



**Análisis funcional de la expresión génica obtenida por transcriptómica de células madre de la papila dental estimuladas con láser de baja potencia**

Carolina Ospina Muñoz - 20762117617  
Edwin Murillo Peña - 20762114371  
Geraldine Molina Higuera - 20762114364  
Yesica García Vélez - 20762116324

**Universidad Antonio Nariño**

Programa Ortodoncia

Facultad de odontología

Armenia, Colombia

2023



**Análisis funcional de la expresión génica obtenida por transcriptómica de células  
madre de la papila dental estimuladas con láser de baja potencia**

Carolina Ospina Muñoz - Edwin Murillo Peña - Geraldine Molina Higuera - Yesica García  
Vélez

Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Ortodoncista**

Director (a):

Dr. David A. Gutiérrez Ramírez

Línea de Investigación:

Biotecnología.

Grupo de Investigación:

Grupo de Innovación en salud bucal

**Universidad Antonio Nariño**

**Especialización en Ortodoncia**

Facultad de odontología

Armenia, Colombia

2023

## NOTA DE ACEPTACIÓN

El trabajo titulado: “Análisis Funcional de la expresión génica obtenida por transcriptómica de células madre de la papila dental estimuladas con láser de baja potencia”, cumple con los requisitos para optar por el título de especialista en Ortodoncia.

---

Firma del Tutor

---

Firma Jurado

---

Firma Jurado

Armenia, 24 11 2023.

## Contenido

Pág.

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>5</b>
2.2. JUSTIFICACIÓN.....	6
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>8</b>
3.1. OBJETIVO GENERAL .....	8
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
<b>4. ANTECEDENTES.....</b>	<b>9</b>
4.1. MARCO TEÓRICO.....	9
4.1.1. Fisiología del tejido de soporte durante el tratamiento de ortodoncia.....	9
4.1.2. Remodelado óseo en ortodoncia.....	11
4.1.3. Teorías biológicas sobre la activación directa .....	12
4.1.4. Lado de presión .....	13
4.1.4. Lado de tensión.....	15
4.1.5. Células mesenquimales.....	16
4.1.6. Células madre de la papila apical .....	16
4.1.7. Terapia láser de baja potencia. ....	17
4.1.8. Aspectos genéticos asociados con la neoformación ósea.....	18
4.1.9. Cambios en la expresión génica de las células madre expuestas terapia láser de baja potencia. ....	21
4.1.10. Análisis funcional de la expresión génica .....	22
<b>5. METODOLOGÍA.....</b>	<b>25</b>
5.1. TIPO DE ESTUDIO.....	25
5.2. POBLACIÓN Y MUESTRA.....	25
5.3. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES .....	25
5.4. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	26
5.5. PROCEDIMIENTO .....	27

5.5.1. Recolección de información .....	27
5.5.2. Análisis funcional .....	28
5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	30
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
6.1. ANÁLISIS INDIVIDUAL POR GEN .....	36
6.1.1. MIS18A .....	36
6.1.2. GPR75 .....	40
6.1.3. JMJD7-PLA2G4B .....	43
6.1.4. FAM 156A.....	46
6.1.5. FAM117B.....	48
<b>7. DISCUSION .....</b>	<b>52</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>57</b>



## Lista de Figuras

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Mapa de calor de expresión diferencial.....	28
<b>Figura 2.</b> Gráfico de volcán de expresión génica del grupo control y el láser.....	29
<b>Figura 3.</b> Gráfico de función molecular basado en GO .....	32
<b>Figura 4.</b> Gráfico de redes según la función entre el set de genes seleccionados.....	33
<b>Figura 5.</b> Gráfico de red de los componentes celulares relacionados con la expresión génica. ....	34
<b>Figura 6.</b> Número de genes asociados con procesos, componente celular y función. ....	35
<b>Figura 7.</b> Estructura tridimensional de la proteína MIS18alpha .....	36
<b>Figura 8.</b> Interacciones de MIS18A .....	37
<b>Figura 9.</b> Vías de señalización asociadas al set de genes que interactúan con MIS18. ....	38
<b>Figura 10.</b> Análisis funcional de MIS18 y el set de genes con mayor expresión. ....	39
<b>Figura 11.</b> Funciones asociadas al set de genes que interactúan con MIS18.....	39
<b>Figura 12.</b> Estructura tridimensional de la proteína GPR75 .....	40
<b>Figura 13.</b> Estructura celular en donde actúa GPR75 .....	41
<b>Figura 14.</b> Análisis funcional de MIS18 y el set de genes con mayor expresión. ....	41
<b>Figura 15.</b> Procesos celulares asociados con GPR75 .....	42
<b>Figura 16.</b> Análisis funcional de GPR75. ....	42
<b>Figura 17.</b> Análisis funcional de JMJD7-PLA2G4B y el set de genes con mayor expresión .....	44
<b>Figura 18.</b> Vías de señalización asociadas al set de genes que interactúan con JMJD7- PLA2G4B .....	45
<b>Figura 19.</b> Estructura celular en donde actúa JMJD7-PLA2G4B.....	45
<b>Figura 20.</b> Red de interacción de FAM156B .....	46
<b>Figura 21.</b> Ubicación celular de FAM156a .....	47
<b>Figura 22.</b> Funciones biológicas asociadas a FAM156A .....	47
<b>Figura 23.</b> Procesos moleculares asociadas a FAM156A.....	48
<b>Figura 24.</b> Imagen tridimensional de la proteína FAM117B.....	49
<b>Figura 25.</b> Red de interacciones del gen FAM117B.....	49
<b>Figura 26.</b> Mapa de proteínas relacionadas con FAM117B .....	50
<b>Figura 27.</b> Vías asociadas con FAM117B y el set de genes. ....	51
<b>Figura 22.</b> Funciones biológicas asociadas a FAM156A.....	48
<b>Figura 23.</b> Análisis de funciones asociadas a FAM156A.....	48
<b>Figura 23.</b> Procesos moleculares asociadas a FAM156A.....	48
<b>Figura 24.</b> Imagen tridimensional de la proteína FAM117B.....	49
<b>Figura 25.</b> Red de interacciones del gen FAM117B.....	49
<b>Figura 26.</b> Mapa de proteínas relacionadas con FAM117B.....	50
<b>Figura 27.</b> Vías asociadas con FAM117B y el set de genes.....	51



## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Descripción de las variables.....	25
<b>Tabla 2.</b> Base de datos de expresión diferencial entre el grupo control y el láser. ....	27
<b>Tabla 3.</b> Base de datos filtrada con los genes sobre y sub expresados .....	29
<b>Tabla 4.</b> Genes para análisis.....	30
<b>Tabla 5.</b> Genes seleccionados para análisis. ....	31
<b>Tabla 6.</b> Interacciones de MIS18A .....	36

## **Dedicatoria**

*A Dios, siempre en primer lugar*

*A cada uno de nuestros padres por su apoyo,  
acompañamiento y respaldo incondicional*

*A toda nuestra familia, hijos, esposos,  
hermanos que sacrificaron parte del tiempo de familia  
para que podamos construir nuestro proyecto  
académico.*

## **Agradecimientos**

Los autores agradecemos a todas aquellas personas que de una u otra forma hicieron parte de este proyecto de trabajo de grado. A la Universidad Antonio Nariño, y en especial a cada uno de nuestros profesores que nos ayudaron con este complejo proceso de hacer investigación.

## RESUMEN

**Introducción.** La aplicación de láser de baja potencia LLLT es una terapia que se viene empleando en diferentes aplicaciones en salud, incluido en odontología para la disminución de la inflamación, control del dolor, estimulación de regeneración de tejidos, entre otras. Aunque en ortodoncia se utiliza durante el tratamiento con aparatología fija para acelerar el proceso de remodelado óseo, se desconocen las bases moleculares subyacentes que gobiernan este proceso. **Objetivo.** Establecer la función de los genes que se expresan en las células madre de la papila dental osteoinducidas estimuladas con láser de baja potencia. **Metodología.** Se realizó un estudio descriptivo con enfoque analítico de datos secundarios. Se analizaron datos transcriptómicos de unos resultados obtenidos por el grupo de investigación Innovación en Salud bucal, en el que se obtuvieron datos analizados por RNAseq a partir de muestras de RNA de células madre de la papila apical (SCAP) cultivadas en medio osteogénico y expuestas a laser de baja potencia (LBP), comparadas con SCAP no expuestas. Donde se analizaron genes que tenían una mayor expresión, utilizando diferentes plataformas como: Gene Ontology GO (<http://geneontology.org/>), la herramienta web pathways commons (<https://apps.pathwaycommons.org/>), REACTOME (<https://reactome.org>) y plataformas integradoras como g profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>). En todos los casos se tendrán en cuenta los términos GO que estaban significativamente enriquecidos cuando el valor de p sea inferior a 0,05 en cada plataforma. **Resultados.** Se analizó un total de 15.364 genes, de los cuales, MIS 18A, GPR75-ASB3, JMJD7-PLA2 mostraron sobreexpresión significativa en comparación con el control, y 2 genes con menor expresión significativa, FAM156A y FAM117B. El proceso biológico asociado a los genes sobreexpresados es principalmente la regulación biológica, señalización y proliferación celular. En cuanto a la función, la que tiene más genes involucrados es la de unión iónica y la de actividad catalítica. **Conclusiones.** Los genes MIS18A, GPR75-ASB3 y JMJD7-PLA2 mostraron sobreexpresión en el grupo de células expuestas al laser, pero no se encuentran relacionados funcionalmente entre sí, sin embargo, el análisis funcional individual muestra que están involucrados principalmente con la proliferación celular, aunque por diferentes vías.

## ABSTRACT

**Introduction.** The application of LLLT low power laser is a therapy that has been used in different health applications, including in dentistry to reduce inflammation, pain control, tissue regeneration stimulation, among others. Although in orthodontics it is used during treatment with fixed appliances to accelerate the bone remodeling process, the underlying molecular bases that govern this process are unknown. **Aim.** To identify changes in gene expression of osteoinduced dental papilla stem cells stimulated with low power laser. **Methodology.** A descriptive study was carried out with an analytical approach to secondary data. The transcriptomic data were analyzed from results obtained by the Oral Health Innovation research group, in which the data analyzed by RNAseq were obtained from RNA samples of stem cells of the apical papilla (SCAP) cultured in osteogenic medium and exposed to low power laser (LBP), compared to unexposed SCAP. Where genes that had a higher expression were analyzed, using different platforms such as: Gene Ontology GO (<http://geneontology.org/>), the paths commons web tool (<https://apps.pathwaycommons.org/>), REACTOME (<https://reactome.org>) and integrating platforms such as g profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>). In all cases, GO terms that have been significantly enriched will be taken into account when the p value is less than 0.05 on each platform. **Results.** A total of 15,364 genes were analyzed, of which MIS 18A, GPR75-ASB3, JMJD7-PLA2 showed significant overexpression compared to the control, and 2 genes with significantly lower expression, FAM156A and FAM117B. The biological process associated with overexpressed genes is mainly biological regulation, signaling and cell proliferation. As for function, the one with the most genes involved is ionic binding and catalytic activity. **Conclusions.** The genes MIS18A, GPR75-ASB3 and JMJD7-PLA2 showed overexpression in the group of cells exposed to the laser, but they are not functionally related to each other; however, individual functional analysis shows that they are mainly involved with cell proliferation, although in different ways

## INTRODUCCIÓN

La aplicación de láser de baja potencia LLLT es una terapia que se viene empleando en diferentes aplicaciones en salud, incluido en odontología para la disminución de la inflamación, control del dolor, estimulación de regeneración de tejidos, entre otras. Aunque en ortodoncia se utiliza durante el tratamiento con aparatología fija para acelerar el proceso de remodelado óseo, se desconocen las bases moleculares subyacentes que gobiernan este proceso.

Recientemente se ha incrementado la demanda en tratamientos ortodónticos y con esto, la búsqueda por parte de los pacientes, de alternativas con menor tiempo de manejo para una mayor confortabilidad. Una de las limitantes del tiempo de tratamiento es que esto no depende de un solo factor, sino por el contrario son múltiples aspectos que hay que tener en cuenta como por ejemplo el diagnóstico, el manejo biomecánico, condiciones sistémicas del paciente, entre otros, que llevan a que se tome entre 2 y 3 años, regularmente (1). Un tratamiento con mucho tiempo afecta sensiblemente aspectos asociados con la calidad de vida del paciente, y aunado a esto, también puede generar otros efectos colaterales no deseados como el aumento de placa que conlleva a susceptibilidad de aparición de caries, enfermedad periodontal y en algunos casos podría llegar a comprometer las raíces dentales, que en ocasiones pueden presentar reabsorciones (2). Es por esto, que los avances tecnológicos buscan proponer alternativas que ayuden a reducir el tiempo y brindar tratamiento más seguros tanto para el paciente como para los especialistas.

En ese orden de ideas, se han desarrollado diferentes propuestas para acelerar el movimiento ortodóntico dental, algunos métodos invasivos como por ejemplo las corticotomías, o la aplicación de medicamentos tales como vitamina D, osteocalcina, entre otros. También se ha ensayado con micro estimulación mecánica (vibraciones), electroestimulación tópica, y más recientemente se ha reportado el uso de la terapia láser de baja potencia (LBP); sin embargo, los estudios se quedan cortos y aún hace falta más evidencia científica que respalde el uso de estos protocolos (2).

La estimulación con LBP es un terapéutica que requiere de una lámpara especial que produce un haz de luz coherente con una longitud de onda específica que es capaz de estimular un fotoreceptor específico en las células y promover la proliferación celular (3). La LBP muestra unos resultados beneficiosos para el paciente no solo por el efecto directo sobre los tejidos, sino que además, es una terapia no invasiva, que se puede aplicar de forma segura en sobre los tejidos sin riesgo de afectar otras estructuras (4). Esta terapia laser viene usándose con mayor frecuencia no solo como bioestimulante celular, sino que también se aplica para promover analgesia, controlar la inflamación, inducir la angiogénesis, entre otros, que en conjunto resultan en la promoción de una regeneración de tejidos, demostrados tanto en estudios *in vivo* como en trabajos *in vitro* (5, 6).

Particularmente, en la especialidad de Ortodoncia, la terapia laser de baja potencia se ha utilizado para diferentes aspectos como por ejemplo el manejo del dolor y la inflamación producida por las fuerzas ortodónticas sobre los tejidos periodontales. También se han evidenciado reportes de su uso en el manejo de trastornos temporomandibulares y algunos estudios muestran efectos positivos en la neoformación ósea después de la expansión palatina rápida, y específicamente en la aceleración de los movimientos ortodónticos (7). La evidencia científica respalda el uso del LBP como una terapia segura y eficaz para ayudar a acelerar el movimiento ortodóntico por medio de la estimulación del remodelado óseo, sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes no están completamente dilucidados.

En un reciente estudio realizado en la Universidad Antonio Nariño, en el que se evaluó el efecto de la irradiación LPB sobre la proliferación y diferenciación sobre células madre de origen dental, se pudo demostrar *in vitro* que sí aumenta el potencial de osteodiferenciación, demostrado con tinciones, la expresión de proteínas BMPs y la expresión génica de OCN, OPN y COL1; aunque en dicho estudio se realizó la recolección de muestras de RNA, no se hizo, ni se reportó el análisis de transcriptómica. El presente trabajo pretende darle continuidad a dicho estudio realizando el análisis transcriptómico con las bases de datos obtenidas por este grupo y establecervla posible relación en el remodelado óseo en el tratamiento ortodóntico.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El LBP ha sido utilizado desde hace unos años en forma empírica en diversos tratamientos, incluso el ortodóntico, bajo la teoría de su efecto antiinflamatorio, proliferativo y inmunomodulador evidenciado en estudios clínicos no dentales. Sin embargo, poco a poco se ha incrementado su uso, y con eso, la necesidad de consolidar evidencia que respalde científicamente la aplicación en estos tratamientos, los resultados clínicos muestran efectos favorables pero aún falta mucho por dilucidar acerca de los mecanismos genéticos y moleculares de esta terapia

A nivel molecular se ha reconocido que el target de la inducción con LBP es la mitocondria, específicamente el citocromo C, lo que promueve una mayor producción de ATP, y con esto, aumenta la energía celular, lo que representa mejor eficiencia en los diferentes eventos celulares (8). Aunque está claramente identificado que se aumenta la expresión de genes asociados con toda la producción de ATP, no se han realizado estudios transcriptómicos para identificar los cambios en expresión de genes asociados con la proliferación y osteodiferenciación, eventos celulares presentes en el remodelado óseo que se presentan durante los movimientos ortodónticos. Basado en lo anteriormente expuesto se plantea la pregunta: ¿Cuáles son las funciones de los genes involucrados en la estimulación con laser de baja potencia sobre células madre de la papila dental?



## 2.2. JUSTIFICACIÓN

El tratamiento de ortodoncia es un procedimiento que generalmente tiene un desarrollo largo en el tiempo, que puede durar desde un año en casos sencillos, hasta tres años en algunos casos complejos. Este tiempo generalmente depende de la biomecánica utilizada, de las condiciones del paciente, pero sobre todo de la capacidad de las células para realizar un remodelado óseo adecuado, si se intenta acelerar y aplicar fuerzas en menos tiempo podría ocasionar el deterioro de los tejidos, desde la pérdida de inserción hasta una pérdida ósea (9).

Actualmente los especialistas en ortodoncia buscan alternativas de tratamiento enfocadas en hacer que las células involucradas en el remodelado óseo tengan una mejor eficiencia en la proliferación (células mesenquimales) y diferenciación (osteoblastos) del lado de tensión, y apoptosis (osteoclastos) del lado de presión durante una la aplicación biomecánica, lo que permitiría realizar un tratamiento más seguro y disminuir los tiempos de trabajo (10).

