



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
Facultad de Odontología  
División de Estudios de Posgrado e Investigación  
CIENCIAS ODONTOLÓGICAS BÁSICAS: BIOLOGÍA BUCAL

**UTILIZACIÓN DE PÉPTIDOS DERIVADOS DEL CEMENTO  
RADICULAR EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DEL  
LIGAMENTO PERIODONTAL *IN VITRO*.**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS ODONTÓLOGICAS**

**P R E S E N T A:**

**PAVEL COZEK JUÁREZ GONZÁLEZ**

**TUTORA PRINCIPAL:**

**Dra. LIA ALIOTH HOZ RODRÍGUEZ**

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

MÉXICO, CD. MX.

**2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Agradecimiento

Agradezco a la Dra. Lía por su apoyo, tiempo, enseñanzas y comprensión en los tiempos tan difíciles que nos tocó vivir durante la maestría y la pandemia, no hay manera de agradecerle su profesionalismo y claro, su amistad.

Al Dr. Enrique igual por su apoyo en el momento clave de los experimentos y también por su tiempo y dedicación.

Al Dr. Higinio Arzate por permitirme trabajar en el laboratorio, por su paciencia y sus enseñanzas durante la maestría.

A la Dra. Almaguer, que sin ella tal vez no se hubiera realizado este trabajo.

A la Dra. Rita por su apoyo en el regreso al laboratorio y en la enseñanza de la técnica del Western Blot.

En general a todo el laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados donde siempre me sentí ayudado y en confianza de preguntar cualquier duda.

## Dedicatorias

A mi mamá, sin tu apoyo emocional no estaría aquí, gracias por tus sacrificio incansable y comprensión. A mi papá, por su apoyo a lo largo de este camino y a mi hermano, por todos sus consejos.

A mi novia Sonia, además de dedicarte este trabajo te agradezco tu incansable ayuda a mi superación personal, sin ti no hubiera pasado nada de esto. Gracias a ti mis momentos más duros en la maestría, se volvieron más amenos y tu compañía inolvidable, gracias por todo, en un gracias infinito.

A mi familia, mis tías, mis primos, por su apoyo incondicional y a mi tía Martha, por ayudarme incondicionalmente en todos mis proyectos, no tengo nada más que gratitud por todo tu apoyo

A mis compañeros de generación: Fernando, Alberto, Isaraí, Lis y Julio, por hacer de esta maestría algo divertido y emocionante y que al final formamos un gran equipo.

## Contenido

<b>1. Resumen</b> .....	9
<b>2. Abstract</b> .....	12
<b>3. Antecedentes</b> .....	15
<b>3.1. Periodonto</b> .....	15
<b>3.2. Encía</b> .....	17
<b>3.3. Ligamento Periodontal</b> .....	18
<b>3.4. Hueso Alveolar</b> .....	22
<b>3.5. Cemento Radicular</b> .....	23
3.5.1. Cementoblastos:.....	24
3.5.2. Cementogénesis.....	25
<b>3.6. Proteínas del Cemento</b> .....	29
3.6.1. Proteína de Adhesión del Cemento (HACD1/CAP).....	29
3.6.2. Proteína del Cemento 1 (CEMP1).....	31
<b>3.7. Diferenciación y Formación de hueso</b> .....	36
<b>3.8. Marcadores de Biomineralización</b> .....	39
3.8.2. Fosfatasa Alcalina (ALP).....	39
3.8.3. Sialoproteína Ósea (BSP).....	40
3.8.4. Osteocalcina (OCN).....	40
3.8.5. Osteopontina (OPN).....	41
<b>4. Planteamiento del problema</b> .....	42
<b>5. Justificación</b> .....	43
<b>6. Hipótesis</b> .....	43
<b>7. Objetivos</b> .....	44
<b>8. Metodología</b> .....	45
<b>8.1. Síntesis de los péptidos de CEMP1-p1 y CAP-p15</b> .....	45
<b>8.2. Cultivo Celular</b> .....	45
<b>8.3. Ensayo de qRT-PCR en tiempo real</b> .....	47
<b>8.4. Western Blot:</b> .....	47
8.4.1. Preparación de las Proteínas.....	48
8.4.2. Preparación del Gel.....	48
<b>8.5. Análisis de datos.</b> .....	49

<b>9. Resultados</b> .....	50
<b>9.1. Ensayo de qRT -PCR</b> .....	50
9.1.1. El uso de ambos péptidos induce el aumento en la expresión relativa de mRNA de HACD1/CAP y CEMP1 a partir de los 5 días. ....	50
9.1.2. El uso de ambos péptidos induce cambios en la expresión relativa de mRNA de los factores asociados a mineralización.....	51
<b>9.2. Western Blot</b> .....	55
9.2.1. El péptido CEMP1-p1 induce un incremento en los niveles proteicos de HACD1/CAP en células del ligamento periodontal humano.....	56
9.2.2. El péptido CAP-p15 incrementa los niveles proteicos de CEMP1 en células del ligamento periodontal humano. ....	59
9.2.3. El uso de ambos péptidos incrementa los niveles proteicos de CEMP1 y CAP en células del ligamento periodontal humano.....	62
9.2.4. El uso de ambos péptidos incrementa los niveles proteicos de CEMP1 en comparación con los péptidos solos.....	65
9.2.5. El uso de ambos péptidos incrementa los niveles proteicos de HACD1/CAP en comparación con los péptidos solos.....	66
<b>10. Discusión</b> .....	69
<b>12. Conclusiones</b> .....	81
<b>13. Tabla de Ilustraciones</b> .....	83
<b>14. Tabla de Gráficos</b> .....	84
<b>15. Referencias</b> .....	85

## Índice de Abreviaturas

Índice de Abreviaturas	Traducción en español
<b>ALP</b>	Fosfatasa Alcalina (Alkaline Phosphatase)
<b>BMMSC</b>	Células Estromales Mesenquimales de la Médula Ósea (Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells)
<b>BMP2</b>	Proteína Morfogénica Ósea 2 (Bone morphogenetic protein 2)
<b>BMP4</b>	Proteína Morfogénica Ósea 4 (Bone morphogenetic protein 4)
<b>BSP II</b>	Sialoproteína Ósea (Bone Sialoprotein)
<b>CAP-p15</b>	Péptido 15 de la proteína de adhesión al cemento (Cementum Attachment Protein peptide 15)
<b>Cbfa1</b>	Factor alfa de unión al núcleo 1 (Core Binding Factor Alpha 1) también conocido como RUNX2
<b>CEMP1</b>	Proteína del Cemento 1 (Cementum Protein 1)
<b>CEMP1-p1</b>	Péptido 1 de la Proteína del Cemento 1 (Cementum Protein 1 Peptide 1)
<b>CGF</b>	Factor de Crecimiento Cementoblásticos (Cementum Growth Factor)
<b>COL 1</b>	Colágena tipo I (Collagen I)
<b>DKK1</b>	Proteína 1 relacionada a Dickkopf (Dickkopf-related protein 1)
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado de Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
<b>DMP1</b>	Fosfoproteína ácida de matriz dentinaria 1 (Dentin Matrix acidic phosphoprotein 1)
<b>DPSCs</b>	Células Troncales de la Pulpa Dental (Dental Pulp Stem Cells)
<b>ECM</b>	Matriz Extracelular (Extracellular Matrix)
<b>FGF</b>	Factor de Crecimiento Fibroblástico (Fibroblasts Growth Factor)
<b>FGFR</b>	Receptor del Factor de Crecimiento Fibroblástico (Fibroblast Growth Factor Receptor)
<b>Fmoc</b>	0-fluorenilmetoxicarbonilo (Fluorenylmethoxycarbonyl Chloride)
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
<b>HACD1/CAP</b>	3- Hidroxiacil-COA-deshidratasa 1 (3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 1)
<b>HAp</b>	Hidroxiapatita (Hydroxyapatite)
<b>HGFs</b>	Factor de crecimiento Hematopoyético (Hematopoietic Growth Factor)
<b>hrCEMP-1</b>	Proteína del Cemento 1 recombinante humana (Human Recombinant Cementum Protein 1)

<b>HuPDLcs</b>	Células del Ligamento Periodontal Humanas (Human Periodontal Ligament Cells)
<b>JNK-MAPK</b>	Cinasas c-Jun N-terminal/ Proteína Cinasa activadas por mitógenos (c-Jun NH2-terminal Kinase/Mitogen-activated protein kinase)
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>kDa</b>	KiloDaltons
<b>Lef1</b>	Factor de unión potenciador linfoide 1 (Lymphoid Enhancer Binding Factor 1)
<b>LRAP</b>	Péptido de Amelogenina rico en leucina (Leucine-Rich Amelogenin Peptide)
<b>LRP5</b>	Proteína 5 relacionada al receptor de Lipoproteína de Baja densidad (LDL Receptor Related Protein 5)
<b>MEM NEAA</b>	Medios Esenciales Mínimos Solución de Aminoácidos No Esenciales (Minimum Essential Media- Non-Essential Amino Acids Solution)
<b>MO</b>	Microscopio Óptico
<b>mRNA</b>	Ácido Ribonucleico mensajero (messenger Ribonucleic Acid)
<b>MSCs</b>	Células Troncales Mesenquimales (Mesenchymal Stem Cells)
<b>OCCM-30</b>	Se refiere a la línea celular de cementoblastos inmortalizados de ratón (Mouse Cementoblast Cell Line)
<b>OCN</b>	Osteocalcina (Osteocalcin)
<b>OPN</b>	Osteopontina (Osteopontin)
<b>Osx</b>	Osterix
<b>p-38</b>	Proteína cinasa activada por mitógenos
<b>PBS</b>	Amortiguador fosfato salino (Phosphate-buffered Saline)
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno (potential Hydrogen)
<b>PDLcs</b>	Células del Ligamento Periodontal (Periodontal Ligament Cells)
<b>PTPLA</b>	Proteína tirosina fosfatasa A (Protein tyrosine phosphatase-like member A)
<b>qRT-PCR</b>	Reacción en cadena de la Polimerasa de transcripción inversa cualitativa en tiempo real (Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
<b>RUNX2</b>	Factor de transcripción 2 relacionado a Runt(Runt-related transcription factor 2)
<b>SATB2</b>	Proteína de unión a secuencia rica en AT especial 2(Special AT-rich sequence binding protein 2)
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato sódico (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)



<b>SEM</b>	Microscopio Electrónico de Barrido
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino (Fetal Bovine Serum)
<b>Smad3</b>	Supresor de Madres contra Decapentapleja 3 (Supressor of Mothers Against Decapentaplegic 3)
<b>SMADS</b>	Supresor de Madres contra Decapentapleja (Supressor of Mothers Against Decapentaplegic)
<b>SOX9</b>	Factor de Transcripción SRY-BOX 9 (SRY-Box Transcription Factor 9)
<b>SPPS</b>	Factor parecido a Sp1 para emparejar silenciamiento sensible (Sp1-like Factor for Pairing Sensitive silencing)
<b>Tcf1</b>	Factor 1 de células T (T cell Factor 1)
<b>TFA</b>	Ácido Trifluoroacético (Trifluoroacetic Acid)
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformador beta (Transforming Growth Factor Beta)
<b>Wnt</b>	Sitio de Integración relacionado a Wingless (Wingless related Integration Site)

## 1. Resumen

El periodonto es una unidad funcional, la cual está conformada por dos tejidos mineralizados (cemento radicular y hueso alveolar) y por dos tejidos conectivos blandos (el ligamento periodontal y la encía), los cuáles le dan soporte al órgano dental (1). El ligamento periodontal es el tejido blando altamente vascularizado y celular que rodea a las raíces de los dientes y conecta el cemento radicular con la pared del alveolo (2). Dentro de estos tejidos, el cemento radicular, es un tejido conectivo mineralizado con características *sui generis*, ya que no presenta irrigación sanguínea, inervación ni sistema linfático y a diferencia del hueso no sufre procesos de remodelación fisiológicos como son; aposición y resorción, sino que se deposita continuamente a través de toda la vida (3). Este tejido cubre la superficie radicular de los órganos dentarios y las células que depositan este tejido (cementoblastos) son derivadas del ecto-mesénquima; (saco o folículo dental) que rodea al germen dentario. El cemento radicular contiene propiedades biológicas únicas ya que contiene dos proteínas que son cemento-específicas: la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión al cemento radicular (HACD1/CAP), las cuales se han localizado y expresado en poblaciones celulares del ligamento periodontal, cementoblastos y células de espacios endosteales y células troncales mesenquimales localizadas perivascularmente en el ligamento periodontal (1). La proteína de adhesión al cemento (HACD1/CAP) fue la primera proteína aislada del cemento radicular, caracterizada y purificada a partir de extractos de cemento maduro de bovino y humano. Se ha determinado que participa en el reclutamiento y la diferenciación celular durante la formación del cemento radicular (4). Se expresa en células del folículo dental, promoviendo su adhesión y diferenciación. Además, las células derivadas del ligamento periodontal *in vitro* y en presencia de HACD1/CAP son capaces de formar un tejido mineralizado. Su papel biológico ha involucrado un papel quimiotáctico de células del ligamento periodontal y del hueso alveolar hacia la superficie radicular. Incrementa la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP), así como la expresión de proteínas asociadas al proceso de biomineralización (1) (5).

