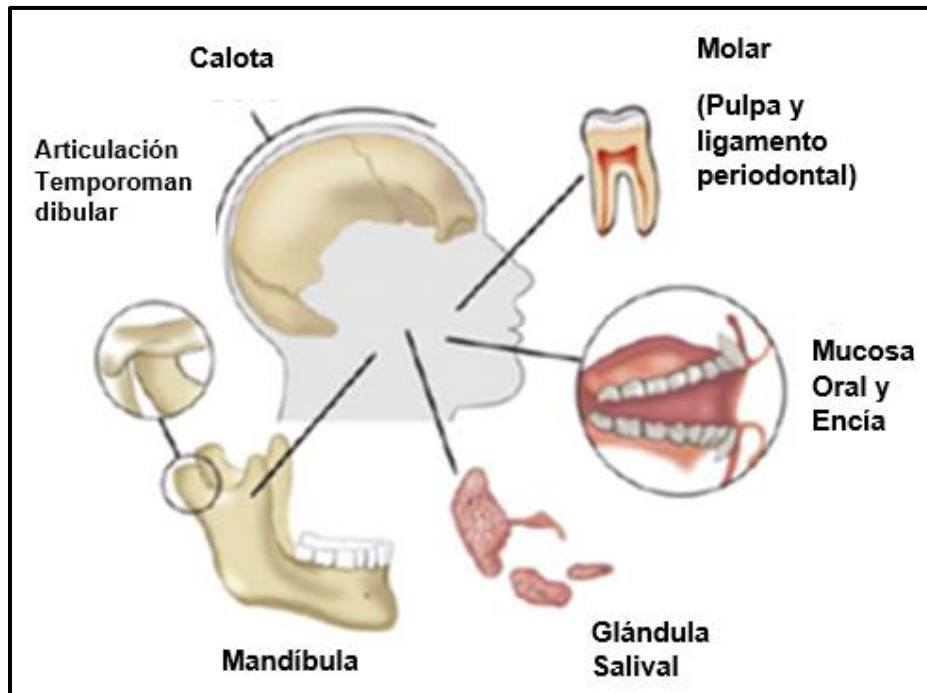


Figura 13. a) Clasificación del Potencial de Diferenciación/plasticidad (b) Clasificación por el estadio en el que se encuentran las células troncales

### 3.9. Células Troncales Adultas

Las células troncales adultas también son llamadas células troncales somáticas o células troncales postnatales. A pesar de que muy pocas de estas células están presentes en tejidos adultos, estas se someten a una auto-renovación y diferenciación para mantener los tejidos sanos y reparar los tejidos lesionados. Estudios recientes de células troncales en el campo de la odontología han identificado muchas fuentes de células troncales en la región oral y maxilofacial. **(Fig. 14)** <sup>(9)</sup> <sup>(10)</sup>

Se cree que estas células residen en un área específica de cada tejido, en un nicho de células troncal. Muchos tipos de célula troncal adulta residen en muchos tejidos mesenquimales y estas células se conocen colectivamente como células troncales mesenquimales o células troncales mesenquimales multipotentes. <sup>(9)</sup> <sup>(10)</sup>



**Figura 14.** Diagrama de los tejidos orofaciales donde se encuentran células troncales. A) células troncales epiteliales que residen en el desarrollo del germen dentario, epitelio oral, glándula salival. Células troncales provenientes de tejido conectivo (mesénquima o de origen mesodérmico) han sido aislados de calvaria, pulpa dental, papila dental, ligamento periodontal y médula de hueso alveolar.<sup>(10)</sup>

### 3.9.1. MSCs (Células Troncales Mesenquimales)

En cultivo celular, las células troncales mesenquimales (MSCs) pueden ser identificadas y aisladas basado en su adherencia a medios tratados con cultivo de tejidos. Las células troncales mesenquimales se encuentran entre las más prometedoras por sus aplicaciones clínicas, éstas fueron encontradas originalmente en la médula ósea, pero subconjuntos similares de MSCs han sido aisladas también de muchos otros tejidos adultos, incluyendo piel, tejido adiposo y varios tejidos dentales.<sup>(9) (22)</sup>



### 3.9.2. BMSCs (Bone Marrow Stem Cells o Células Troncales de la Médula ósea) de los huesos orofaciales

Las BMSCs humanas pueden ser aisladas de médula ósea orofacial aspiradas (maxila y mandíbula), obtenidos durante procedimientos de cirugía dental como tratamiento de implantes dentales, extracción del tercer molar, extirpación de quistes y osteotomía ortodóntica. <sup>(9)</sup>

Embriológicamente, la maxila y la mandíbula se originan exclusivamente de células de cresta neural craneal, mientras que la cresta iliaca se forma del mesodermo. Estas propiedades de las BMSCs orofaciales pueden proveer una ventaja para la regeneración orofacial, aunque el volumen recolectable de médula ósea es menor (0.03-05ml) que la médula ósea de la cresta iliaca. <sup>(9)</sup>

### 3.9.3. Células troncales derivadas de los tejidos dentales

Además, dos tipos de células troncales adultas han sido descritas en los tejidos dentales, las primeras son las células troncales epiteliales y las células parecidas a células troncales mesénquimales (MSC-like cells). <sup>(9)</sup>

El nicho de células troncales epiteliales adultas está localizado en el asa cervical de los ápices dentales, estas células pueden diferenciarse notablemente en ameloblastos productores de esmalte. <sup>(9)</sup>

Por el momento muchas fuentes de MSC han sido identificadas en los tejidos dentales, en la pulpa dental fueron identificadas las primeras células (dental pulp stem cells, DPSCs), las cuales tienen características fenotípicas similares a las BMSCs. Posteriormente, también se aislaron de la pulpa dental de dientes deciduos humanos (stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED). <sup>(9)</sup>



Las DPCs y SHED poseen propiedades de células troncales como multi-diferenciación y auto-renovación. Además, estas células tienen capacidad específica para regenerar el complejo dentino-pulpar cuando han sido trasplantados en ratones inmunocomprometidos. <sup>(9) (10)</sup>

El ligamento periodontal es otra fuente de MSCs adultas en los tejidos orales, las células troncales del ligamento periodontal (PDLSCs) pueden ser aisladas de dientes extraídos. Estas células tienen la capacidad de regenerar tejidos periodontales (cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar). <sup>(9) (10)</sup>

También se identificaron las células parecidas a MSC en los tejidos orales, como las del folículo dental, mesénquima dental y de la papila apical. <sup>(9)</sup>

El folículo dental humano es un tejido o saco que forma parte del germen dental que rodea completamente al órgano del esmalte y limita con la papila dental en estadios tempranos del crecimiento dental. <sup>(21)</sup>

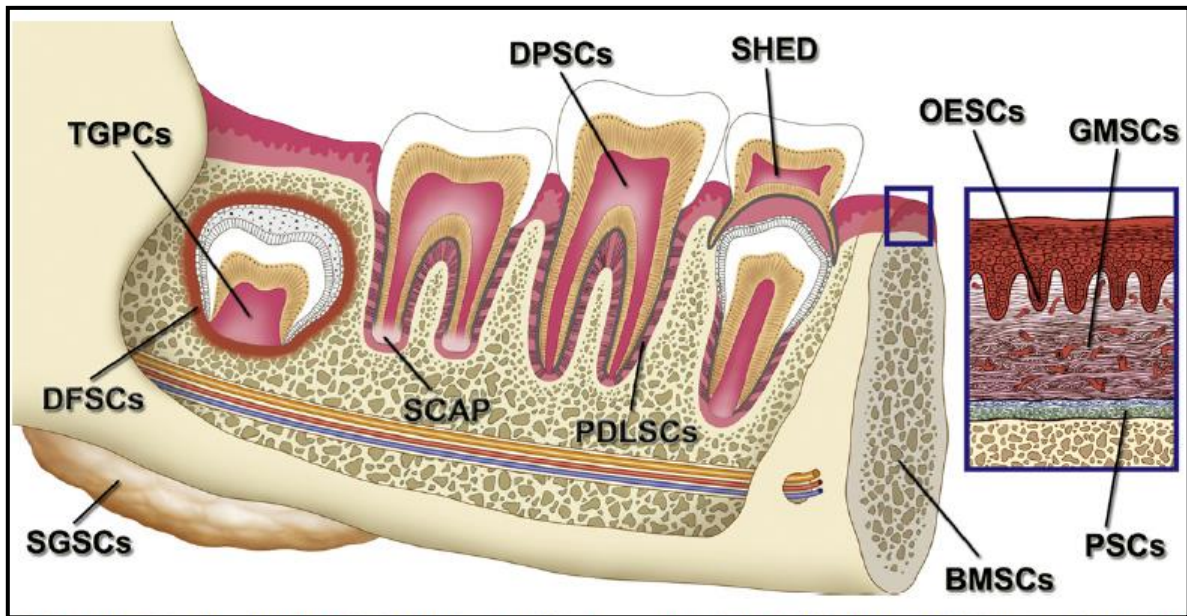
Se informó que las células troncales y las células precursoras que residen en el folículo dental se diferencian en tres tipos de células llamadas: osteoblastos, fibroblasto del ligamento periodontal (PDLF) y los cementoblastos, los cuales resultan en la formación de tres distintos tipos de tejidos periodontales; el cemento, ligamento periodontal y el hueso alveolar. <sup>(21)</sup>

Ikeda *et al.*, identificó células troncales distintas en el mesénquima del germen del tercer molar en el estadio de campana tardía (tooth germ progenitor cells, TGPCs), las cuales tienen gran capacidad proliferativa, y la habilidad de diferenciarse in vitro en linajes de las tres capas germinativas incluyendo osteoblastos, células neurales y hepatocitos. <sup>(9)</sup>

Las células de la papila apical (stem cells from the apical papilla, SCAP) se encontraron en tejido de la papila, en la parte apical de las raíces de los dientes en desarrollo. Comparadas con las DPSCs, las SCAP demostraron una mejor proliferación in vitro y mejor regeneración en la matriz dentinaria cuando son trasplantadas en ratones inmunocomprometidos. <sup>(9)</sup>



Estos tejidos son de gran importancia para la investigación debido a su disponibilidad, por lo cual la obtención de estas células presenta una buena opción de estudio para poder establecer sus potenciales aplicaciones clínicas. <sup>(9)</sup> Todas estas células se describen en la siguiente imagen: **(Fig. 15)**



**Figura 15.** Orígenes de las células troncales adultas en la región oral y maxilofacial. BMSCs: MSCs derivadas de médula ósea del hueso orofacial; DPSCs: Células troncales de la pulpa dental; SHED: Células troncales de dientes deciduos exfoliados humanos; PDLSCs: Células troncales del ligamento periodontal; DFSCs: Células troncales del folículo dental; TGPCs: Células troncales del germen dental; SCAP: Células troncales de la papila apical; OESCs: Células troncales del epitelio oral; GMSCs: MSCs derivados de la encía; PSCs: Células troncales derivadas del periostio; SGSCs: Células troncales derivadas de la glándula salival. <sup>(9)</sup>

### 3.10. Células troncales derivadas de la mucosa bucal

La mucosa bucal es un tejido que proviene de la cresta neural, que es una especialización del ectodermo. <sup>(23)</sup>

La mucosa oral está compuesta de un epitelio escamoso estratificado y un tejido conectivo subyacente constituido por la lámina propia, el cual es un tejido bien vascularizado, y la submucosa, que puede contener glándulas salivales menores, tejido adiposo, haces neurovasculares y tejidos linfáticos dependiendo el sitio. <sup>(9)</sup>



Durante la vida, la mucosa bucal está en constante regeneración, esto debido a la fricción que sufre durante la actividad de masticar y hablar. Usualmente las heridas de la mucosa bucal se curan por regeneración, sin complicaciones y sin dejar cicatriz. <sup>(23)</sup>

Debido a esto, se pensó que la mucosa bucal debería tener una población de células troncales, con gran capacidad de proliferación que pudieran mantener la población. En 2010 se caracterizaron por primera vez las células troncales derivadas de la lámina propia de la mucosa bucal. <sup>(24)</sup>

Hasta la fecha se han identificado dos tipos diferentes de células troncales humanas adultas en la mucosa oral. <sup>(9)</sup>

Las primeras son las células troncales progenitoras del epitelio oral, las cuales son una subpoblación de pequeños queratinocitos orales (más pequeños de 40µm). Pueden sólo crecer en células epiteliales, poseen clonogenicidad y la capacidad de regenerar un injerto de mucosa oral *ex vivo* altamente estratificado y bien organizado, el cual sugiere que las células pueden ser de utilidad para injertos intraorales. <sup>(9)</sup>

Las otras células troncales de la mucosa oral han sido identificadas en la lámina propia de la encía, las cuales se adhieren directamente al periostio del hueso subyacente sin submucosa intermedia. La encía subyacente a la cresta alveolar y a la región retromolar, es reseca frecuentemente durante el tratamiento dental general y a menudo puede ser obtenido como una muestra biológica descartada. En 2009, Zhang *et al.*, fueron los primeros en caracterizar a las células troncales mesenquimales derivadas de la encía humana (human gingiva-derived MSCs o GMSCs), las cuales exhiben clonogenicidad, autorenovación y capacidad de diferenciación multipotente similar a las células troncales derivadas de la médula ósea (BMSCs). <sup>(9)</sup>

Las GMSCs proliferan más rápido que las BMSCs, muestran una morfología estable y no pierden sus características de MSC. <sup>(9)</sup>



Recientemente, se ha reportado una población parecida a célula troncal multipotente de la cresta neural denominada célula troncal de la mucosa oral (oral mucosa stem cells, OMSCs), que se puede generar de manera productiva de la lámina propia de la encía humana adulta. <sup>(9)</sup>

La multipotencia de las GMSCs/OMSCs, su fácil aislamiento, abundancia clínica y expansión rápida *ex vivo*, como fuente de células troncales, provee de una gran ventaja para aplicaciones clínicas potenciales. <sup>(9)</sup>

Estas células presentan una gran capacidad de proliferar, expresan marcadores tanto de células troncales embrionarias, como de troncales mesenquimales; su eficiencia de expansión *in vitro* y de diferenciación es muy amplia ya que se han obtenido células derivadas de las tres capas embrionarias *in vitro* y teratomas bilineales (ectodermo y mesodermo) *in vivo*. <sup>(23)</sup>

### 3.11. Factores de Pluripotencia

Los genes de pluripotencialidad fueron descubiertos, clonados y caracterizados en el periodo entre 1990 y 2003. En total fueron identificados más de 100 genes involucrados en estos procesos. <sup>(12)</sup>

Dos hallazgos notables de estos estudios fueron que, un grupo de sólo tres genes (Oct4, NANOG, Sox2) controlan el circuito total de los genes de pluripotencialidad y que, en este circuito transcripcional también juegan un papel importante los genes conocidos por su contribución a la cancerogénesis, tales como SSEA4, c-Myc y Klf4. <sup>(12)</sup>