Las células mesenquimales son células adultas indiferenciadas multipotentes que se encuentra en todo el organismo y hacen parte de los procesos regenerativos. En la actualidad, las células mesenquimales se cultivan *in vitro* y son un modelo muy aceptado para estudios de ciencias básicas. Está probado que con una adecuada inducción se puede promover la proliferación y la diferenciación hacia el linaje osteoblástico. El grupo de investigación de innovación en salud bucal de la Universidad Antonio Nariño viene trabajando desde hace varios años con células mesenquimales aisladas de la papila apical, conocidas como SCAP por sus siglas en inglés (*Stem cells from the Apical Papilla*). Estas células en particular han

mostrado tener mayor potencial osteogénico en comparación con otras células madre y son de más fácil obtención, reconocidas como unas células promisorias (11).

Por otra parte, en ortodoncia se viene usando el láser de baja potencia como terapia no invasiva mostrando que actúa como inductor para promover la osteodiferenciación en células madre de médula ósea y de otras líneas celulares. Son pocos los estudios de LBP sobre DSCs (*Dental Stem Cells*) y hasta la fecha solo hay un estudio sobre SCAPs, realizado por Gutiérrez *et al.* (2021), quienes identificaron el potencial osteogénico por medio de la detección de tres genes y 4 proteínas sobre células SCAP estimuladas con LBP(11), sin embargo, aún falta conocer la gran red de genes que se expresan con esta estimulación.

Lo anterior se puede lograr con análisis transcriptómico, que se fundamenta en la lectura de las secuencias de ARN presentes en una célula. Al analizar la colección completa de secuencias de ARN (el transcriptoma), se puede determinar la expresión de los diferentes genes que están activos durante los procesos celulares. Al obtener y comparar los transcriptomas de distintos tipos de células, o de la misma célula en diferentes condiciones, se puede lograr una comprensión profunda de lo que constituye un tipo específico de célula, cómo funciona normalmente y cómo los cambios en el nivel normal de actividad génica pudieran afectar o contribuir a mejorar los procesos celulares propios.

Finalmente, este proyecto se encuentra en el área de la biotecnología, reconocida por la OMS como un área promisoría que determina el desarrollo de un país. De igual manera, en Colombia, por medio del ministerio de ciencia tecnología e investigación se ha desarrollado el programa Nacional de Biotecnología que busca articular las capacidades de investigación e innovación de universidades, centros de investigación y empresas. Similarmente, la Universidad Antonio Nariño incluyó a la Biotecnología dentro de las prioridades nacionales institucionales, acorde con los objetivos institucionales propuestos en el plan de desarrollo de la UAN.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Establecer la función de los genes que se expresan en las células madre de la papila dental osteoinducidas estimuladas con láser de baja potencia.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar los genes que muestran los cambios de expresión en las células madre de la papila dental osteoinducidas estimuladas con láser de baja potencia.
- Establecer el sitio celular donde usualmente se expresa los genes sobre regulados (up/down), los procesos celulares con los que normalmente se asocian y las funciones más relevantes.
- Reconocer cuáles son las posibles redes de interacción y la expresión de los genes up/down que usualmente participan en las mismas vías.

## **4. ANTECEDENTES**

### **4.1.MARCO TEÓRICO**

#### **4.1.1. Fisiología del tejido de soporte durante el tratamiento de ortodoncia**

El tejido óseo es un tejido conectivo especializado que tiene como función principal dar la estructura rígida que sostiene otros tejidos blandos, principalmente los músculos. Toda la estructura conforma el esqueleto óseo y tiene funciones tanto mecánicas como biológicas. Los huesos también sirven de protección para otros órganos o sistemas (12). El hueso hace parte de la estructura de soporte del diente, en conjunto con el ligamento periodontal y el cemento radicular. Para realizar tratamientos de ortodoncia es absolutamente necesario conocer muy bien el tejido óseo y la fisiología durante la biomecánica de los tratamientos. Para comprender cabalmente la respuesta periodontal a las fuerzas ortodónticas es importante recordar el comportamiento biológico de los tejidos afectados por el tratamiento biomecánico (13).

El tratamiento de ortodoncia se basa en el principio de que la presión prolongada sobre los dientes los movilizará para regenerar el hueso circundante. El hueso se pierde selectivamente en algunas áreas y se agrega en otras. El diente se mueve a través del hueso, tirando del retenedor a medida que se mueve el alvéolo con la intervención activa de las fibras del ligamento periodontal (13).

Durante la masticación, los dientes y el periodonto están sometidos a cargas fuertes y periódicas. Al masticar alimentos blandos se aplica una fuerza de 1 a 2 kg, mientras que al masticar alimentos más estables se puede alcanzar hasta 50 kg. En esta forma de sobrecarga, el diente es sostenido por el ligamento periodontal, el líquido tisular impide que el diente se

mueva. transferir. Muévete rápido. El diente se ubica en el espacio del ligamento periodontal, la fuerza se transmite al hueso alveolar, el hueso alveolar se deforma en respuesta y cada diente se mueve ligeramente. El ligamento periodontal se adapta a cargas de corta duración; Con una fuerza sostenida, presionar el diente dentro del alvéolo hará que el hueso comience a regenerarse, incluso si la fuerza no es demasiado grande. La movilización ortodóncica se logra utilizando una fuerza suave y sostenida (14).

De igual forma, los tejidos blandos tales como músculos peribucales, labios y la misma lengua, ejercen fuerza sobre los dientes, que usualmente son constantes, pero en ocasiones pueden desequilibrarse, pero no provocan el movimiento de los dientes debido a la compensación que realiza el ligamento periodontal con su actividad metabólica (14). La idea detrás de esto es que las personas afectadas por una enfermedad periodontal avanzada necesitarán apoyo continuo después de la ortodoncia.

Asimismo, la respuesta de estos tejidos depende directamente de la magnitud y duración de la fuerza. La fuerza máxima de movimiento dentario sin interrumpir la irrigación capilar del ligamento periodontal es de 26 g/cm<sup>2</sup>, que en lo posible no se debe exceder. Si la fuerza aplicada al diente es tan grande que bloquea completamente la luz capilar en áreas específicas del ligamento periodontal, el cese del suministro de sangre allí conducirá a una necrosis aséptica del área comprimida..

Adicionalmente, histológicamente se puede observar que tras la desaparición de las células, las células de zonas vecinas intactas deben regenerar el hueso. Los osteoclastos aparecen cerca del área necrótica e invaden la base ósea necrótica del ligamento periodontal. Este proceso se llama reabsorción basal. Cuando esto sucede, el movimiento del diente inevitablemente se retrasará debido al retraso en la estimulación de la diferenciación celular y también porque se debe eliminar un espesor significativo de hueso antes de que el diente pueda moverse (15).

Con movimientos ortodóncicos apropiados, el mayor movimiento dental debe lograrse aplicando una fuerza suave adecuada a la viabilidad de las células del ligamento periodontal, relativamente sin dolor, y regenerando el hueso alveolar de los dientes basándose en el mecanismo de resorción ósea frontal. Incluso con un impacto menor, pueden aparecer pequeñas áreas avasculares en el ligamento, dificultando el movimiento de los dientes hasta su eliminación por reabsorción primaria (15).

#### **4.1.2. Remodelado óseo en ortodoncia**

La respuesta del hueso alveolar y las fibras periodontales ha sido ampliamente estudiada durante muchos años, dando lugar a descripciones bastante detalladas de las transformaciones tisulares del ligamento periodontal, así como a teorías que intentan explicar este progreso. Para entender esta respuesta tisular, hay que recordar que el diente se encuentra rodeado de hueso, que se adapta a la superficie de la raíz y forma una cavidad llamada alvéolo. Cada diente está unido al hueso alveolar mediante una fuerte estructura de soporte de colágeno conocida como ligamento periodontal, que es una red fibrilar colágena insertada en el cemento de la superficie de la raíz y en el hueso duro. El colágeno de los ligamentos se renueva continuamente durante la actividad normal. Además, el ligamento periodontal contiene otros componentes importantes como las células, dentro de las que se cuenta las células mesenquimales y osteoblastos principalmente. También tiene propiedades hidráulicas vasculares, neurales y tisulares únicas, que son el fundamento del movimiento ortodóncico seguro y confiable (16).

El movimiento ortodóncico pretende desplazar y reposicionar de una forma segura los dientes, pero este proceso requiere que tisularmente se realice una remodelación ósea, entendida como el proceso fisiológico del hueso que permite promover tanto resorción como aposición, entendida como el balance funcional del hueso. Esto representa básicamente dos respuestas que se dan simultáneamente, una en el lado que se opone al sentido del movimiento, conocido como lado de presión, en donde el hueso se tendrá que reabsorber para darle paso al desplazamiento radicular. En el lado contrario, conocido como lado de tensión

el hueso deberá formarse con la suficiente velocidad para tratar de mantener la integridad y el espesor periodontal (17).

Por otra parte, la respuesta tisular a los estímulos mecánicos ejercidos sobre los dientes dependerá de la magnitud de dichas fuerzas, por lo que en casos en que se incrementan intensamente pueden generar inicialmente la aparición del dolor, seguido de una necrosis celular del ligamento, para finalizar con una consecuente reabsorción basal. Contrariamente, las fuerzas de baja intensidad están relacionadas con la supervivencia de las células del ligamento y con una remodelación ósea adecuada, lo que se convierte en el reto de los especialistas, lograr la fuerza indicada que lleve a un movimiento controlado y una respuesta ósea balanceada (18).

#### **4.1.3. Teorías biológicas sobre la activación directa**

La activación directa se ha intentado explicar de muchas formas, pero en la actualidad permanecen vigentes dos teorías que explican cómo a través de una fuerza ligera se puede estimular la resorción ósea. En primer lugar, se encuentra la denominada teoría piezoeléctrica o de electricidad biológica, que propone que el movimiento dental se produce en parte por cambios en el metabolismo óseo, controlados por señales eléctricas producidas por la flexión inducida del hueso alveolar. Estas electro- señales inicialmente son de tipo piezoeléctrico, debido a la flexión que induce el desplazamiento de los electrones en la red cristalina, lo que genera un flujo de corriente eléctrica. Estas señales interactúan con las cargas electronegativas presentes en la membrana plasmática de las células, lo que induce a la permeabilidad y activan su potencial eléctrico, y con esto la consecuente activación de segundos mensajeros, que siguen sus vías para generar una respuesta celular. Se ha comprobado que al estimular el hueso con electrodos, la formación de nuevo hueso se da en la zona circundante al electrodo negativo, y contrariamente, la reabsorción se presenta hacia el positivo (19).

Por su parte, la teoría presión-tensión sugiere que las fuerzas aplicadas producen dos estenosis y un consecuente microaneurisma del lado en donde se realiza la presión. Este cambio en el flujo sanguíneo al interior del ligamento activa una respuesta molecular inmediata que inicia con la extravasación del oxígeno que interactúa con el hueso e induce la activación de la cascada osteoclástica. Del otro lado, en el de tensión, también como respuesta del ligamento, se activa la osteogénesis pro medio cambios químicos, actuando directamente o estimulando la liberación de otras moléculas señalizadoras que activan la osteodiferenciación (20).

Por su parte, otras teorías aceptadas están asociadas con la membrana plasmática, una sugiere que la presión de los líquidos en el ligamento logra vencer la resistencia de la membrana y hace que responda abriendo canales iónicos como compensación para equilibrarse con el medio, lo que permite el paso de segundos mensajeros como por ejemplo iones de calcio, AMP y GMPC principalmente, que se encargarán a su vez de activas la osteogénesis. Otra teoría propone que los mecano-receptores de la membrana tales como integrinas, son los responsables de percibir cambios mecánicos mínimos transmitidos desde el diente hacia el ligamento y estos actúan como activadores de vías metabólicas que inducen remodelado óseo (21).

De igual forma, también se ha sugerido que el desbalance puede inducir la liberación de neuropéptidos que actúan como primeros mensajeros, y estos a su vez, inducen un vasodilatación y extravasación de prostaglandinas y leucocitos necesario para modular la inflamación inicial. Las PGs, a su vez activan los segundos mensajeros AMPC y GMPC. Por su lado, los leucocitos activan indirectamente la producción de citocinas que activan la actividad osteoblástica (22).

#### **4.1.4. Lado de presión**

Es el lado en donde se comprime el ligamento periodontal por la acción de una fuerza ortodóntica aplicada durante el movimiento dental. Microscópicamente se observa que en



este lado se hay aumento progresivo de osteoclastos residentes en lagunas reabsortivas que luego se ocuparán por osteoblastos, que forman el hueso en donde se anclará nuevamente las fibras periodontales, que se reinsertarán tanto en la pared de hueso como la de cemento, de forma simultánea, la resorción ósea se reactivará en un nueva posición (23).

Así como sucede el remodelado de hueso, las fibras del ligamento también deben ser remodeladas, pero la inserción en el cemento debe mantenerse dando paso a la reconstrucción del sistema de la fibras. Algunos autores han descrito otros medios de recambio y reorganización fibrilar, en los que han reconocido que se da de forma dual, es decir, en algunas zonas permiten el desplazamiento del diente sin la fijación con el hueso, lo que permite de cierta forma un trabajo simultaneo de las dos áreas, sin que se recargue el remodelado a una sola. Autores como Sicher, por medio de estudios animales identificaron este proceso tanto en dientes de crecimiento continuo como en dientes de desarrollo fijo, y más recientemente, también fue demostrado en dientes humanos (21).

En ese orden de ideas, Sicher denominó a esta zona dual, como el plexo intermedio, pero en la actualidad, a pesar de sus hallazgos concluyentes, es más común referirse a una zona de coordinación en la que se enlazan las fibras más recientes con las más antiguas. Este proceso, a diferencia del hueso es mucho más dinámico y eficiente, debido a que la tasa proliferativa de los fibroblastos es muy alta en comparación con la del hueso. Por otra parte, en los pacientes de mayor edad, el comportamiento es diferente en la medida que el colágeno maduro cuenta con una alta cantidad de hidrogeniones, lo que lo hace más estable, y por ende se convierte en una limitación debido a que esto aumenta la probabilidad de que se presente recidiva. Así mismo, la calidad y tipo de hueso en pacientes adultos dificultan el acceso de las células para producir la resorción. También se observa que las zonas proximales del alveolo son más vascularizadas lo que facilita en cierta medida el movimiento en dirección mesial o distal en comparación con la vestibular o palatina (21).

#### **4.1.4. Lado de tensión**

En cuanto al lado contrario a la dirección de la fuerza, que es donde se estira el ligamento, se debe dar un proceso fisiológico contrario al otro lado, es decir que se presenta la formación constante de nuevo hueso acompañado lógicamente, por la formación de una nueva inserción de las fibras periodontales. Las fibras preexistentes permanecen en forma pasiva en la parte frontal al avance de nuevo hueso y otras fibras nuevas se van formando y reinsertando, así, se forma nuevo hueso y se mantiene el espesor constante (200-250µm) del ligamento periodontal durante la aplicación de las fuerzas ortodónticas.

En los movimientos ortodónticos, en el lado de tensión, a diferencia del lado de presión, no se comprime el ligamento por lo que no se interrumpe la irrigación, así que esto ayuda en cierta medida con el proceso de proliferación y osteodiferenciación, observable incluso a los pocos días del estímulo mecánico. La primera respuesta la hace generalmente el ligamento periodontal, en el que se presenta una hiperextensión de las fibras, que activan inmediatamente la osteogénesis para producir un osteoide, un tejido primario de hueso. Luego, se presenta una consecuente calcificación del tejido osteoide por la acción de las sales minerales. Finalmente, se las fibras se reconstruyen para mantener en lo posible la unión osteo-dental (23).

Similarmente, así como en el lado de presión, la regeneración en el lado de tensión en tratamientos ortodónticos realizados en pacientes adultos no se da con la misma velocidad que en pacientes más jóvenes, debido a que la actividad de los osteoblastos es muy limitada y de igual forma, la capacidad proliferativa también es lenta y en menor cantidad.

En investigaciones recientes, se ha estudiado la intervención de los restos epiteliales de Malassez (REM) durante la movilización dentaria ortodóntica. Los REM son remanentes de la vaina epitelial radicular de Hertwig que, después de su fragmentación, pasan a formar parte del ligamento periodontal 25. Algunas de sus células son incorporadas al cemento y otras permanecen cercanas a la superficie radicular. Las funciones de los REM habían sido asociadas únicamente con la aparición de quistes, sin embargo, se ha demostrado que al ser

estimuladas por medio del estrés mecánico que se produce en el ligamento durante el tratamiento, aumentan de tamaño y de número, además de intervenir significativamente en el metabolismo y remodelación del ligamento periodontal (24).

#### **4.1.5. Células mesenquimales**

Las células madre de origen dental (DSC, por su sigla en inglés), son células madre adultas mesenquimales, que se pueden obtener de diferentes tejidos orales y maxilofaciales (pulpa, encía, papila apical, ligamento, folículo, entre otros). Se aíslan de tejido de dientes tanto permanentes como deciduos, o también se pueden obtener de estructuras de soporte dental como ligamento periodontal, o de estructuras adyacentes como el capuchón pericoronario, la papila apical o la bolsa de Bichat (25).

Las DSCs presentan varios marcadores de superficie comunes a todas las fuentes de donde se aíslan, pero también, algunos específicos a cada origen de obtención. Los marcadores de superficie que se utilizan más frecuentemente para identificar el inmunofenotipo de estas células son: Stro-1, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166 y CD271 (26). Su multipotencia se ha demostrado por su capacidad de diferenciación osteogénica, dentinogénica, adipogénica, condrogénica, miogénica, y neurogénica. A pesar de que su capacidad para producir osteoblastos y de liberar factores osteoinductivos demostrada en estudios in vitro e in vivo, la mayoría de los experimentos que usaron DSCs se centraron en sus potencialidades odontogénicas (29)

#### **4.1.6. Células madre de la papila apical**

Una de las fuentes de obtención de DSCs es la papila apical, a partir de la cual se obtienen células madre denominadas como (SCAP) por su traducción del inglés (Stem cell from apical papilla), residentes en dientes inmaduros en los que aún no se ha formado completamente la raíz y que corresponden a estadios 7, 8 o 9 según la clasificación de Nolla, es decir, formación de uno, dos o tres tercios de la raíz sin cierre apical. Además, estos dientes se pueden obtener fácilmente por extracción indicada para ortodoncia, frecuentemente usados

los primeros premolares y/o terceros molares (27). Las SCAPs fueron aisladas, caracterizadas y descritas por primera vez, hace aproximadamente una década por Sonoyama y col (25).