A partir de la secuencia proteica completa de HACD1/CAP se ha identificado una secuencia compuesta de 15 aminoácidos (VSFPSCCFSTAVIFM), que integran el péptido de la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP-p15); la cual tiene un punto isoeléctrico de 5.48 y un peso molecular de 1,651.03 daltons (6). El péptido promueve la formación de cristales de hidroxiapatita, además de tener la capacidad de regular la morfología y madurez de cristales en un sistema libre de células, promoviendo la nucleación de cristales de HAp (7); influye como inductor, estimulador de la regeneración ósea en defectos segmentales de tamaño crítico, con características histológicas y con una densidad ósea similar al de un hueso sano y vital; por lo tanto podría jugar un papel clave en los procesos regenerativos involucrados en la regeneración periodontal (8). Por otro lado, el gen humano de la proteína del cemento 1 (CEMP1) codifica para una proteína de 247 aminoácidos con una masa molecular de 25.9 kDa. Y donde estudios *in vitro* han demostrado que es un regulador clave en el proceso de biomineralización, ya que promueve la adhesión y diferenciación celular, así como regula el depósito, composición y morfología de cristales de fosfato octacálcico (precursor de hidroxiapatita) (1). A partir de CEMP1, se creó un péptido sintético (CEMP1-p1) obtenido a partir de la técnica de síntesis de fase sólida, sintetizado con una secuencia específica de 20 aminoácidos (MGTSSTDSQQAGARRTSTSN) tomados del extremo amino terminal de la proteína CEMP1. Se eligió esta secuencia porque se cree que tiene sitios de actividad para la mineralización, por su plasticidad y facilidad para unirse a los cristales de hidroxiapatita (9) (10). Se han realizado diversos estudios comparando su efecto con relación a la proteína nativa, obteniendo una función similar: *in vitro* participa en la formación de cristales de hidroxiapatita en geles de silicato, en un cultivo de células del ligamento periodontal mostró favorecer la proliferación y la formación de tejido mineralizado, así como estimular su diferenciación hacia un tipo mineralizante (11). Además, al hacer un análisis profundo, se obtienen mayores ventajas del péptido CEMP1-p1, a comparación con la proteína nativa, que permiten ser un buen candidato con potencial aplicación en la medicina regenerativa y más importante aún, en la regeneración periodontal (12). La enfermedad periodontal es la causa principal de pérdida de los órganos dentarios en los adultos (13); por lo que se han propuesto tratamientos alternativos para la terapia periodontal, en la búsqueda por restaurar o establecer la estructura y función de un

órgano o tejido dañado. (14). Como se ha dicho previamente, los péptidos CAP-p15 y CEMP1-p1 promueven la formación de tejido mineralizado, pero solo se han evaluado sus capacidades por separado, por lo cual en este estudio se busca determinar, la posible sinergia de estos dos péptidos derivados de las proteínas del cemento radicular en la diferenciación de las células del ligamento periodontal humanas *in vitro*. Para esto, se cultivaron células derivadas del ligamento periodontal, las cuales fueron tratadas con ambos péptidos. Para determinar la expresión de factores asociados a mineralización se realizó la extracción de proteínas y ácidos nucleicos de las células, para posteriormente realizar qRT – PCR y Western Blot. En este estudio se probó que los dos péptidos demostraron tener funciones inductoras importantes, ya que promovieron la expresión relativa de mRNA de factores asociados a fases tempranas del proceso de biomineralización como ALP y COL II, así como de factores asociados a las fases intermedias y tardías como son BMP2, OPN y BSP11. Esto prueba que los péptidos pueden inducir la diferenciación de las células derivadas del ligamento periodontal humano hacia un fenotipo mineralizante *in vitro*.

También se demostró que los péptidos en conjunto logran una sinergia al superar los resultados obtenidos por los péptidos por sí solos, en todos los tiempos de cultivo al inducir la expresión relativa del mensajero y aumentar los niveles proteicos de CEMP1 y HACD1/CAP de manera significativa *in vitro*. Estos resultados nos sugieren que al usar ambos péptidos podríamos obtener mejores resultados a corto plazo, se podrían acelerar los procesos de diferenciación y de mineralización, así como obtener mejores resultados en la regeneración en futuros estudios *in vivo*.

## 2. Abstract

The periodontium is a functional unit, which is conformed by two mineralized tissues (root cementum and alveolar bone) and two soft connective tissues (periodontal ligament and gingiva), which support the dental organ (1). The periodontal ligament is a highly vascularized and cellular soft tissue that surrounds the roots of the teeth and connects the root cementum to the alveolar wall (2). Within these tissues, the root cementum is a mineralized connective tissue with *sui generis* characteristics, since it does not contain blood irrigation, innervation, or lymphatic system and unlike bone it does not undergo physiological remodeling processes such as apposition and resorption but is continuously deposited throughout life (3). This tissue covers the root surface of the dental organs and the cells that deposit this tissue (cementoblasts) are derived from the ecto-mesenchyme (dental sac or follicle) that surrounds the dental germ. Root cementum contains unique biological properties as it contains two proteins that are cemento-specific: cementum protein 1 (CEMP1) and cementum attachment protein (HACD1/CAP), which have been localized and expressed in cell populations of the periodontal ligament, cementoblast and cells of endosteal spaces and mesenchymal stem cells located perivascularly in the periodontal ligament (1). Cementum attachment protein (HACD1/CAP) was the first protein isolated from root cementum, characterized, and purified from bovine and human mature cementum extracts. It has been found to be involved in cell recruitment and differentiation during root cementum formation (7). It is expressed in dental follicle cells, promoting their adhesion and differentiation. In addition, cells derived from the periodontal ligament *in vitro* and in the presence of HACD1/CAP can form mineralized tissue. Its biological role has involved a chemotactic role of periodontal ligament and alveolar bone cells towards the root surface. It increases the activity of the enzyme alkaline phosphatase (ALP), as well as the expression of proteins associated with the biomineralization process (1) (8).

From the protein sequence of HACD1/CAP, a sequence composed of 15 amino acids (VSFPSCCFSAIVIFM) has been identified, which integrate the peptide of the cementum attachment protein (CAP-p15); which has an isoelectric point of 5.48 and a molecular weight of 1,651.03 daltons (11). This peptide promotes the formation of hydroxyapatite crystals, besides having the ability to regulate the morphology and maturity of crystals

in a cell-free system, promoting the nucleation of HAp crystals (12); it influences as an inducer, stimulator of bone regeneration of critical size segmental defects, with histological characteristics and with a bone density similar to that of a healthy and vital bone; therefore it could play a key role in the regenerative processes involved in periodontal regeneration (13). On the other hand, the human gene for cementum protein 1 (CEMP1) codes for a protein of 247 amino acids with a molecular mass of 25.9kDa. And where *in vitro* studies have shown that it is a key regulator in the biomineralization process, as it promotes cell adhesion and differentiation, as well as regulates the deposition, composition, and morphology of octacalcium phosphate crystals (hydroxyapatite precursor) (1). From CEMP1, a synthetic peptide (CEMP1-p1) obtained from the solid-phase synthesis technique, synthesized with a specific sequence of 20 amino acids (MGTSSSTDSQQAGAGARRTSTSN) taken from the amino terminal end of the CEMP1 protein, was created. This sequence was chosen because it is believed to have activity for mineralization, due to its plasticity and ease of binding to hydroxyapatite crystals (15) (16). Several studies have been carried out comparing its effect in relation to the native protein, obtaining a similar function: *in vitro* it participates in the formation of hydroxyapatite crystals in silicate gels, in a culture of periodontal ligament cells it was shown to favor the proliferation and formation of mineralized tissue, as well as to stimulate its differentiation towards a mineralizing type (17). In addition, upon further analysis, greater advantages of the CEMP1-p1 peptide, compared to the native protein, were obtained, making it a suitable candidate for potential application in regenerative medicine and, more importantly, in periodontal regeneration (18). Periodontal disease is the leading cause of dental organ loss in adults (19); therefore, alternative treatments for periodontal therapy have been proposed in the quest to restore or establish the structure and function of a damaged organ or tissue (20). As previously mentioned, CAP-p15 and CEMP1-p1 promote the formation of mineralized tissue, but their capabilities have only been evaluated separately, so in this study we sought to determine the possible synergy of these two peptides derived from root cementum proteins in the differentiation of human periodontal ligament cells *in vitro*. For this purpose, periodontal ligament-derived cells were cultured and treated with both peptides. To figure out the expression of factors associated with mineralization, proteins and nucleic acids were extracted from the cells and then qRT-PCR and Western Blot

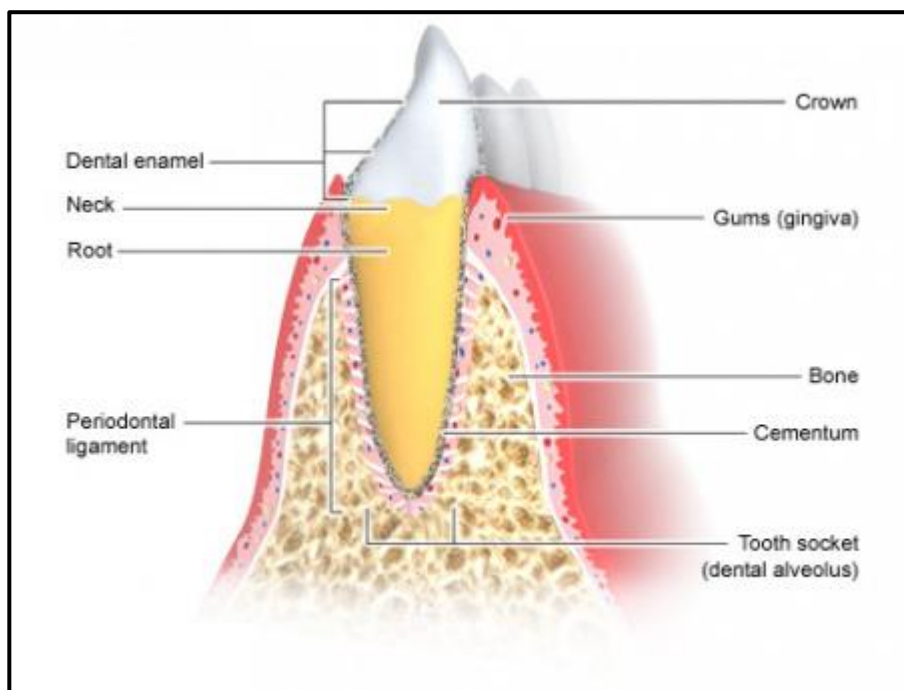
were performed. In this study it was proved that the two peptides showed important inducing functions, since they promoted the relative mRNA expression of factors associated with early phases of the biomineralization process such as ALP and COL II, as well as factors associated with intermediate and late phases such as BMP2, OPN and BSP11. This proves that peptides can induce the differentiation of human periodontal ligament-derived cells towards a mineralizing phenotype *in vitro*.

It was also shown that the peptides together achieve synergy by outperforming the results obtained by the peptides alone, at all culture times by inducing relative messenger expression and increasing the protein levels of CEMP1 and HACD1/CAP significantly *in vitro*. These results suggest that by using both peptides we could obtain better short-term results, accelerate the differentiation and mineralization processes, as well as obtain better regeneration results in future *in vivo* studies.

## 3. Antecedentes

### 3.1. Periodonto

El periodonto es una unidad compleja presente en la cavidad oral, cuyo principal objetivo es brindar la unión del diente al hueso alveolar y distribuir las fuerzas masticatorias, además constituye un reservorio de células necesarias para la homeostasis del ecosistema oral. Está compuesto de tejidos duros y blandos, como el cemento, el ligamento periodontal, el hueso alveolar y la encía, los cuáles le dan soporte y protección a la estructura dental (Fig. 1). (1) (2) (13) (15)



*Figura 1. Estructura y Componentes del Periodonto. Extraído de: InformedHealth.org [Internet]. Cologne, Germany: Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2006-. How does the periodontium work? 2011 Mar 20 [Updated 2017 Dec 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279619/>*

La formación del periodonto inicia con el proceso de la formación de la raíz, donde el mesénquima apical prolifera, mientras que el epitelio dental interno y el externo se fusionan para dar lugar a la vaina epitelial de Hertwig. Las células de la vaina epitelial de Hertwig migran apicalmente hacia el ectomesénquima subyacente, dividiendo la papila del folículo dental hasta la región del futuro ligamento periodontal, donde se re-asocian para formar los restos epiteliales de Malassez. (1) (2) (15)



Se ha propuesto que las células de la vaina epitelial de Hertwig inducen la diferenciación de odontoblastos para formar la dentina radicular y para diferenciar células del saco dental hacia cementoblastos. Por otro lado, las células de los restos de Malassez están relacionadas con el desarrollo de la inervación del ligamento periodontal, así como en la regulación de la resorción radicular y la inducción en la formación de cemento acelular. El desarrollo del periodonto está regulado por un gran número de genes, que incluyen factores de crecimiento, sus receptores y componentes de la matriz extracelular. (Fig. 2) (1) (2)