### 3.11.1. Oct4(POU5F1):

Oct4 es un factor de transcripción embrional de unión al motivo octamer. Pertenece a la familia POU de factores de transcripción específicamente expresados en ESC, en el embrión temprano y en células germinales. En estas células, tiene un rol vital en la regulación y mantenimiento de la pluripotencia, por lo que es usualmente usado como un marcador de pluripotencia y de autorenovación. Fue originalmente designado como Oct3, Oct  $\frac{3}{4}$ , OTF3 y OTF4. <sup>(12) (25) (26)</sup>

El Oct4 humano puede generar tres isoformas principales, los cuales son Oct4A, Oct4B y Oct4B1. Se ha confirmado que Oct4A es un factor de transcripción responsable de las propiedades de troncalidad. En cambio, Oct4B no tiene la capacidad de sostener la autorenovación de las células troncales embrionales, pero responde al estrés celular. Su ausencia en embriones causa la muerte en útero en estadios de pre-implantación. <sup>(25) (26)</sup>

La función de Oct4 es importante para los primeros eventos de diferenciación del embrión en estadios entre mórula y blastocisto. La ausencia de Oct4 en embriones provoca la muerte al momento de la implantación, la pérdida de Oct4 cambia el destino de las células internas del blastocisto en embriones de ratón. Los niveles de expresión de Oct4 en el embrión temprano dictan si las células pertenecen a la ICM (Masa Celular interna, Inner Cell Mass) (nivel alto) o al trofotodermo (nivel bajo). El papel de Oct4 (junto con Sox2 y NANOG) en las células de la masa interna y de las células del epiblasto (también denominado ectodermo primitivo) es preservar la pluripotencialidad y autorenovación. <sup>(12) (27) (28)</sup>

La expresión de Oct4 baja su regulación cuando las ESCs están a punto de diferenciarse, y su expresión se pierde en células somáticas normales de tejidos diferenciados. Se ha demostrado que Oct4 es el factor más importante para formar células iPS, ya que c-Myc puede ser omitido, Sox1 puede reemplazar a Sox2, Klf2 o Klf5 pueden reemplazar a Klf4; sin embargo, Oct4 no puede ser reemplazado por otros miembros de la familia de Oct. <sup>(27)</sup>



### 3.11.2. Sox2:

Es miembro de la familia Sox (SRY-related HMG-box), molécula de 34kDa que parte de una familia de factores de transcripción expresados en ESC, en células germinales y algunas SC adultas, específicamente del sistema nervioso. Su importancia quedó firmemente establecida con el descubrimiento de que, al eliminar ambos alelos de Sox2 produce letalidad embrionaria en ratones.

La ausencia de Sox2 en embriones causa la muerte debido al desarrollo fallido del epiblasto. El interés por Sox2 aumentó drásticamente con el descubrimiento de Takashi y Yamanaka, donde demostraron la conversión de fibroblastos embrionarios de ratón a una célula troncal pluripotente inducida (iPS), por la expresión ectópica de Sox2 junto con Oct4, Klf4 y c-Myc. Tal como Oct4, Sox2 es indispensable para mantener la pluripotencialidad de ESC, pero con la distinción de que Sox2 además tiene funciones en células que no son pluripotenciales.<sup>(12) (28) (29)</sup> Por otra parte, la expresión ectópica y la amplificación de este gen ha sido asociada con la presencia y desarrollo de cáncer en múltiples tejidos, como en pulmón y mamas.<sup>(29) (30)</sup>

Los diferentes roles en los que participa Sox2 en las redes regulatorias consisten en la influencia de factores de transcripción, micro RNAs, reguladores epigenéticos y hasta en moléculas de señalización.<sup>(29) (30)</sup>

En estadios embrionales Sox2 puede diferenciar directamente a las ESCs en destinos de neuroectodermo; mientras que Oct4 y NANOG promueven específicamente a mesoendodermo. EL efecto de Sox2 en la autorenovación y diferenciación de las ESCs es altamente dependiente, lo que sugiere que su expresión necesita ser balanceada con otros cofactores, en orden de mantener la pluripotencia. La expresión de Sox2 es controlada en muchos diferentes niveles, como a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional.<sup>(30)</sup>



### 3.11.3. NANOG

Es un factor de transcripción homeobox, que tiene un papel importante en el destino de las células troncales embrionales y su autorenovación. <sup>(31)</sup> En humanos, el gen de NANOG está localizado en el brazo corto del cromosoma 12, la región promotora de NANOG tiene 299 bp de largo, esta región contiene motivos de unión a Oct4 y Sox2; forma homo y heterodímeros con Oct4 y Sox2 por medio de su dominio rico en triptófano, el cual es esencial para la autorenovación y pluripotencia de las ESCs. <sup>(32)</sup>

Los genes homeobox son un grupo de genes con una secuencia de DNA común, que están relacionados con la diferenciación celular durante el desarrollo embrional. NANOG es una proteína de 305 aminoácidos de largo con un peso molecular de 34.6 kDa. <sup>(31)</sup>

NANOG fue identificado inicialmente por dos grupos durante algunas pruebas de detección para identificar factores que no necesitan de un factor inhibidor de leucemia (LIF) para mantener la pluripotencia. <sup>(32)</sup>

Se expresa específicamente en ESC's manteniendo su autorrenovación y pluripotencialidad. La inhibición de la expresión de NANOG en cultivos de ESCs resulta inmediatamente en su diferenciación. Los blastocistos deficientes en NANOG muestran morfología normal, pero la ICM sólo produce células parecidas al endodermo parietal. <sup>(12) (33)</sup>

EL rol significativo de NANOG para mantener la pluripotencia empieza cuando los factores más importantes Oct4, Sox2 no pueden soportar la carga de autorenovación de las células troncales embrionarias. Además, la transición de estado pre-iPS a estado iPS, requiere un reclutamiento de factores de reprogramación mediados por NANOG. Estos hallazgos sugieren que NANOG actúa como un "gen maestro", orquestando un encendedor molecular hacia un estado puramente indiferenciado. <sup>(31)</sup>



#### 3.11.4. c-Myc

c-Myc pertenece a una familia de protooncogenes que incluye a L-Myc, a N-Myc y a c-Myc, los cuales se relacionan con el origen de diversas neoplasias en seres humanos. El gen más ampliamente estudiado de esta familia es c-Myc, que fue el primero en ser descubierto, mediante su homología con el gen transformante del virus de la mielocitomatosis aviar MC29 (v-Myc). La mutagénesis de inserción retroviral identificó a c-Myc como un oncogén mayor. Por otra parte, se encontró que el gen de c-Myc se encuentra alterado en diversos tumores sólidos, como en leucemias y linfomas, así como en diferentes tumores en animales. <sup>(34)</sup>

El gen de c-Myc codifica para la proteína c-Myc de peso molecular entre 64 y 74 kDa constituida por 439 aminoácidos, además se tiene interés particular en las diferentes funciones de dos productos alternativos del gen que son: c-Myc 1 y c-Myc 2. La proteína c-Myc2 estimula el crecimiento celular, mientras que c-Myc 1 lo suprime. <sup>(34)</sup>

Estos genes actúan como factores de transcripción y participan en la regulación del ciclo celular en varios tipos de células, tanto normales como tumorales (actúa en la inhibición de la expresión de genes supresores de tumores, que controlan el paso de la fase G1 a la fase S en el ciclo celular). <sup>(12) (35)</sup>

Está documentado que c-Myc participa en la iniciación de tumores, un descenso en la expresión de c-Myc en líneas celulares con cáncer establecido *in vitro*, muestran una reducción en la proliferación celular y en algunas ocasiones induce apoptosis. Además de su rol en la formación de tumores, c-Myc fue también identificado como uno de los cuatro genes que incluye a Sox2, Oct4 y Klf4, que pueden colectivamente reprogramar fibroblastos a células troncales pluripotentes. (Takahashi y Yamanaka) 2006). <sup>(35)</sup>





### 3.11.5. Klf4

También conocido como *gut-enriched Krüppel-like factor (GKlf)*, pertenece a una familia conservada de factores de transcripción (SP/KLF factors) con 3 motivos de dedos de zinc dentro de sus secuencias de carboxilo terminal, importante en la regulación de múltiples procesos biológicos tales como la diferenciación, la proliferación y la apoptosis. <sup>(12) (36)</sup>

Klf4 contiene 483 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 53kDa. Varias variantes del gen de Klf4 han sido identificadas en células normales y con cáncer. <sup>(36)</sup> Su regulación es mediada por genes de transactivación en múltiples niveles, modulando a KLF4 por fosforilación, acetilación, metilación y ubiquitización dependiendo de donde se encuentre. <sup>(36)</sup>

Uno de los principales roles de Klf4 en la célula, es el promover la supervivencia celular al suprimir la apoptosis. Se ha encontrado que Klf4 suprime la vía apoptótica dependiente de p53 al inhibir directamente a TP53 y la supresión de la expresión de BAX. <sup>(36)</sup>

En los últimos años, Klf4 ha ganado notoriedad gracias a su rol como uno de los cuatro factores requeridos para inducir células troncales pluripotentes. Klf4 participa en un rol dual durante la inducción de la pluripotencia, inicialmente reprimiendo marcadores de diferenciación y facilitando la expresión de genes de pluripotencia en estadios tardíos. Por sí mismo, se ha demostrado que es directamente regulado por el factor inhibidor de leucemia. <sup>(36)</sup>





### 3.11.6. SSEA4

SSEA-4 (Stage Specific Embryonic Antigen-4) es un marcador de células troncales embrionales, es un gangliósido que consiste en un glicoesfingolípido que contiene un residuo ácido N-acetilneuraminico. Es sintetizado a partir de SSEA3 por la enzima ST3GAL2). La expresión de SSEA4 sufre cambios cualitativos y cuantitativos durante el desarrollo, diferenciación y tumorigénesis. <sup>(37)</sup>

Durante el desarrollo de preimplantación humana, SSEA3 y 4 son los primeros observados en las células pluripotentes de la masa celular interna y se pierde en la diferenciación. La promoción o inhibición de la tumorigénesis por medio de glicosilación, es de crucial importancia en los estudios de investigación de cáncer. Algunos estudios muestran que SSEA4 está implicado en la malignidad de algunos cánceres, así como en la invasión y en la metástasis. Su expresión está asociada al incremento en el potencial metastático y en el pronóstico malo de cáncer renal, oral, de mama y de pulmón. <sup>(37)</sup>

Se ha documentado que es capaz de aislar MSCs genuinos de la médula ósea. La expresión de SSEA4 fue también detectada en placenta, ligamento periodontal, pulpa dental y membrana sinovial derivada de MSCs. <sup>(38)</sup>

SSEA4 ha sido usado previamente como marcador para distinguir células embrionales primitivas humanas de carcinoma y células troncales embrionales. En tejidos dentales, se ha encontrado en células de la pulpa dental de dientes permanentes. <sup>(39)</sup>

## 3.12. Marcadores Mesenquimales para Células Troncales

Las células troncales para poder ser identificadas como tales deben tener un cierto fenotipo. Ya que las células troncales mesenquimales (MSC) pueden provenir de cualquier tejido adulto, su inmunofenotipo ha sido más difícil de determinar. Este fenotipo suele cambiar dependiendo del tipo de célula troncal o del tejido adulto del



cual fueron aisladas. Un número de moléculas han sido sugeridas como marcadores mesenquimales, entre ellos están Stro-1, CD271 y CD146. <sup>(38)</sup> El consenso actual es que deben ser positivos a CD73, CD105 y CD90 y negativos a CD45, CD34, CD14, CD79a y HLA-DR. <sup>(13)</sup> <sup>(38)</sup>

### 3.12.1. Stro-1

STRO1 es uno de los marcadores mejor conocidos para células troncales mesenquimales. Fue descubierto a principios de los 70s, en células troncales y estromales, tiene un peso molecular aproximado de 75kDa.. El anticuerpo para Stro-1 es producido por uno de los muchos hibridomas, que fue generado por ratones inmunizados intra-renalmente con CD34 humano de células de la médula ósea. Análisis adicionales identificaron al anticuerpo Stro-1 como un isotipo de IgM. <sup>(40)</sup>

En el cuerpo humano, Stro-1 existe en muchos órganos como en hígado y pulmón, además de que se ha observado su expresión en endotelio. <sup>(40)</sup> <sup>(41)</sup> Un subconjunto de células de médula enriquecidas con Stro-1, pueden diferenciarse en linajes mesenquimales, incluidas las células estromales de soporte de hematopoyesis con un fenotipo vascular de tipo músculo liso, adipocitos, osteoblastos y condrocitos.

### 3.12.2. CD73 (ecto-5'-nucleotidasa):

CD73 (también conocida como ecto-5'-nucleotidasa, E5NT, NT, NT5, NTE, eN y eNT) es una proteína de adhesión anclada a glicosil fosfatidilinositol (GPI), que cataliza la desfosforilación de nucleótidos purinas y pirimídicos a su correspondiente nucleósido bioactivo. CD73 es un dímero de dos subunidades idénticas, que dependen de GPI para unirse con la cara externa de la membrana plasmática.

Al igual que otras proteínas ancladas a GPI, D73 es mediador de señales de coestimulación en la activación de células T.



Se encuentra unida a la cara externa de la membrana plasmática. También se cree que participa en las interacciones estromales de la médula ósea, migración de MSC y modulación de la inmunidad por parte de las MSC. <sup>(42)</sup>

### 3.12.3. CD90(Thy-1):

Es un marcador designado como Thy-1, también conocido como CDw90, es una glicoproteína de superficie celular anclada cuando se coexpresa con CD34 en las células de la médula ósea normal humana. Ésta identifica una subpoblación que incluye células troncales pluripotentes y hematopoyéticas.

Su función no está bien definida, pero se ha propuesto que participa en interacciones célula-célula, como la adhesión de monocitos al endotelio y a fibroblastos y también en la adherencia al estroma de células CD34+. <sup>(42)</sup>

### 3.12.4. CD105(Endogлина):

Endogлина también designado CD105 y ALK-1 (activin receptor like kinase 1, también designada de la superfamilia RI), que desempeña una función en la señalización durante la angiogénesis y durante la diferenciación de células mesenquimales a condrocitos. <sup>(13)</sup>

Endogлина y ALK-1 son miembros tipo III y tipo I de la superfamilia de receptores TGF- $\beta$  respectivamente, que son expresados en células endoteliales.

Los tres marcadores (CD90, CD105 y CD73), no nos indican ninguna función troncal, pero la combinación de los tres nos ayuda a identificar células en nichos celulares específicos dentro de los tejidos adultos, mismas que, usualmente, se considera que se encuentran alrededor de capilares. <sup>(13)</sup>



### 3.12.5. CD34:

Es una glucoproteína situada en la superficie celular, que actúa como molécula de adhesión y se expresa selectivamente en las células madre precursoras de la hematopoyesis. Regula el apego a células madre a la matriz extracelular de la médula ósea o directamente a células estromales. Clínicamente está asociado con la selección y enriquecimiento de células troncales hematopoyéticas para trasplantes de médula ósea.