Estudios recientes han demostrado que las SCAPs tienen un alto potencial osteogénico y son células mesenquimales reconocidas como promisorias para la regeneración tisular por su potencial osteogénico, neurogénico y angiogénico. Es necesario continuar haciendo estudios básicos y preclínicos con SCAPs en conjunto con otros biomateriales, encaminados a la estandarización de protocolos de regeneración ósea más eficiente (28).

#### **4.1.7. Terapia láser de baja potencia.**

La luz amplificada por emisión estimulada de radiación (LÁSER) se usa en diferentes aplicaciones para la industria y la tecnología. De igual forma, la aplicación de baja potencia ha mostrado beneficios en medicina dado que genera efectos terapéuticos en tejidos biológicos. Es un haz de luz con propiedades específicas diferentes a las de la luz ordinaria, con alto grado de concentración energética, como la longitud de onda, la emisión continua y ordenada de ondas, entre otras. El láser es una luz muy intensa, capaz de generar efectos muy definidos cuando reacciona con algún punto en el entorno (29).

Se ha utilizado en múltiples aplicaciones dado que convierte la energía eléctrica en fuentes de alto rendimiento en labores muy específicas, desde la comunicación por fibra óptica hasta la manipulación de elementos celulares microscópicos. Desde pocos años después de haberse inventado se ha aplicado en diferentes áreas de la medicina tales como ortopedia, rehabilitación, oftalmología, dermatología, odontología, entre otras, siendo su futuro muy prometedor en todas las áreas de diagnóstico y terapéuticas (29)

La terapia con láser a bajo nivel (LLLT, por su sigla en inglés) consiste en la aplicación de una fuente de luz de bajo poder que promueve la tasa de reparación tisular por medio de la disminución de la inflamación y el dolor, sin cambiar la estructura del tejido. El mecanismo de acción propuesto para esta biofotomodulación es que los cromóforos mitocondriales y los foto-receptores de la membrana plasmática absorben la luz rojo y la cercano al infrarrojo,

provocando la excitación de un electrón de baja energía lo cual produce energía metabólica, que a su vez disocia el inhibidor del óxido nítrico del complejo citocromo C oxidasa, aumentando el transporte de electrones y por lo tanto la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP, lo que finalmente conlleva a un aumento de la actividad del ADN y de la síntesis de ARN y proteínas necesarias para la proliferación y migración celular, además reguladoras de procesos inflamatorios; sin embargo, aún se desconocen muchos aspectos de los mecanismos de acción (30).

El láser de baja potencia empleado a unas longitudes de onda comprendidas entre 600 y 700nm, estimula, in vitro, el crecimiento, proliferación y diferenciación de varios tipos celulares como fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales y miocitos. Por otro lado estudios tanto in vitro como in vivo sugieren que puede llegar favorecer la formación de nuevas estructuras óseas ya que estimula la proliferación y diferenciación de osteoblastos, con un marcado aumento en la expresión de biomarcadores como la fosfatasa alcalina y la Osteocalcina, convirtiéndose en un buen modulador de procesos de regeneración ósea (31).

#### **4.1.8. Aspectos genéticos asociados con la neoformación ósea**

La regeneración ósea se sustenta en el remodelado óseo, un proceso fisiológico necesario en la reparación de lesiones, homeostasis del calcio, adaptación del tejido frente a fuerzas mecánicas tanto intrínsecas como extrínsecas y la eliminación del tejido que ha perdido vitalidad, principalmente. El remodelado óseo tiene un rol de importancia en la edad adulta de los individuos debido a que regula procesos para mantener la masa ósea y la estabilidad de la densidad mineral ósea (32).

La regulación molecular en el proceso de la regeneración ósea han sido objeto de estudio por varios grupos de investigación, y aunque se ha avanzado en su conocimiento, aún falta mucho por dilucidar debido a que se ven involucradas una gran cantidad de moléculas y diferentes vías de señalización. Dentro de estas vías, la Wingless tail/ $\beta$ -catenin (Wnt/ $\beta$ -catenina) y la proteína morfogenética ósea (BMP) juegan un papel fundamental. También hay reportes de otras vías implicadas asociadas con moléculas como mitogen-activated

protein kinase (MAPK), los factores de crecimiento derivado plaquetario (PDGF), fibroblástico (FGF), similar a la insulina (IGF) y transformante beta (TGF- $\beta$ ), además de algunos iones como el Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), entre otros, que transducen señales que determinan el destino y función de osteoblastos, promueven la proliferación, activan segundos mensajeros, entre otras más funciones dentro del proceso regenerativo (17).

Las células madre mesenquimales presentes en el tejido óseo expresan factores de transcripción que permiten su diferenciación hacia diferentes fenotipos, como osteoblastos, adipocitos o condrocitos. Una vez estas células se exponen a las señales del medio se generan desbalances (mayor o menor expresión) en los factores de transcripción que inducen a la célula hacia una diferenciación osteoblástica, afectando a su vez la expresión de otros factores de transcripción como el relacionado con runt 2 (Runx2), el Msh homeobox 2 (Msx2) y osterix (Osx), entre otros, muy importantes para la lograr la diferenciación osteoblástica.

Las Wnt son una súper familia de glicoproteínas secretadas y ricas en cisteína. Tienen una gran cantidad de funciones tanto en el desarrollo como en la vida adulta, como por ejemplo la regulación de la diferenciación, mantenimiento, destino, función y muerte celular.

Se ha evidenciado que la activación de la vía Wnt genera un aumento en la masa ósea desde las primeras fases de diferenciación celular, durante la definición del compromiso de la célula madre mesenquimal hacia una diferenciación de osteoblasto. También regula el fenotipo osteoblástico de otras formas, al inicio, estimula la replicación de preosteoblastos y posteriormente también logra inhibir la apoptosis tanto de osteoblastos como de osteocitos. En osteoblastos maduros, la señal a través de Wnt se da por la interacción con los receptores de membrana de la familia Frizzled (Fz) y correceptores de lipoproteína de baja densidad relacionados con proteína 5 y 6 (LRP5/6), además, también inhibe la actividad de la enzima glicógena sintasa quinasa 3 (GSK3), lo que resulta en el control de la degradación  $\beta$ -catenina. Cuando  $\beta$ -catenina se acumula en el citosol hace una translocación al núcleo y termina actuando como coactivador transcripcional del factor linfóide de unión al promotor de células T (LEF/TCF), lo que termina regulando positivamente genes implicados en diferenciación celular (33).

En los casos en que no se activa la vía de señalización Wnt ya sea por problemas del receptor o del acople ligando-receptor, se activa el complejo de degradación de  $\beta$ -catenina conformado por tres proteínas: GSK3, APC (Adenomatous polyposis coli) y Axin. GSK3 se encarga de fosforilar a  $\beta$ -catenina y ésta se degrada por la vía ubiquitina/proteasoma  $\beta$ -TrCP ( $\beta$ -TrCP-mediated ubiquitin/proteosome pathway) (34).

Por otra parte, las BMPs son proteínas con capacidad osteogénica y autorreguladora. La vía señalización de BMP por la vía Smad (small mothers against decapentaplegic) no es tan compleja. El ligando BMP interactúa con su correspondiente receptor de membrana (tipo serina/treonina cinasa tipo I y tipo II). De esta interacción se forma el complejo heterodimérico que fosforila proteínas Smad, cuando las Smad están activadas se traslocan al núcleo para posteriormente interactuar con el elemento de unión a Smad (SBE). Una vez en el núcleo, induce la expresión del gen Runx2, generando una autorregulación, dado que - como se vio anteriormente- Runx2 tiene un rol importante en la diferenciación osteoblástica (35).

También se ha demostrado que la vía de señalización Notch está sobre-regulando los mecanismos de reparación ósea. La inhibición de la vía conduce a una disminución en la proliferación, diferenciación y maduración osteoblástica. La vía Notch es la más simple de todas las vías de señalización, debido a que una vez el ligando activa al receptor Notch, la misma porción intracelular de este último se transloca al núcleo y activa la transcripción de genes reguladores de la maduración del osteoblasto (36).

Otras vías han sido implicadas dentro del proceso de regeneración ósea, así como algunas moléculas que interactúan a su vez con otras moléculas componentes de las principales vías reguladoras. En general, es una vasta red de interacciones moleculares que intervienen en las diferentes fases de diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico, por lo que el entendimiento de esta red aún es incipiente debido a la gran cantidad tanto de moléculas como de interacciones. Aunque ya se ha comprendido una parte importante de este

complejo proceso, es necesario continuar con más estudios que ayuden a dilucidar los aspectos moleculares asociados a la regeneración ósea.

#### **4.1.9. Cambios en la expresión génica de las células madre expuestas terapia láser de baja potencia.**

Son pocos los estudios que ha evidenciado los cambios en la expresión génica de células mesenquimales luego de ser expuestas a la terapia láser de baja potencia. Amid R et al (2014) en una revisión de la literatura, evidenciaron que el principal efecto de la estimulación láser sobre cultivos de células madre es el aumento de la proliferación y diferenciación principalmente (37).

De igual manera, en un estudio experimental realizado por Wu et al (2013) comprobaron que la irradiación de laser a 660nm produce aumento en la expresión de genes como fosfatasa alcalina (ALP), lactodeshidrogenasa (LDH) entre otros. Similarmente, en otro estudio se comprobó el láser puede promover la diferenciación odontoblástica de las células madre de origen pulpar (DPSC) humanas a través de las vías de señalización TLR-4, ERK y P38 MAPK (He et al., 2015). La(s) interleucina(s) inflamatoria(s)-1. -6. -11 (IL-1. IL-6. IL-11) y TNF- $\alpha$  pueden estimular el desarrollo de osteoclastos y, por lo tanto, el proceso de resorción ósea.

Los factores de crecimiento son moléculas secretadas cuya expresión se ve significativamente aumentada al ser expuesta a la estimulación láser, pueden afectar la diferenciación celular y promover o inhibir la mitosis. Da Rocha et al (2021) evidenció que la mayoría de factores de crecimiento aumentó la expresión por la estimulación láser, a excepción de algunos pocos en los que se vio disminuida, como por ejemplo BMP-1 (-3,67 veces), BMP-4 (-3,73 veces), y BMP-7 (-2,28 veces). En el mismo sentido, VEGF-B fue significativamente disminuido por el tratamiento con láser (-9,43 veces)

En un estudio previo realizado por el grupo de investigación de Innovación en salud oral de la Universidad Antonio Nariño, se evidenció que la irradiación con terapia láser de



baja potencia sobre las células mesenquimales aisladas de la papila apical dental tiene un efecto de aumento de la tasa de proliferación a los 7, 14 y 21 días, así como un aumento en el potencial osteogénico. Además se evidenció que hubo un aumento estadísticamente significativo de la expresión de genes osteopontina (Opn), osteocalcina (con) y colágeno tipo I (Col I) analizados por RT-PCR, y también un aumento en la expresión de factores de crecimiento VEGF y TGF $\beta$ 2 a los 14 días de expuestas las células al láser (11).

De igual manera, el mismo grupo de investigación realizó un análisis de transcripción a partir de la extracción de RNA de las células expuestas al láser y se halló cambios significativos en la expresión de diferentes genes en cada uno de los periodos evaluados (1,7 14 y 21 días post irradiación) (Datos no publicados). Particularmente se encontró una sobre expresión de los genes MIS18A, FAM156A y GPR75(11).

#### **4.1.10. Análisis funcional de la expresión génica**

El resultado del análisis de expresión diferencial de RNA-seq es una lista de genes expresados diferencialmente (DEG) significativos. Para obtener una mayor comprensión biológica de los genes expresados diferencialmente, se pueden realizar varios análisis según el objetivo a consolidar:

- Determinar si hay enriquecimiento de funciones, interacciones o vías biológicas conocida.
- Identificar la participación de genes en nuevas vías o redes agrupando genes en función de tendencias similares.
- Utilizar cambios globales en la expresión genética visualizando todos los genes significativamente regulados hacia arriba o hacia abajo en el contexto de datos de interacción externos.

Generalmente, para cualquier análisis de expresión diferencial, es útil interpretar las listas de genes resultantes utilizando herramientas basadas en R y web disponibles gratuitamente.

Si bien las herramientas para el análisis funcional abarcan una amplia variedad de técnicas, se pueden clasificar en tres tipos principales: análisis de sobrerrepresentación, puntuación de clase funcional y topología de ruta.

Existe una gran cantidad de herramientas de enriquecimiento funcional que realizan algún tipo de análisis de "sobrerrepresentación" consultando bases de datos que contienen información sobre la función y las interacciones de los genes.

Estas bases de datos generalmente clasifican genes en grupos (conjuntos de genes) según una función compartida, participación en una vía, presencia en una ubicación celular específica u otras categorizaciones, p. vías funcionales, etc. Esencialmente, los genes conocidos se agrupan en categorías que han sido nombradas consistentemente (vocabulario controlado) en función de cómo se ha anotado funcionalmente el gen. Estas categorías son independientes de cualquier organismo; sin embargo, cada organismo tiene distintas categorizaciones disponibles.

Para determinar si alguna categoría está sobrerrepresentada, puede determinar la probabilidad de tener la proporción observada de genes asociados con una categoría específica en su lista de genes en función de la proporción de genes asociados con la misma categoría en el conjunto de antecedentes (categorizaciones de genes para el organismo apropiado).

Una de las categorizaciones más utilizadas es la Gene Ontology (GO) establecida por el proyecto Gene Ontology. Este proyecto es el resultado de la colaboración para abordar la necesidad de descripciones consistentes de productos genéticos en todas las bases de datos". El Gene Ontology Consortium mantiene los términos GO, y estos términos GO se incorporan a las anotaciones genéticas en muchos de los repositorios populares de genomas animales, vegetales y microbianos.

Las herramientas que investigan el enriquecimiento de funciones o interacciones biológicas a menudo utilizan las categorizaciones de ontología genética (GO), es decir, los

términos GO para determinar si alguno ha modificado significativamente su representación en una lista determinada de genes. Por lo tanto, para utilizar e interpretar mejor los resultados de estas herramientas de análisis funcional, es útil tener una buena comprensión de los términos GO en sí y de su organización.

### Ontologías GO

Para describir las funciones de los genes y los productos genéticos, los términos GO se organizan en tres vocabularios controlados independientes (ontologías) de manera independiente de la especie:

**Proceso biológico:** se refiere al papel biológico que involucra al gen o producto génico y podría incluir “transcripción”, “transducción de señales” y “apoptosis”. Un proceso biológico generalmente implica un cambio químico o físico del material de partida o insumo.

**Función molecular:** representa la actividad bioquímica del producto génico, dichas actividades podrían incluir “ligando”, “GTPasa” y “transportador”.

**Componente celular:** se refiere a la ubicación en la célula del producto génico. Los componentes celulares podrían incluir "núcleo", "lisosoma" y "membrana plasmática".

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. TIPO DE ESTUDIO

Estudio descriptivo transversal con fuente de datos secundarios

### 5.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

Este proyecto se llevó a cabo utilizando una base de datos del estudio realizado por el profesor, asesor del presente trabajo David Gutiérrez Ramírez. La lista de resultados analizada tenía información génica a los 21 días de haber sido estimulada con LLLT y otra de grupo control. No se realizó calculo muestral debido a que fue seleccionada por conveniencia, es decir, que se aceptaron todas las unidades de observación que cumplieron con los criterios de selección durante el periodo evaluado

La muestra se seleccionó por conveniencia, se tomaron todos los datos del análisis transcriptómico realizado por RNAseq obtenidos por el profesor, asesor del presente trabajo David Gutiérrez Ramírez. No se realizó calculo muestral debido a que fue seleccionada por conveniencia, es decir, que se aceptaron todas las unidades de observación que cumplieron con los criterios de selección durante el periodo evaluado.

### 5.3. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

**Tabla 1.** Descripción de las variables

VARIABLE	DESCRIPCIÓN	CATEGORÍA O UNIDAD DE MEDIDA	TIPO DE VARIABLE
GEN	Nombre asignado al gen según la base de datos NCBI para la especie de <i>homo sapiens</i>	Denominación del gen	Cualitativa Nominal
FPKM	Fragments de transcrito por millón de secuencias mapeadas	0 a $\infty$	Cuantitativa Continua

Expresión diferencial	Medida que se aplica para comparar la expresión génica de grupos distintos, calculada con el logaritmo base 2 del grupo experimental por el logaritmo base 2 del grupo control	$-\infty$ a $\infty$	Cuantitativa Continua
Expresión diferencial significativa	Valor de p obtenido por la comparación de expresión del grupo experimental con respecto al control	0 a 1	Cuantitativa Continua
Nivel de expresión	Determinado por el cambio (negativo/positivo) en la expresión de un gen entre el grupo control y el experimental	Up Down *	Cualitativa Nominal
Interacción	Genes que usualmente interactúan con otro según reportes previos hallados en la base de datos <i>Pathways commons</i>	Nombre de los genes	Cualitativa Nominal

#### 5.4. CONSIDERACIONES ÉTICAS

La presente investigación se ciñó a la normatividad mundial concerniente con investigación en salud que involucra seres humanos tales como la Declaración de Helsinki a nivel mundial, y particularmente, en la normatividad en la República de Colombia, las normas colombianas de investigaciones en salud como la Resolución 8430 de 1993 promulgada por el Ministerio de Salud de la República de Colombia, en la que se basó para determinar la presente investigación como “sin riesgo” por cuanto solo se usaron bases de datos. De igual forma, el comité de ética y de investigación de la facultad de odontología de la Universidad Antonio Nariño aprobó todos los documentos pertinentes al proyecto. Por ser un estudio con fuente de datos secundarios requería la aprobación del propietario de los datos, profesor asesor del presente trabajo, Dr. David Gutiérrez, quién voluntariamente dio su consentimiento para usar los datos con fines investigativos.