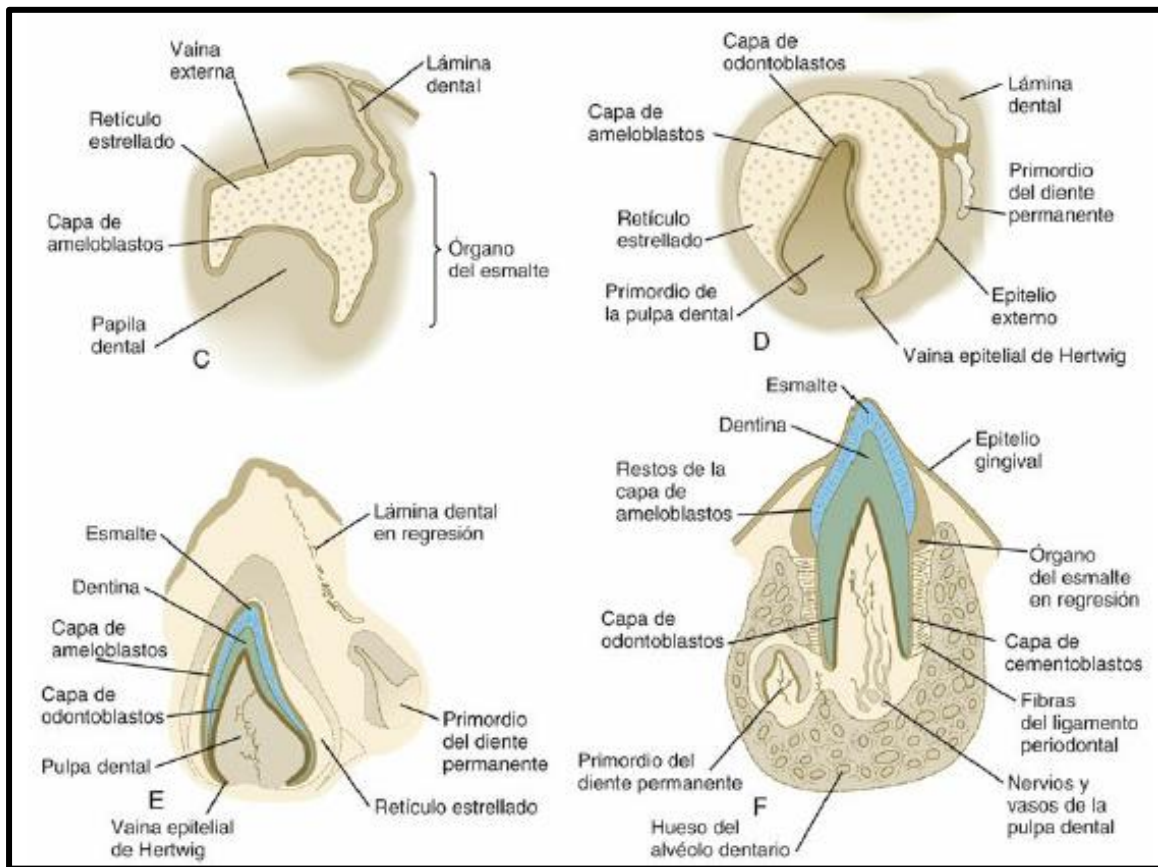


Figura 2. Desarrollo del diente y periodonto. C) Primordio dentario en fase de copa en un embrión de 11 semanas. D) Primordio de un incisivo central en estadio de campana en un embrión de 14 semanas, antes del depósito de esmalte y dentina, E) Incisivo de un feto a término antes del proceso de erupción, nótese el desarrollo de la vaina epitelial de Hertwig F) Incisivo en erupción parcial donde se está formando el cemento, el ligamento periodontal y el hueso alveolar primordiar. Extraído de Patten B. *Human Embryology*. 3ª ed. Nueva York: McGraw-Hill;1968)

### 3.2. Encía

La encía es la parte de la mucosa bucal que rodea al diente y cubre el hueso alveolar. Forma parte de los tejidos de soporte periodontal y, al formar una conexión con el diente a través del surco gingival, protege a los tejidos de soporte subyacentes frente al entorno bucal. Puesto que dependen de los dientes, cuando éstos se extraen las encías desaparecen. (13)

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

La encía sana es rosa, firme, de márgenes finos y con una forma festoneada que le permite ajustarse al contorno de los dientes. Su color puede variar según la cantidad de pigmentación por melanina en el epitelio, el grado de queratinización de este y la vascularización y naturaleza fibrosa del tejido conjuntivo subyacente. (2) (13)

Se pueden distinguir dos partes de la encía, la encía libre y la encía adherida: (Fig. 3)

- La encía Insertada o mucosa funcional se extiende desde el surco gingival hasta la unión mucogingival, donde se encuentra con la mucosa alveolar. (13)

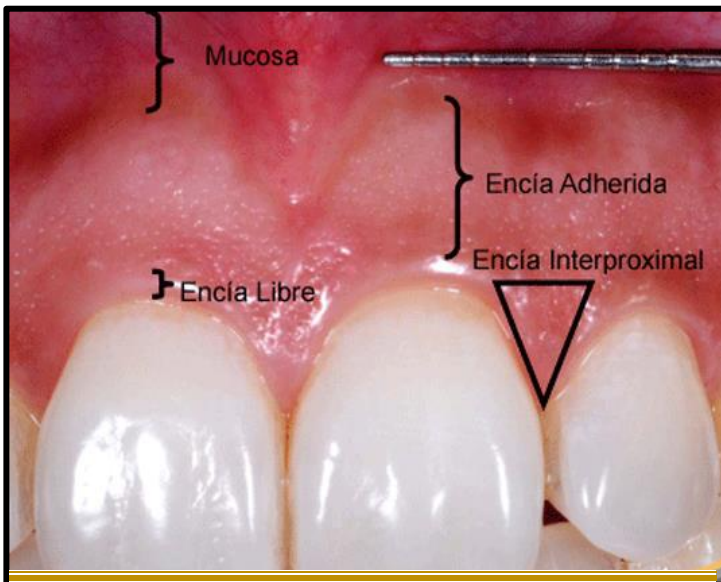
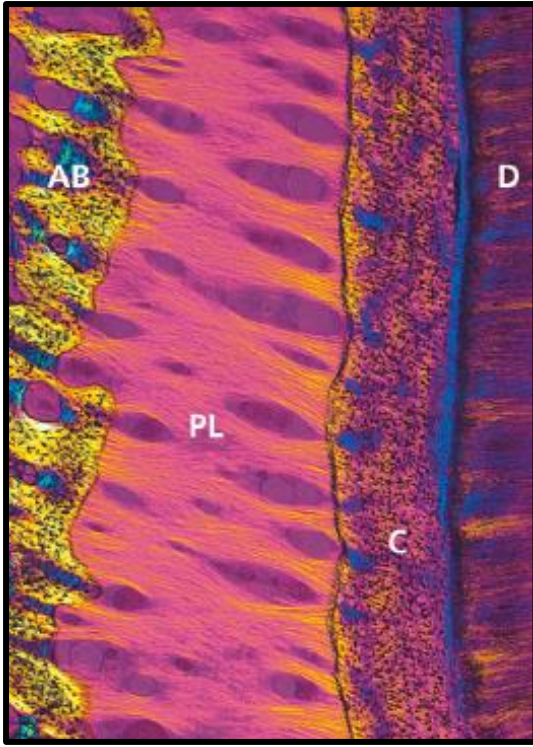


Figura 3 Tipos de encía. Extraído de:  
<https://www.propdental.es/periodontitis/encia/>

- La encía libre es cóncava y se ha descrito como un “nicho” o “col” que une las papilas faciales y linguales. Es donde contactan los dientes, el “col” adopta la forma de los dientes en su parte apical al área de contacto. La región interdental tiene una importancia especial porque es el lugar de mayor depósito de bacterias y su estructura la hace especialmente vulnerable. (13)

### 3.3. Ligamento Periodontal



**Figura 4. Micrografía ilustrando el ligamento periodontal (PL).** Se ven las fibras de colágeno entre la raíz cubierta de cemento (C) y el hueso alveolar (AB); (D) dentina. Extraído de Bosshardt DD, Stadlinger B, Terheyden H. Cell-to-cell communication--periodontal regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 2015 Mar;26(3):229-39

El ligamento periodontal es el tejido blando altamente vascularizado y celular que rodea a las raíces de los dientes y conecta el cemento radicular con la pared del alvéolo. En sentido coronal, el ligamento periodontal se continúa con la lámina propia de la encía y está delimitado respecto de ella por los haces de fibras colágenas que conectan la cresta ósea alveolar con la raíz (las fibras de la cresta alveolar). (2) (15)

El ligamento periodontal se ubica en el espacio situado entre las raíces y la lámina dura o hueso alveolar fasciculado. El hueso alveolar rodea al diente hasta un nivel situado a aproximadamente 1mm hacia apical de la conexión cemento-adamantina. (Fig. 4)

Se ha investigado mucho sobre la estructura, función y composición del ligamento periodontal por razones funcionales y clínicas (2). Sus

funciones son las siguientes:

- Es el tejido de inserción entre el diente y el hueso alveolar. Por tanto, se encarga de resistir las fuerzas de desplazamiento y protege los tejidos dentales de las cargas oclusales excesivas.
- Se encarga de mantener al diente en una posición funcional durante el proceso de erupción dental y los cambios de posición se producen en el diente después de una extracción, atrición o carga oclusal excesiva.
- Sus células forman, mantienen y reparan el hueso alveolar y el cemento.
- Sus mecanorreceptores intervienen en el control neurológico de la masticación.

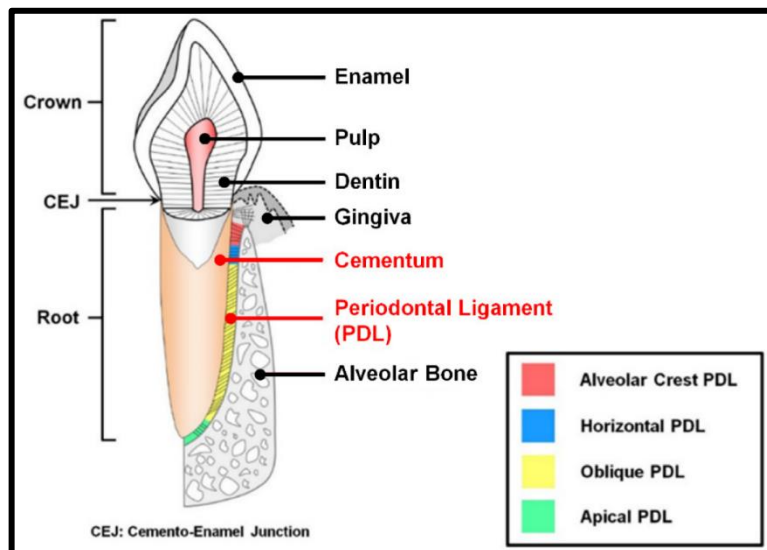
- Tiene un rico aporte vascular con anastomosis con las de los espacios medulares del hueso y la encía y facilita estas funciones. (13)

El ligamento consta de haces de fibras de colágeno bien organizados de unos 5µm de diámetro, en una matriz de sustancia fundamental por la que circulan vasos y nervios. Los haces de fibras, insertadas por un extremo en el cemento y por el otro en la pared del alvéolo como fibras de Sharpey. (2) Los haces de fibras, insertadas por un extremo en el cemento y por el otro en la pared del alvéolo como fibras de Sharpey, suelen describirse en grupos identificables según su orientación predominante. (13) (Fig. 5)

1. Las fibras de la cresta alveolar circulan del cemento del cuello del diente a la cresta alveolar.
2. Las fibras horizontales van del cemento a la cresta alveolar.
3. Las fibras oblicuas forman el componente principal del ligamento y van desde el hueso en sentido ligeramente apical para insertarse en el cemento, de forma que parecen suspender el diente en su alvéolo.
4. Las fibras apicales van del ápice radicular a la base del alvéolo. También pueden incluirse las fibras interradiculares que se encuentran en la furcación de dientes multirradiculares y circulan como fibras transeptales de raíz a raíz coronales a la cresta alveolar. (15)

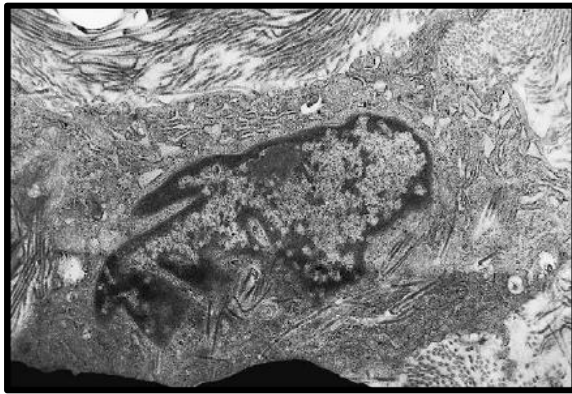
**Figura 5. Fibras del Ligamento Periodontal.**

Extraído de Park, C.H. Biomaterial-Based Approaches for Regeneration of Periodontal Ligament and Cementum Using 3D Platforms. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 4364.



### 3.3.1. Células del Ligamento Periodontal humanas (huPDLcs)

El ligamento periodontal es una estructura importante, donde las células del ligamento periodontal generan fibras de tejido conectivo que cubren la brecha entre el cemento y el hueso alveolar para sostener al diente. Esta estructura compleja de tejido del ligamento periodontal comprende una gran diversidad de poblaciones de células, que incluyen células del ligamento periodontal (PDLc), las cuales son predominantemente fibroblastos y tienen un rol crucial en mantener y regenerar el tejido periodontal. (16) (Fig. 6)



**Figura 6. Micrografía electrónica de un fibroblasto.** Se observan múltiples fibras de colágeno (flecha), en los fagolisosomas unidos a la membrana.

Es posible que los fibroblastos del ligamento periodontal sean células contráctiles móviles capaces de generar una fuerza para la erupción de los dientes. (13) En condiciones normales, los fibroblastos del ligamento periodontal *in vivo* intervienen principalmente en la síntesis proteica de colágeno, GAG, proteoglicanos y glucoproteínas. (13)

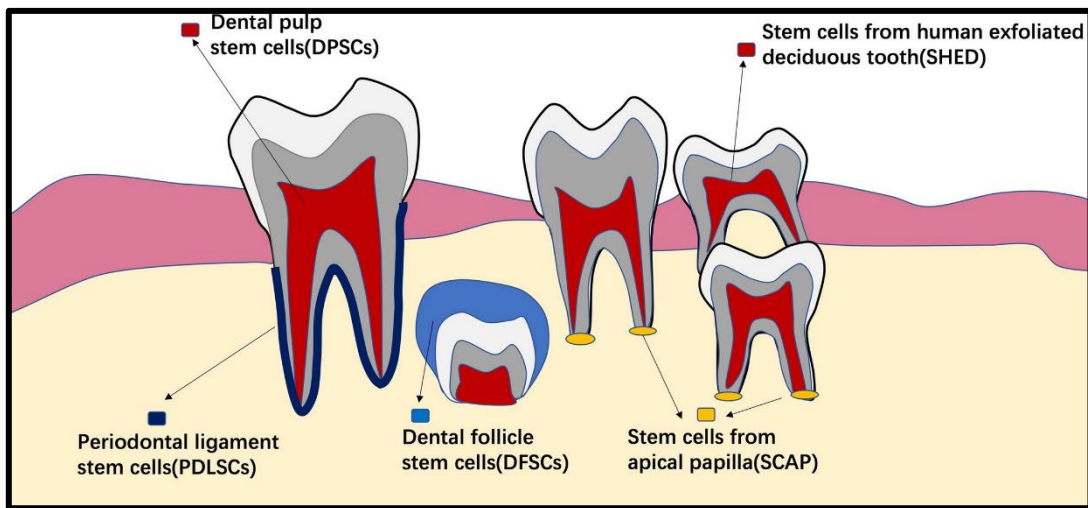
Las células del ligamento periodontal obtenidas de dientes extraídos son una fuente prometedora de células para la regeneración periodontal, medicina regenerativa e ingeniería tisular, debido a que incluyen células troncales que tienen una alta capacidad de proliferación, autorenovación y de diferenciación multilineaje, además de tener la habilidad de formar tejido parecido a ligamento periodontal y cemento *in vivo*. (17)

Aunque los fibroblastos gingivales y del ligamento periodontal tienen un aspecto similar cuando se cultivan, presentan diferencias funcionales muy importantes. Por tanto, en estudios en animales se ha hallado que, al recubrir raíces dentales con células de

ligamento periodontal cultivadas y reimplantadas *in vivo*, éstas actuaron como células progenitoras y dieron lugar a formación de nuevo tejido de ligamento periodontal. (13)

Además, se ha observado que algunas células del ligamento periodontal tienen características similares a los osteoblastos, como la producción de osteonectina, osteocalcina y concentraciones altas de fosfatasa alcalina. Estos estudios indican que existen subpoblaciones funcionales y fenotípicamente distintas de células de la estirpe de los fibroblastos y osteoblastos/cementoblastos en el ligamento periodontal y estas células incluyen células troncales y precursoras importantes en la reparación y la regeneración.