Sus anticuerpos son usados para cuantificar y purificar células troncales hematopoyéticas progenitoras para investigación y para trasplantes de médula ósea. <sup>(43)</sup>

### 3.12.6. CD45:

Es una proteína tirosina fosfatasa que se encuentra presente en todos los leucocitos, con una mayor expresión en los linfocitos. Es un marcador de linaje linfocítico T; es una proteína que se requiere para la activación de las células T. El estudio de la expresión de este antígeno de superficie por citometría de flujo es de particular importancia, ya que permite distinguir el linaje celular y también inferir el estadio de maduración de la mayoría de las células hematopoyéticas. <sup>(43)</sup>

### 3.12.7. HLA-DR:

También conocido como el complejo mayor de histocompatibilidad clase II, es parte del complejo que presenta antígenos al sistema inmune adaptativo. También forma parte del sistema de reconocimiento de lo propio contra lo extraño, por lo que suele ser uno de los causantes de rechazo en los trasplantes de órganos. <sup>(43)</sup>

Las fuentes de MSC han sido identificadas en los tejidos orales, al igual que su capacidad de diferenciación, los marcadores a los que responden y sus factores de pluripotencia. <sup>(12)</sup> **(TABLA 1)**



Células Troncales	Expresión de Antígeno CD		Otros Marcadores Importantes	Capacidad de diferenciación <i>In vitro</i>	Capacidad de Formación de tejidos <i>In vivo</i>
	Positivo	Negativo			
<b>DPSCs (Dental Pulp Stem Cells)</b>	CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49d, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166	CD14, CD31, CD34, CD45, CD117, CD133	STRO-1, Nestin	Dent (od), mes (os, ad, cho, myo), ect (neu)	Dent (dentin, Pulp), mes (adipose, muscle)
<b>SHED (Stem Cells from human exfoliated deciduous teeth)</b>	CD13, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146	CD14, CD19, CD34, CD43, CD45	STRO-1, Oct-4, NANOG, Nestin, SSEA-3, SSEA-4	Dent (od), mes (os, ad, cho, myo, endo), ect (neu)	Dent (dentin), mes (bone, microvessel)
<b>PDLSCs (Periodontal ligament Stem Cells)</b>	CD9, CD19, CD13, CD29, CD44, CD49d, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166	CD31, CD34, CD45	STRO-1, Scleraxis	Dent (cem), mes (os, ad, cho), ect (neu)	dent (cementum, PDL), mes (hueso alveolar)
<b>DFSCs (Dental Follicle Stem Cells)</b>	CD9, CD19, CD13, Cd29, CD44, CD49d, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166	CD31, CD34, CD45, CD133	STRO-1, HLA class 1	Dent (cem), mes (os, ad, cho), ect (neu)	dent (cementum, PDL), mes (hueso alveolar)
<b>TGPC (Tooth Germ Progenitor Cells)</b>	CD29, Cd44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166	CD14, CD34, CD45	STRO-1, Oct-4, NANOG, HLA class 1	Mes (os, ad, endo), ect (neu), end (help)	Mes (bone)
<b>SCAP (Stem Cells from the Apical Papilla)</b>	CD49d, CD51/61, CD56, CD73, CD90, CD106, CD146, CD166	CD14, CD18, CD34, CD45, CD117, CD150	STRO-1, Nestin, Survivin	Mes (ad), ect (neu)	Dent (dentin, Pulp)
<b>GMSCs (Gingiva Derived MSCs) OMSCs (Oral Mucosa- Derived Stem Cells)</b>	CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166	CD34, CD45, CD117	STRO-1, Oct-4, NANOG, Nestin, SSEA-4, HLA-ABC, Sox-2, Tra2-49, Tra2-54	Mes (os, ad, cho), ect (neu, glia cell), end (definitive endoderm cell)	Mes (bone, cartilage, fat, muscle), ect (epithelia, neural tissue)

**Tabla 1.** PDL: Linajes de diferenciación del Ligamento Periodontal, dent (Linaje Dentinogénico), mes (Linaje Mesodérmico), ect (linaje ectodérmico), end (linaje endodérmico), od (odontoblasto), os (osteoblasto), ad (adipocito), cho (condrocito), myo (mioblasto), neu (célula neuronal), endo (célula endotelial), cem (cementoblasto), hep (hepatocito). (9)



Entre marcadores de importancia están los factores asociados a mineralización, cartílago y a tejido adiposo.

### 3.13. Factores Asociados a Mineralización

El cemento contiene muchas proteínas no colágenas, incluyendo unas fosfoproteínas mayores que son osteopontina y sialoproteína ósea. Estas proteínas participan en rellenar espacios, creados durante el ensamblaje de colágena y permitiendo la deposición mineral que se esparce a través de una malla entera de colágena. <sup>(17)</sup>

El rol propuesto para estas proteínas es, que son reguladoras de la nucleación y del crecimiento de cristales de hidroxapatita. Además, se sugiere que osteopontina y la sialoproteína ósea son necesarias para la iniciación de la formación de cristales en las fibrillas altamente ordenadas de colágeno tipo I y II. <sup>(17)</sup>

#### 3.13.1. BSP (Sialoproteína Ósea)

La sialoproteína ósea o BSP es miembro del grupo de proteínas denominado SIBLING. Es una glicoproteína fosforilada de alrededor de 327 aminoácidos, con altos niveles de ácido glutámico. Esta proteína sólo se expresa en tejidos mineralizados como el hueso, cemento, durante estadios tempranos del desarrollo de la raíz y en el diente maduro, así como también en el cartílago hipertrófico y en calcificaciones patológicas. Es una proteína quimioatrayente de precementoblastos, que promueve su adhesión y diferenciación. Se ha demostrado que tiene una alta afinidad a la colágena tipo I con sitios de interacción específicos. <sup>(17)</sup>

#### 3.13.2. OPN (Osteopontina)

La osteopontina es la unión de dos palabras que son: “osteo” y “pontina”, la cual es usualmente nombrada para caracterizar su papel de enlace de las células óseas al hueso extracelular. <sup>(44)</sup>



OPN es una glicoproteína ácida de 34 kDa, después de ser secretada de la célula sufre modificaciones post-traduccionales, dando como resultado, un peso molecular de 44 a 75kDa. OPN es altamente expresado en osteoblastos y osteoclastos, con un rol importante en la biomineralización, además de estar implicado en varias funciones fisiológicas, incluyendo inflamación crónica y biología tumoral. <sup>(44)</sup>

### **3.14. Factor Asociado a Cartílago**

#### **3.14.1. Colágena tipo II**

La colágena tipo II se encuentra en el cartílago y sólo en algunos sitios, incluyendo la córnea, el vítreo y la notocorda, así como en el núcleo pulposo de los discos vertebrales. La colágena tipo II está compuesta de una mezcla de algunas fibrillas de unos 100 nm de diámetro y otras de 20nm de diámetro. La variedad más pequeña es corta y no tiene las características distintivas de bandas cruzadas de las fibrillas largas. Esta red de fibrillas de colágena permite al cartílago que atrape el agregado de proteoglicano, así como también proporciona resistencia a la tracción al tejido. <sup>(45)</sup>

La colágena tipo II es la base del cartílago articular y del cartílago hialino, está formada por homotrímeros de colágena, tipo II, cadenas alfa 1. Por lo que constituye el 50% de todas las proteínas en cartílago y en un 85% de colágena de cartílago articular. La administración oral de colágeno de tipo II nativo induce tolerancia oral a las respuestas inmunes patológicas y puede ser útil en la artiritis. <sup>(45)</sup>

### **3.15. Factor Asociado a tejido adiposo**

#### **3.15.1. LPL(Lipoproteína Lipasa)**

La enzima lipoproteína lipasa (LPL), fue originalmente identificada como un factor de depuración lipasa, que hidroliza triglicéridos presentes en lipoproteínas VLDL (very low density lipids) y en quilomicrones. La lipólisis es llevada a cabo por esta



proteína. LPL es expresado principalmente en tejidos que oxidan o almacenan ácidos grasos en grandes cantidades como el corazón, músculo esquelético, tejido adiposo café y blanco. También se ha demostrado que, la actividad de LPL es requerida para el mantenimiento de células troncales progenitoras hematopoyéticas (HSPC).<sup>(46) (47)</sup>

### 3.16. Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)

Este gen codifica para un miembro de la familia de las proteínas gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Se ha identificado la función de la proteína codificada, la cual es su capacidad para realizar funciones mecánicamente distintas. El producto de este gen cataliza un paso importante para producir energía, en el metabolismo de los carbohidratos, por medio de la fosforilación oxidativa reversible de gliceraldehído 3-fosfato en la fosforilación oxidativa, en la presencia de NAD (Nicotinamida adenosin dinucleótido).<sup>(48)</sup>

Participa en la glucólisis, donde cataliza el primer paso de la vía al convertir D-gliceraldehído 3-fosfato, en 3-fosfo-D-glicerol fosfato. Además de tener funciones nucleares, participa en eventos en el núcleo incluyendo transcripción, transporte de RNA, replicación del DNA y apoptosis. Modula la organización y el ensamblaje del citoesqueleto.<sup>(48)</sup>

Además, se ha identificado que tiene actividad uracil DNA glicosilasa en el núcleo y esta proteína contiene un péptido que tiene actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*.<sup>(48)</sup>





#### **4. Planteamiento del Problema**

La proteína CEMP-1 ha sido relacionada a varios procesos biológicos, como proliferación celular, biomineralización y en varias vías de señalización celular. <sup>(49)</sup> Se ha descubierto que tiene relación con la activación de células troncales, en las cuáles están relacionados varios factores de pluripotencia. <sup>(12)</sup> Pero no se tiene claridad de la relación directa de CEMP1 en cuanto a la inducción del fenotipo troncal mesenquimal y la expresión de factores de pluripotencia.

#### **5. Justificación**

CEMP1 ha demostrado ser una proteína con cualidades regenerativas e inductoras de procesos biológicos, por lo que demostrar si los HGF transfectados con el gen que codifica para CEMP1 promueve positivamente la expresión de marcadores de pluripotencia, permitirá ampliar las opciones terapéuticas asociadas a la regeneración tisular utilizando células troncales de fácil adquisición como son los fibroblastos derivados de la encía humana. <sup>(1)(6)(9)</sup>

#### **6. Hipótesis**

Las células HGFs transfectadas con el gen que codifica para CEMP1 inducirán la expresión de los factores de pluripotencia Oct4, Sox2, NANOG, c-Myc, Klf4 y SSEA4, así como la expresión de factores asociados a tejido mineralizado (BSP, PTPLA/CAP, OPN y CEMP1), factor asociado a cartílago (colágena tipo II) y factor asociado a tejido adiposo LPL.



## 7. Objetivos

### 7.1. Generales

Determinar si el gen que codifica para CEMP1 transfectado en la población celular de fibroblastos humanos derivados de la encía humana, regula positivamente diversos factores de pluripotencialidad y aquellos asociados a tejidos mineralizados, adiposo y cartílago.

### 7.2. Específicos

- Determinar la expresión del producto génico de factores de pluripotencia Oct4, Sox2, NANOG, c-Myc, Klf4 y SSEA4.
- Determinar la expresión del producto génico de factores asociados al proceso de mineralización como lo son sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN), CEMP1 y PTPLA/CAP.
- Determinar la expresión del producto génico de factores asociados a cartílago como lo es la colágena tipo II.
- Determinar la expresión del producto génico de factores asociados a tejido adiposo como lo es LPL.



## 8. Metodología

### 8.1. Cultivo Celular:

Los fibroblastos derivados de la encía humana se obtuvieron por medio del método de explante y se cultivarán en cajas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con Suero Fetal Bovino al 10% y antibióticos (100 µg/ml estreptomicina y 100 UI/ml penicilina, Sigma Chemical CO, Saint Louis MO). Las células se incubaron en un ambiente con 100% de humedad a 37°C, 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.

### 8.2. Aislamiento/Construcción de pcDNA40-CEMP1 que expresa el vector y la transfección en fibroblastos humanos derivados de la encía:

La región codificante de CEMP1, (GenBank Accession No. NM\_001048212) fue subclonada en el vector pENTR/SD/D (Invitrogen, Carlsbad, CA). El resultante pENTR/SD/D-CEMP1 cDNA construido fue ligado al vector pcDNA40 (+) [CEMP1-pcDNA40 (+)] (Invitrogen, Carlsbad, CA). El plásmido pcDNA40-CEMP1, fue transfectado en HGF (HGF/CEMP1) usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se seleccionaron las células que expresaron establemente el gen CEMP1 con G418 600 µg/mL, (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) hasta por ocho semanas.

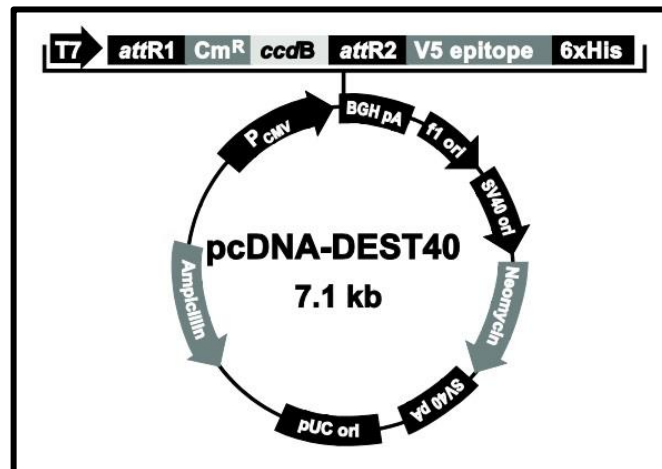


Figura 16. Mapa de pcDNA-DEST40. El DNA del clon entrante reemplaza la región entre las bases 918 y 2601. (Invitrogen, Carlsbad, CA)

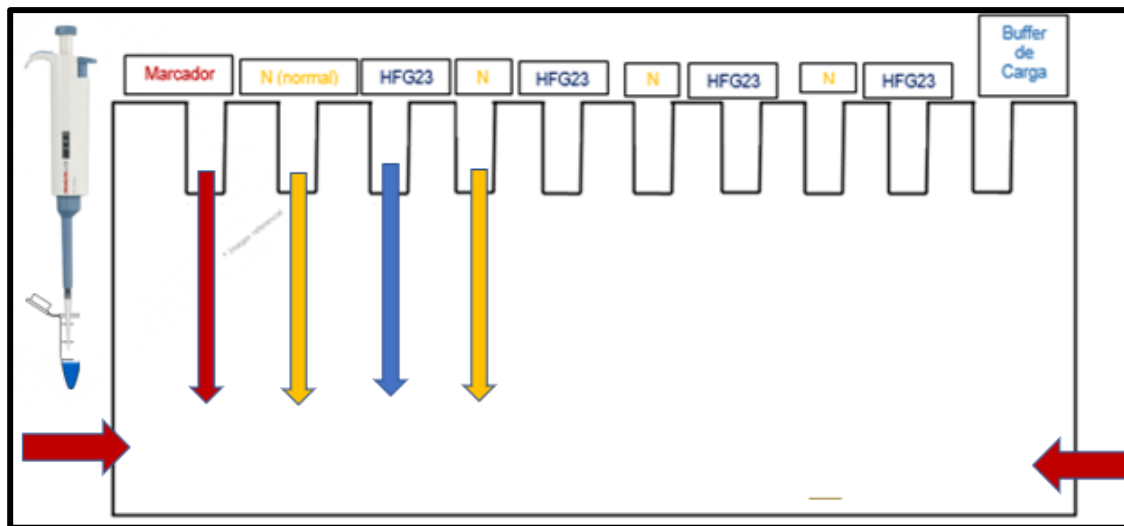
### 8.3. Western Blot:

Para determinar la expresión a nivel traduccional, los fibroblastos derivados de la encía humana han sido transfectados con el gen que codifica para CEMP1. Para que expresen este factor establemente, se cultivaron hasta llegar a confluencia. El lisado celular se obtuvo utilizando amortiguador de lisis frío (1mM EDTA, pH 8.0, 10mM Hepes, 50mM NaCl, 0.5% Tritón X-100, 1mM fenil-feni-metil-sulfonil fluoriro, 5µM leupeptina y 10µg/µl aprotinina), posteriormente se sonicaron y centrifugaron por 5min a 2,000rpm. El sobrenadante se separó y se colocó en un tubo nuevo. La cuantificación de proteínas se realizó por método de Bradford.