## 5.5. PROCEDIMIENTO

### 5.5.1. Recolección de información

Para el presente estudio sólo se utilizó una fuente de información secundaria, es decir, datos obtenidos a partir de una base recolectada previamente. El propietario de los datos previamente dio su aprobación para que sean utilizados con fines de investigación. Se trabajó con tres bases de datos: 1) Expresión de las células no expuestas (control) 21 días postinteracción; 2) Células expuestas al láser (experimental) a los 21 días después de la irradiación; y finalmente también se trabajó con la base de datos de “Expresión diferencial método Poisson”.

Se tomó el archivo en crudo en formato de texto plano (.txt) y se exportó a formato de hoja de cálculo (.xlsx) para ser leído en Microsoft Excel®. Se utilizó la herramienta de “filtros” de Excel (Microsoft®) para extraer los datos que se utilizaron como muestra de análisis y se exportaron a un base de datos nueva (Figura 1). Para controlar el sesgo de información, el análisis de datos lo realizó un solo investigador.

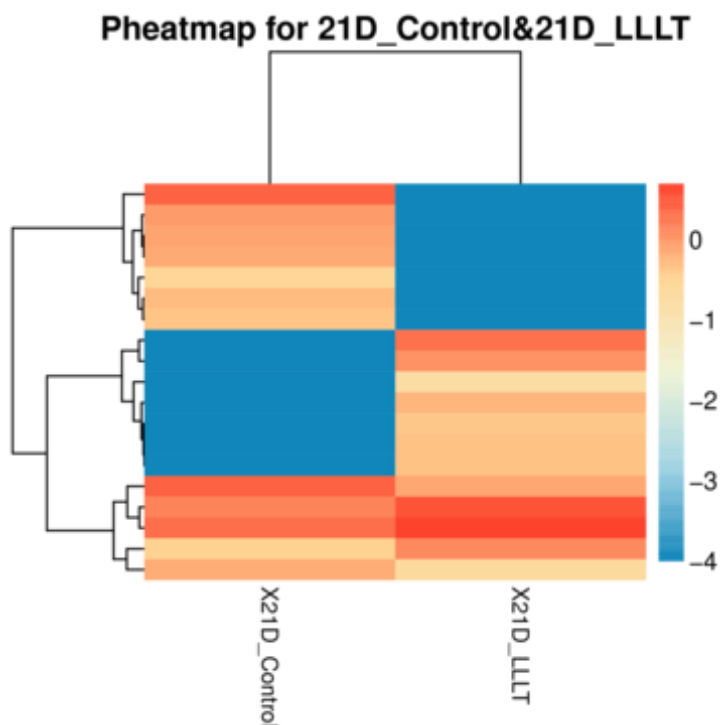
**Tabla 2.** Base de datos de expresión diferencial entre el grupo control y el láser.

GeneID	Length	21D_Control	21D_LLTLT-	Log2FoldChange(21D_LLLT)	FDR	Up/Down	Pvalue	Symbol
100529261	2867	0,01	2,03	766.533.591.718.518	2,13E-12	Up	8,44E-24	CHURC1-FNT
10723360	2200	0,01	1,13	682.017.896.241.519	1,51E+04	Up	1,69E-06	LOC10272336
641517	264	0,01	0,66	604.439.411.935.845	0,56220977	*	0,248574	DEFB109B
720	5426	0,01	0,58	585.798.099.512.757	4,75E+00	Up	4,02E-11	C4A
100526832	4229	0,01	0,47	555.458.885.167.764	3,057+06	Up	4,38E-05	PHOSPHO2-K
8357	473	0,01	0,47	555.458.885.167.764	0,38690894	*	0,1240506	HIST1H3H
29970	1668	0,01	0,46	552.356.195.605.701	6,23E+09	Up	1,84E+00	SCHIP1
100631383	3060	0,01	0,42	539.231.742.277.876	3,48E+09	Up	9,16E-02	FAM47E-STBO
54937	2198	0,01	0,41	535.755.200.461.808	0,00132266	*	5,93E+00	SOHLH2
100128327	1118	0,01	0,41	535.755.200.461.808	0,06254758	*	0,00769428	TRAPC3L
3293	1134	0,01	0,41	535.755.200.461.808	0,06248146	*	0,00769428	HSD17B3
4852	576	0,01	0,37	520.945.336.562.895	0,38745953	*	0,1240506	NPY
978	985	0,01	0,34	508.746.284.125.034	0,16510074	*	0,0308946	CDA

3013	510	0,02	0,67	506.608.919.045.777	0,25902566	*	0,0619072	HIST1H2AD
654426	1325	0,01	0,33	504.439.411.035.845	0,10192811	*	0,01541792	TMEM191C
317772	448	0,01	0,33	504.439.411.035.845	0,56487072	*	0,248574	HIST2H2AB
115650	934	0,01	0,29	485.798.099.512.757	0,25980394	*	0,0619072	TNFRSF13C
401427	933	0,01	0,29	485.798.099.512.757	0,25987492	*	0,0619072	OR2A7
3040	622	0,01	0,28	48.073.549.220.576	0,56772572	*	0,248574	HBA2
102723555	939	0,01	0,28	48.073.549.220.576	0,38848622	*	0,1240506	SPDYE16
203562	732	0,01	0,28	48.073.549.220.576	0,38738078	*	0,1240506	TMEM31C
128346	950	0,01	0,28	48.073.549.220.576	0,25895514	*	0,0619072	C1orf162
347517	1077	0,01	0,25	464.385.618.977.472	0,2603729	*	0,0619072	RAB41
6343	578	0,01	0,25	464.385.618.977.472	0,56755698	*	0,248574	SCT

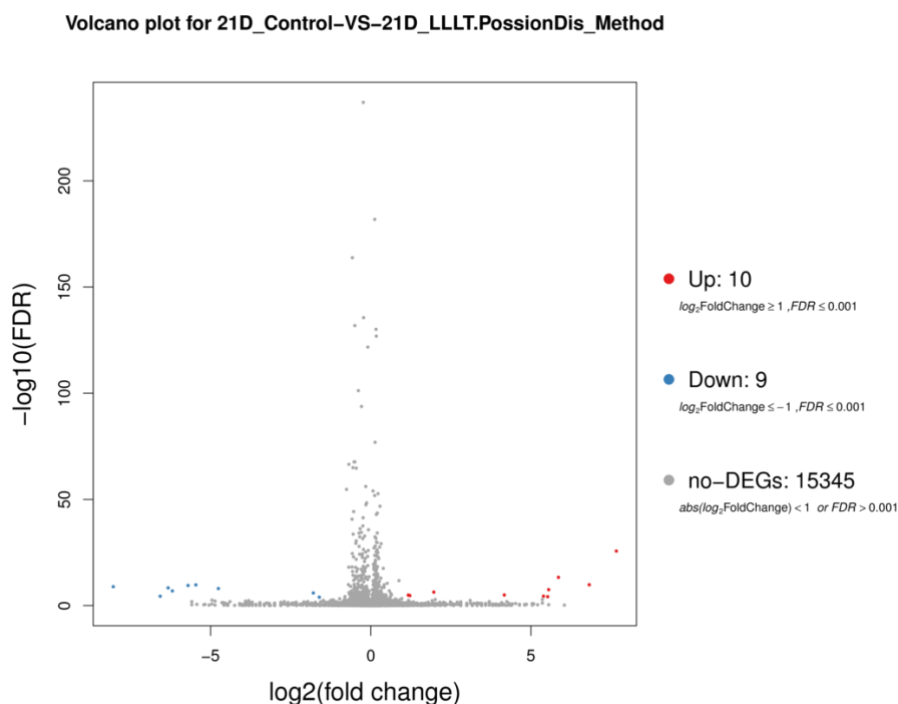
### 5.5.2. Análisis funcional

Se reportó un total de quince mil trescientos sesenta y cuatro genes (15.364) que evidenciaron algún nivel de expresión tanto en el control como en el grupo experimental, algunos con mayor o menor expresión en el grupo experimental como se evidencia en la figura 1.



**Figura 1.** Mapa de calor de expresión diferencial

Se identificaron un total de 19 genes que estaba “up” o “down” expresados, de los cuales fueron 10 con sobreexpresión: CHURC1-FNTB, LOC102723360, C4A, PHOSPHO2-KLHL23, SCHIP1, FAM47E-STBD1, RGPD6, JMJD7-PLA2G4B, GPR75-ASB3, MIS18A y los subexpresión: SMIM11A, WRB-SH3BGR, PLA2G4B, CDRT4, C8orf44-SGK3, ATP5MF-PTCD1, ZNF660-ZNF197, FAM156A y FAM117B (Figura 2 y Tabla3).



**Figura 2.** Gráfico de volcán de expresión génica del grupo control y el láser.

**Tabla 3.** Base de datos filtrada con los genes sobre y sub expresados

GeneID	Length	21D_Control	21D_LLLT-	Log2FoldChange(21D_LLLT FDR	Up/Down	Pvalue	Symbol
100529261	2867	0,01	2,03	766.533.591.718.518	2,13E-12 Up	8,44E-24	CHURC1-FNT
102723360	2200	0,01	1,13	682.0.17.896.241.519	1,51E+04 Up	1,69E-06	LOC102723360
720	5426	0,01	0,58	585.798.099.512.757	4,75E+00 Up	4,02E-11	C4A
100526832	4229	0,01	0,47	555.458.885.167.764	3,05E+06 Up	4,38E-05	PHOSPHO2-K
29970	1668	0,01	0,46	552.356.195.605.701	6,23E+09 Up	1,84E+00	SCHIP1
100631383	3060	0,01	0,42	539.231.742.277.876	3,48E+09 Up	9,16E-02	FAM47E-STBD1
729540	7640	0,01	0,18	4.17	9,77E+08 up	2,28E-02	RGPD6
8681	3340	0,33	1,29	1.97	4,34E+06 uP	7,54E-04	JMJD7-PLA2G4B
100302652	2007	1,45	3,38	1.22	1,87E+09 UP	4,69E-02	GPR75-ASB3
54069	1587	2,18	4,91	1.17	1,18E+09 UP	2,79E-02	MIS18A
54065	917	2,61	0,01	(-8.03)	1,28E+05 Down	1,56E-06	SMIM11A
106865373	1416	0,95	0,01	(-6.57)	3,75E+0,9 Down	9,93E-02	WRB-SH3BGR
100137049	2752	0,8	0,01	(-6,32)	4,66E+05 Down	6,22E-06	PLA2G4B
284040	2515	0,73	0,01	(-6.19)	1,26E+0,7 Down	1,97E-04	CDRT4
100533105	4563	0,52	0,01	(-5.70)	3,38E+0,4 Down	3,92E-07	C8ORF44-SGK3
100526740	5538	0,44	0,01	(-5,46)	1,74E+0,4 Down	1,96E-06	ATP5MF-PTCD1
110354863	7663	0,27	0,01	(-4,75)	9,09E-02 Down	1,24E-05	ZNF660-ZNF197
29057	1946	2,67	0,77	(-1.79)	1,10E+08 Down	2,05E-03	FAM156A
150864	5795	0,67	0,22	(-1.61)	0,00011213 Down	3,56E-01	FAM117B



Se realizó la normalización como lo indica BID, empresa que realizó el análisis transcriptómico y se descartaron los que estaban dentro del margen de error reportado, y que mostraron una expresión (FPKM) igual o menor a 0,01. Se seleccionaron los siguientes genes para análisis: JMJD7, GPR75, MIS18A, FAM156A y FAM117B (Tabla 4)

**Tabla 4.** Genes para análisis

GeneID	Length	21D_Contrc	21D_LLTLT-	Log2FoldChange(21D_LLTLT)	FDR	Up/Down	Pvalue	Symbol
8681	3340	0,33	1,29	1.97	4,34E+06	uP	7,54E-04	JMJD7-PLA2G
100302652	2007	1,45	3,38	1.22	1,87E+09	UP	4,69E-02	GPR75-ASB3
54069	1587	2,18	4,91	1.17	1,18E+09	UP	2,79E-02	MIS18A
29057	1946	2,67	0,77	(-1.79)	1,10E+08	Down	2,05E-03	FAM156A
150864	5795	0,67	0,22	(-1.61)	0,00011213	Down	3,56E-01	FAM117B

Posteriormente se calculó el LOG2 fold change (LFC) (38) de la base normalizada y se realizó el análisis funcional de los genes seleccionados en las bases de datos digitales Pathcards, Quickgo, Reactome, David, Genecard y Pathway commons, y se cruzaron los datos de redes de genes que interactúan, genes de las vías de señalización involucradas con la base de datos normalizada y se tuvo en cuenta para análisis los que presentaban un LFC mayor 0,5.

## 5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de expresión en FPKM fueron obtenidos a partir del promedio de muestras triplicadas. Se calculó la diferencia significativa por medio de la prueba de poisson para expresión diferencial. A partir de FPKM se calculó el logaritmo en base dos del Fold change (LFC) por medio de la formula en Excel (=LOG(FPKM laser/FPKMcontrol;2) Fueron reconocidas las diferencias que existían entre los dos grupos y se tuvo un valor significativo ( $p < 0,05$ ), realizado y validado por BGI con el software R.

## 6. RESULTADOS

Los resultados de este estudio son datos secundarios obtenidos apartir de la investigación titulada “*evaluacion invitro del potencial osteogénico de la celulas madre mesenquimales de origen dental estimuladas con una matriz de fibrina bioactiva y láser de baja potencia*”(Gutierrez,D, 2019). Para interés de este proyecto se seleccionaron como motivo de investigación el grupo estimulado con láser de baja potencia y grupo control (células no expuestas) evaluados a los 21 días después de la estimulación con el láser.

Se obtuvo una base de datos con 15.364 genes los cuales fueron analizados por medio de transcriptómica, dando como resultado la sobreexpresión de 3 genes “UP” (MIS 18A, GPR75-ASB3, JMJD7-PLA2) y 2 genes “DOWN” (FAM156A, FAM117B) (Tabla 5).

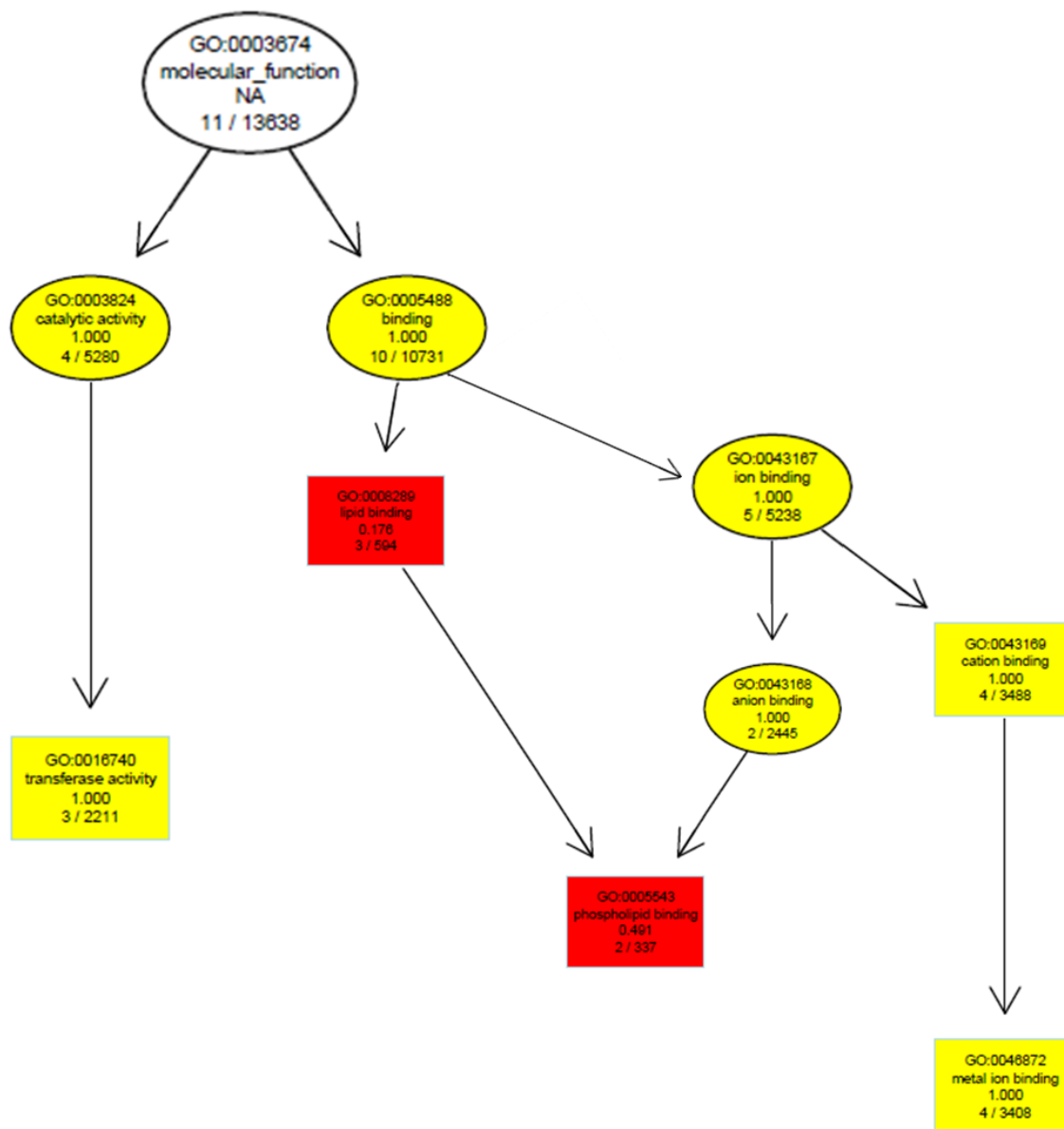
**Tabla 5.** Genes seleccionados para análisis.