Las células troncales del ligamento periodontal humanas son similares a las células troncales mesenquimales de la médula ósea (BMMSC), son capaces de suprimir la respuesta inmune y las reacciones inflamatorias, lo que sugiere que las células troncales del ligamento periodontal puedan ser usadas en terapias basadas en células troncales alogénicas. (18)



**Figura 7. Células troncales dentales.** DPSCs son aisladas de la pulpa dental. PDLSCs son un grupo de células aisladas del ligamento periodontal. SHED se obtienen de dientes deciduos exfoliados. DFSCs se aíslan del folículo dental de dientes no erupcionados. SCAPs son aisladas de la papila apical. Extraído de: Wang D, Wang Y, Tian W, Pan J. *Advances of tooth-derived stem cells in neural diseases treatments and nerve tissue regeneration. Cell Prolif.* 2019 May;52(3): e12572.

Las células del ligamento periodontal humanas (huPDLs) son células heterogéneas que comparten las características de células troncales mesenquimales (MSCs) y son reconocidas como células troncales prometedoras para la regeneración periodontal. (19) (20) (Fig. 7)

Las huPDLCs pueden diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y cementoblastos, contribuyendo a la curación fisiológica del complejo del ligamento periodontal-cemento y hueso alveolar. (21)

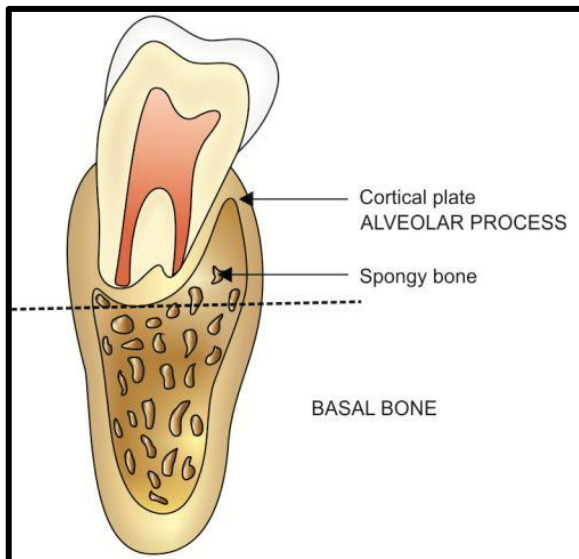
La diferenciación osteogénica permite a las huPDLCs a ser un potencial objetivo para la promoción de la restauración funcional de los tejidos periodontales. (22)

Las células del ligamento periodontal usadas en estudios experimentales son obtenidas a partir de explantes de tejido de ligamento periodontal (medio de cultivo celular que contiene 10% de suero fetal bovino como promotor de crecimiento). (22)

### 3.4. Hueso Alveolar

La apófisis alveolar se define como la parte de los maxilares superior e inferior que forma y sostiene los alvéolos de los dientes. (Fig. 8) La apófisis alveolar está compuesta de hueso que se forma tanto por células del folículo dental (saco dentario), el hueso alveolar fasciculado, como por células que son independientes del desarrollo dentario. (13) (15)

Junto con el cemento radicular y el ligamento periodontal, el hueso alveolar constituye



**Figura 8. Esquema del hueso alveolar.** Extraído de <https://www.jaypeedigital.com/book/9789386261731/chapter/ch4>

el aparato de inserción del diente, cuya función principal consiste en distribuir y absorber las fuerzas generadas por la masticación y otros contactos dentarios. (15)

El hueso alveolar tiene su origen embriológico en la condensación inicial del ectomesénquima alrededor del germen del diente inicial. Está formado por hueso alveolar propio, en el que se insertan las fibras de Sharpey; hueso compacto, formado por la cortical vestibular y oral, y hueso

esponjoso, localizado entre ellos. (2) (13)

Además de sostener los dientes, el hueso maxilar y mandibular también sirve para insertar los músculos, como almacén a la médula ósea y actúa como reservorio de iones, en concreto de calcio. (13)

El hueso es un tejido conjuntivo mineralizado y, por peso consta de alrededor de un 60% de materia inorgánica, un 25% de materia orgánica y un 15% de agua. Por volumen, estas proporciones son del 36, 36 y 28% respectivamente. La fase mineral consta de hidroxiapatita, cristales pequeños en forma de aguja o finas láminas de unos 8nm de grosor y de longitud variable. Alrededor del 90% de la materia orgánica es colágena de tipo I. Además, hay pequeñas cantidades de otras proteínas, como osteonectina, osteocalcina, osteopontina y proteoglicanos. (2) (13)

Pueden identificarse cinco tipos de células en el hueso. Se encuentran células formadoras de hueso (osteoblastos) en la superficie del hueso. Las células grandes multinucleares (osteoclastos) se encargan de reabsorber hueso. Además, se encuentran células osteoprogenitoras, que aparecen como células largas y delgadas. Son una población de células madre para formar osteoblastos. (3) (13)

Se sitúan cerca de los vasos sanguíneos de la médula y el ligamento periodontal. Cuando el hueso no sufre deposición ni resorción activa, su superficie latente está recubierta por células relativamente indiferenciadas conocidas como células de revestimiento óseo, que pueden ser osteoblastos inactivos. (3) (13)

### **3.5. Cemento Radicular**

El cemento fue descrito por primera vez en 1835, es un tejido conectivo único, mineralizado y avascularizado que cubre la superficie radicular de los dientes. No sufre procesos de remodelación, pero sí de aposición, lo cual se mantiene durante toda la vida. (1)

El cemento es derivado de la capa celular ectomesenquimática del saco o folículo dental que rodea al germen dentario. Desde el punto de vista estructural, el cemento es comparable al hueso ya que su dureza y composición química son prácticamente similares; además ambos crecen por aposición, poseen laminillas, y cuando el cemento presenta células, éstas se alojan en lagunas, como los osteocitos. (3)



El cemento radicular es formado por los cementoblastos, provee de una interfase por la que la superficie radicular es anclada a las fibras colágenas de Sharpey del ligamento periodontal. (23)

El cemento, al cubrir la porción radicular de los dientes, se relaciona con la dentina por su cara interna; con el ligamento periodontal, por su cara externa; por su extremo coronario con el esmalte y con la pulpa dental por su extremo apical. (3)

El cemento radicular no es uniforme y además difiere en composición química. Cerca del 50% es matriz inorgánica constituida por fosfatos de calcio que se organizan en forma de cristales de hidroxiapatita y el resto corresponde a la matriz orgánica consistente, sobre todo de colágenas tipo I (95%) y tipo III(5%), las cuales en su conjunto desempeñan un papel estructural; así como glicoproteínas, proteoglicanos y proteínas no colagénicas como la amelogenina, ameloblastina, enamelina, fosfatasa alcalina (ALP), sialoproteína ósea (BSP), proteína de la matriz dentinaria-1(DMP-1), osteopontina, fibronectina, osteocalcina, el factor de crecimiento derivado del cemento (CGF). (3) (13) (15)

El cemento está formado por elementos celulares, en especial los cementoblastos y cementocitos y por una matriz extracelular calcificada. (3) (13)

Los precursores de cementoblastos están presentes en el ligamento periodontal y pueden ser usados para regeneración del cemento si es necesario.

### 3.5.1. Cementoblastos:

Los cementoblastos se encuentran adosados a la superficie del cemento, del lado del ligamento periodontal (Zona cementógena del periodonto). En un diente funcional, los cementoblastos se consideran integrantes estructurales de dicho ligamento. Los cementoblastos pueden encontrarse en estado activo (con el microscopio óptico se observan como células cúbicas, muy basófilas) o inactivo (aparecen aplanados, con núcleo de heterocromatina). (3)

En las raíces en desarrollo suele haber una capa continua de cementoblastos activos en toda su extensión. En los dientes con raíces completamente formadas, en cambio, se encuentran cementoblastos activos a partir del tercio medio o sólo en el tercio apical,

es decir, en las zonas donde hay deposición de cemento secundario (zonas cementógenas). (3)

Entre los cementoblastos activos y el cemento mineralizado existe una delgada capa de sustancia cementoide, cemento inmaduro o precemento, que representa la deposición más reciente de matriz orgánica donde aún no se han precipitado las sales minerales. (3)

Con el microscopio electrónico, los cementoblastos formativos presentan núcleo excéntrico de forma irregular, con uno o dos nucléolos, abundantes mitocondrias, RER (Retículo Endoplásmico Rugoso) y aparato de Golgi bien desarrollado. Los cementoblastos presentan menor cantidad de RER, pero un mayor número de mitocondrias. (3)

En los cementoblastos humanos se ha descrito la presencia de numerosos granos de glucógeno, así como de filamentos intermedios y de actina. Las células se asocian mediante uniones comunicantes y desmosomas muy simples. (3)

Las membranas de los cementoblastos poseen receptores para la hormona del crecimiento y para el EGF (factor de crecimiento epidérmico), para la acción de la PTHrP (Proteína relacionada con la paratohormona), la cual parece tener un importante papel en la regulación de la cementogénesis. (3)

### 3.5.2. Cementogénesis

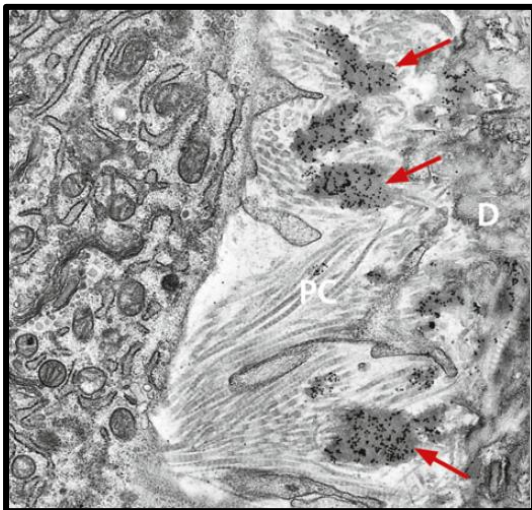
La formación de dentina y cemento en la raíz de un diente en desarrollo depende de la presencia de la vaina radicular de Hertwig. Esta vaina se origina por proliferación de las células del epitelio dental interno y externo en el asa cervical del órgano del esmalte, una vez que se ha completado la aposición del esmalte en toda la extensión de la corona. La vaina epitelial crece extendiéndose en sentido apical, y en su extremo distal forma el diafragma epitelial, más marcado en el caso de los dientes multirradiculares. (3) (15)

A medida que la vaina crece y rodea a la papila en expansión, induce a las células situadas en la periferia de ésta a diferenciarse en odontoblastos, los que una vez maduros secretan la matriz orgánica de la dentina radicular. (3) (15)

Al avanzar el proceso de mineralización se interrumpe para las células epiteliales la fuente de nutrición proveniente de la papila dentaria, por lo que la vaina radicular se fragmenta, formando una red fenestrada. Las células provenientes de la disgregación de la vaina de Hertwig persisten en el adulto constituyendo los restos epiteliales de Malassez. (3) (15)

A través de la red que forma la vaina epitelial migran las células ectomesenquimáticas indiferenciadas provenientes del folículo o saco dentario, y se colocan en estrecha aposición con la capa hialina que cubre la superficie de la dentina radicular. (3) (13)

Estas células ectomesenquimáticas aumentan de tamaño y desarrollan todos los orgánulos citoplasmáticos característicos de las células sintetizadoras y secretoras de proteínas, diferenciándose en cementoblastos. Estos comienzan a depositar la matriz orgánica del cemento. (3) (23) (Fig. 9)

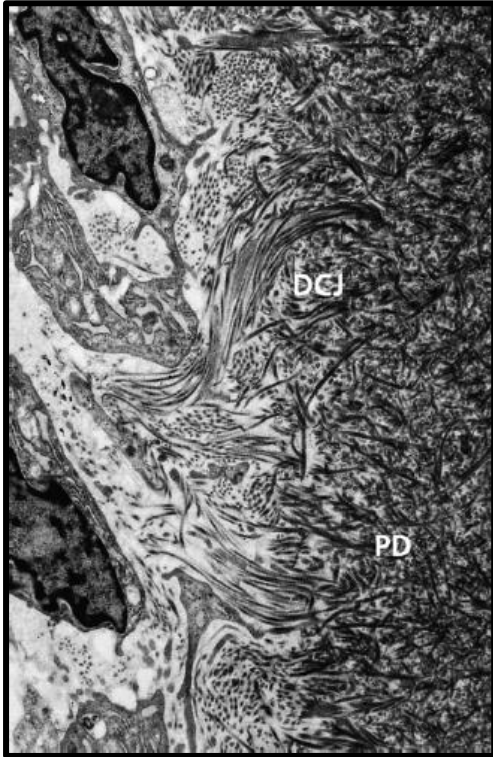


**Figura 9. Inicio de la cementogénesis.** Micrografía electrónica de transmisión que ilustra una preparación inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-amelogenina y con técnica de proteína A-dorada. Al inicio de la cementogénesis, depósitos redondos de matriz orgánica unidos con partículas doradas (flechas) están distribuidos de manera aleatoria a lo largo de la superficie de la dentina (D) donde se colocaliza con la matriz colágena del precemento (PC). Extraído de Bosshardt DD, Stadlinger B, Terheyden H. Cell-to-cell communication--periodontal regeneration. Clin Oral Implants Res. 2015 Mar;26(3):229-39