#### 8.3.1. Preparación de las Proteínas.

Como controles se utilizó una población heterogénea de fibroblastos derivados de la encía humana, que no han sido transfectados con el vector vacío.

Para cada proteína que se midió se usó 3.9µl de buffer de carga + 3.9µl de nuestra muestra transfectada. La muestra del estándar de proteínas llevó 10 µl y se agregó el volumen de la proteína equivalente a 30 µg (**Fig.16**)



**Figura 17.** Esquema que representa el ordenamiento de muestras en gel de Poliacrilamida. Se señala el marcador y buffer de carga. También se ve cómo serán llevadas las muestras desde el tubo eppendorf por medio de micropipetas hasta el gel.



### 8.3.2. Preparación del Gel.

Se preparó 1 gel de poliacrilamida al 7.5%, 5 al 12%, 1 gel de 10%. **(TABLA 2.)**

En un vaso de precipitado se colocaron los reactivos para hacer el gel separador y se dejó reposar 10-15 min para gelificación completa. Posteriormente, se preparó en otro vaso de precipitado la solución para el gel concentrador entre 15 y 20 min.

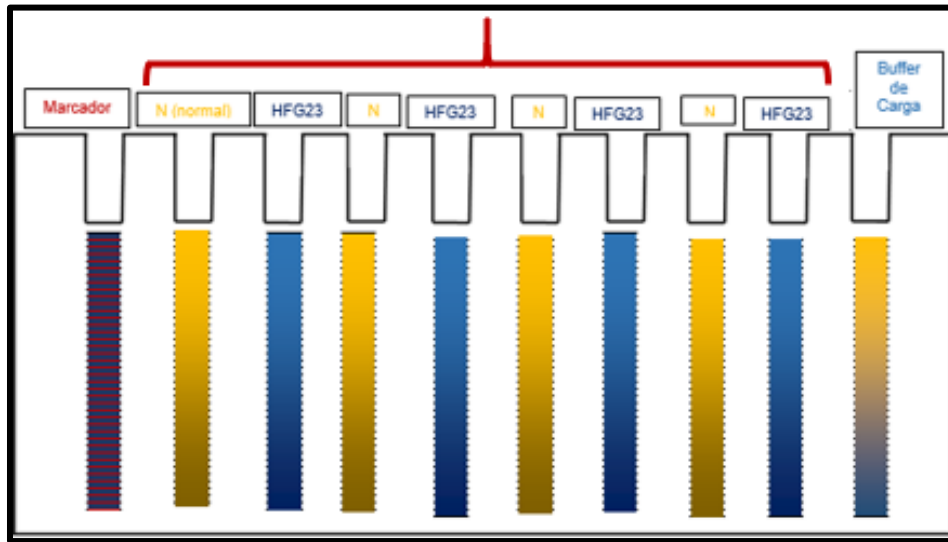
#### Elaboración del gel separador y gel concentrador.

Reactivos	Separador (Inferior)					Concentrador (Superior)					
	10										
Para dos geles	7.5%	10 %	12 %	15%	20%	Para dos geles	7.5%	10%	12%	15%	20%
Acrilamida-Bis	2.5ml 	3.3ml 	4.1ml 	5.12 5ml	5.8ml	Acrilamida-Bis	0.8ml 	1ml	1.25 ml	1.56 ml	1.8ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.5ml 	2.5ml 	2.5ml 	3.12 5ml	2.5ml	Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.5ml 	1.5ml	1.5ml 	1.87 5ml	2ml
Agua desionizada	4.2ml 	3.4ml 	2.6ml 	3.25 ml	1.2ml	Agua desionizada	3.04 ml	3.06ml 	2.8 ml	3.5m 	3.6ml
SDS 10 %	0.2ml 	0.2ml 	0.2ml 	0.25 ml	0.2ml	SDS 10 %	60µl	60µl	60µl	75µl	90µl
Persulfato de amonio (APS)	126 µl	85µl	140 µl	165µ 	170 µl	Persulfato de amonio (APS)	20µl	60µl	50 µl	50µl	60 µl
TEMED	12.6 µl	8.5 µl	14 µl	16.5 µl	17 µl	TEMED	4 µl	8µl	10 µl	7.5 µ 	7.4 µl

**Tabla 2.** Preparación del gel separador y gel concentrador dependiendo de la concentración de poliacrilamida

### 8.3.3. Electroforesis

Una vez hechos los geles, se llenó con el Buffer de Corrida en el interior y exterior de los geles. Se colocó en el primer carril marcador Invitrogen con 4 $\mu$ l. En los demás carriles para todos los geles, se colocó un carril con proteína control o en este caso nombrada HGF normal y en el siguiente carril, se colocó la misma proteína transfectada con HGF23.



**Figura 18.** Esquema que representa el ordenamiento de muestras en gel de Poliacrilamida. Se señalan los carriles donde irán las muestras control(N) y las experimentales (HGF23).

Para HGF normal se colocaron 10 $\mu$ l y para HGF23, 15 $\mu$ l. Cuatro en cada gel, cada uno intercalado. **(Fig. 17)** Se activó la electroforesis a 25mA, posteriormente se subió progresivamente hasta 30-35 mA durante 60 min. **(Fig. 18)**



**Figura 19.** A) Cámara de electroforesis armada. B) Centro de Poder encendido con las condiciones seleccionadas.

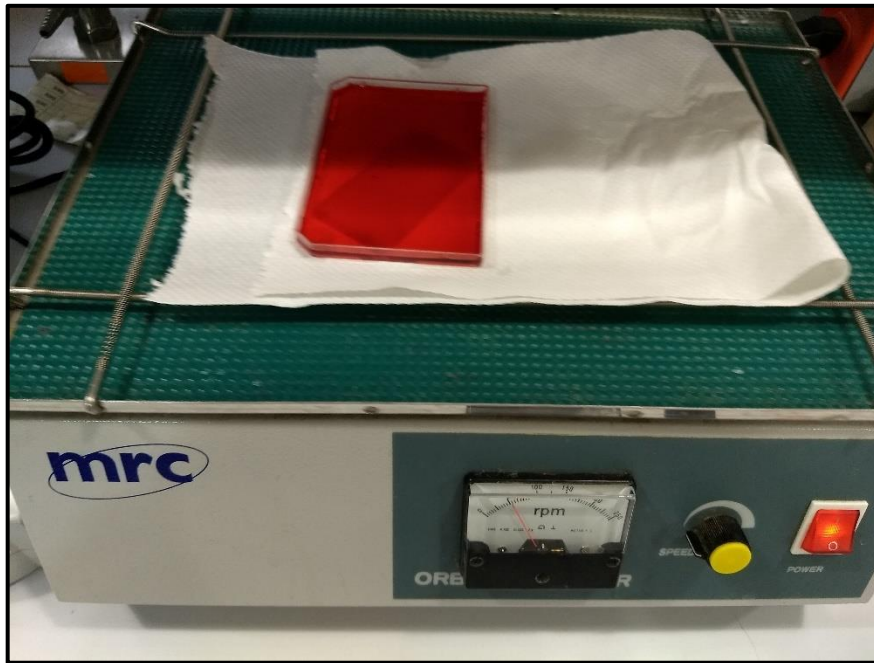


#### 8.3.4. Transferencia:

Posterior a la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de Polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Millipore, USA). Las membranas cortadas se humectaron con metanol por 5 min y se humectaron los filtros con buffer de transferencia.

Los metales de la cámara de transferencia se humectaron con buffer de transferencia. Se colocaron todos los componentes en la cámara de transferencia de la siguiente manera: papel filtro/membrana/gel/ papel filtro. Esto se hace para los dos geles. Se cerró la cámara y el circuito, posteriormente se conectó el centro de poder y se activó la transferencia a 50 V durante 1hr y media.

Inmediatamente después de la transferencia se tiñeron las membranas con solución de Ponceau, para observar de manera adecuada los carriles y cortar las membranas. **(Fig. 19)**



**Figura 20.** Tinción de una membrana de PVDF con rojo de ponceau. (Sigma)



Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% durante 1hr a temperatura ambiente. Se realizarán 3 lavados con TBST (Tris Buffered Saline-Tween).

Se colocaron los anticuerpos primarios policlonales para pluripotencia anti- Oct4, NANOG, Sox2, c-Myc y SSEA4 (Santa Cruz Biotechnology). Para mineralización anti-BSP, CEMP1, OPN y PTPLA/CAP (Santa Cruz Biotechnology), para cartilago anti-Colágena tipo II y para adiposo anti-LPL (Santa Cruz Biotechnology). Las membranas se incubaron durante 12hrs a 4°C en agitación. **(TABLA. 3)**

<u>Factor de Pluripotencia/ Anticuerpo Primario</u>	<u>Peso Molecular</u>	<u>Anticuerpo secundario/Concentración</u>
1. Sox2	34kDa	Rabbit polyclonal 1:3000
2. NANOG	40kDa	Rabbit polyclonal 1:3000
3. Oct4	45kDa Isoforma B 52kDa Isoforma A	Mouse Monoclonal 1:3000
4. SSEA4	43kDa	Mouse Monoclonal 1:2000
5. c-Myc	76kDa	Rabbit polyclonal 1:2000
6. Klf4	53kDa	Rabbit polyclonal 1:3000
<b>Factor asociado a tejido Adiposo</b>		
7. LPL	53kDa	Rabbit polyclonal 1:3000
<b>Factor Asociado a tejido de Mineralización</b>		
8. BSP	33-60kDa	Rabbit polyclonal 1:1000
9. CEMP1 –	50kDa	Rabbit polyclonal 1:2000
PTPLA/CAP –	55kDa	Rabbit Polyclonal 1:3000
10. OPN –	45-65kDa	Rabbit polyclonal 1:3000
<b>Cartilago</b>		
11. Colágena tipo II –	190kDa	Rabbit Polyclonal 1:1000
<b>Control</b>		
12. GAPDH –	25-37Kda	Rabbit Polyclonal 1:2500

**Tabla 3.** Distribución de los primarios y concentración de los anticuerpos secundarios con el peso molecular para cada factor

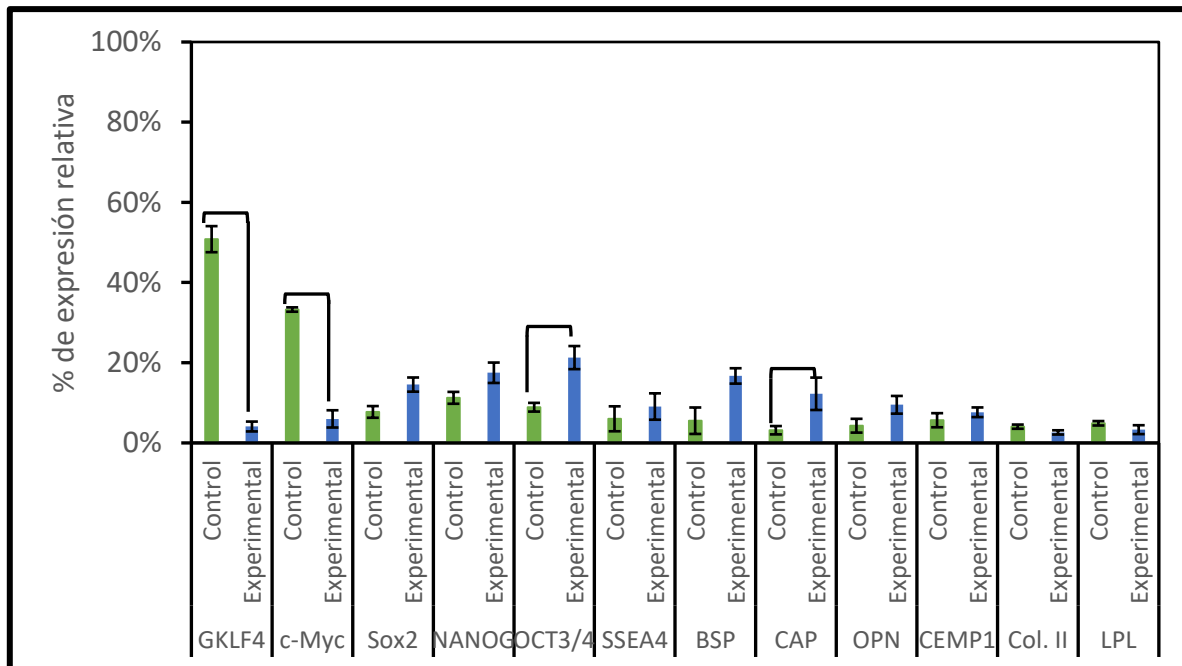




Después se realizaron nuevamente 3 lavados con TBST y las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado, a peroxidasa durante dos horas a temperatura ambiente. Para el revelado se realizaron lavados con TBST y se reveló con diaminobenzidina (Tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB), NiCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PBS). (50)

#### 8.4. Análisis Estadístico

Las membranas se escanearon y se analizaron con el software ImageJ, se determinó la expresión relativa de los productos génicos que se mencionaron anteriormente. Se utilizó GAPDH como producto génico constitutivo y la expresión de los productos génicos de este estudio se compararon contra la expresión de éste. Como controles se utilizó una población heterogénea de fibroblastos derivados de la especie humana que no fueron transfectados. El análisis estadístico se realizó por medio de la prueba estadística T de Student y ANOVA. La p se estableció <0.05. utilizando el software GraphPad (GraphPad Software INC, USA).