GEN	EXPRESIÓN FPKM		LOG2FC	NIVEL	P Valor
	CONTROL	LASER			
MIS 18A	2.18	4.91	1,17	UP	0,027
GPR75	1.45	3.38	1,97	UP	0,046
FAM156A	2.67	0.77	-1,79	DOWN	0,002
JMJD7	0.33	1.29	1,97	UP	0,00075
FAM 117B	0.67	0.22	-1,61	DOWN	0,035

Se puede evidenciar en las células estimuladas con láser de baja potencia después de 21 días había sobreexpresión significativa en MIS18A, el cual mostró una expresión 1,17 veces mayor en comparación con el control. Similarmente se observó que tanto GPR75 como JMJD7-PLA2 presentaron 1,97 veces mayor expresión en comparación con el control. Por otra parte los genes FAM156A y FAM117B mostraron respectivamente 1,79 y 1,61 veces menor expresión en las células irradiadas que en las no irradiadas.

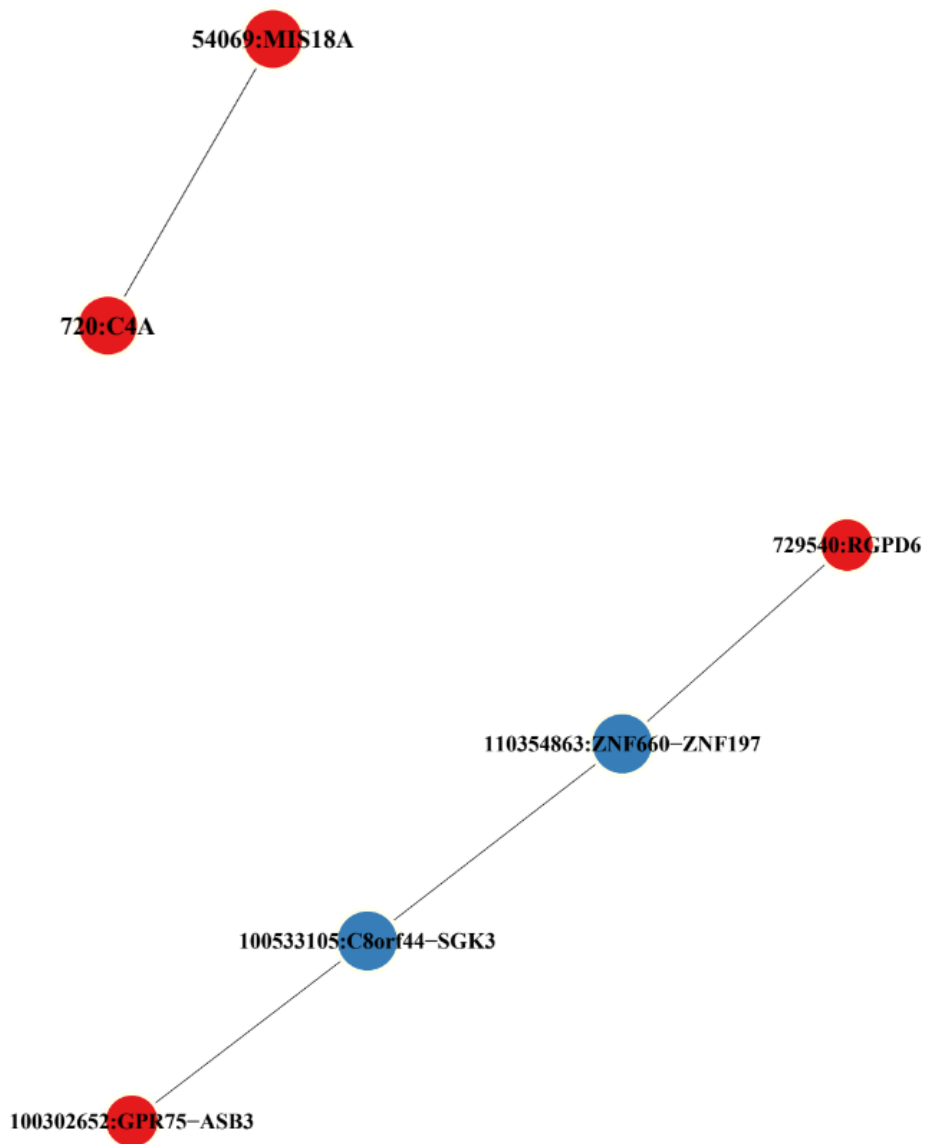
El análisis funcional realizado con GO function con el set de genes seleccionados pudo comprobar que la principal función molecular en la que se encuentran involucrados es

la actividad transferasa (GO:0016740), union de iones (GO:0043167), union de cationes (GO:0043169), unión de aniones (GO:0043168) y union de iones a metal (GO: 0046872). (Figura 3).



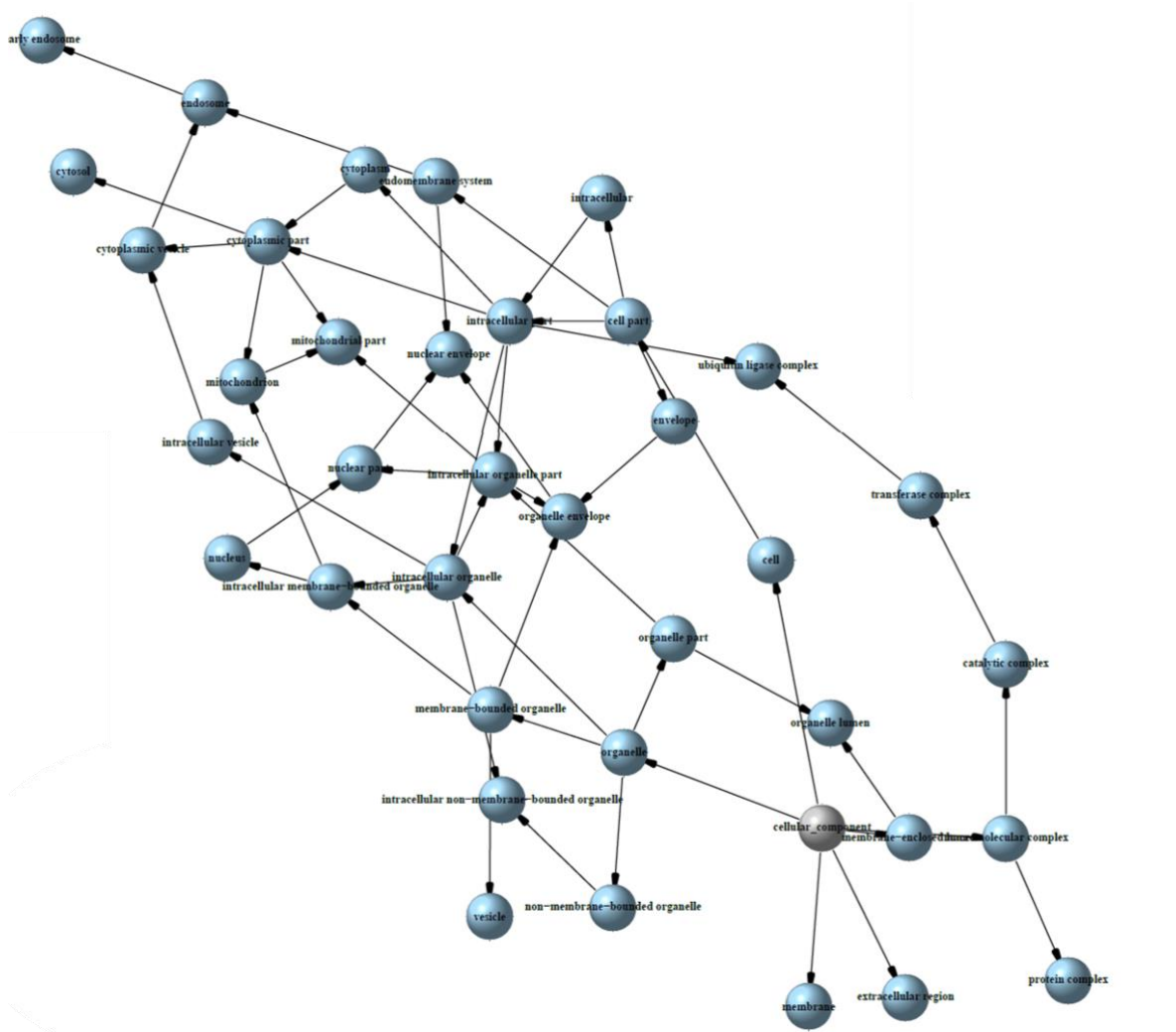
**Figura 3.** Gráfico de función molecular basado en GO

El análisis de “enrichment” usando los 5 genes no arrojó ningún resultado (Figura 7), lo que indica que no se encuentra asociados en alguna vía, por lo tanto se procedió a hacer análisis individual de cada gen.



**Figura 4.** Gráfico de redes según la función entre el set de genes seleccionados

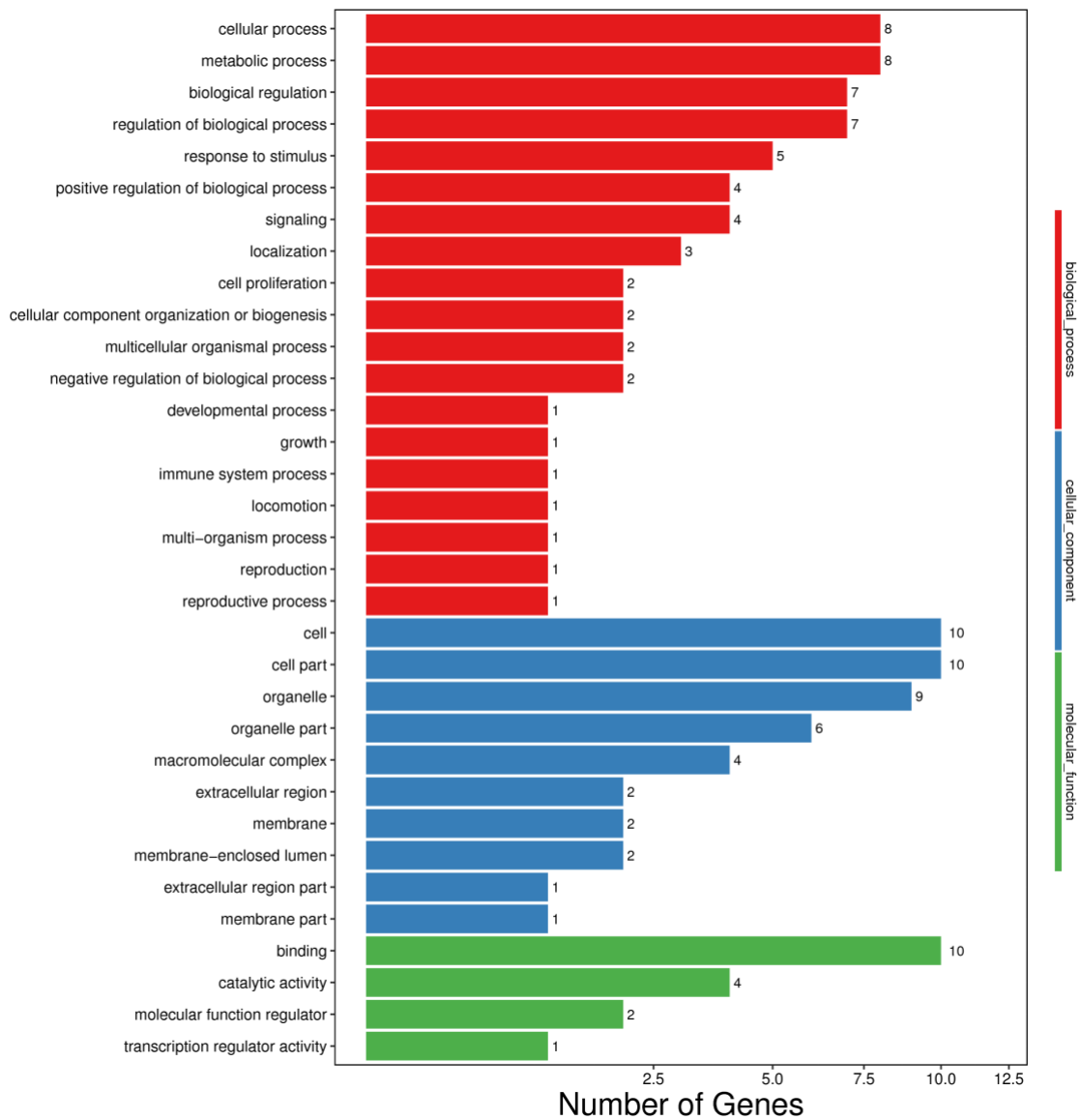
El análisis general de los componentes celulares asociados principalmente muestra que el núcleo y la mitocondria son los que más frecuentemente están involucrados con el set de genes analizados con expresión diferencial (Figura 5).



**Figura 5.** Gráfico de red de los componentes celulares relacionados con la expresión génica.

El resumen del número de genes involucrado en cuanto a función molecular, componentes celulares y procesos biológicos asociados con la expresión génica diferencial de las células expuestas a láser de baja potencia se puede observar en la figura 9, en la que

se aprecia que el proceso biológico con mayor presencia de genes involucrados es la regulación biológica, señalización y proliferación celular. En cuanto a la función, la que tiene más genes involucrados es la de unión iónica y la de actividad catalítica (Figura 9).



**Figura 6.** Número de genes asociados con procesos, componente celular y función.

## 6.1. ANÁLISIS INDIVIDUAL POR GEN

### 6.1.1. MIS18A

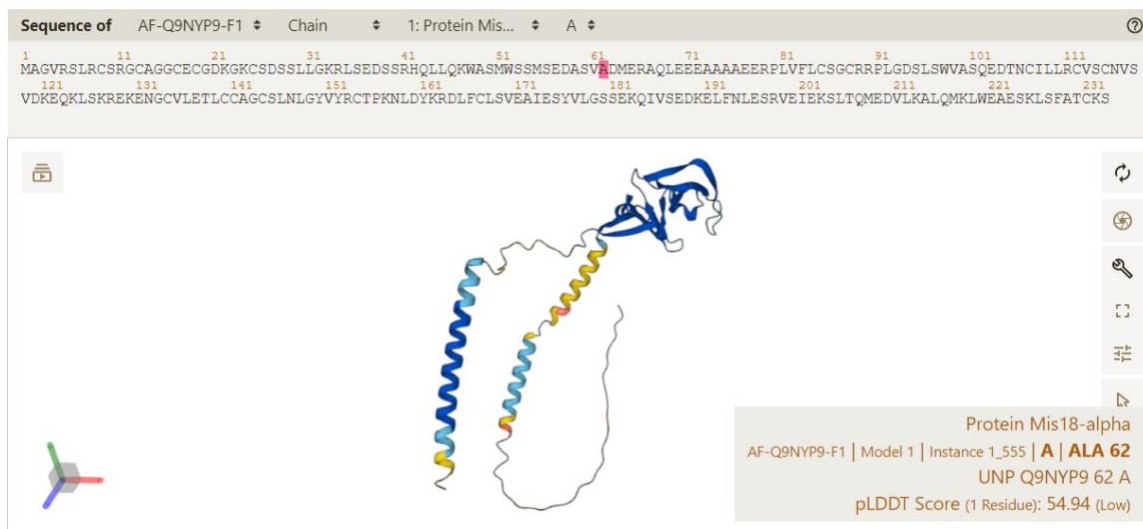
Es un gen con una longitud de 3340b que codifica para la proteína del mismo nombre que generalmente se encuentra en el núcleo y en menor proporción en el citosol y la mitocondria, como se evidencia en la figura 10.

**Tabla 6.** Interacciones de MIS18A

Name	Source	Evidence	Confidence
Nucleoplasm	HPA	IDA	★★★★☆
Cytosol	HPA	IDA	★★★★☆
Chromosome, centromeric region	GO_Central	IBA	★★★★☆
Chromatin	GO_Central	IBA	★★★★☆
Nucleus	GO_Central	IBA	★★★★☆

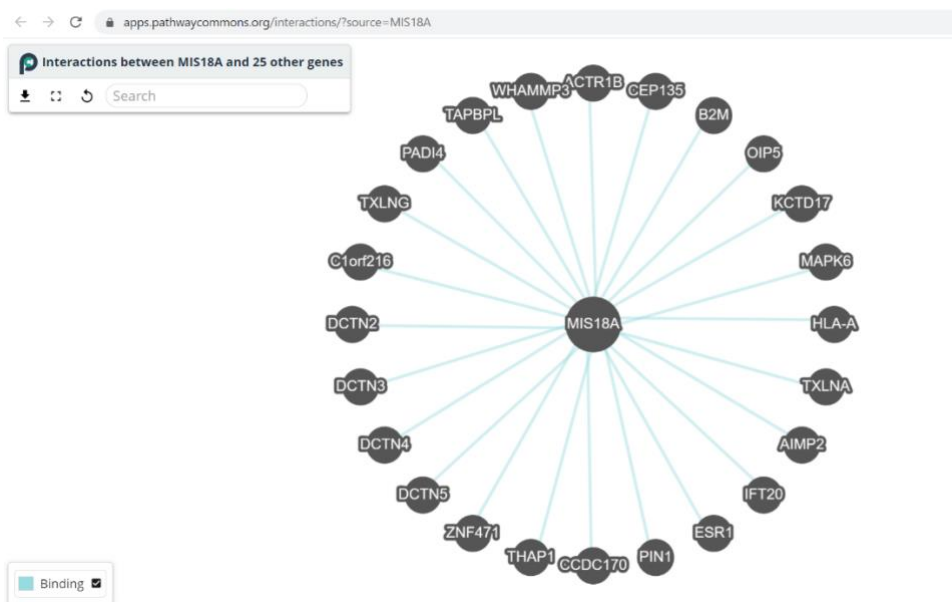
El gen Mis18A codifica para la proteína llamada Mis18alfa que tiene múltiples funciones, pero principalmente está asociada con la división celular. Esta proteína está asociada principalmente con el núcleo el proceso biológico con el que se encuentra asociado principalmente es la división celular.