La matriz orgánica se mineraliza por la formación de vesículas matriciales en los momentos iniciales y por propagación de los cristales de hidroxiapatita desde la superficie dentinaria de la raíz. (3) (15)

Las zonas más anchas dispuestas entre ellas son las laminillas, que corresponden a nuevas capas de cemento. Las fibras colágenas de cada laminilla (fibras intrínsecas del

cemento, producidas por los cementoblastos) se orientan paralelamente a la superficie radicular, pero la dirección en cada laminilla es diferente de las laminillas vecinas. (3)(Fig. 10)



**Figura 10. Adherencia inicial de colágeno del cemento a la predentina.** Micrografía electrónica de transmisión que ilustra la adherencia inicial de la matriz de colágeno de las fibras extrínsecas del cemento a la matriz de predentina (PD) de la raíz en la región de la futura unión dentinocemento. Extraído de Bosshardt DD, Stadlinger B, Terheyden H. Cell-to-cell communication--periodontal regeneration. Clin Oral Implants Res. 2015 Mar;26(3):229-39

Al mismo tiempo que se produce la aposición del cemento, van quedando incluidas en él las fibras colágenas del ligamento periodontal en formación, que constituyen las fibras extrínsecas del cemento o fibras perforantes, las que llegan a mineralizarse total o parcialmente al estar dentro de este tejido. (3) (Fig. 11)

Desde la perspectiva histológica se clasifica como celular o acelular dependiendo de la presencia o ausencia de cementocitos en su estructura. Otra clasificación incluye cemento con fibras intrínsecas o extrínsecas, dependiendo de la presencia de fibras colágenas. (1)



**Figura 11. Formación del Cemento radicular.** Las fibras de colágeno se adhieren a la dentina de la raíz y su mineralización resulta en la formación del cemento radicular. Extraído de Bosshardt DD, Stadlinger B, Terheyden H. Cell-to-cell communication--periodontal regeneration. Clin Oral Implants Res. 2015 Mar;26(3):229-39

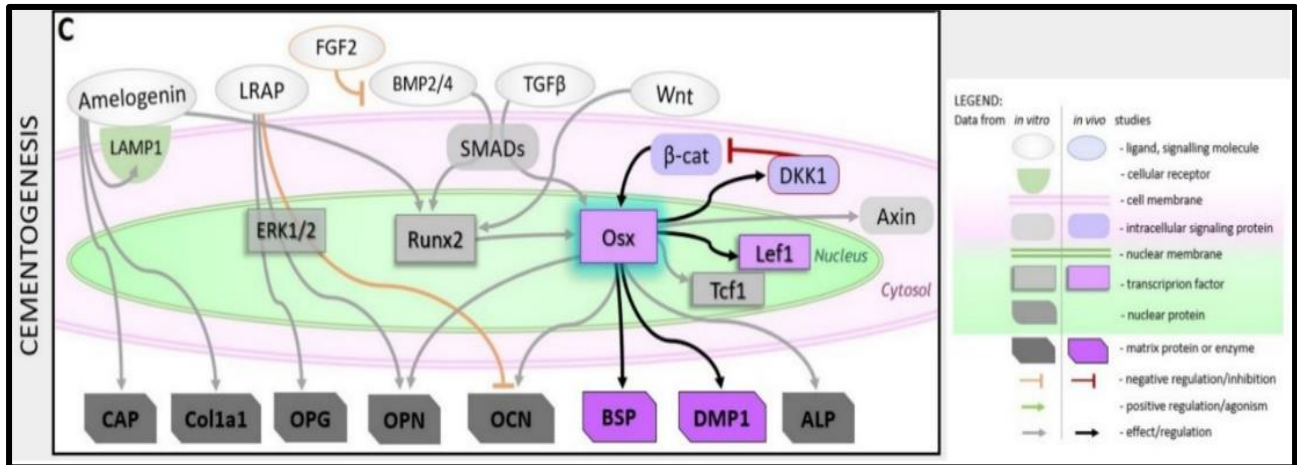
### 3.5.3. Vías de Señalización de la Cementogénesis

En analogía con la dentinogénesis, TGF- $\beta$ , BMPs, Wnt y factores derivados de ameloblastos regulan la expresión de proteínas de la matriz estructural del cemento. El factor de transcripción central de la cementogénesis es Osterix (Osx) el cual es activado por la señalización de Wnt y TGF- $\beta$ . Osx es expresado abundantemente por cementoblastos y cementocitos durante la deposición del cemento, el cual regula la expresión de DMP1, BSP, OCN y ALP. (24)

La estabilización de  $\beta$ -catenina lleva a una alta formación de cemento por medio de una regulación positiva de Osx, el cual es logrado por  $\beta$ -catenina al unirse al promotor de Osx, lo que apunta a una regulación directa de Osx por  $\beta$ -catenina. Además, Osx regula la expresión de la proteína 1 relacionada a dickkopf (DKK1), un antagonista de  $\beta$ -catenina, y el factor 1 de los factores de transcripción de las células T (Tcf1) y el factor 1 de unión potenciador linfoide (Lef1), los cuales en conjunto con  $\beta$ -catenina forman un complejo iniciador de la transcripción con  $\beta$ -catenina en el núcleo celular. (24)

Además de la regulación de Wnt/  $\beta$ -catenina, Osx es regulado vía el eje TGF- $\beta$ /Smad, por ejemplo, Smad3 tiene un rol importante en la expresión del gen Osx durante la cementogénesis. BMP2 y BMP4 a su vez regulan la expresión de Osx por vía de la cascada de BMP-Smad-Runx2, así como por la vía de Runx2 independientemente. (24)

Los componentes de señalización derivados del esmalte, amelogenina y sus isoformas, regulan la cementogénesis al modular la expresión de varias proteínas de la matriz. En un estudio se determinó que la aplicación de una proteína recombinante de amelogenina induce la expresión de mRNA de osteopontina (OPN), proteína de adhesión al cemento (HACD1/CAP), OCN, COL I, BSP, DMP1 y ALP, lo que mejora la mineralización de líneas celulares de cementoblastos de ratones inmortalizados (OCCM-30). (24) (Fig. 12)



**Figura 12. Cascadas de Señalización de la cementogénesis.** Mayor cascada de señalización relacionada a la cementogénesis con *Osx* como el factor de transcripción central, el cual es regulado por medio de *Wnt/β-catenina* en un loop de retroalimentación. Los productos derivados de ameloblastos (*LRAP* y *amelogenina*) muestran que modulan la expresión de genes cementogénicos clave *in vitro*. Baranova J, Büchner D, Götz W, Schulze M, Tobiasch E. Tooth Formation: Are the Hardest Tissues of Human Body Hard to Regenerate? *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 4;21(11):4031.

En los últimos años se han descrito dos proteínas aisladas de la matriz del cemento radicular (propuestas como tejido específicas), la proteína del cemento 1 (CEMP-1) y la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP). (1)

### 3.6. Proteínas del Cemento

#### 3.6.1. Proteína de Adhesión del Cemento (HACD1/CAP)

Fue la primera proteína aislada del cemento radicular, caracterizada y purificada a partir de extractos de cemento maduro de bovino y humano. Es una variante producida por el splicing alternativo para la 3-hidroxiacil-CoA-deshidratasa 1, antiguamente denominada PTPLA y actualmente denominada HACD1 (25) (26).

La 3-Hidroxiacil coenzima A deshidratasa 1/proteína de adhesión del cemento, está conformada por una secuencia de 140 aminoácidos, tiene un peso molecular teórico de 14.9 kDa y una movilidad relativa de 54kDa y tiene un punto isoelectrico teórico de 7.82. (6)

El gen que codifica para la proteína HACD1/CAP se localiza en el cromosoma 10 región p13-14, se trata de una de las dos isoformas del gen HACD1, la primera de ellas se expresa en tejido muscular y se ha demostrado que cataliza múltiples reacciones en el ciclo de los ácidos grasos de cadena larga, además de participar en la formación de membranas lipídicas. (6) (Fig. 13)

Por otro lado, la isoforma 2, difiere de la secuencia canónica en los siguientes aminoácidos: 126-140: IVHCLIGIVPTSVIV ---- VSFPSCCFSIAVIFM (UniProtKB-B0YJ81-2) (27) (Fig. 14)

10	20	30	40	50
MGRLTEAAAA	GSGSRAAGWA	GSPPTLLPLS	PTSPRCAATM	ASSDEDGTNG
60	70	80	90	100
GASEAGEDRE	APGERRRLGV	LATAWLTFYD	IAMTAGWLVL	AIAMVRFYME
110	120	130	140	150
KGTHRGlyKS	IQKTLKFFQT	FALLEIVHCL	IGIVPTSVIV	TGVQVSSRIF
160	170	180	190	200
MWLITHSIK	PIQNEESVVL	FLVAWTVTEI	TRYSFYTFSL	LDHLPYFIKW
210	220	230	240	250
ARYNFFIILY	PVGVAGELLT	IYAALPHVKK	TGMFSIRLPN	KYNVSEFDYYY
260	270	280		
FLITMASYI	PLFPQLYFHM	LRQRRKVLHG	EVIVEKDD	

Figura 13. Secuencia de aminoácidos de la Isoforma 1 HACD1 (Entrada: UniProtKB-B0YJ81-1). (Extraído de Nidome M. 2018) (27)

10	20	30	40	50
MGRLTEAAAA	GSGSRAAGWA	GSPPTLLPLS	PTSPRCAATM	ASSDEDGTNG
60	70	80	90	100
GASEAGEDRE	APGERRRLGV	LATAWLTFYD	IAMTAGWLVL	AIAMVRFYME
110	120	130	140	
KGTHRGlyKS	IQKTLKFFQT	FALLE	VSFPS CCFsIAVIFM	

Figura 14. Secuencia de aminoácidos de la isoforma 2 HACD1/CAP, en el recuadro rojo se observan los 15 aminoácidos que diferencian a la isoforma 2 de la isoforma 1 (Entrada: UniProtKB – B0YJ81-2) (Extraído de Nidome M. 2018) (27)

Se ha determinado que participa en el reclutamiento y la diferenciación celular durante la formación del cemento radicular (4). Se expresa en células del folículo dental, promoviendo su adhesión y diferenciación. Además, las células periodontales crecidas *in vitro* en presencia de HACD1/CAP son capaces de formar un tejido mineralizado (1)

Su papel biológico ha involucrado un papel quimiotáctico de células del ligamento periodontal y del hueso alveolar hacia la superficie radicular. Incrementa la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP), así como la expresión de proteínas asociadas al proceso de biomineralización (1) (5).

En estudios de dicroísmo circular se ha observado que esta proteína posee un alto porcentaje de estructura aleatoria. En estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM), se ha observado que la proteína se auto ensambla en esferas que a su vez se aglomeran en fibras. Los resultados observados tanto en los estudios de dicroísmo circular, así como en SEM muestran un comportamiento recurrente en otras proteínas involucradas en la mineralización. (5) (28)

En estudios de formación de cristales *in vitro* en un medio libre de células, se ha observado que la proteína es capaz de promover la formación de estructuras esféricas compuestas de cristales de hidroxiapatita que crecen desde un centro de nucleación. (28)

La obtención de la proteína recombinante a través de sistemas procariontes ha permitido realizar investigaciones *in vitro* permitiendo conocer su actividad en la formación de cristales de hidroxiapatita y en la formación de tejido mineralizado en defectos críticos en calvaria de ratas *in vivo* (5) (29) (30)

### 3.6.2. Proteína del Cemento 1 (CEMP1)

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

El gen humano de la proteína del cemento 1 (CEMP1) contiene 1 exón, se extiende 1.4kb, y mapea el brazo corto del cromosoma 16 (16p 13.3) El gen CEMP1 codifica para una proteína de 247 aminoácidos con una masa molecular de 25.9 kDa, la cual después de modificaciones postraduccionales, incrementa a 50kDa. Análisis fisicoquímicos de CEMP-1 revelaron que es una proteína alcalina con un punto isoeléctrico de 9.73. (10)



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

La proteína del cemento 1 (CEMP1) parece ser un regulador clave de la cementogénesis ya que regula la velocidad de deposición, composición y morfología de los cristales de hidroxiapatita. (31)

Además, regula la expresión de proteínas que participan en la formación y maduración de tejido mineral como la fosfatasa alcalina (ALP), osteopontina (OPN) y sialoproteína ósea (BSP) en cementoblastos, mediante la activación de vías de señalización caracterizadas como lo es la de p-38 y JNK-MAPK; así como también participa activamente en la mineralización de la matriz extracelular de los cementoblastos. (1)

Investigaciones muestran que la recombinante humana CEMP-1 (hrCEMP-1) estimula la proliferación y migración células humanas del ligamento periodontal (HuPDLCs) y de anticuerpos-1<sup>+</sup> de células troncales mesenquimales, lo que sugiere que esta proteína está relacionada con el mecanismo de reclutamiento perivascular de células troncales. Estudios *in vivo* han mostrado que hrCEMP-1 promueve la regeneración ósea en calvarias de ratas con defectos de gran tamaño, lo que sugiere que es un mediador para sanación de heridas y regeneración periodontal. CEMP-1 sostiene propiedades biológicas y farmacológicas y juega un papel primordial durante el proceso de mineralización, así como en la regeneración de tejidos mineralizados. (10)