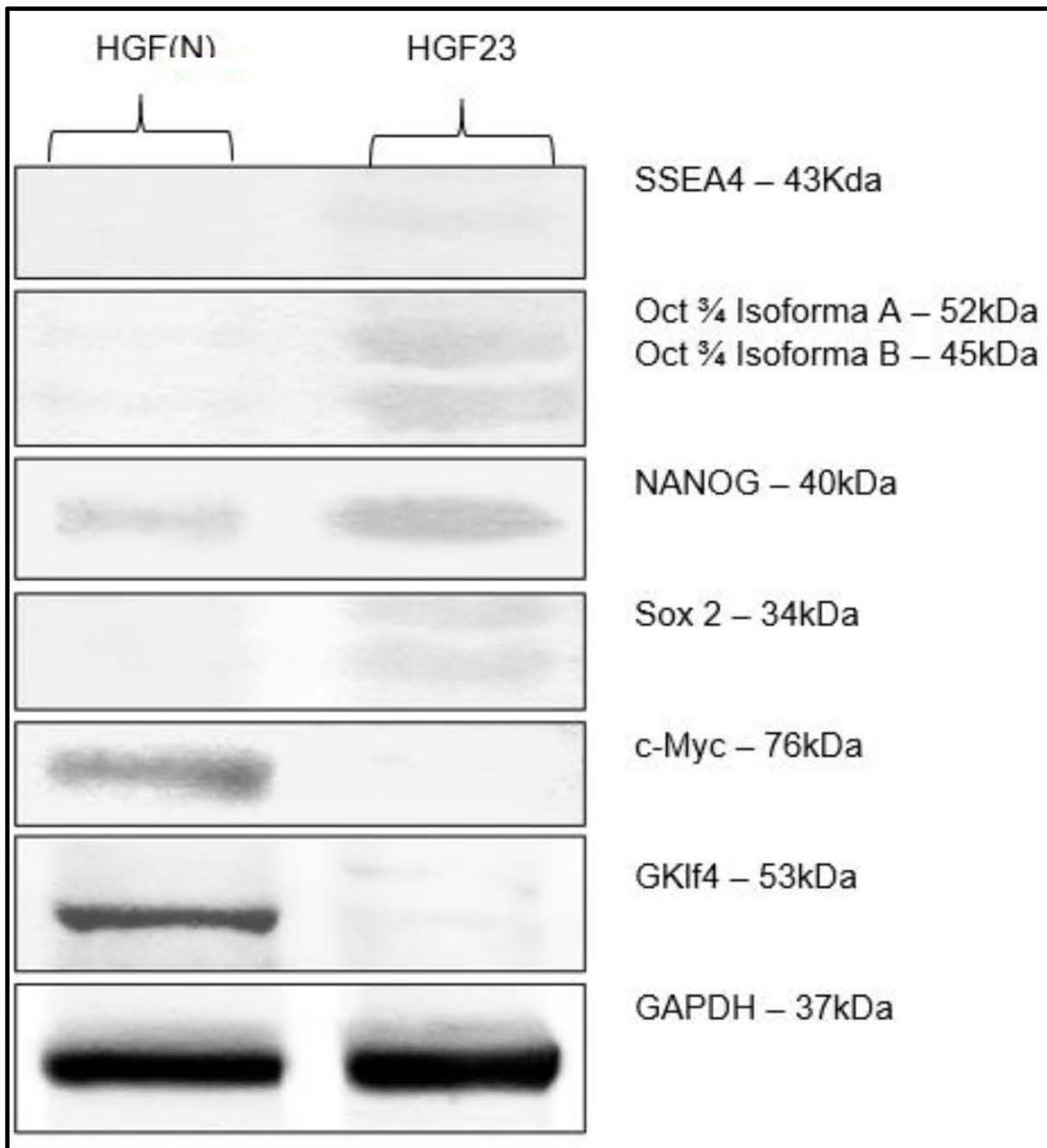


**Gráfica 1.** Se puede observar un panorama general de todos los factores estudiados en este estudio, por medio de la prueba estadística T de Student y ANOVA. Hay algunos factores que tuvieron significancias, que se observan marcadas con líneas que van desde la barra normal a la barra experimental, por ejemplo, en Klf4, c-Myc, Oct4 y CAP. También se observa el error estándar en cada barra.



## 9. Resultados

### 9.1.1. CEMP1 promueve la expresión de genes pluripotencia.

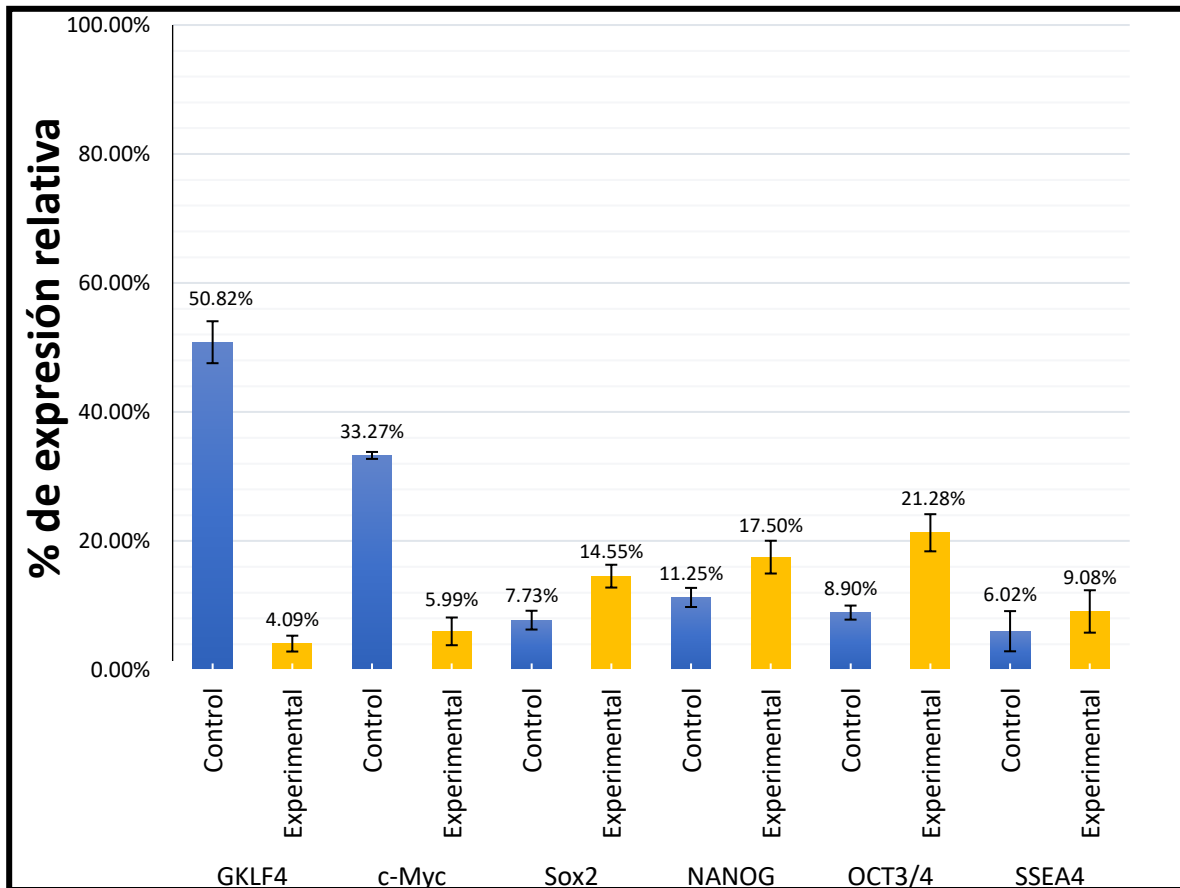


**Figura 21.** Western Blot de los Factores de Pluripotencia. GAPDH fue la muestra control para todos los factores estudiados, se puede observar las bandas del lado izquierdo corresponden a las muestras normales (N) y las bandas del lado derecho corresponden a la muestras experimentales (HGF23).



En el estudio de western blot se determinó que, el gen que codifica para CEMP1 transfectado en una población de HGF, provoca un aumento en la expresión de Oct4, NANOG y Sox2 y SSEA4, comparándolo con el control.

Por otro lado la expresión de c-Myc, Klf4 tuvo un notable decremento en comparación con el control. (Fig. 21)



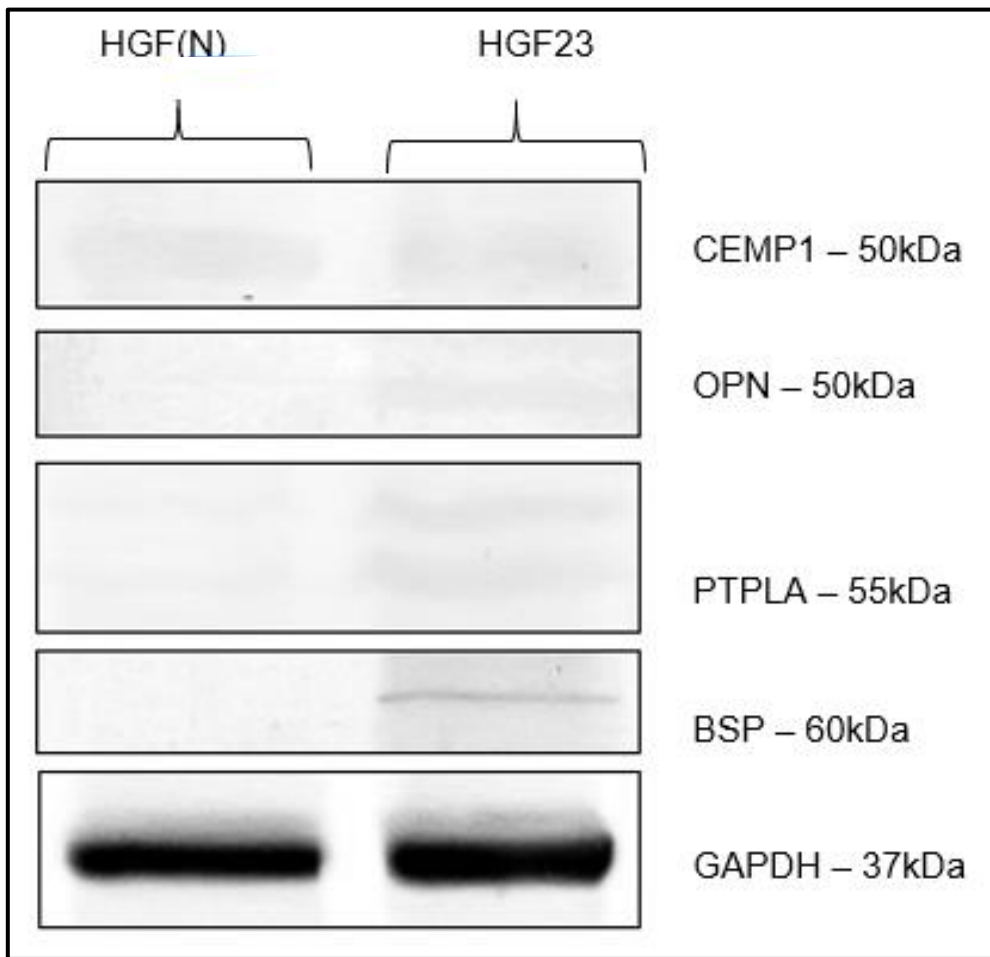
**Gráfica 2.** Expresión relativa de las muestras génicas para factores de pluripotencia en muestras control y experimentales. se observa la expresión relativa en azul de los controles y en amarillo de los experimentales.

En la Gráfica 2 se puede observar cómo Klf4 tuvo una expresión casi 13 veces menor en la muestra transfecteda, respecto a la muestra control, lo cual muestra una enorme significancia. En la muestra transfecteda la expresión de c-Myc tuvo diferencia con respecto al control casi 6 veces menor.



Sox2 tuvo un incremento en su expresión 2 veces mayor en la muestra transfectada respecto a la muestra control, En la muestra transfectada la expresión de NANOG tuvo incremento con respecto al control 1.5 veces mayor. La expresión relativa de Oct4 en las muestras control y experimentales se midió de acuerdo con la unión de cada una de las isoformas; en las cuales se encontró que en Oct4 hay un aumento en su expresión casi 2.5 veces mayor. En la muestra transfectada se notó que la expresión relativa de SSEA4 tuvo un incremento en la expresión 1.5 veces mayor.

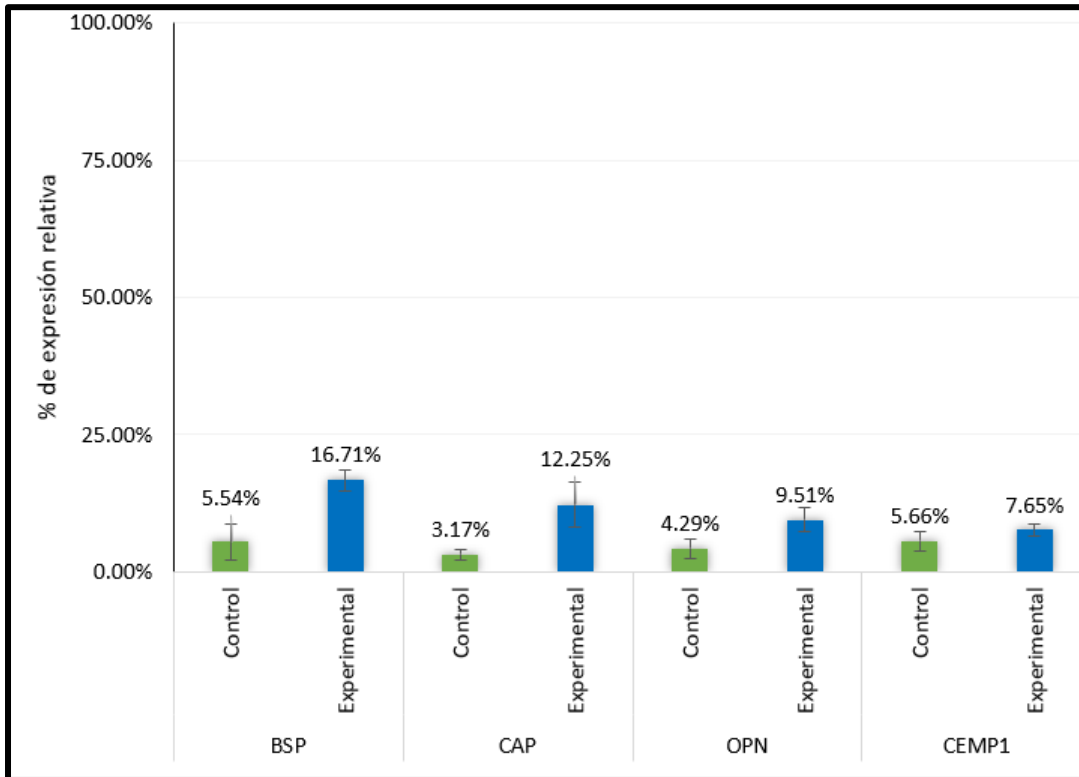
### 9.1.2. CEMP1 induce el aumento en la expresión de factores de mineralización.