**Figura 7.** Estructura tridimensional de la proteína MIS18alpha



Dentro de las funciones más importantes del gen MIS18 está el reclutamiento de una proteína llamada CENPA en los centrómeros y a la segregación cromosómica durante el proceso de la mitosis. El papel funcional de MIS18A radica en que permite que esta proteína CENPA funcione de forma correcta ya que es responsable de la especificación de identidad en el cromosoma, además de que codifica proteínas en el centrómero el cual se une a la histona para permitir el plegamiento del ADN. La deficiencia de MIS18A causa una mala localización del gen CENP-A lo cual da como resultado falta de segregación de los cromosomas durante la división celular de células embrionarias y esto conduce a muerte celular y letalidad en la etapa embrionaria temprana.

Después de realizar el análisis de interacciones de MIS18A se pudo comprobar en reportes previos que tiene relación con otros genes como MAPkinasasas, BDM, dedos de Zinc, entre otros (Figura 12). Al revisar el LFC de cada uno de estos genes en la base de datos, se pudo evidenciar una mayor expresión (>0,5) de ESR1 y AIMP2.

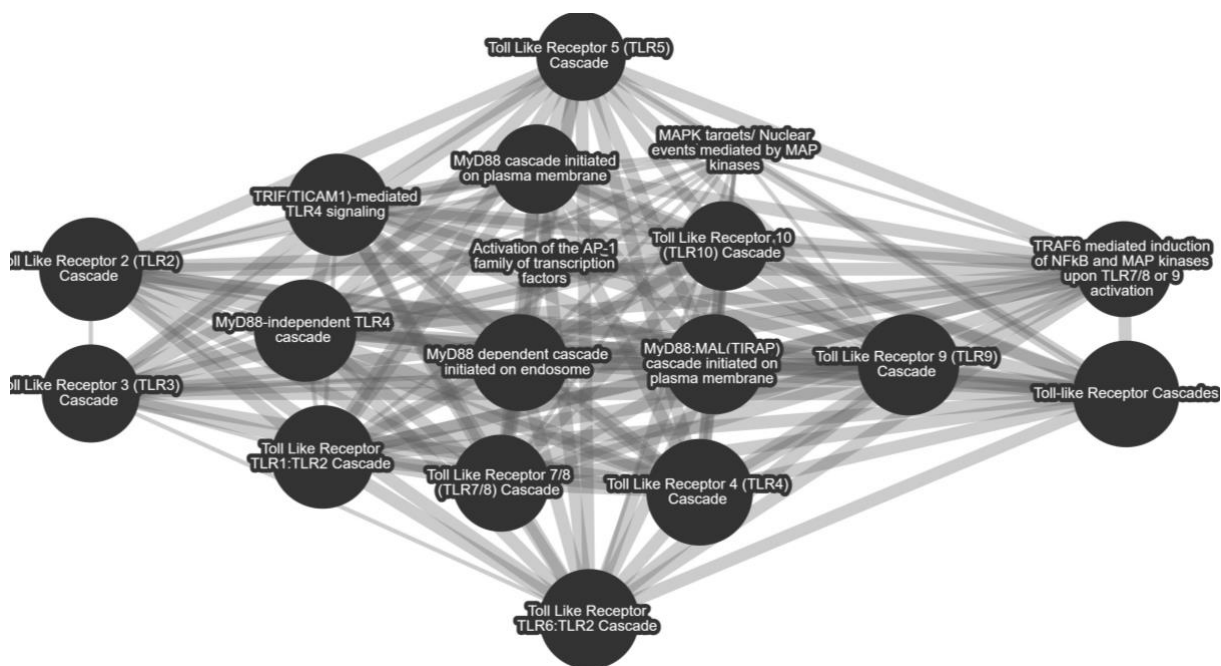


**Figura 8.** Interacciones de MIS18A



El gen ESR1 codifica un receptor de estrógeno y un factor de transcripción activado por ligando, entre otras funciones tiene un rol importante en el metabolismo. Está también involucrado en la regulación de la expresión de genes eucarióticos y afectan la proliferación y diferenciación celular en los tejidos diana. En el análisis de vías de señalización posiblemente asociadas con MIS18A se encontró una relación con ESR, que mostró mayor expresión en comparación con el control. Este está asociado con la vía de TLR7, gen que también se halló expresado 1,7 veces en comparación con el control.

Por otra parte, dentro de las vías de señalización reportadas a partir de estudios sobre *homo sapiens*, se encuentran las vías asociadas con: ciclo celular y mitosis, empaquetado de los extremos de los telómeros, señalización citoesquelética y mantenimiento de los telómeros, y daño celular. Las vías asociadas se pueden resumir en la Figura No.9.



**Figura 9.** Vías de señalización asociadas al set de genes que interactúan con MIS18.

De igual forma, también se encontró que hay otra vía de señalización implicada con el set de genes en lo que se halló mayor expresión asociados a MIS18A, como lo es la vía de las JUN kinasas, que es una familia de proteínas altamente conservadas, activadas por

protein-kinasas (MAPK). Las JNK están codificadas por al menos tres genes activados por choque térmico de calor, citoquinas inflamatorias o por irradiación UV (Figura 10). La MAPK18 se encontró que se expresa 0,85 veces más en el grupo laser en comparación con el control.

The screenshot shows the Reactome search interface. The search bar contains 'MIS18A, ESR1, ATF2, FOS, NFKB2'. The results show 30 results out of 36. The primary pathway identified is 'JNK (c-Jun kinases) phosphorylation and activation mediated by activated human TAK1'. The pathway identifier is R-HSA-450321 and the species is Homo sapiens. The compartment is cytosol, nucleoplasm. The description states that JNKs are an evolutionarily conserved family of serine/threonine protein kinases, activated by heat shock, inflammatory cytokines, or UV radiation. It lists three genes: JNK1/SAPK-gamma, JNK2/SAPK-alpha, and JNK3/SAPK-beta, and describes their roles in cell survival and proliferation.

**Figura 10.** Análisis funcional de MIS18 y el set de genes con mayor expresión.

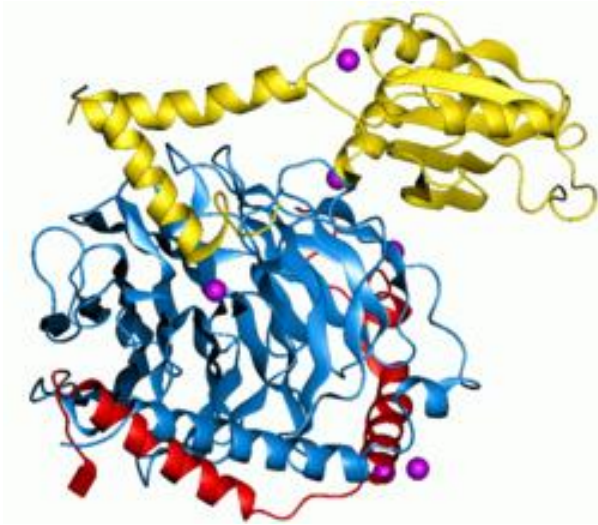
El análisis funcional reporta que la principal función asociada a MIS18 y el set de genes que usualmente interactúan con esta, se encontró que la función principal es la de unión iónica y otras asociadas con proliferación como división, ciclo celular, etc, como se puede evidenciar en la figura 11.

Gene Product	Symbol	Qualifier	GO Term	Evidence	Reference	With / From
UniProtKB:A0A214AT96	mis18a	enables	GO:0046872 (F) metal ion binding	ECO:0007322 (IEA)	GO_REF:0000043	UniProtKB-KW:KW-0479
UniProtKB:A0A214AT96	mis18a	located_in	GO:0005694 (C) chromosome	ECO:0007322 (IEA)	GO_REF:0000043	UniProtKB-KW:KW-0158
UniProtKB:A0A214AT96	mis18a	located_in	GO:0000775 (C) chromosome, centromeric region	ECO:0007322 (IEA)	GO_REF:0000043	UniProtKB-KW:KW-0137
UniProtKB:A0A214AT96	mis18a	involved_in	GO:0007049 (P) cell cycle	ECO:0007322 (IEA)	GO_REF:0000043	UniProtKB-KW:KW-0131
UniProtKB:A0A214AT96	mis18a	involved_in	GO:0051301 (P) cell division	ECO:0007322 (IEA)	GO_REF:0000043	UniProtKB-KW:KW-0132

**Figura 11.** Funciones asociadas al set de genes que interactúan con MIS18.

### 6.1.2. GPR75

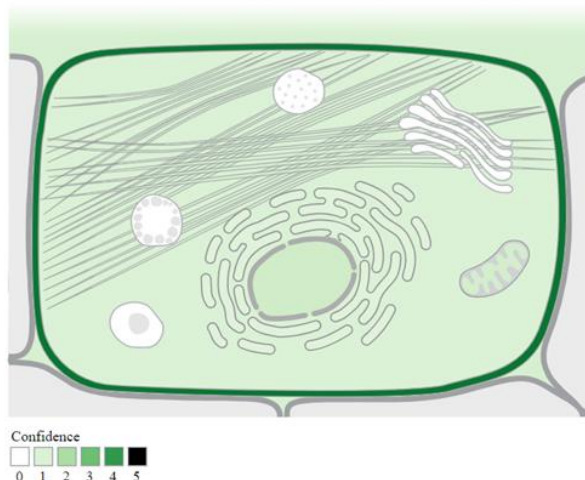
Es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G. Los GPR son receptores de la superficie celular que activan las proteínas de unión de nucleótidos de guanina tras la unión de un ligando. Son conocidos como interruptores “*switches*” moleculares (figura 12).



**Figura 12.** Estructura tridimensional de la proteína GPR75

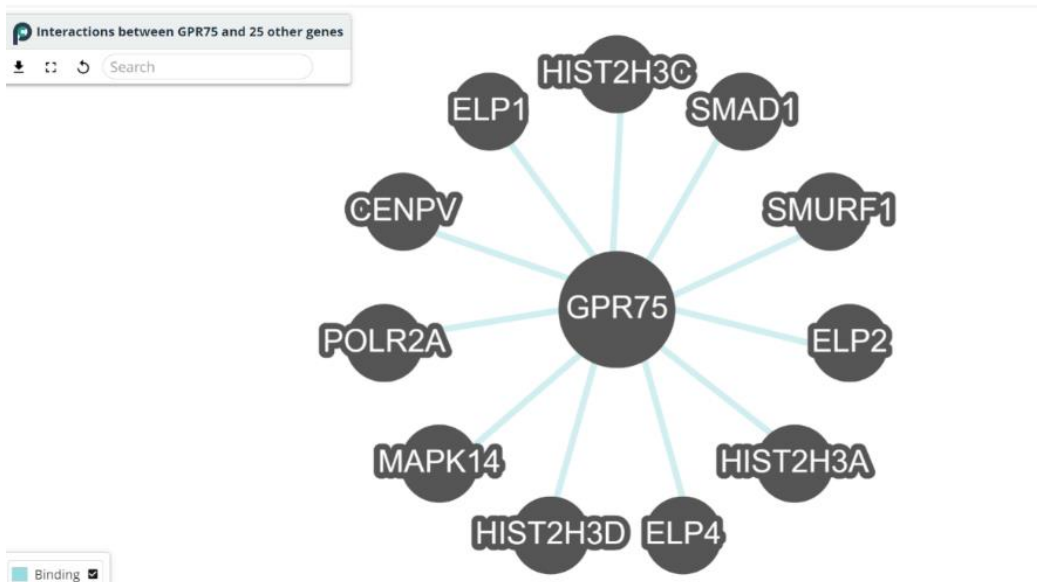
Actualmente, GPR75 está clasificado como un GPCR huérfano y se están realizando varios estudios para identificar su ligando. En un estudio, se demostró que la quimiocina CCL5 (RANTES) estimula la movilización de calcio y la formación de trifosfato de inositol en células transfectadas con GPR75.

La ubicación principal de GPR75 evidentemente es en su mayor porcentaje en la membrana celular, debido precisamente a su función como receptor en la vía de señalización, como se puede evidenciar en la figura 13.



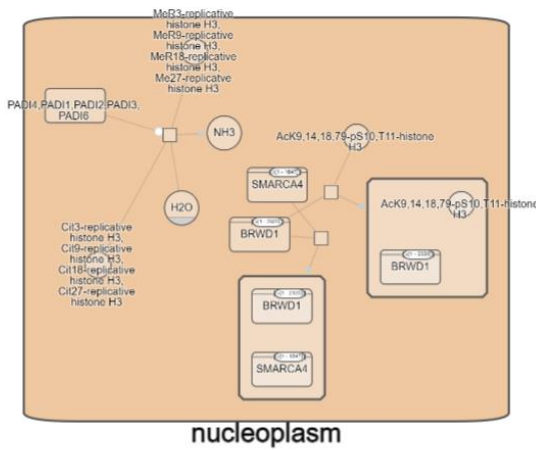
**Figura 13.** Estructura celular en donde actúa GPR75

De los genes reportados que usualmente interactúa GPR75, se encuentran algunos asociados con el complejo de traducción, diferenciación celular, entre otros (Figura 18). Se encontró algunos con mayor expresión en la base de datos, como por ejemplo SMURF1 (0,17 FC) ( $p=0,04$ ), ELP4 (0,36 FC) ( $p=0,03$ ), HIST2H3D (0,18 FC), cenpv8 (0,14 FC).



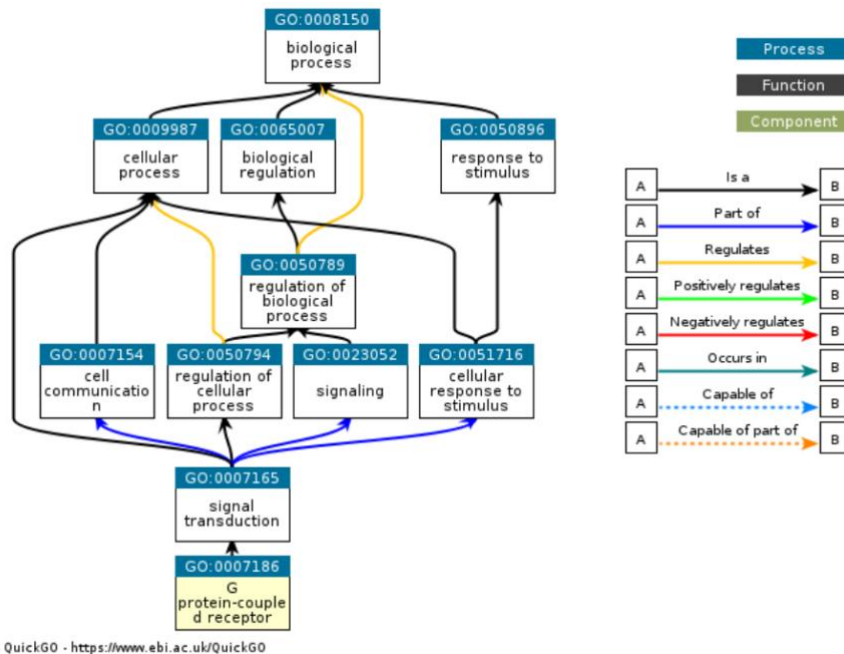
**Figura 14.** Análisis funcional de MIS18 y el set de genes con mayor expresión.

Al realizar el análisis de ELP4 se pudo evidenciar que la mayoría de genes que reportan interacción son aquellos asociados con el proceso de replicación durante la división celular figura 15.



**Figura 15.** Procesos celulares asociados con GPR75

En cuanto al análisis funcional se encontró que la principal función es la de señalización a través de proteína G ((GO:0007186), transducción de señal (GO:0007165) y vía de señalización mediada por quimioquinas (go:0070098) (Figura 16).



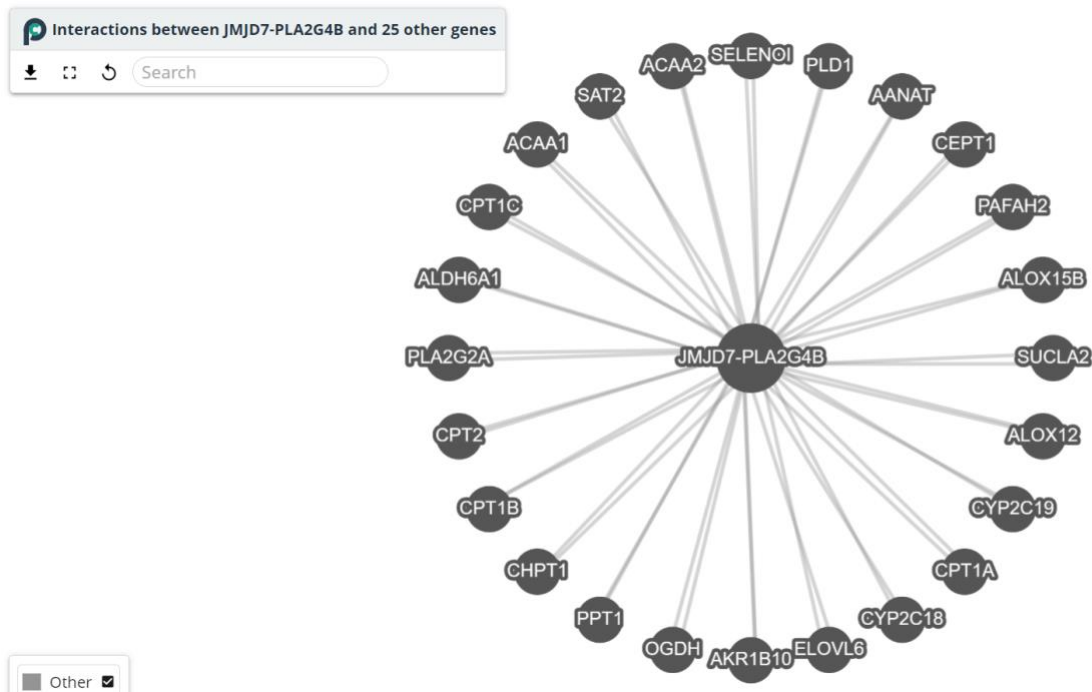
**Figura 16.** Análisis funcional de GPR75.