En otros estudios *in vitro* se comprobó que CEMP-1 promueve la proliferación celular, promueve el incremento en la actividad de ALP cuando actúa sobre las HuPDLCs. Además, el CEMP-1 puede inducir la diferenciación de las HuPDLCs hacia un fenotipo parecido al mineralizante. (10)

Además, se demostró que CEMP1 puede modular la expresión de muchos genes relacionados con el desarrollo, crecimiento, ciclo y muerte celular en HGFs (fibroblastos gingivales humanos) transfectados con CEMP1. (31)

Además, la transfección de CEMP1 en células no osteogénicas como los fibroblastos gingivales adultos humanos resultan en la diferenciación de estas células a un fenotipo de células parecidas a las mineralizantes. (32) 4

### 3.6.3. Generalidades de los péptidos en la biomineralización..

Los péptidos son polímeros compuestos por aminoácidos en secuencias cortas que, a diferencia de las proteínas, pueden no poseer estructura tridimensional. (33) En general un péptido consiste en por lo menos dos aminoácidos. Un polipéptido es una larga cadena de aminoácidos. También la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) estableció que un oligopéptido consiste en alrededor de 10 a 20 aminoácidos, mientras que los polipéptidos, mientras que la definición médica indica que es un fragmento de proteína que consiste en menos de 25 aminoácidos. (34)

Los péptidos cortos tienen características de oligómeros, más que de polímeros, pero no hay un consenso claro entre científicos. En la literatura se encuentra información contradictoria, en unos estudios mencionan que pueden ser hasta 30 (Habault J. y Poyet J., 2019; Fisher F. et al., 2019), 50 (Pavan S. y Berti F., 2012, Baig M. et al, 2018) y hasta 100 (Hamley I. W. 2017) aminoácidos. Por otro lado, péptidos ultracortos son precisamente definidos como péptidos que tienen alrededor de 7 aminoácidos. También los péptidos cortos no deben exceder los 45 aminoácidos. (34)

Cumplen funciones como estimular, regular o inhibir numerosas funciones biológicas; actúan como transmisores de información y coordinar distintas actividades en diferentes tejidos. (33)

Estas moléculas se han encontrado presentes en células o en fluidos del cuerpo en cantidades pequeñas, por lo cual, se consideran como posibles agentes terapéuticos. Pueden sintetizarse químicamente a grandes cantidades, y el costo es mucho menor al compararlos con proteínas.

Los péptidos han estado a la vanguardia de la investigación científica de las últimas décadas. Su diversidad estructural y alto nivel de selectividad, los posicionan como principales candidatos para desarrollo terapéutico. Para este fin, es deseable ser capaz de sintetizar péptidos bajo condiciones de laboratorio controladas utilizando reacciones químicas altamente eficientes. (33)

A través de diferentes estudios en el campo de la biomineralización, se ha logrado identificar algunos factores que deben cumplir los péptidos para participar en este proceso entre los cuales podemos destacar:

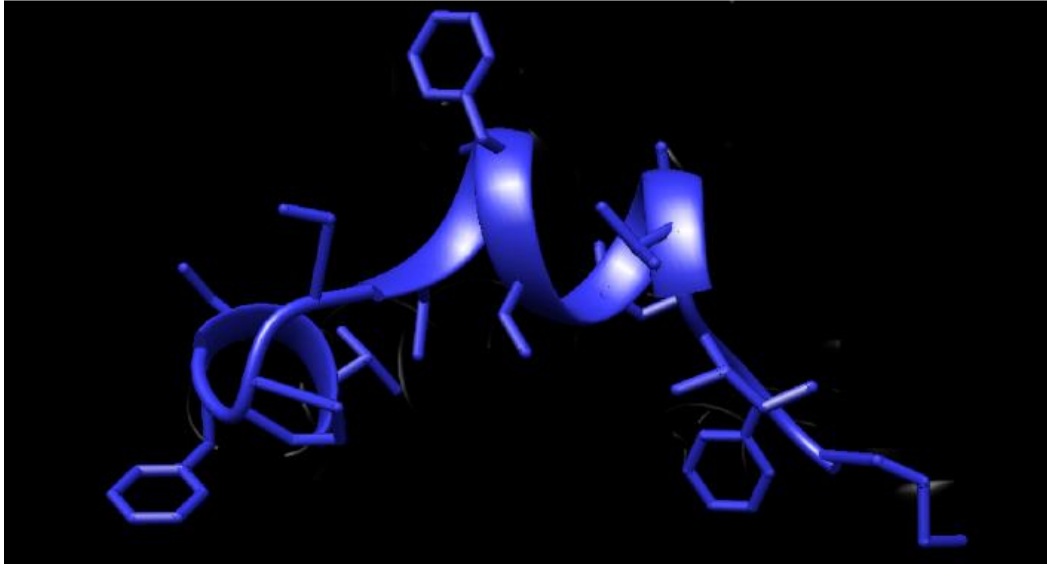
- Composición y secuencia de aminoácidos:

La estructura primaria se refiere a la secuencia de aminoácidos que compone los péptidos. Esta estructura puede ser modificada y sutiles sustituciones en la composición de aminoácidos del péptido pueden tener diferentes efectos.

- Cada residuo dentro de la secuencia peptídica tiene un papel que desempeñar: La histidina y la cisteína son residuos comúnmente asociados con la unión y la quelación, mientras que la tirosina se sabe que induce la reducción de los iones metálicos en su estado de valencia cero. Los residuos ácidos y básicos son responsables de la carga global del péptido y los aminoácidos hidrofóbicos están implicados en la conformación del péptido de unión a metales que son críticos para regular la biomineralización son consecuencia del sinergismo que existe entre los diferentes aminoácidos.

### 3.6.3.1. Péptidos de HACD1/CAP

A partir de la secuencia proteica de HACD1/CAP se ha identificado una secuencia compuesta de 15 aminoácidos (VSFPSCCFSIIVIFM) del extremo carboxilo terminal, que integran el péptido de la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP-p15); la cual tiene un punto isoeléctrico de 5.48 y un peso molecular de 1.65 kDa (6). Estos aminoácidos al no ser compartidos por otra secuencia hacen única esta región de la proteína. De estos 15 aminoácidos constitutivos, 10 son hidrofóbicos y 5 hidrofílicos, por lo cual, se considera un péptido hidrofóbico de estructura globular. (8) (Fig. 15)



*Figura 15. Modelo teórico del péptido PTPLA/CAP. Estructura secundaria con cadenas laterales de la secuencia de los aminoácidos: VSFPSCCFSIAVIFM. Extraído de Salgado F (2014) (8)*

El péptido promueve la formación de cristales de hidroxiapatita, además de tener la capacidad de regular la morfología y madurez de cristales en un sistema libre de células, promoviendo la nucleación de cristales de HAp (7); influye como inductor, estimulador de la regeneración ósea en defectos segmentales de tamaño crítico, con características histológicas y con una densidad ósea similar al de un hueso sano y vital; por lo tanto podría jugar un papel clave en los procesos regenerativos involucrados en la regeneración periodontal (8).

### 3.6.3.2. Péptidos de CEMP1

Existe un péptido sintético de CEMP1 (CEMP1-p1) obtenido a partir de la técnica de síntesis de fase sólida, sintetizado con una secuencia específica de 20 aminoácidos (MGTSSTDSQQAGARRTSTSN) tomados del extremo amino terminal de la proteína CEMP1. Se eligió esta secuencia porque se cree que tiene sitios de actividad para la mineralización, por su plasticidad y facilidad para unirse a los cristales de hidroxiapatita (9) (10).

Se han realizado diversos estudios comparando su efecto con relación a la proteína nativa, obteniendo una función similar: *in vitro* participa en la formación de cristales de hidroxiapatita en geles de silicato, en un cultivo de células del ligamento periodontal mostró favorecer la proliferación y la formación de tejido mineralizado, así como estimular su diferenciación hacia un tipo mineralizante (11).

También se realizaron estudios *in vivo* en defectos críticos de calvaria de ratas Wistar donde se observó su participación en la formación de tejido mineralizado. Además, al hacer un análisis profundo, se obtienen mayores ventajas del péptido CEMP1-p1, a comparación con la proteína nativa, que permiten ser un buen candidato con potencial aplicación en la medicina regenerativa y más importante aún, en la regeneración periodontal (12).

### **3.7. Diferenciación y Formación de hueso**

El hueso es el tejido más duro entre todos los tejidos conectivos del cuerpo, consiste en 50% de agua. La parte sólida consiste en varios minerales, especialmente 76% de sales de calcio y un 33% de material celular. Las células formadoras de hueso, osteoblastos y osteoclastos tienen un papel importante en el crecimiento y desarrollo del hueso.

La función del tejido óseo es influenciada por muchos factores, así como hormonas, factores de crecimiento y a la carga mecánica. La microestructura del hueso es la distribución y alineación de cristales de apatita biológica. Esto es determinado por la dirección del comportamiento de células óseas, por ejemplo, la migración y regulación celular. El desarrollo de hueso inicia con el remplazo de tejido mesenquimal rico en colágena por hueso.

Esto resulta en la formación de tejido óseo nuevo, una forma primitiva de hueso con fibras de colágena organizadas de manera aleatoria que se remodela a un hueso laminar maduro, el cual posee anillos paralelos regulares de colágeno. Generalmente, el hueso es formado por una osificación endocondral o intramembranosa. La osificación

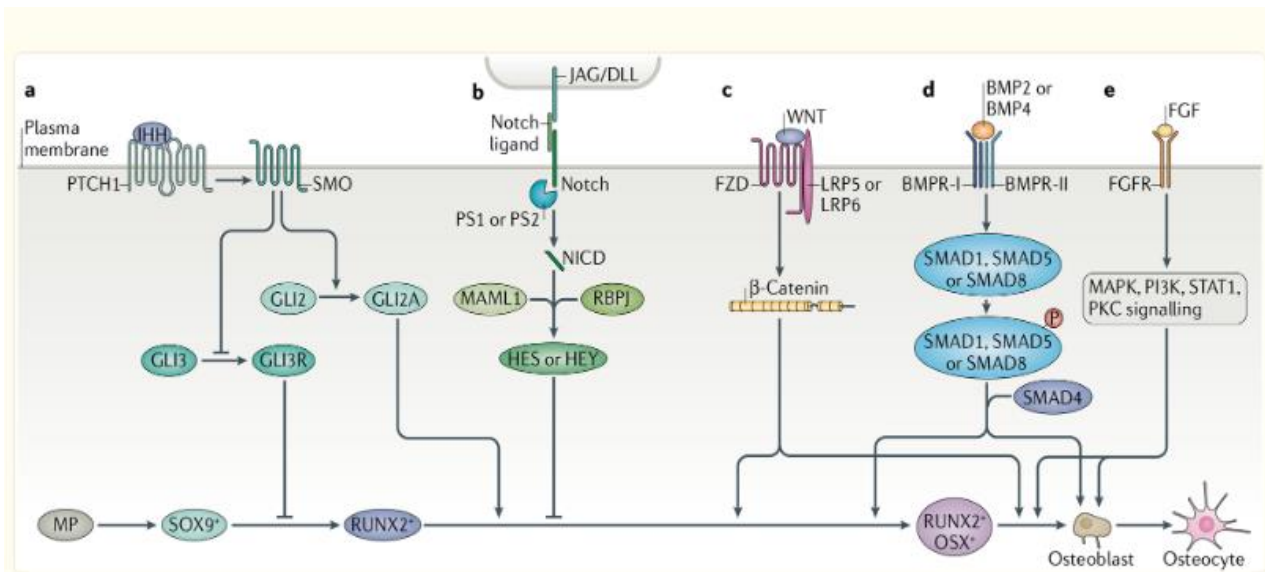
intramembranosa es esencial en huesos como el cráneo, los huesos faciales y la pelvis en donde las MSCs directamente se diferencian en osteoblastos. Mientras que, la osificación endocondral tiene un papel importante en muchos hueso en el esqueleto humano, incluyendo huesos, largos, cortos e irregulares, en donde las MSCs, primero experimentan una condensación y luego una diferenciación en condrocitos para formar la placa de crecimiento de cartílago y la placa de crecimiento es gradualmente reemplazada por un nuevo tejido óseo. La migración y diferenciación de MSCs son dos procesos fisiológicos importantes en la formación de hueso. (35)

En la osificación intramembranosa, las MSCs llevan a cabo una proliferación u diferenciación por medio de una linaje osteoblástico para formar hueso directamente sin formar cartílago primero. La migración de MSCs y preosteoblastos está involucrada en este proceso y esta mediado por diverso factores. MSCs inicialmente se diferencia en preosteoblastos los cuales proliferan cerca de la superficie del hueso y secretan ALP. Así se convierten en osteoblastos maduros y empiezan a formar osteocitos que queda atrapados en la matriz extracelular (ECM). Otros factores que regulan la osificación intramembranosa de MSCs son Runx2, Proteína 2 de unión a la secuencia rica en AT (SATB2) y Osterix, así como las vías Wnt/ $\beta$ -catenina y la vía de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP). (35)

En la osificación endocondral, las MSCs son las primeras en condensarse para iniciar la formación de la placa de cartílago. Este proceso está mediado por las BMPs a través de fosforilación y activación del receptor SMADs que transduce las señales. Durante la condensación, la parte central de MSCs se diferencia en condrocitos y secreta matriz cartilaginosa. Mientras, que las otras células en la periferia forman el pericondrio que continúa expresando colágena tipo I y otros factores importante, como proteoglicanos y ALP. Los condrocitos en el centro empiezan su maduración acompañados de una invasión de cartílago hipertrófico por la vascularización, seguido de la diferenciación de osteoblastos dentro del pericondrio y de la cavidad de la médula ósea. Muchos factores que regulan la osificación endocondral son los factores de crecimiento: factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y SOX9. (35)

A medida que las células precursoras se van diferenciando expresan en la membrana celular proteínas específicas de su función o marcadores. La expresión de Cbfa1 es la primera evidencia de la diferenciación osteogénica. La colágena I y la osteopontina (OPN), se expresan de forma temprana en células osteoprogenitoras.