**Figura 22.** Western Blot de Factores de Mineralización. GAPDH fue la muestra control para todos los factores estudiados, se puede observar las bandas del lado izquierdo que corresponden a las muestras normales (N) y las bandas del lado derecho corresponden a la muestras experimentales (HGF23).



En el análisis del western blot se determinó que el gen que codifica para CEMP1 transfectado en una población de HGF, promueve el incremento en la expresión de BSP, PTPLA/CAP y OPN, comparándolos con el control. Por otro lado, la expresión de CEMP1 tuvo un aumento no tan significativo en comparación con el control. (Fig. 22)

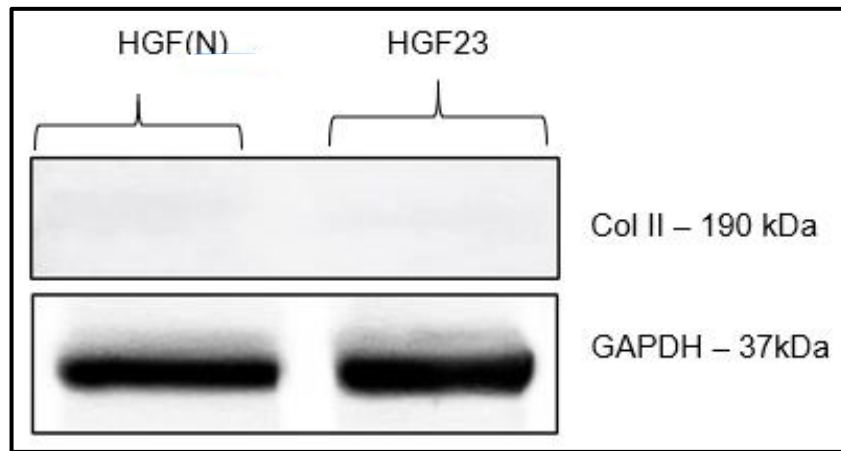


Gráfica 3. Expresión relativa de las muestras génicas para factores de mineralización en muestras control y experimentales. se observa la expresión relativa en verde de los controles y en azul de los experimentales.

En la gráfica 3, se puede observar que BSP en la muestra transfectada respecto a la muestra control, tuvo un incremento en su expresión 3 veces mayor. En la muestra transfectada la expresión de PTPLA/CAP tuvo un aumento con respecto al control casi 4 veces mayor.

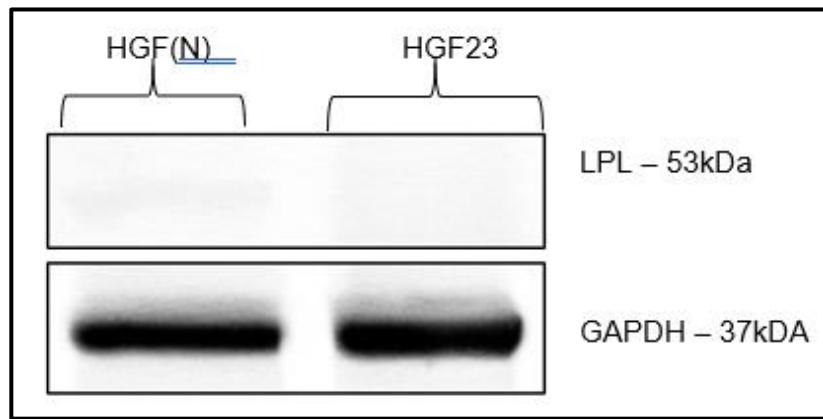
OPN en la muestra transfectada respecto a la muestra control, tuvo incremento en su expresión 2.3 veces mayor. En la muestra transfectada la expresión de CEMP1 tuvo un ligero aumento con respecto al control 1.3 veces mayor.

9.1.3. CEMP1 regula la expresión relativa de factores asociados a cartílago y tejido adiposo.

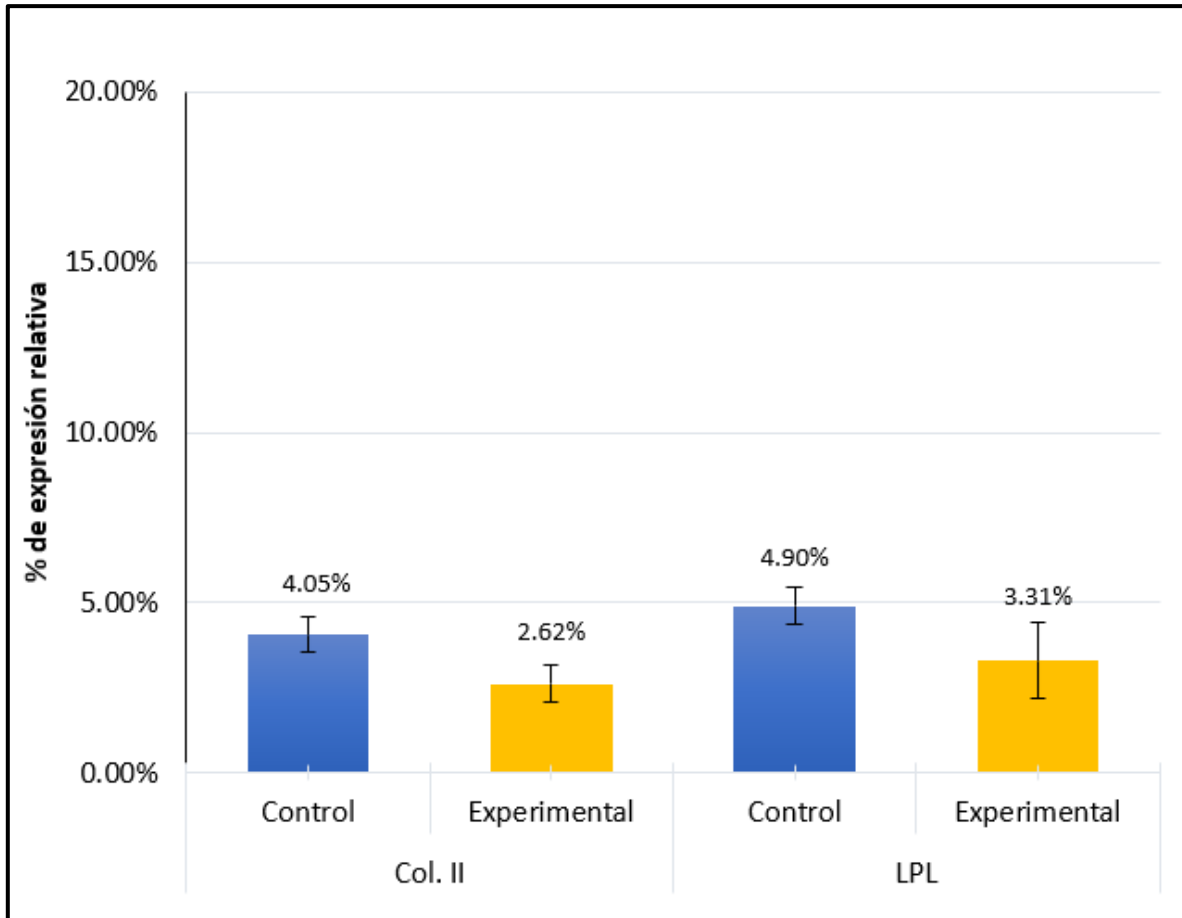


**Figura 23.** Western Blot de Factor asociado a Cartílago. GAPDH fue la muestra control para todos los factores estudiados, se puede observar las bandas del lado izquierdo.

En el análisis de western blot se determinó que, el gen que codifica para CEMP1 transfectado en una población de HGF regula y disminuye la expresión de Col. II y LPL comparándolos con el control



**Figura 24.** Western Blot de Factor Asociado a Tejido Adiposo. GAPDH fue la muestra control para todos los factores estudiados, se puede observar las bandas del lado izquierdo



**Gráfica 4.** Expresión relativa de las muestras génicas para factores asociados a cartilago y tejido adiposo. se observa la expresión relativa en azul de los controles y en amarillo de los experimentales

En la gráfica 4 se puede observar que Col II en la muestra transfectada respecto a la muestra control, tuvo una disminución en su expresión casi 1.5 veces menor. El factor asociado a tejido adiposo, LPL, tuvo una disminución casi 1.5 veces menor, en la expresión relativa en la muestra transfectada, con respecto a la muestra control.



## 10. Discusión

En este trabajo se realizaron ensayos de western blot, para evaluar la capacidad del gen que codifica para CEMP1 transfectado en una población de fibroblastos gingivales humanos, para inducir factores de pluripotencia y regular positivamente factores asociados a tejidos mineralizados, adiposo y cartílago.

En estudios previos (Villegas, 2018), realizó la transfección de CEMP1 en fibroblastos gingivales humanos para crear una línea celular de HGF-CEMP1, que dio como resultado células con un fenotipo parecido al mineralizante. En este mismo estudio se menciona que CEMP1 puede modular la expresión de diversos genes relacionados con el desarrollo, crecimiento, ciclo y muerte celular en los HGFs transfectados con CEMP1. Por lo tanto, el efecto de CEMP1 en los HGFs es a nivel transcripcional, pero no en un nivel estructural. <sup>(8)</sup>

Se realizó un estudio de expresión génica relativa para cada uno de los factores (pluripotencia, mineralización, asociado a cartílago y a tejido adiposo), donde las membranas se escanearon y se analizaron con el software ImageJ. Se utilizó GAPDH como producto génico constitutivo y todos los factores se compararon contra la expresión de éste.

También se demostró que CEMP1 induce positivamente la expresión de Oct4, Sox2, NANOG y SSEA4, el papel de los primeros tres en las células de la masa interna y de las células del epiblasto (también denominado ectodermo primitivo) es preservar la pluripotencialidad y autorenovación, además de que son parte del circuito de activación de pluripotencialidad <sup>(12)</sup>, esto implica que el gen que codifica para CEMP1, provoca una reprogramación en la población de fibroblastos gingivales humanos <sup>(51)</sup>. En (Bermúdez, 2015), realizan la transfección de CEMP1 en fibroblastos humanos y encontraron que, con distintos ensayos las células “transformadas” incrementan significativamente la expresión de un gran número de genes asociados con desarrollo celular, proliferación, crecimiento, muerte y ciclo





celular, que induce la expresión de proteínas asociadas a cemento, hueso y mineralización de la matriz extracelular. <sup>(51)</sup>

En el presente trabajo se encontró un aumento en la expresión de Oct4, tanto en su isoforma A como en su Isoforma B. En la expresión relativa de la isoforma Oct4A se encontró que hay un aumento casi 2 veces mayor, esto puede indicar que aumentan las propiedades de troncalidad. En la expresión relativa de la isoforma Oct4B hubo un aumento dos veces mayor, lo que implica que la presencia de Oct4B, puede participar en la respuesta al estrés celular. <sup>(25) (26)</sup>

En la expresión de Sox2, se observó un incremento en su expresión en la muestra transfectada respecto a la muestra control 2 veces mayor, el valor de Sox2 es que es indispensable para mantener la pluripotencialidad de ESC, pero hay que resaltar que tiene funciones en células que no son pluripotenciales. <sup>(12) (28) (29)</sup>

En la muestra experimental, la expresión de NANOG tuvo un incremento con respecto al control 1.5 veces mayor. En condiciones normales NANOG se expresa específicamente en ESC, manteniendo su autorrenovación y pluripotencialidad, aunque se ha observado también en conjunto con Sox2 y Oct4 en MSCs.

En cuanto a SSEA-4 (marcador de células troncales embrionales), se observó que en la muestra experimental la expresión relativa fue 1.5 veces mayor. Lo que quiere decir que, CEMP1 puede incrementar la expresión de marcadores para distinguir células embrionales primitivas humanas de carcinoma y células troncales embrionales.

Se observó que la transfección del gen que codifica para CEMP1 en los fibroblastos gingivales humanos provoca una disminución en la expresión de Klf4 y c-Myc.

En la muestra transfectada, Klf4 mostró un decremento en su expresión 13 veces más bajo respecto a la muestra control. Esta disminución sugiere un cambio importante en la expresión de este gen, el cual está relacionado en la regulación de múltiples procesos biológicos, tales como diferenciación, proliferación y apoptosis. <sup>(12) (36)</sup>



Además, se ha visto que Klf4 puede funcionar como un oncogén y se ha encontrado una alta expresión de este gen en cáncer de mama, aunque es dependiente del estado de p21. También se ha reportado que, un incremento en la expresión de Klf4 se encuentra en carcinoma de células escamosas en cabeza y cuello. <sup>(36)</sup>

Como ya se ha mencionado, c-Myc es un regulador de ciclo celular en varios tipos de células tanto normales como tumorales, que actúa en la inhibición de la expresión de genes supresores de tumores que controlan el paso de la fase G1 a la fase S en el ciclo celular. <sup>(12)</sup> En la muestra experimental la expresión de c-Myc tuvo una expresión 6 veces menor, esto sugiere que CEMP1 regula negativamente la expresión de reconocidos oncogenes como c-Myc y Klf4, por lo que podría ser capaz de prevenir el crecimiento tumoral.

Sin embargo, es necesario realizar una observación más detallada de este conjunto de resultados (los cuales podrían ser analizados de manera más profunda e individualmente) para establecer las posibles capacidades de regulación tumoral de CEMP1.

También se determinó la expresión del producto génico de factores asociados al proceso de mineralización como lo son sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN), CEMP1 y PTPLA/CAP, de los cuales se desprenden las siguientes conclusiones.

La sialoproteína ósea o BSP en la muestra experimental respecto a la muestra control, tuvo incremento en su expresión casi 3 veces mayor. Como ya se ha mencionado en estudios anteriores (Villegas, 2018), se llegó a la conclusión de que la transfección del gen que codifica para CEMP1 en HGFS, produce células parecidas a mineralizantes. Por lo que en este estudio se puede corroborar el aumento de esta proteína, que sólo se expresa en tejidos mineralizados como el hueso, cemento, durante estadios tempranos del desarrollo de la raíz y en el diente maduro. El aumento de la expresión de BSP podría promover la quimioatracción de precementoblastos, su adhesión y diferenciación.