### 6.1.3. JMJD7-PLA2G4B

Es un gen codificador de proteínas. Entre sus vías relacionadas se encuentran la biosíntesis de glicerofosfolípidos y la remodelación de la cadena de acilo de la PE, también incluyen la unión de iones de calcio y la actividad de fosfolipasa. Dentro del gen PLA2G4B Este gen codifica un miembro de la familia de proteínas de la fosfolipasa A2 citosólica. Las enzimas fosfolipasa A2 hidrolizan el enlace sn-2 de los fosfolípidos, liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos. Las fosfolipasas son un grupo de enzimas que hidrolizan los fosfolípidos en ácidos grasos y otras moléculas lipofílicas. Hay cuatro clases principales; fosfolipasa A, fosfolipasa B, fosfolipasa C específica de fosfoinositida y fosfolipasa D.

Dentro de las fosfolipasas asociadas a este gen se encuentran:

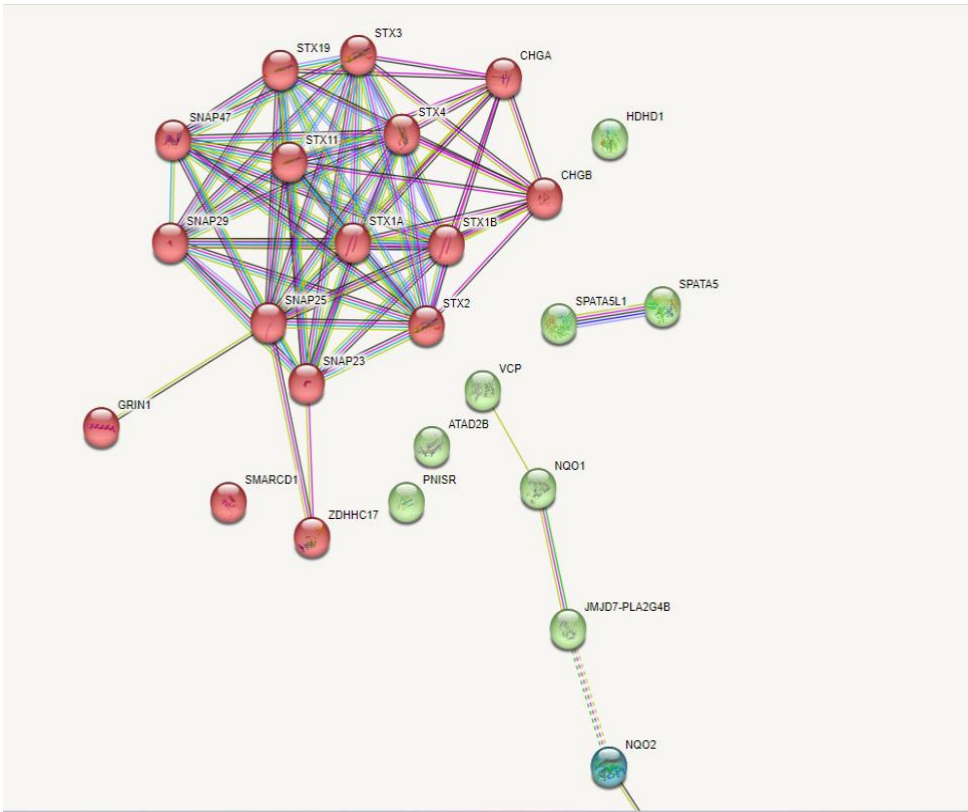
- Fosfolipasa A1 y A2 dependiente de calcio y lisofosfolipasa que pueden desempeñar un papel en la remodelación de los fosfolípidos de la membrana.
- [Isoforma 3]: fosfolipasa A2 dependiente de calcio y lisofosfolipasa. Rompe el enlace éster del grupo acilo graso unido a la posición sn-2 de las fosfatidiletanolaminas, produciendo lisofosfolípidos que pueden usarse en ciclos de desacilación-reacilación. Hidroliza las lisofosfatidilcolinas con baja eficiencia, pero es ineficiente frente a las fosfatidilcolinas.
- [Isoforma 5]: Fosfolipasa A1 y A2 dependiente de calcio y lisofosfolipasa. Rompe el enlace éster del grupo acilo graso unido a la posición sn-1 o sn-2 de los diacilfosfolípidos (actividad de fosfolipasa A1 y A2, respectivamente), produciendo lisofosfolípidos que pueden usarse en ciclos de desacilación-reacilación. Puede hidrolizar aún más los lisofosfolípidos, lo que permite una desacilación completa. No tiene actividad frente a los fosfolípidos de alquilacilo.



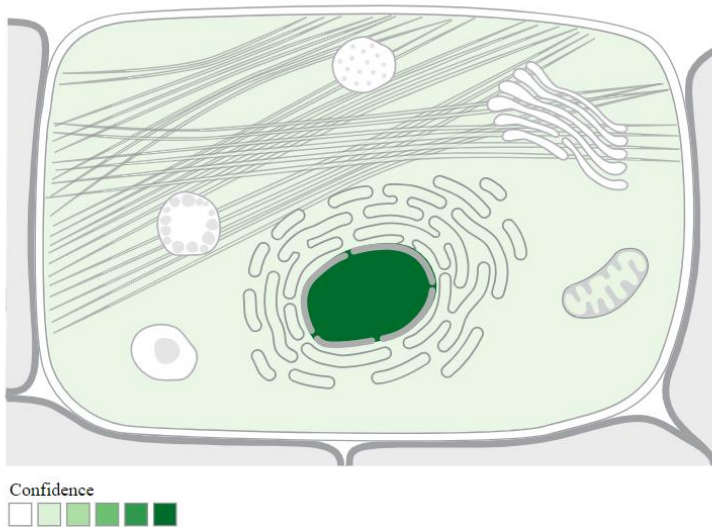
**Figura 17.** Análisis funcional de JMJD7-PLA2G4B y el set de genes con mayor expresión

PAFAH2 0,25 (P=0,036), CYP2C18 1,58, PPT1 0,30 (P=0,0001), ALDH6A1 0,21 (P=0,01) CPT1C -0,30 CHPT 0,12 activador plaquetario? No se reportan vías en común entre el set de genes identificados con mayor cambio de expresión.

Por otra parte en el análisis con la herramienta string se identificaron 3 cluster de genes asociados a JMJD7-PLA2G4B, pero solo se seleccionó para análisis el cluster en el que se encontraba el gen. Se identificaron genes como SNAP23, NQO1, VCP, NQO2, que también mostraron una mayor expresión en el grupo laser.



**Figura 18.** Vías de señalización asociadas al set de genes que interactúan con JMJD7-PLA2G4B

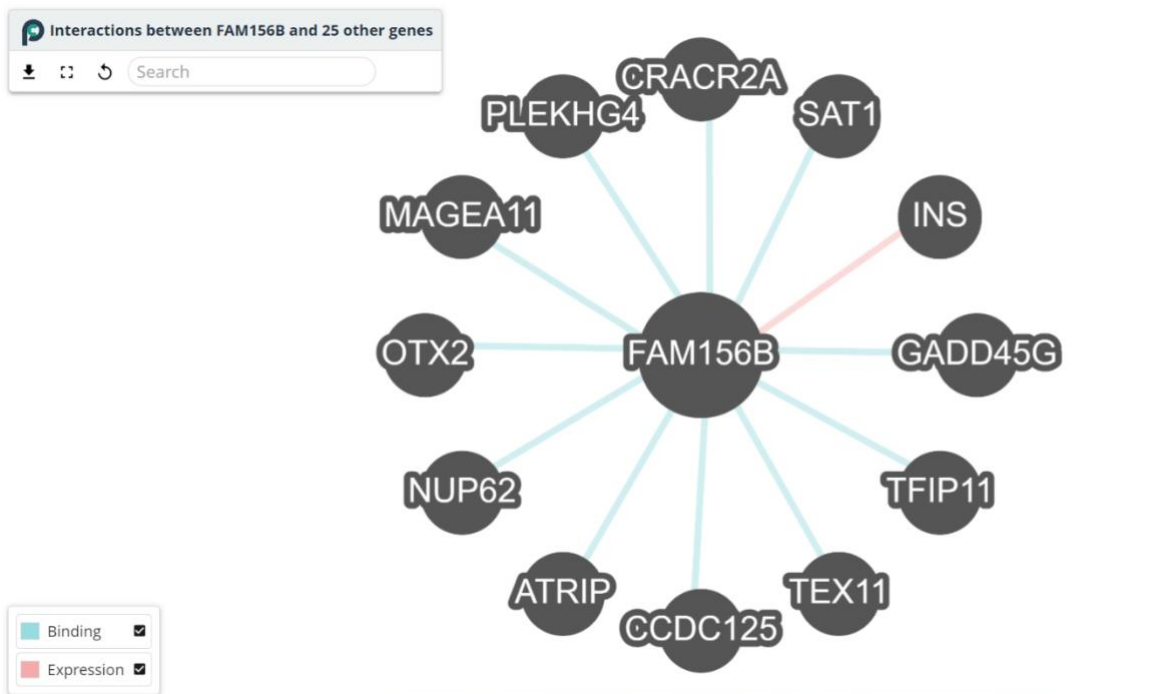


**Figura 19.** Estructura celular en donde actúa JMJD7-PLA2G4B.



#### 6.1.4. FAM 156A

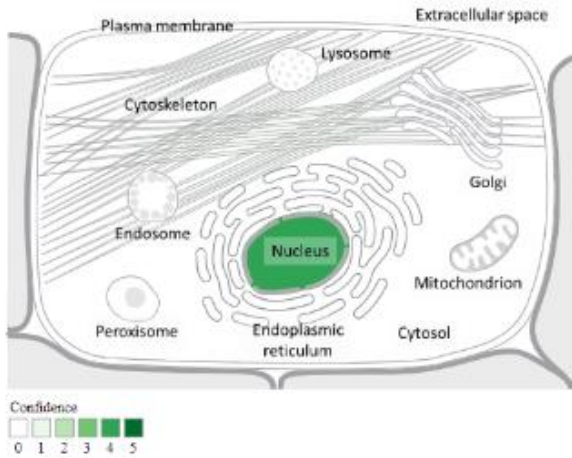
Es un gen que Codifica para la proteína denominada de igual manera, y pertenece a la familia de factores de unión a proteínas. De igual manera también se ha identificado que la expresión de este gen se encuentra asociada con la actividad de unión de histonas metiladas, por lo que su función está estrechamente relacionada con el proceso de transcripción génica. La principal vía asociada a FAM156A es la de Q8NDB6 (Figura 20)



**Figura 20.** Red de interacción de FAM156B

Se ha identificado que se encuentra estrechamente relacionada con otras proteínas como bZIP, que es un factor de transcripción de cremallera básica de leucina (bZIP), que es una proteína de unión al ADN que regula los programas de expresión génica que gobiernan la proliferación celular, la apoptosis, la respuesta al estrés del RE, la homeostasis y la memoria a largo plazo.

En condiciones normales, FAM156A se encuentra sobre expresado en la placenta humana. Pero también hay reportes que se expresa en diversos tejidos en el organismo. Se encuentra ubicado generalmente en el nucleoplasma (Figura 21)

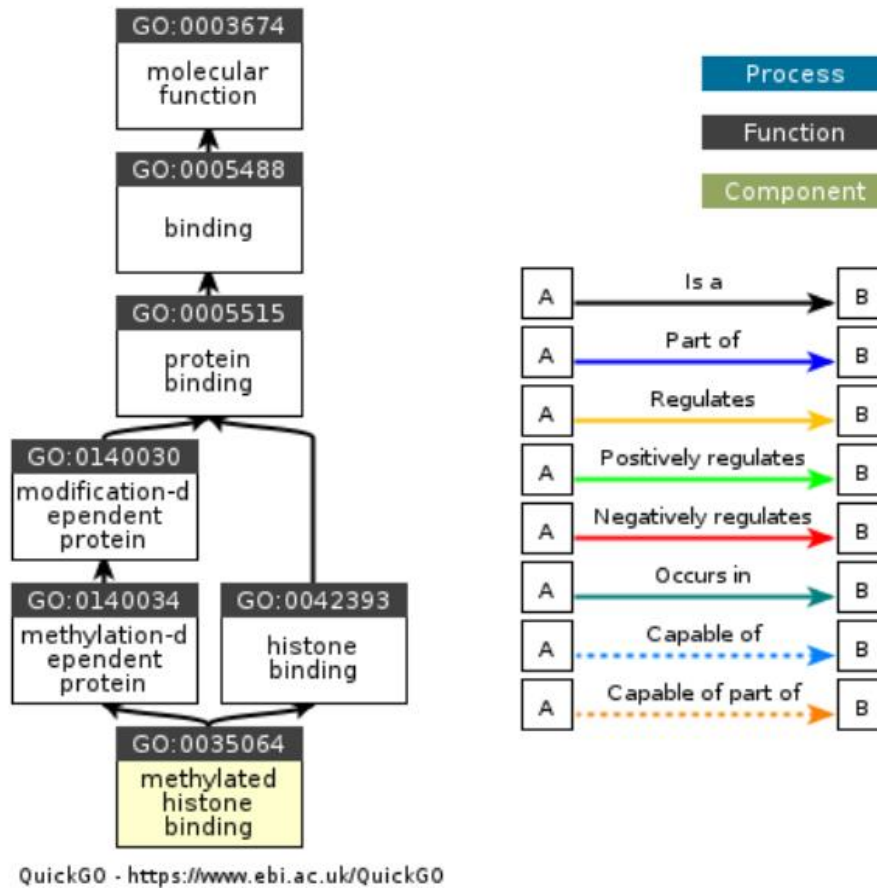


**Figura 21.** Ubicación celular de FAM156a

El gen 156A solamente se encuentra asociado a la función biológica (GO:0035064) de unión a histona metilada (Figura 22)

Gene Product	Symbol	Qualifier	GO Term	Evidence	Reference	With / From
UniProtKB:A0A8M1G518	FAM156A	enables	GO:0035064 methylated histone binding	ECO:0000256 IEA	GO_REF:0000002	InterPro:IPR029096

**Figura 22.** Funciones biológicas asociadas a FAM156A

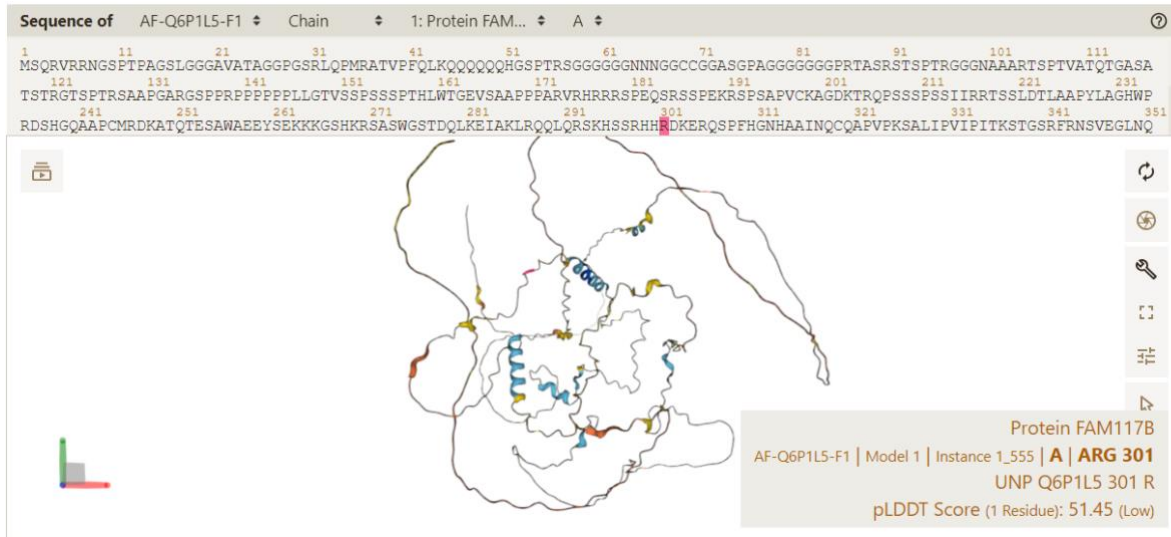


**Figura 23.** Procesos moleculares asociadas a FAM156A

Por otra parte, el análisis de vías de señalización realizado con el set de genes asociados con FAM156A no arrojó ningún resultado.

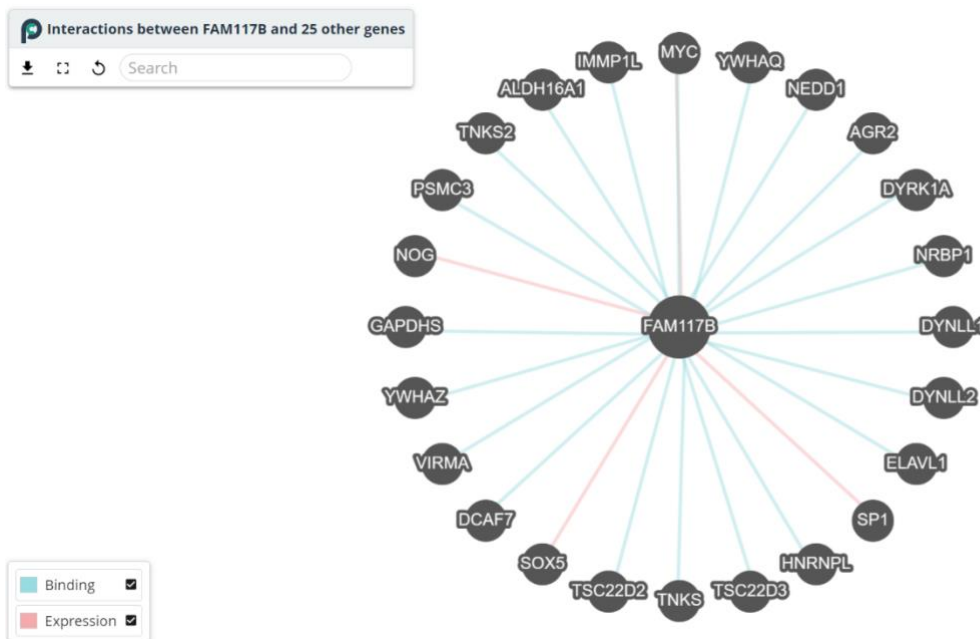
### 6.1.5. FAM117B

Es un gen que codifica para la proteína de baja densidad denominada con el mismo nombre.



**Figura 24.** Imagen tridimensional de la proteína FAM117B

Usualmente está asociada con algún tipo de cáncer de colon o rectal, pero también se ha observado en algunos otros procesos celulares, según con las proteínas con las que esté interactuando como unión a proteínas, motilidad, regulación de la transcripción, entre otros. El análisis de interacciones entre FAM117B reporta un total de 28 genes

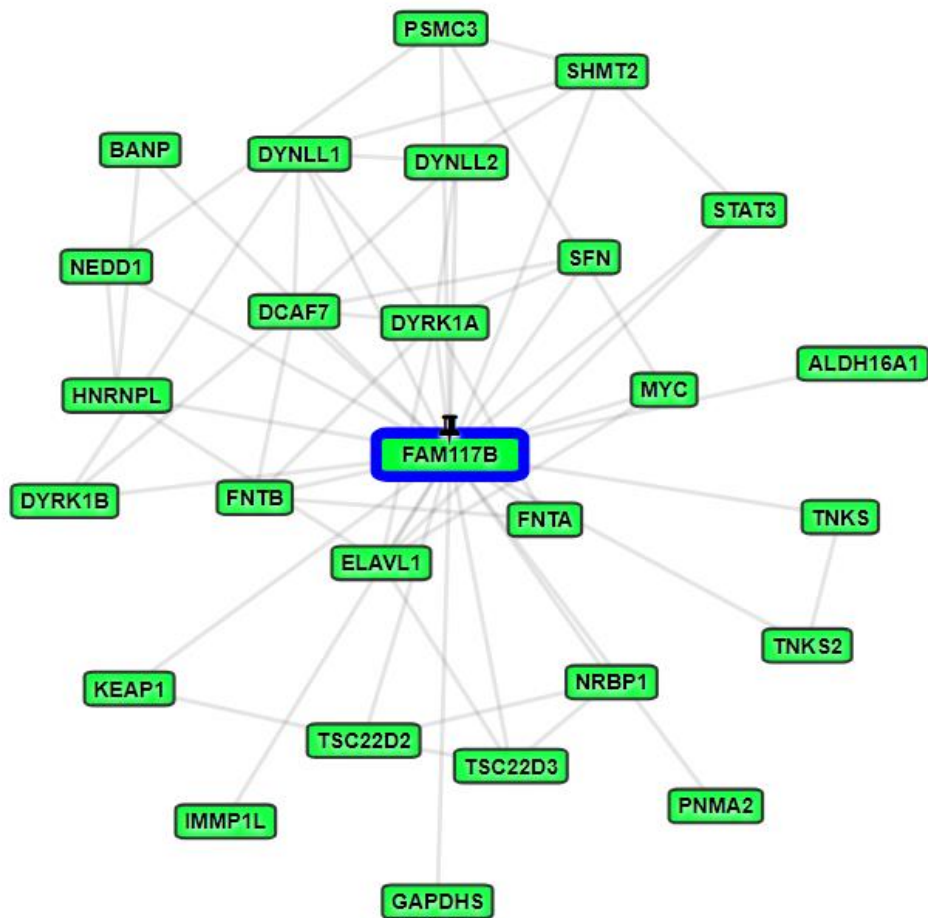


**Figura 25.** Red de interacciones del gen FAM117B

De los genes que interactúan con FAM117B se pudo reconocer en la base de datos que particularmente se hallaron con cambios en la expresión los genes: YWHAQ (0,21FC), DYNLL1 (0,35FC), SOX5 (-0,26FC), YWHAZ (0,29FC), GAPDHS (-1,17FC), NOG (-0,32FC), IMMP1L (-0,27FC).

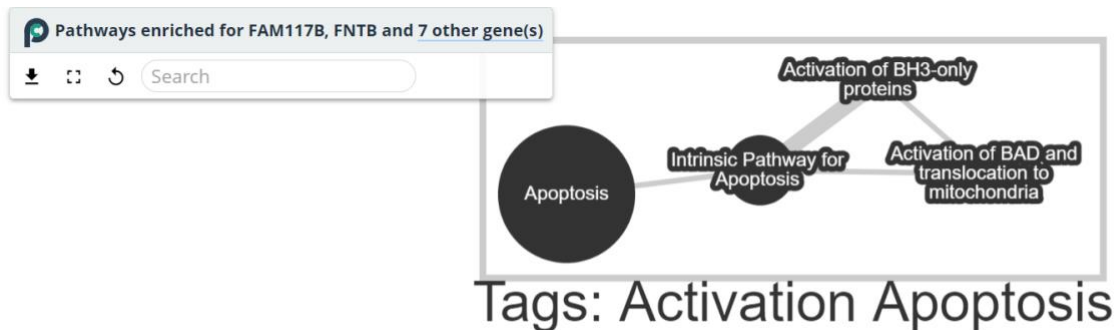
En la herramienta bioinformática GPS-prot se encontró otro set de genes que incluían además a FNTB (-0,29)y DYRK1A (0,13)

<http://gpsprot.org/navigator.php?q=150864&minscore=0.38>



**Figura 26.** Mapa de proteínas relacionadas con FAM117B

El análisis de vías asociadas realizado mediante pathways commons pudo evidenciar que con el set de genes que tenía cambios en la expresión mostró como resultados la activación de la apoptosis (Figura 26)



**Figura 27.** Vías asociadas con FAM117B y el set de genes.

Por otra parte, se pudo evidenciar que uno de los genes, particularmente NOG se encuentra menos expresado en el grupo láser. Este es un regulador negativo de la activación de la vía de BMPs, debido a que este actúa por competencia con los ligandos de la vía canónica y se acopla a los receptores, inactivando la vía. De igual forma la menor expresión de SOX5, que es un factor de transcripción es posible que esto desencadene una menor proliferación.

## 7. DISCUSION

La terapia láser de baja potencia, también conocida como LLLT (*Low-level laser therapy*) es una técnica que utiliza la irradiación con longitud de onda baja que se ha evidenciado que sirve para promover la proliferación y diferenciación celular. Además, ya se han realizado múltiples estudios tanto preclínico como clínicos(32), pero aún no se tiene claro las bases genéticas que gobiernan estos procesos. El presente estudio realizó un análisis transcriptómico a partir de datos secundarios obtenidos de la exposición al laser sobre células madre de la papila apical.

El análisis transcriptómico permitió establecer la expresión de los genes de las células expuestas al LLLT y compararla con un grupo control, de células no expuestas. Además, también sirvió para asociar la expresión con la función, y establecer las posibles interacciones. Los resultados acá encontrados mostraron la sobreexpresión de los genes MIS 18A, GPR75-ASB3, JMJD7-PLA2 en el grupo de células expuestas a láser. Aunque no se pudo establecer una posible interacción entre estos genes, todos tenían en común que estaban asociado principalmente con la división celular, y por ende, al proceso de proliferación, lo que resulta muy benéfico en términos clínicos, debido a que durante el movimiento ortodóntico se requiere de una alta tasa de neoformación ósea en el lado de tensión para garantizar un movimiento confiable y predecible.

En ese orden de ideas, el gen MIS18 está asociado con el reclutamiento de una proteína llamada CENPA en los centrómeros y durante la segregación cromosómica en el proceso de la mitosis. La proteína CENPA está localizada en el centrómero A y en humanos está codificada por el gen CENPA. CENPA es una variante de histona H3 que es el factor crítico que determina la posición del cinetocoro en cada cromosoma en la mayoría de los eucariotas, incluidos los humanos. Particularmente CENP-A está involucrado con el mantenimiento de la integridad del DNA(39). Por otra parte, Tomonaga evidenció que la expresión adecuada y el reclutamiento del CENP-A en el centrómero es importante en el proceso de división celular normal (40). Esto podría indicar que en SCAP, estaría posiblemente asociado con el mantenimiento y la proliferación celular, se requiere más estudios para comprobarlo.

De igual forma, también se halló que dentro de los genes con los que interactúa MIS18A están los genes AIMP2 y ESR1, que mostraron una mayor expresión significativa que en el grupo control. Estos genes están implicados -entre otras funciones- con la proliferación celular y con el complejo multi-sintetasa que se activa tanto en procesos de división celular como de diferenciación (41). Es decir que es posible que la activación con el laser no solo estimule la proliferación de SCAP, sino que además podría estar implicada en la diferenciación, pero se requieren análisis con un mayor tiempo de cultivo para determinar su posible relación.

Por otra parte, el gen GPR75, que también mostró sobreexpresión en el grupo de laser, transcribe para un receptor acoplado a proteína G GPR75. Tanto este receptor como uno de sus posibles ligandos, el ácido 20-hidroxicicosatetraenoico (20-HETE) eicosanoide vasoactivo derivado del citocromo P450, están involucrados en la activación de múltiples vías de señalización que activan diferentes procesos, como por ejemplo la cascada proinflamatoria, disfunción/remodelación vascular, hipertensión y enfermedad cardiovascular (42). Además, también se ha reconocido su rol en el proceso de producción y movilización del calcio, un componente importante para el proceso de la osteogénesis, por lo que podría entenderse la importancia de este gen durante las etapas iniciales de prediferenciación hacia el linaje osteoblástico, aunque no hay suficientes estudios que comprueben esta hipótesis.

De otro lado, aunque se ha reconocido que GPR75 es un receptor huérfano del cual no se ha podido establecer el posible ligando, un estudio reciente reportó que este también puede actuar como fotoreceptor por lo que esta podría ser la forma en que se active. Estos datos en conjunto, permiten establecer una posible asociación a dos funciones de acuerdo con los genes con los que se ha demostrado que interactúa, por un lado está los genes asociados a la vía canónica de señalización BMP a través de SMURF1 Y SMAD1(43), pero también se identificó que otro de los genes que tiene alta expresión y se relaciona con GPR75 es ELP4 que codifica para el complejo acetiltransferasa durante la elongación transcripcional, por lo que parte de su función está en la facilitación de la transcripción, también se ha



demostrado que se relaciona con CENPV una proteína de unión que regula la organización cromosómica durante la división celular (44). Contrariamente, se descartó que la activación de GPR75 sea por medio de las quimioquinas reportadas CCL5, debido a que se presentó una menor expresión 0,34 FC en el grupo de láser. Estos datos en conjunto presumen que la función de GPR75 podría estar asociada tanto con la proliferación como con la diferenciación de las células madre de la papila apical.

La transactivación nuclear dependiente de ligando implica la unión directa del homodímero a una secuencia palindrómica del elemento de respuesta al estrógeno (ERE) o la asociación con otros factores de transcripción que se unen al ADN, como AP-1/c-Jun, c-Fos, ATF-2, Sp1 y Sp3, para mediar en la señalización independiente de ERE. Similarmente, el gen ZNF47 proteína con dedos de zinc 471 está asociado con la actividad del factor de transcripción de unión al ADN, la actividad de unión al ADN específica de la secuencia de la región reguladora cis de la región reguladora cis de la ARN polimerasa II y la ARN polimerasa II. Se prevé que participe en la regulación de la transcripción por la ARN polimerasa II.

Por su parte, el gen JMJD7 que codifica para una proteína que lleva el mismo nombre que actúa de dos formas sobre la regulación de la expresión, una a través de endopeptidasa y la otra por medio de monoxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato. Un estudio reciente demostró además que JMJD7 regula negativamente la diferenciación osteoclástica, lo que implica un aporte importante en el balance de la osteogénesis (45).

Esta enzima puede estar asociada con mitocondrias y endosomas tempranos. La mayoría de los tejidos también expresan transcripciones de lectura completa del gen aguas arriba en este gen, algunas de las cuales pueden codificar proteínas de fusión que combinan el extremo N del gen *upstream*, incluido su dominio JmjC, con la región codificante casi completa de este gen, incluidos los genes C2 y dominios de fosfolipasa A2 citoplasmática.

En cuanto a la actividad de FAM156A, implicada en la metilación de diferentes residuos de lisinas y argininas en las histonas puede dirigir a condensación de la cromatina y

silenciamiento génico o a descondesación de la cromatina y actividad transcripcional; estos procesos son regulados por las enzimas histona metiltransferasas(HMT) e histona demetiladas (HDM) (46). Este gen FAM156A que se encuentra con menor expresión en el grupo de láser puede favorecer la descondensación de la cromatina y con esto aumentar la actividad transcripcional.

Estos resultados en conjunto permiten reconocer que la acción de la irradiación laser sobre las células madre de la papila apical puede actuar en diferentes vías para lograr los mismos estímulos sobre los procesos celulares como la proliferación, lo que hace que la terapia sea más eficaz. Es necesario realizar más estudios con la mutación de algunos de estos genes para poder entender aún más las vías implicadas y en el proceso de biofotomodulación.

## CONCLUSIONES

- Los genes MIS18A, GPR75-ASB3 y JMJD7-PLA2 mostraron sobreexpresión en el grupo de células expuestas al láser, pero no se encuentran relacionados funcionalmente entre sí.
- Genes sobre regulados (up) se encuentran ubicados a nivel celular MIS18A -en el centrómero, GPR75-ASB3 – membrana celular y JMJD7-PLA2-mitocondria
- Genes sub regulados (down) se encuentran ubicados a nivel celular FAM 156A membrana nuclear-FAM 117B en el centrosoma, ayudan a la regulación de la transcripción

El análisis funcional individual muestra que MIS18A, GPR75-ASB3 y JMJD7-PLA2 que no tienen relación entre sí, pero están activos en funciones similares, principalmente la proliferación celular, aunque por diferentes vías.



## Referencias Bibliográficas

1. Fleming P. Timing orthodontic treatment: early or late? Australian dental journal. 2017;62 Suppl 1.
2. Nimeri G, Kau C, Abou-Kheir N, Corona R. Acceleration of tooth movement during orthodontic treatment--a frontier in orthodontics. Progress in orthodontics. 2013;14. 15
3. Carroll JD, Milward MR, Cooper PR, Hadis M, Palin WM. Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. Dent Mater. 2014;30(5):465-75.
4. Lins RD, Dantas EM, Lucena KC, Catao MH, Granville-Garcia AF, Carvalho Neto LG. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. An Bras Dermatol. 2010;85(6):849-55.
5. Soleimani M, Abbasnia E, Fathi M, Sahraei H, Fathi Y, Kaka G. The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts--an in vitro study. Lasers Med Sci. 2012;27(2):423-30.
6. Makhlof M, Dahaba MM, Tuner J, Eissa SA, Harhash TA. Effect of adjunctive low level laser therapy (LLLT) on nonsurgical treatment of chronic periodontitis. Photomed Laser Surg. 2012;30(3):160-6.
7. Acosta M, Guerrero D, La Mantia P, Lunini P, Uzcátegui R. Use of low level laser in dentistry: Orthodontics and periodontics. 2. 2014;2:170:85.
8. Farivar S, Malekshahab iT, Shiari R. Biological Effects of Low Level Laser Therapy. Journal of lasers in medical sciences. 2014;5(2).
9. Baloul S. Osteoclastogenesis and Osteogenesis during Tooth Movement. Frontiers of oral biology. 2016;18.
10. Huang H, Williams R, Kyrkanides S. Accelerated orthodontic tooth movement: molecular mechanisms. American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics. 2014;146(5).
11. Gutierrez D, Rouabhia M, Ortiz J, Gaviria D, Alfonso C, Muñoz A, et al. Low-Level Laser Irradiation Promotes Proliferation and Differentiation on Apical Papilla Stem Cells. Journal of Lasers in Medical Sciences. 2021;12(e75).
12. Buckwalter J, Cooper R. Bone Structure and Function. Instructional course lectures. 1987;36.
13. Li Y, Jacox L, Little S, Ko C. Orthodontic tooth movement: The biology and clinical implications. The Kaohsiung journal of medical sciences. 2018;34(4).
14. Feller L, Khammissa RA, Schechter I, Thomadakis G, Fourie J, Lemmer J. Biological Events in Periodontal Ligament and Alveolar Bone Associated with Application of Orthodontic Forces. ScientificWorldJournal. 2015;2015:876509.
15. Masella R, Meister M. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics. 2006;129(4).
16. Jiang N, Guo W, Chen M, Zheng Y, Zhou J, Kim S, et al. Periodontal Ligament and Alveolar Bone in Health and Adaptation: Tooth Movement. Frontiers of oral biology. 2016;18.
17. Xiao W, Wang Y, Pacios S, Li S, Graves D. Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. Frontiers of oral biology. 2016;18.
18. Feller L, Khammissa R, Schechter I, Moodley A, Thomadakis G, Lemmer J. Periodontal Biological Events Associated with Orthodontic Tooth Movement: The Biomechanics of the Cytoskeleton and the Extracellular Matrix. TheScientificWorldJournal. 2015;2015.
19. Karanth H, Shetty K. Orthodontic tooth movement and bioelectricity. Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research. 2001;12(4).
20. Krishnan V, Davidovitch Z. On a path to unfolding the biological mechanisms of orthodontic tooth movement. Journal of dental research. 2009;88(7). 58
21. Asiry M. Biological aspects of orthodontic tooth movement: A review of literature. Saudi journal of biological sciences. 2018;25(6).
22. Isola G, Matarese G, Cordasco G, Perillo L, Ramaglia L. Mechanobiology of the