En la muestra experimental, osteopontina (OPN) tuvo un incremento 2.3 veces mayor en su expresión respecto a la muestra control; esta proteína es altamente expresada en osteoblastos y osteoclastos, por lo que esto podría sugerir que el aumento en su expresión promueva la biomineralización, además de estar implicada en varias funciones fisiológicas. <sup>(44)</sup>

En cuanto a la expresión de PTPLA/CAP, la muestra experimental tuvo un aumento casi 4 veces mayor con respecto al control. Por lo que este aumento en su expresión podría sugerir que, las células transfectadas puedan tener características parecidas a las mineralizantes, promover el reclutamiento y la diferenciación celular durante la formación del cemento radicular, e incrementar la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP), así como la expresión de proteínas asociadas al proceso de biomineralización. <sup>(2)</sup>

CEMP1 tuvo un aumento en su expresión, con respecto al control aproximadamente 1.3 veces mayor. En otros estudios (Villegas, 2018), demostró que CEMP1 puede modular la expresión de muchos genes relacionados con el desarrollo, crecimiento, ciclo y muerte celular en HGFs (human gingival fibroblasts) transfectados con CEMP1. <sup>(8)</sup>

Se determinó la expresión relativa del producto génico del factor asociado a cartílago, colágena tipo II. En donde se observó en la muestra experimental una disminución casi 1.5 veces menor en su expresión respecto a la muestra control. Esto significa que hay una menor expresión de Col. II, que se encuentra normalmente en el cartílago y sólo en algunos sitios, incluyendo la córnea, el vítreo y la notocorda. (Arzate H. 1996) realizó experimentos *in vivo* en células mesenquimales en un estadio embrionario, como los condrocitos y demostró que CEMP1 podía promover la condrogénesis, regulando la diferenciación de cartílago y hueso, aunque esto sucedió por distintas vías y con distintas concentraciones de la proteína del cemento. <sup>(52)</sup>

Los procesos de adhesión, mejora de la proliferación y estimulación de las células mesenquimales, para expresar proteínas de origen cartilaginoso y así poder generar



después hueso; son de importancia para la regeneración periodontal, debido a que hay evidencia de que las células progenitoras de los tejidos periodontales residen en áreas perivasculares del ligamento periodontal y espacios endosteales del hueso alveolar, como células mesenquimales no diferenciadas.<sup>(52)</sup>

Aunque, en este trabajo se utilizó una población de fibroblastos humanos transfectados con el gen que codifica para CEMP1, lo puede significar que hay algún factor que impide la expresión para el gen de Col. II en los fibroblastos, o que CEMP1 no puede dar dicha capacidad. Por lo que se propone realizar más estudios en otras células mesenquimales para comprender mejor las capacidades de CEMP1.

En otros estudios se realizaron experimentos sobre células del ligamento periodontal para ver su potencial de diferenciación hacia otros tejidos, como osteogénico, adipogénico, condrogénico y cementogénico, además de que se mostró que las células del ligamento periodontal son multipotentes y pueden diferenciarse a distintos linajes celulares, se encontró que pueden diferenciarse a un linaje adipogénico, por ejemplo, adipocitos.<sup>(53)</sup> En este estudio se midió la expresión de LPL ya que es uno de los primeros genes en expresarse durante el proceso de diferenciación del adipocito. En cuanto a la expresión relativa del producto génico del factor asociado a tejido adiposo, LPL, en la muestra experimental tuvo una disminución casi 1.5 veces menor con respecto a la muestra control. Esta disminución significa que CEMP1 puede no inducir la expresión de LPL, del cual se ha demostrado que su actividad es también requerida para el mantenimiento de células troncales progenitoras hematopoyéticas (HSPC).<sup>(46)(47)</sup> Esto al igual que con la colágena tipo II tiene que ser evaluado con distintos estudios, ya que es importante conocer el potencial de diferenciación a otros linajes que puede tener CEMP1 en distintas poblaciones celulares.



## 11. Conclusiones

En los últimos años la ingeniería tisular ha tenido un gran avance, y su uso en técnicas de regeneración en cuanto a las enfermedades periodontales ha llevado al estudio de los diferentes mecanismos implicados. Entre las terapias usadas están: el uso de células troncales para regeneración, el uso de proteínas (p. ej. emdogain), el uso de membranas o la transfección de otros genes para inducir pluripotencia en diversos tipos de células. <sup>(54)</sup>

Se han realizado múltiples estudios con CEMP1, debido a sus propiedades, localización y funciones. Por ejemplo, regula el crecimiento y composición de cristales de apatita, regulación de osificación endoncondral, remodelamiento óseo, juega un papel importante en los estadios tempranos del proceso de biomineralización.

Por los resultados obtenidos en este estudio se obtienen las siguientes conclusiones:

En este trabajo se pretendió observar la capacidad del gen que codifica para CEMP1 transfectado en una población de fibroblastos gingivales humanos, para inducir diversos factores de pluripotencia. Donde se observó que:

- CEMP1 promueve la expresión de genes pluripotencia, como Oct4, NANOG, Sox2 y SSEA4.
- Se sugiere que CEMP1 regula negativamente la expresión de un reconocido oncogén (c-Myc) y podría ser capaz de prevenir el crecimiento tumoral.
- CEMP1 induce el aumento en la expresión de factores de mineralización. BSP. OPN, PTPLA/CAP.
- CEMP1 regula la expresión relativa de factores asociados a cartílago como COL. II y tejido adiposo (LPL).



Debido a la necesidad de comprender mejor la manera en la que CEMP1 puede regular la expresión de estos factores y que el estudio se realizó de manera cualitativa, se propone realizar en un futuro diversos análisis como: estudios de citodiferenciación, ensayos *in vitro*, diferenciación espontánea de células, prueba de la expresión de marcadores de pluripotencia, como Oct 4, Sox 2, NANOG, Klf4, cMyc, etc., por medio de inmunohistoquímica, por microarreglos de DNA, PCR y Western Blot. <sup>(22)</sup>

Tener conocimiento del cemento es clave para el entendimiento de las funciones del periodonto, identificando patologías para el desarrollo de terapias más exitosas en cuanto a la reparación y regeneración de tejidos periodontales dañados. El tener conocimiento sobre las propiedades de CEMP1 y de diversas proteínas del cemento, nos puede ayudar a entender de mejor manera la cementogénesis, las vías y rutas necesarias para su formación y correcto funcionamiento; por lo que estas proteínas del cemento tienen un potencial terapéutico importante no solo para estructuras periodontales, sino para tejidos. Aunque es importante reconocer que aun hace falta realizar más estudios para comprender de mejor manera los procesos en los que interviene CEMP1 y sus implicaciones en el cuerpo.



## 12. Índice de Figuras

<b>FIGURA 1.</b> DIAGRAMA DE UN CORTE LONGITUDINAL DE UN ELEMENTO DENTARIO CON LOS TEJIDOS DEL PERIODONTO DE PROTECCIÓN E INSERCIÓN. <sup>(1)</sup> .....	15
<b>FIGURA 2.</b> ENCÍA NORMAL DE UN ADULTO JOVEN. LAS FLECHAS MARCAN LA LÍNEA MUCOGINGIVAL ENTRE LA ENCÍA INSERTADA Y LA MUCOSA ALVEOLAR. <sup>(13)</sup> .....	16
<b>FIGURA 3.</b> DIAGRAMA QUE MUESTRA LAS CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DE LA ENCÍA. <sup>(15)</sup> .....	17
<b>FIGURA 4.</b> DIAGRAMA DE LAS FIBRAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL. <sup>(14)</sup> .....	18
<b>FIGURA 5.</b> HACES DE FIBRAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL <sup>(15)</sup> .....	19
<b>FIGURA 6.</b> CORTE LONGITUDINAL DE MANDÍBULA HUMANA CON EL DIENTE EN SU SITIO. LA LÍNEA PUNTEADA MARCA LA SEPARACIÓN ENTRE EL HUESO BASAL Y EL HUESO ALVEOLAR. <sup>(14)</sup> .....	20
<b>FIGURA 7.</b> DIAGRAMA QUE MUESTRA LAS INTERACCIONES ENTRE LAS INTERRELACIONES ENTRE LAS DIFERENTES CÉLULAS DEL TEJIDO ÓSEO. (1).....	21
<b>FIGURA 8.</b> DISTINTOS TIPOS CELULARES DEL CEMENTO. <sup>(14)</sup> .....	23
<b>FIGURA 9.</b> ORIGEN DE LA VAINA EPITELIAL DE HERTWIG. POSICIÓN DEL DIAFRAGMA EPITELIAL. <sup>(14)</sup> .....	25
<b>FIGURA 10.</b> A, B, C. ETAPAS DE LA CEMENTOGÉNESIS. <sup>(1)</sup> .....	26
<b>FIGURA 11.</b> DEFINICIÓN FUNCIONAL DE CÉLULA TRONCAL. <sup>(12)</sup> .....	31
<b>FIGURA 12.</b> EL CIGOTO (A) ES UNA CÉLULA TRONCAL TOTIPOTENCIAL (DA ORIGEN AL EMBRIÓN Y A LAS ESTRUCTURAS EXTRAEMBRIONARIAS). AL AUTORREPLICARSE, GENERA VARIAS CÉLULAS IDÉNTICAS A ELLA. (B), LAS CUALES CONSTITUYEN EL ESTADIO DE MÓRULA. EN EL ESTADIO DE BLASTOCISTO (C), LAS CÉLULAS DE LA MASA CELULAR INTERNA (D) CORRESPONDEN A CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS PLURIPOTENCIALES (PUEDEN FORMAR CÉLULAS DE CUALQUIER TEJIDO EMBRIONARIO). DICHAS CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS DAN LUGAR A CÉLULAS TRONCALES DE LA LÍNEA GERMINAL (E), O BIEN, A CÉLULAS TRONCALES SOMÁTICAS (F) DE LAS TRES CAPAS EMBRIONARIAS: ECTODERMO, ENDODERMO Y MESODERMO. <sup>(12)</sup> .	32
<b>FIGURA 13.</b> A) CLASIFICACIÓN DEL POTENCIAL DE DIFERENCIACIÓN/PLASTICIDAD (B) CLASIFICACIÓN POR EL ESTADIO EN EL QUE SE ENCUENTRAN LAS CÉLULAS TRONCALES.....	36
<b>FIGURA 14.</b> DIAGRAMA DE LOS TEJIDOS OROFACIALES DONDE SE ENCUENTRAN CÉLULAS TRONCALES. A) CÉLULAS TRONCALES EPITELIALES QUE RESIDEN EN EL DESARROLLO DEL GERMEN DENTARIO, EPITELIO ORAL, GLÁNDULA SALIVAL. CÉLULAS TRONCALES PROVENIENTES DE TEJIDO CONECTIVO (MESÉNQUIMA O DE ORIGEN MESODÉRMICO) HAN SIDO AISLADOS DE CALVARÍA, PULPA DENTAL, PAPILA DENTAL, LIGAMENTO PERIODONTAL Y MÉDULA DE HUESO ALVEOLAR. <sup>(10)</sup> .....	37
<b>FIGURA 15.</b> ORÍGENES DE LAS CÉLULAS TRONCALES ADULTAS EN LA REGIÓN ORAL Y MAXILOFACIAL. BMSCs: MSCs DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA DEL HUESO OROFACIAL; DPSCs: CÉLULAS TRONCALES DE LA PULPA DENTAL; SHED: CÉLULAS TRONCALES DE DIENTES DECIDUOS EXFOLIADOS HUMANOS; PDLSCs: CÉLULAS TRONCALES DEL LIGAMENTO PERIODONTAL; DFSCs: CÉLULAS TRONCALES DEL FOLÍCULO DENTAL; TGPCs: CÉLULAS TRONCALES DEL GERMEN DENTAL; SCAP: CÉLULAS TRONCALES DE LA PAPILA APICAL; OESCs: CÉLULAS TRONCALES DEL EPITELIO ORAL; GMSCs: MSCs DERIVADOS DE LA ENCÍA; PSCs: CÉLULAS TRONCALES DERIVADAS DEL PERIOSTIO; SGSCs: CÉLULAS TRONCALES DERIVADAS DE LA GLÁNDULA SALIVAL. <sup>(9)</sup> .....	40
<b>FIGURA 16.</b> MAPA DE pCDNA-DEST40. EL DNA DEL CLON ENTRANTE REEMPLAZA LA REGIÓN ENTRE LAS BASES 918 Y 2601. (INVITROGEN, CARLSBAD, CA) .....	58
<b>FIGURA 17.</b> ESQUEMA QUE REPRESENTA EL ORDENAMIENTO DE MUESTRAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA. SE SEÑALA EL MARCADOR Y BUFFER DE CARGA. TAMBIÉN SE VE CÓMO SERÁN LLEVADAS LAS MUESTRAS DESDE EL TUBO EPPENDORF POR MEDIO DE MICROPIPETAS HASTA EL GEL. ....	59
<b>FIGURA 18.</b> ESQUEMA QUE REPRESENTA EL ORDENAMIENTO DE MUESTRAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA. SE SEÑALAN LOS CARRILES DONDE IRÁN LAS MUESTRAS CONTROL(N) Y LAS EXPERIMENTALES (HGF23). ....	61
<b>FIGURA 19.</b> A) CÁMARA DE ELECTROFORESIS ARMADA. B) CENTRO DE PODER ENCENDIDO CON LAS CONDICIONES SELECCIONADAS. ....	61
<b>FIGURA 20.</b> TINCIÓN DE UNA MEMBRANA DE PVDF CON ROJO DE PONCEAU. (SIGMA).....	62
<b>FIGURA 21.</b> WESTERN BLOT DE LOS FACTORES DE PLURIPOTENCIA. GAPDH FUE LA MUESTRA CONTROL PARA TODOS LOS FACTORES ESTUDIADOS, SE PUEDE OBSERVAR LAS BANDAS DEL LADO IZQUIERDO CORRESPONDEN A LAS MUESTRAS NORMALES (N) Y LAS BANDAS DEL LADO DERECHO CORRESPONDEN A LAS MUESTRAS EXPERIMENTALES (HGF23).....	65



**FIGURA 22.** WESTERN BLOT DE FACTORES DE MINERALIZACIÓN. GAPDH FUE LA MUESTRA CONTROL PARA TODOS LOS FACTORES ESTUDIADOS, SE PUEDE OBSERVAR LAS BANDAS DEL LADO IZQUIERDO QUE CORRESPONDEN A LAS MUESTRAS NORMALES (N) Y LAS BANDAS DEL LADO DERECHO CORRESPONDEN A LA MUESTRAS EXPERIMENTALES (HGF23)..... 67

**FIGURA 23.** WESTERN BLOT DE FACTOR ASOCIADO A CARTÍLAGO. GAPDH FUE LA MUESTRA CONTROL PARA TODOS LOS FACTORES ESTUDIADOS, SE PUEDE OBSERVAR LAS BANDAS DEL LADO IZQUIERDO..... 69

**FIGURA 24.** WESTERN BLOT DE FACTOR ASOCIADO A TEJIDO ADIPOSO. GAPDH FUE LA MUESTRA CONTROL PARA TODOS LOS FACTORES ESTUDIADOS, SE PUEDE OBSERVAR LAS BANDAS DEL LADO IZQUIERDO..... 69

### 13. Índice de Tablas

**TABLA 1.** PDL: LINAJES DE DIFERENCIACIÓN DEL LIGAMENTO PERIODONTAL, DENT (LINAJE DENTINOGÉNICO), MES (LINAJE MESODÉRMICO), ECT (LINAJE ECTODÉRMICO), END (LINAJE ENDEDÉRMICO), OD (ODONTOBLASTO), OS (OSTEOBLASTO), AD (ADIPOCITO), CHO (CONDROCITO), MYO (MIOBLASTO), NEU (CÉLULA NEURONAL), ENDO(CÉLULA ENDOTELIAL), CEM (CEMENTOBLASTO), HEP (HEPATOCITO)..... 52

**TABLA 2.** PREPARACIÓN DEL GEL DE CORRIDA Y GEL CONCENTRADOR DEPENDIENDO DE LA CONCENTRACIÓN DE POLIACRILAMIDA 60

**TABLA 3.** DISTRIBUCIÓN DE LOS PRIMARIOS Y CONCENTRACIÓN DE LOS ANTICUERPOS SECUNDARIOS CON EL PESO MOLECULAR PARA CADA FACTOR..... 63

### 14. Índice de Gráficas

**GRÁFICA 1.** SE PUEDE OBSERVAR UN PANORAMA GENERAL DE TODOS LOS FACTORES ESTUDIADOS EN ESTE ESTUDIO, POR MEDIO DE LA PRUEBA ESTADÍSTICA T DE STUDENT Y ANOVA. HAY ALGUNOS FACTORES QUE TUVIERON SIGNIFICANCIAS QUE SE OBSERVAN MARCADAS CON LÍNEAS QUE VAN DESDE LA BARRA NORMAL A LA BARRA EXPERIMENTAL, POR EJEMPLO, EN KLF4, C-MYC, OCT4 Y CAP. TAMBIÉN SE OBSERVA EL ERROR ESTÁNDAR EN CADA BARRA..... 64

**GRÁFICA 2.** EXPRESIÓN RELATIVA DE LAS MUESTRAS GÉNICAS PARA FACTORES DE PLURIPOTENCIA EN MUESTRAS CONTROL Y EXPERIMENTALES. SE OBSERVA LA EXPRESIÓN RELATIVA EN AZUL DE LOS CONTROLES Y EN AMARILLO DE LOS EXPERIMENTALES. .... 66

**GRÁFICA 3.** EXPRESIÓN RELATIVA DE LAS MUESTRAS GÉNICAS PARA FACTORES DE MINERALIZACIÓN EN MUESTRAS CONTROL Y EXPERIMENTALES. SE OBSERVA LA EXPRESIÓN RELATIVA EN VERDE DE LOS CONTROLES Y EN AZUL DE LOS EXPERIMENTALES. 68

**GRÁFICA 4.** EXPRESIÓN RELATIVA DE LAS MUESTRAS GÉNICAS PARA FACTORES ASOCIADOS A CARTÍLAGO Y TEJIDO ADIPOSO. SE OBSERVA LA EXPRESIÓN RELATIVA EN AZUL DE LOS CONTROLES Y EN AMARILLO DE LOS EXPERIMENTALES ..... 70





## 15. Referencias

1. **Gómez de Ferraris M. E., Campos A.** *Histología y Embriología Bucodental*. 2a Ed. Madrid : Médica Panamericana, 2002. Pp 341-354.
2. **Almaguer A., Villagómez J. G.** *Ecología Oral*. Ciudad de México : El Manual Moderno, 2018. 30-33.
3. **Carmona-Rodríguez, B., Álvarez, M. A., Narayanan, A. S. Zeichner- David, M., Reyes Gasga, J., Molina Guarneros, J., Arzate, H.** *Human Cementum Protein 1 induce expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts*. s.l. : Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. 358 (3), 763-769.
4. **Villareal-Ramírez, E., Moreno, A., Mas-Oliva, J., Chávez-Pacheco, J. L. Narayanan, A. S., Gil-Chavarria, I., Arzate, H.** *Characterization of Recombinant Human Cementum Protein 1 (hrCEMP1): Primary role in biomineralization*. s.l. : Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009. 384 (1), 49-54.
5. *Bone regeneration in rat cranium critical-size defects induced by cementum protein 1 (CEMP1)*. **Serrano J., Romo E., Bermúdez M., Narayanan A., Zeichner-David M., Santos L., Arzate H.** s.l. : PLOS one, 2013, Vols. 8 (11) 1-10.
6. **Correa R., Arenas J., Montoya G., Hoz L., López S., Salgado F., Arroyo R., Salmerón N., Romo E., Zeichner-David M & Arzate H.** *Synthetic Cementum Protein 1-Derived peptide regulates mineralization in vitro and promotes bone regeneration in vivo*. s.l. : The FASEB Journal, 2018. (33) 1-12.
7. **Kémoun P., Laurencin-Dalcioux S., Brunel G., Arzate H.** *Localization of STRO-1, BMP-2/-3/-7, BMP receptors and phosphorylated Smad-1 during the formation of mouse periodontium*. s.l. : Tissue and Cell, 2007. 39(4), 257-266.
8. **Villegas C. E., Agredano L. T., Bermúdez M., Segura M. L., Arzate H., Del Toro E. F., Jiménez L. F.** *Cementum Protein 1 transfection does not lead to ultrastructural changes in nucleolar organization of human gingival fibroblasts*. s.l. : Journal of Periodontal Research, 2018. 00:1-7.
9. **Egusa, H., Sonoyama, W., Nishimura, M., Atsuta, I., & Akiyama, K.** *Stem Cells in Dentistry-Part I: Stem Cells Sources*. s.l. : Journal of Prosthodontic Research, 2012. 56 (3), 151-165.
10. **Mao J.J., Prockop D. J.** *Stem Cells in the Face: Tooth Regeneration and Beyond*. s.l. : Cell Stem Cell, 2012. Vol. 11, 4: 291-301.
11. **Gutiérrez G., Guadarrama A., Muñoz C., Arreguín J.** *Hydrogen peroxide-induced apoptosis in human gingival fibroblasts*. s.l. : Int. J. Clin. Exp. Pathol., 2015. 8(12): 15563-15572.



12. **Pelayo R., Santa-Olalla J., Velasco I.** *Células Troncales y Medicina Regenerativa*. 1era. Ciudad de México : Programa Universitario de Investigación en Salud, 2011. pp. 37-39, 119, 300-314.
13. **Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al.** *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells*. *Cytotherapy : The International Society for Cellular Therapy position statement.*, 2006. 8(4): 315-317.
14. **Newman M.G., Takei H.H.** *Periodontología Clínica de Carranza*. 11va Ed. s.l. : Elsevier Saunders, 2012. pp. 12-30.
15. **Lindhe J., Lang N.P.** *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. 5ta Ed. s.l. : Editorial Médica Panamericana, 2017. pp. 3-40.
16. **Eley B. M., Soory m., Manson J.D.** *Periodoncia*. 6ta Ed. Barcelona (España) : Elsevier, 2012. pp. 1-16.
17. *Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration*. **Arzate H., Zeichner-David M., Mercado-Celis G.** s.l. : *Periodontology 2000*, 2015, Vols. 67 (2015) 211-233.
18. *Isolation and partial characterization of mitogenic factors from cementum*. **Nakae H., Narayanan A., Raines E., Page R.** s.l. : *Biochemistry*, 1991, Vols. 30 (29) 7047-7052.
19. **Uwanogho, D. A., Hardcastle, Z., Balogh, P., Mirza, G., Thornbug, K. L., Ragoussis, J., & Sharpe, P. T.** *Molecular Cloning, Chromosomal Mapping, and Developmental Expression of a Novel Protein Tyrosine Phosphatase-like Gene*. s.l. : *Genomics*, 1999. 62(3), 406-416.
20. **Romo-Arévalo E., Arzate H., Montoya G., Rodríguez A.** *High-level expression and characterization of a glycosylated human cementum protein 1 with lectin activity*. s.l. : *Febs letters*, 2016. 590:129-138.
21. **Sowmya S., Chennazhi K. P., Arzate H., Jayachandran P., Shantikumar V., Jayakumar R.** *Periodontal Specific Differentiation of Dental Follicle Stem Cells into Osteoblast, Fibroblast and Cementoblast*. s.l. : *Tissue Engineering*, 2014. Vol. Part C. 1-44.
22. **Mokry, J y Písal, R.** *The Basic Principles of Stem Cells*. s.l. : *Stem Cell Biology and Tissue Engineering*, 2015. 237-248.
23. **Marynka-Kalmani K., Treves S., Yafee M. et al.** *The Lamina Propria of Adult Human Buccal Mucosa Harbors a Novel Stem Cell Population*. s.l. : *Stem Cells*, 2010. 28:984-995.
24. **Miyoshi K., Tsuji D., Kudoh K.** *Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Buccal Mucosa*. s.l. : *J Biosci Bioeng*, 2010. 110:3, 345-350.
25. **Wang X., Dai J.** *Concise Review: Isoforms of OCT4 Contribute to the Confusing Diversity in Stem Cell Biology* *Wang*. s.l. : *Stem Cells*, 2010. 28:885-893.



26. **Okasawa H., Okamoto K., Ishino F., Takeda S., Toyoda Y.** *The Oct3 Gene, a gene for an embryonic transcription factor, is controlled by a retinoic acid repressible enhancer.* Tokyo : The EMBO Journal, 1991. Vol.10 No 10 pp.2997-3005.
27. **Feng, Q.** *Octamer-Binding Transcription Factors: Genomics and Functions.* VT : Landmark Ed, 2015. 18: 1051 - 1071.
28. **Narayan S., Bryant G., Shah S., Berrozpe G. & Ptashne M.** *OCT4 and SOX2 work as Transcriptional Activators in Reprogramming Human Fibroblasts.* New York : Cell Reports, 2017. 20(7), 1585-1596.
29. **Wuebben E., Rizzino A.** *The Dark Side of SOX2: Cancer - a comprehensive overview.* Nebraska : Oncotarget, 2017. 8(27), pp: 44917-44943.
30. *Overview of the roles of Sox2 in stem cell and development.* **Wen J., Feng R.** s.l. : Biological Chemistry, 2015, Vols. 396 (8) 1-20.
31. **Allouba M., ElGuindy A., Krishnamoorthy N., Yacoub M.** *NaNog: A pluripotency homeobox (master) molecule.* Qatar : Global Cardiology Science and Practice, 2015. 2015:36. pp. 1-9.
32. *NANOG expression in embryonic stem cells - An ideal Model System to dissect enhancer function.* **Blinka S., Rao S.** s.l. : BioEssays, 2017, Vols. 39 (12) 1-11.
33. **Saunders A., Li D., Faiola F., Huang X., Fidalgo M., Guallar D., Ding J.** *Context-Dependent Functions of NANOG phosphorylation in pluripotency and Reprogramming.* New York : Stem Cell Reports, 2017. 8(5), 115-1123.
34. *Alteraciones del gen c-Myc en la oncogénesis.* **Ospina M., Muñetón C.** s.l. : IATREIA, 2011, Vols. 24 (4) 389-401.
35. *MYC on the path to cancer.* **Dang, G.** s.l. : Cell, 2013, Vols. 149 (1) 22-35.
36. **Ghaleb A., Yang V.** *krüppel-Like factor 4 (KLF4): What we currently know.* New York : Gene, 2017. 611, 27-37.
37. *Expression of stage-specific embryonic antigen 4 (SSEA4) defines spontaneous loss of epithelial phenotype in human solid tumor cells.* **Sivasubramaniyan K., Harichandan A., Schilbach K., Mack A., Bedke J., Stenzl A., Kanz L., Niederfellner G.** s.l. : Cell Biology, 2015, Vols. 25 (8) 902-917.
38. **Feng J., Tuan R., Cheung K., Leung V.** *Concise review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells.* s.l. : Stem Cells, 2014. 32:1408-1419.
39. **Kawanabe N., Murata S., Fukushima H., Ishihara Y., Yanagita T., Yamashiro T.** *Stage-specific embryonic antigen-4 identifies human dental pulp stem cells.* California : Experimental Cell Research, 2012. 318 (5) 453-463.
40. **Lin G., Liu G., Banie L., Wang G., Ning H.** *Tissue Distribution of Mesenchymal stem cell marker Stro-1.* s.l. : Stem Cells Dev, 2011. (10):1747-1752.



41. **Ning H., Lin G., Lue T., Lin C.** *Mesenchymal Stem Cell Marker Stro-1 is a 75kD Endothelial Antigen.* California : Biochem Biophys Res Commun, 2011. 23; 413(2): 353-357.
42. **Boxal S., Jones E.** *Markers for characterization of bone marrow multipotent stromal cells.* s.l. : Stem Cells International, 2012. 2012:pp12.
43. **Consortium, The UniProt.** *UniProt: The Universal protein knowledgebase* Nucleic Acids Res. 2017. 45:D158-D169.
44. **Wei, R., Wong, J. P. C., & Kwork, H. F.** *Osteopontin: A Promising Biomarker for Cancer Therapy.* s.l. : Journal of Cancer, 2017. 8(12), 2173-2183.
45. **Bergman R., Afifi K. & Heidger P. M.** *Histología.* s.l. : Mc Graw Hill, 1997. 52-54.
46. **Liu C., Han T., Stachura D., Wang H. Vaisman B.** *Lipoprotein lipase regulates hematopoietic stem progenitor cell maintenance through DHA supply.* California : Nature Communications, 2018. (2018) 9:1310.
47. **Kersten, S.** *Physiological Regulation of Lipoprotein lipase.* California : Biochimica et Biophysica Acta, 2014. (2014) 919.933.
48. **ID, GENE.** NCBI. [En línea] 12 de Marzo de 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2597>.
49. **Álvarez-Pérez, M. A., Narayanan, S., Zeichner-David, M., Rodríguez Carmona, B., & Arzate, H.** *Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23).* s.l. : Bone, 2006. 38(3), 409-419.
50. **Yang P. C, Mahmood T.** *Western Blot: Technique, theory and trouble shooting.* s.l. : North American Journal of Medical Sciences, 2012. 4(9), 429.
51. **Bérmudez M., Imaz-Rosshandler I., Rangel C., Zeichner M., Arzate H., Mercado G.** *CEMP1 Induces Transformation in Human Gingival Fibroblasts.* s.l. : PLOS one, 2015. 10:1-20.
52. **Arzate H., Chimal J., Lagunas L., Díaz de León L.** *Human Cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells.* s.l. : J Periodont Res, 1996. 31:144-148.
53. **Barrera C., Hoz L., Arzate H., Fonseca A., Pérez J., Rodil S.** *Comparison of the osteogenic, adipogenic, chondrogenic and cementogenic differentiation potential of periodontal ligament cells cultured on different biomaterials.* s.l. : Materials Science & Engineering C, 2017. c76: 1075-1084.
54. **Cairo F., Nieri M., Pagliaro U.** *Efficacy of periodontal plastic surgery procedures in the treatment of localized facial gingival recessions. A systematic review.* s.l. : J Clin Periodontol, 2014. 41(S-15):S44-S62.
55. **Filipczyk A., Marr C., Hastreiter S. et al.** *Network plasticity of pluripotency transcription factors in embryonic stem cells.* s.l. : Nature Cell Biology, 2015. 17: 1235-1246.
56. **Krüppel-like factor (Klf4): What we currently know.** s.l. : Gene. 611: 27-37.