Igualmente, la fosfatasa alcalina (ALP) es una proteína de superficie que podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas. La sialoproteína ósea (BSP) y la osteocalcina (OCN), son marcadores de diferenciación del preosteoblasto al osteoblasto y aparecen cuando se inicia la mineralización. La expresión de estas proteínas resulta especialmente útil como marcadores osteogénicos en los estadios finales de la diferenciación osteoblástica. (36)



**Figura 16. Desarrollo de las vías de señalización que regulan la diferenciación osteoblástica.** Varias vías de señalización funcionan de manera coordinada para asegurar el apropiado desarrollo y reparación del hueso. A) Progenitores mesenquimales (MP) iniciado por la expresión de SOX9 a un linaje osteocondroprogenitor. B) Vía de señalización Notch de regulación negativa la diferenciación osteoblástica. C) Vía de señalización canónica de Wnt que actúa como un regulador positivo de la diferenciación osteoblástica. El ligando Wnt se une a proteína relacionada al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP5) o LRP6, lo que lleva a la acumulación de β-catenina, esto permite su translocación al núcleo donde afecta expresión génica, incluyendo el incremento de RUNX2 y Osterix (OSX), el cual marca el proceso de maduración de los osteoblastos. D) La Señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP) induce la diferenciación a un linaje osteoblástico. La unión de BMP2 o BP4 lleva a la fosforilación de SMAD1, SMAD5 o SMAD8. Esto forma un complejo con SMAD4 y luego entra al núcleo para controlar la expresión génica, permitiendo la transición de células RUNX2+OSX+ a osteoblastos maduros. E) El Factor de crecimiento fibroblástico (FGF) se une a los receptores FGF tirosin cinasa de la superficie celular (FGFR1-FGFR4), lo que lleva a una cascada de eventos de señalización intracelular. La señalización de FGF controla la proliferación de preosteoblastos, la diferenciación de osteoblastos y la función de osteoblastos maduros. (36)

### 3.8. Marcadores de Biomineralización

En el proceso de biomineralización participan múltiples proteínas que tienen diversas funciones, desde ser las responsables de obtener sustratos minerales del medio, precipitar sales minerales, nuclear cristales de calcio y organizar la agregación y posterior crecimiento mineral. (4) (37)

La nucleación de dichos cristales puede ser de tipo homogénea, si en el proceso se ven involucrados solamente la saturación de minerales que forman los cristales, o de tipo heterogénea si además de existir la saturación local de minerales están involucradas macromoléculas como proteínas que promueven la formación de estos cristales. Este último tipo de nucleación es el que se lleva a cabo en los seres vivos. (4) (37)

#### 3.8.1. Proteína Morfogénica Ósea 2 (BMP2)

Las proteínas morfogenéticas óseas son moléculas de señalización multifuncionales con roles esenciales en la formación y mantenimiento del sistema óseo. Son miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Las BMPs son polipéptidos ácidos multifuncionales, que son predominantemente sintetizados y secretados por osteoblastos. (38)

Las BMPs son proteínas básicas de bajo peso molecular que se pueden aislar desde el hueso cortical, la dentina y algunos tumores óseos. (39)

Se han identificado por lo menos 20 subtipos, entre estas, BMP2 es un factor regulador importante en la osteogénesis. (40) BMP2 es un factor de crecimiento polipeptídico que contiene 396 aminoácidos, tiene como función inducir células mesenquimales indiferenciadas a tejido óseo y cartílago. (41)

#### 3.8.2. Fosfatasa Alcalina (ALP)

Esta proteína tiene un peso de 42, 190 Da (UniProtKB – P28296), mayoritariamente enriquecida en estructura secundaria de alfa hélices. Es una hidrolasa, la cual tiene la capacidad de regular las concentraciones extracelulares de fosfatos mediante la defosforilación de diversas moléculas que se encuentran en el medio como



nucleótidos, proteínas y alcaloides; esto lleva a clasificar a la ALP como un marcador del inicio del proceso de biomineralización, en el cual se reclutan moléculas minerales del medio para la formación de cristales. (42)

### 3.8.3. Sialoproteína Ósea (BSP)

La sialoproteína ósea es un componente importante de la matriz mineralizada del hueso, dentina, cemento y cartílago calcificado. La BSP es una fosfoproteína de la matriz extracelular de hueso, aislada a partir de hueso cortical con un peso aproximado de 23, 000 Da, sin embargo, presenta una movilidad relativa de 60-80,000 Da en geles SDS-PAGE, el cual muestra una gran diferencia en peso teórico obtenido a partir de su secuencia de aminoácidos. (43)

El papel de esta proteína es el de servir como nucleador de cristales de hidroxiapatita durante el proceso de biomineralización y se le ha considerado como un marcador de la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos. (44)

Además, la presencia de BSP indica una fase tardía de la diferenciación de los osteoblastos y una fase precoz de la mineralización de la matriz. Existe también una presencia débil en el ligamento periodontal en sitios de unión en el hueso alveolar y en el cemento. Es expresada por células que revisten la superficie radicular en la primeras fases de la cementogénesis durante el desarrollo dental. También, puede servir como factor de inserción porque tiene afinidad por las fibras de colágena y aumenta la inserción de osteoblastos y fibroblastos a superficies plásticas. (13)

### 3.8.4. Osteocalcina (OCN)

Es una proteína de 10,963 Da, constituye hasta el 2% del total de las proteínas del hueso. Se caracteriza por tener una unión muy fuerte a la apatita de calcio. (UniProtKB -P02818).

Es producida por osteoblastos y osteoclastos, localizada principalmente en hueso alveolar, cemento radicular y dentina. Tiene la función de modular el crecimiento, tamaño y forma de los cristales de hidroxiapatita que forma de los cristales de hidroxiapatita que forma estos tejidos y está completamente involucrada en el proceso de remodelación ósea. (45)

### 3.8.5. Osteopontina (OPN)

También llamada sialoproteína ósea I (BSPI) es una proteína con un peso molecular teórico de 35, 400 Da. En su secuencia contiene múltiples sitios putativos de unión a hidroxiapatita, tiene la capacidad de unirse a colágena, fibronectina y osteocalcina. Esta proteína puede ser localizada en el frente de mineralización de hueso, aunque se ha encontrado en múltiples sitios no mineralizados como el riñón y secreciones como saliva, leche y bilis. Las funciones principales de esta proteína son el regular la adhesión celular, regular la actividad osteoclástica y la regulación de la mineralización de la matriz extracelular. (46)

## 4. Planteamiento del problema

La enfermedad periodontal es prevalente en países desarrollados y subdesarrollados por igual, afecta entre el 20-50% de la población global, aunque se espera siga incrementando. La alta prevalencia de la enfermedad periodontal en adolescentes, adultos y en población anciana la hace una preocupación en salud pública (47).

Además, uno de los mayores retos es la limitación para estimular la neoformación de cemento radicular, el cual es uno de los eventos cruciales requeridos para la regeneración de estructuras periodontales. (48) (49). Por lo que se han creado diversas terapias en la regeneración periodontal, dentro de ellas, el estudio con diversos péptidos que han demostrado tener propiedades regenerativas, inductivas, importantes (50), aunque aún falta realizar más estudios para aclarar sus capacidades ante una enfermedad de carácter global.

Aunque se han realizado diversos estudios con el uso de péptidos derivados del cemento radicular, no se han realizado estudios con el uso de estos péptidos en combinación y tampoco se ha evaluado si en conjunto pudieran tener un efecto sinérgico en las células derivadas del ligamento periodontal humano.

## 5. Justificación

Como se mencionó antes, se ha investigado sobre el uso de diversos péptidos para la regeneración periodontal. El estudio se centrará en la actividad de dos péptidos, estos son:

- 1) el péptido CEMP1-p1, el cual es un péptido derivado de CEMP1 el cual ha probado tener las mismas características funcionales que la proteína recombinante, lo que permite la formación de tejidos mineralizados, además de tener un papel inductor en células troncales mesenquimales (10).
- 2) El otro es el péptido derivado de HACD1/CAP, CAP-p15 el cual, dadas sus características fisicoquímicas, y a que previamente se ha demostrado su papel en la nucleación de cristales de hidroxiapatita. (6).

Por lo tanto, en este estudio se pretende evaluar las propiedades en conjunto y la posible sinergia de CEMP1-p1 y CAP-p15 en los procesos de diferenciación y mineralización en células del ligamento periodontal humano.

Esta investigación ayudará a la generación de conocimiento para determinar el comportamiento celular con el uso combinado de los péptidos para una futura terapéutica regenerativa en la enfermedad periodontal.

## 6. Hipótesis

La aplicación combinada de los péptidos derivados de las proteínas del cemento radicular HACD1/CAP y CEMP1 inducirán la expresión de moléculas asociadas a la diferenciación cementoblástica de células derivadas del ligamento periodontal *in vitro*.

## 7. Objetivos

### **Generales**

Evaluar el efecto en la expresión de marcadores asociados a diferenciación cementoblástica de los péptidos CAP-p15 combinado con CEMP1-p1 en células derivadas del ligamento periodontal *in vitro*.

### **Específicos**

- a) Determinar si los péptidos CAP-p15 y CEMP1-p1 en combinación promueven la expresión de moléculas relacionadas en el proceso de regeneración ósea.
- b) Determinar si los péptidos CAP-p15 y CEMP1-p1 favorecen la expresión a nivel traduccional de moléculas relacionadas al proceso de biomineralización.
- c) Analizar por medio de  $\Delta\Delta Ct$  los niveles de expresión de mRNA de marcadores asociados al proceso de biomineralización.

## **8. Metodología**

### **8.1. Síntesis de los péptidos de CEMP1-p1 y CAP-p15**

La siguiente secuencia de aminoácidos: MGTSSSTDSQQAGHRCSTSN, fue sintetizada en Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Corresponde a los primeros 20 aminoácidos de la secuencia de la proteína CEMP1 (Protein Database NP\_001041677.1). El fragmento obtenido se denominó péptido 1 de CEMP1 (CEMP1-p1). Se utilizó PBS pH 7.2 para las diluciones del péptido que se requirieron en los ensayos realizados. La síntesis de la secuencia VSFPSCCFSIAVIFM fue llevada a cabo por la casa comercial NEP (New England Peptide) a partir de la técnica de síntesis peptídica en fase sólida (SPPS). Durante este proceso los ciclos repetitivos de acoplamiento-lavado-desprotección-lavado son muy meticulosos ya que se requiere del empleo de agentes de acoplamiento, en este caso se utilizó Fluorenil-9-metoxicarbonil (Fmoc) como protector de extremo amino terminal, t-Butil-éster para la porción carboxilo terminal y ácido tricloroacético (TFA) como eluyente. Posteriormente el péptido se preparó a una concentración de 5µg/ml en agua bidestilada.

### **8.2. Cultivo Celular**

Las células huPDLCs se aislaron con la técnica de explante celular. Las células se cultivaron hasta la subconfluencia en frascos de 75cm<sup>2</sup> (Nunc, Life Technologies, MX), en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA) suplementado con 1% (v/v) Anti-anti, MEM NEAA, 100 mM de piruvato de Sodio y 10% (V/V Suero Fetal Bovino inactivado (SFB) (Gibco, Invitrogen, MX) en una atmósfera de 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad. Las células entre el segundo y quinto pasaje se utilizaron para los procedimientos experimentales.

Las células huPDLCs se tripsinizaron, homogeneizaron y contaron. La densidad celular fue ajustada a 1.5x10<sup>3</sup> y posteriormente se sembraron en cajas de cultivo de 96 pozos

(Nunc, Life Technologies, MX) a una densidad de  $2.5 \times 10^3$  células por pozo en medio DMEM 1X (Gibco).

Después de 24 hrs las células adheridas se lavaron con PBS pH 7.2 y se agregó el medio DMEM suplementado para el grupo control positivo con 10% SFB y todos los grupos experimentales con SFB al 2%, el primer grupo experimental estará con CEMP1-p1, el segundo con CAP-p15 y el tercer grupo experimental con CEMP1-P1 y CAP-p15 en concentraciones entre  $5 \mu\text{g/ml}$ . (TABLA 1)

Las células se incubaron durante 0 a 15 días, realizando cambio de medio cada tercer día.

GRUPO	T5 – T10 – T15
CONTROL POSITIVO	10% SFB
EXP 1	2% SFB + CEMP1-p1 ( $5\mu\text{g}$ )
EXP 2	2% SFB + CAP-p15 ( $5\mu\text{g}$ )
EXP 3	2% SFB + CEMP1-p1 y CAP-p15 ( $5\mu\text{g}$ )

*Tabla 1. Grupos experimentales y Controles. Tabla en donde se ven los grupos controles y experimentales. Los cuales están determinados por distintos tiempos (5, 10 y 15 días de cultivo). El grupo control estará conformado por células derivadas del ligamento periodontal que son tratadas con 10% de SFB, luego son 3 grupos experimentales. El 1) Grupo experimental 1. Son HuPDLs tratadas con 2% de SFB y una concentración de  $5\mu\text{g}$  de péptido CEMP1-p1. 2) Grupo Experimental 2. Son HuPDLs tratadas con 2% de SFB y una concentración de  $5\mu\text{g}$  de péptido CAP-p15. Y por último el 3) Grupo Experimental 3. HuPDLs tratadas con 2% de SFB y una concentración de  $5\mu\text{g}$  de péptido CAP-p15 +  $10\mu\text{g}$  de péptido CEMP1-p1.*

### 8.3. Ensayo de qRT-PCR en tiempo real

Las células huPDLcs fueron sembradas a una densidad de  $5 \times 10^4$  en placas de 6 pozos hasta la confluencia. Fueron tratadas según se explicó para los grupos controles y experimentales con ambos péptidos. A los tiempos de 5 y 15 días el RNA total se aislaron mediante el método de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Se usaron 10ng de RNA para realizar el ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (One-Step qRT-PCR (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). Se realizó la transcripción en forma inversa del RNA en un analizador de tiempo real (Rotor – Gene 6000; Corbett Life Science PO, NSW, NZ).

Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron oligonucleótidos sintéticos sentido y antisentido, diseñados para amplificar el transcrito de las proteínas BSP, BMP 2/4, ALP, COL I, OPN, HACD1/CAP, CEMP1 y GAPDH (control interno). Las condiciones de termociclado utilizadas fueron las siguientes: 30 ciclos de 1 minuto, desnaturalización a  $94^{\circ}\text{C}$ , alineamiento a  $55^{\circ}\text{C}$  y extensión a  $72^{\circ}\text{C}$ . Los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se cuantificaron mediante fluorescencia y reportados como expresión relativa de mRNA.

### 8.4. Western Blot:

Para determinar la expresión a nivel traduccional, las células derivadas del ligamento periodontal humano fueron tratados con los péptidos de HACD1/CAP y CEMP1 como se indicó anteriormente. Para que expresen este factor establemente, se cultivaron hasta llegar a confluencia.

El lisado celular se obtuvo utilizando amortiguador de lisis frío (1mM EDTA, pH 8.0, 10mM HEPES, 50mM NaCl, 0.5% Tritón X-100, 1mM fenil-metil-sulfonil fluoruro, 5 $\mu$ M leupeptina y 10 $\mu$ g/ $\mu$ l aprotinina), posteriormente se sonicaron y centrifugaron por 5min a 2,000rpm. El sobrenadante se separó y se colocó en un tubo nuevo. La cuantificación de proteínas se realizó por método de Bradford.



#### 8.4.1. Preparación de las Proteínas.

Como controles se utilizó una población heterogénea de células derivadas del ligamento periodontal humana que no fueron tratados con ningún péptido. Para cada proteína que se midió se agregaron los agentes reductores 2µl de DTT 2mM + 2 µl de Urea 8M junto con buffer de carga + las muestras controles y experimentales. Las muestras tanto control como experimentales de proteínas se llevaron a el volumen de la proteína equivalente a 20µg.

#### 8.4.2. Preparación del Gel.

Se prepararon 9 geles de poliacrilamida al 12%. En un vaso de precipitado se colocaron los reactivos para hacer el gel separador y se dejó reposar 10-15 min para gelificación completa. Posteriormente, se preparó en otro vaso de precipitado la solución para el gel concentrador entre 15 y 20 min.

#### 8.4.3. Electroforesis

Una vez hechos los geles, se llenó con el Buffer de Corrida en el interior y exterior de los geles. Se colocó en el primer carril marcador Invitrogen con 4µl. En los demás carriles para todos los geles, se colocó un carril con proteína control a 5, 10 y 15 días y en los siguientes carriles, se colocaron las muestras experimentales de 5, 10 y 15 días cada uno intercalado, para cada tipo de condición.

Para cada muestra tanto experimental como control se colocó 20 µl. Se activó la electroforesis a 20 mA.

#### 8.4.4. Transferencia:

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

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

Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% durante 30 min a temperatura ambiente. Se realizaron 2 lavados con PBS (Phosphate-Buffered Saline). Se colocaron los anticuerpos primarios monoclonales para GAPDH, CEMP1 y HACD1/CAP (Santa Cruz Biotechnology).

Las membranas se incubaron durante 12hrs a 4°C en agitación.

Después se realizaron nuevamente 2 lavados con PBS y las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo y anti-ratón conjugado a peroxidasa durante dos horas a temperatura ambiente.

Para el revelado se realizaron lavados con PBS y se reveló con diaminobenzidina (Tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB), NiCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PBS). Los procedimientos se realizaron por triplicado.

### **8.5. Análisis de datos.**

En el análisis de qRT-PCR, la determinación de la expresión en el análisis se realizó por el software Rotor Gen 6000 (Qiagen, USA) mediante  $\Delta\Delta C_t$  y posteriormente mediante la prueba estadística ANOVA \* $p < 0.05$ .

En el caso del Western Blot, las membranas se digitalizaron y se analizaron con el software ImageJ, se determinó la expresión relativa de los productos génicos que se mencionaron anteriormente. Se utilizó GAPDH como producto génico constitutivo y la expresión de los productos génicos de este estudio se compararon contra la expresión de éste.

Como controles se utilizó una población de células del ligamento periodontal humano tratadas con 10% de SFB.

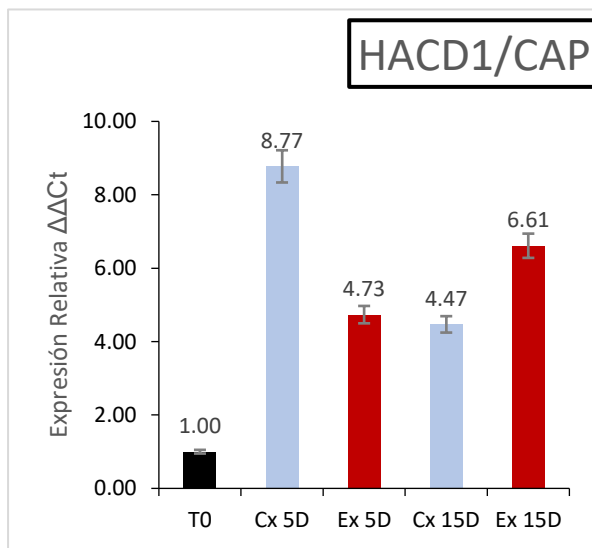
El análisis estadístico se realizó por medio de la prueba estadística T de Student y ANOVA. La  $p$  se estableció  $< 0.05$  utilizando el software GraphPad (GraphPad Software Inc, USA).

## 9. Resultados

### 9.1. Ensayo de qRT-PCR

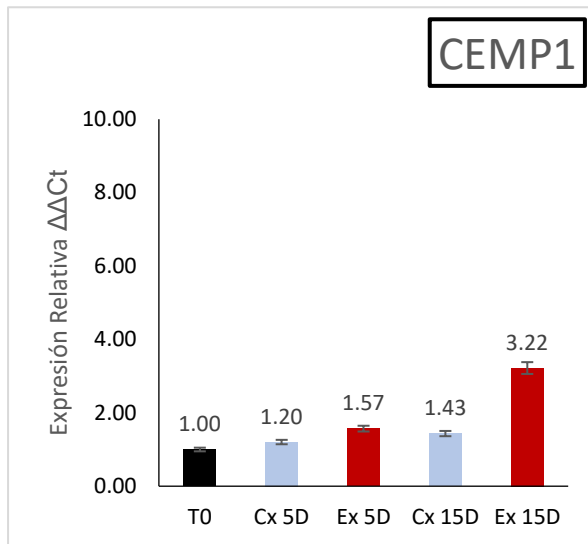
#### 9.1.1. El uso de ambos péptidos induce el aumento en la expresión relativa de mRNA de HACD1/CAP y CEMP1 a partir de los 5 días.

Los resultados de la qRT-PCR muestran la expresión relativa del mRNA de las proteínas seleccionadas con valores de fluorescencia. Los resultados expresan la cantidad de mRNA normalizado contra la expresión endógena de GAPDH y comparados contra los valores de los grupos control. Las muestras experimentales tienen ambos péptidos: CAP-p15 y CEMP1-p1.



**Gráfica 1. HACD1/CAP.** Análisis por qRT-PCR de la expresión de HACD1/CAP. Resultado del tratamiento con los péptidos CAP-p15 y CEMP1-p1 en HuPDLs a diferentes tiempos (T0, 5 y 15 días respectivamente), donde se puede observar el tiempo 0 (barra negra) y las muestras control (barras azules) comparadas contra las muestras experimentales (barras rojas). Se observa un efecto reducido de las muestras control a los 5 días mientras que a los 15 días hay un aumento en la expresión relativa de mRNA de CAP. La determinación de la expresión en el análisis se realizó por el software Rotor Gen 6000 (Qiagen, USA) mediante  $\Delta\Delta C_t$  y posteriormente mediante la prueba estadística ANOVA  $*p < 0.05$ . T0: tiempo cero, cx 5D: control 5 días, Ex 5D: Experimental 5 días. Cx 15D: Control 15 días y Ex 15D: Experimental 15 días.

Las muestras experimentales con CAP-p15 y CEMP1-p1, a los 5 días produjeron un efecto que fue 1.85 veces menor en comparación con las muestras control a 5 días, mientras que las muestras experimentales a los 15 días tuvieron un efecto 1.47 veces mayor en comparación con las muestras control a 15 días de la expresión relativa de mRNA de HACD1/CAP.

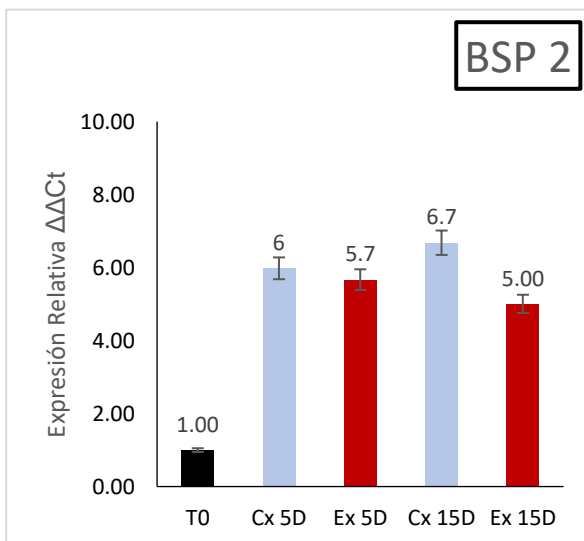


**Gráfica 2. CEMP1.** Análisis por qRT-PCR de la expresión de CEMP1. Resultado del tratamiento con los péptidos CAP-p15 y CEMP1-p1 en HuPDLs a diferentes tiempos (T0, 5 y 15 días respectivamente), donde se puede observar el tiempo 0 (barra negra) y las muestras control (barras azules) comparadas contra las muestras experimentales (barras rojas). Se observa un efecto reducido de las muestras control a los 5 días mientras que a los 15 días hay un aumento en la expresión relativa de mRNA de CEMP1. La determinación de la expresión en el análisis se realizó por el software Rotor Gen 6000 (Qiagen, USA) mediante  $\Delta\Delta Ct$  y posteriormente mediante la prueba estadística ANOVA \* $p < 0.05$ .

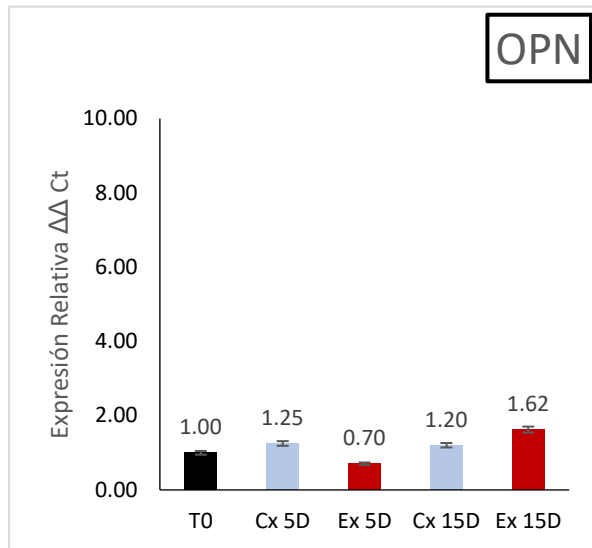
Las muestras experimentales con CAP-p15 y CEMP1-p1 a los 5 días tuvieron un efecto 1.2 veces mayor que las control, mientras que las muestras experimentales a los 15 días tuvieron un efecto 2.25 veces mayor de la expresión relativa de mRNA de CEMP1.

### 9.1.2. El uso de ambos péptidos induce cambios en la expresión relativa de mRNA de los factores asociados a mineralización.

Las muestras experimentales tratadas con CAP-p15 y CEMP1-p1 a los 5 días tuvieron un efecto 1.05 veces menor, mientras que las muestras experimentales a los 15 días tuvieron un efecto 1.34 veces menor que el control. Por lo que ambos péptidos tienen un efecto menor al inducir la expresión relativa de mRNA de BSP II.

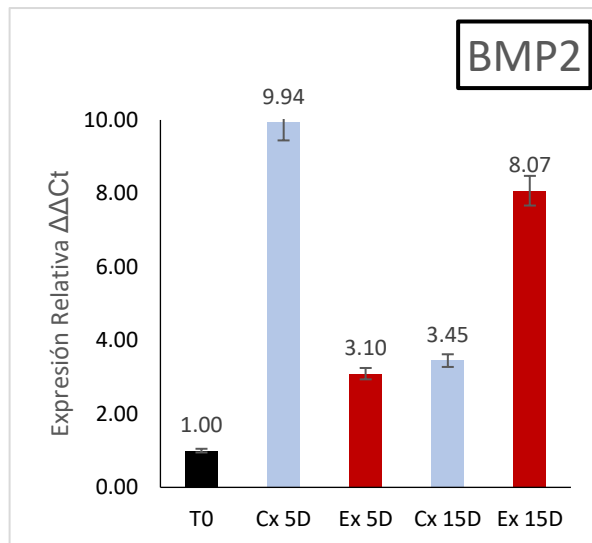


**Gráfica 3. BSP II.** Análisis por qRT-PCR de la expresión de BSP II. Resultado del tratamiento con los péptidos CAP-p15 y CEMP1-p1 en HuPDLs a diferentes tiempos (T0, 5 y 15 días respectivamente), donde se puede observar el tiempo 0 (barra negra) y las muestras control (barras azules) comparadas contra las muestras experimentales (barras rojas). Se observa un efecto reducido de las muestras control a los 5 días mientras que a los 15 días hay un aumento en la expresión relativa de mRNA de BSP II. La determinación de la expresión en el análisis se realizó por el software Rotor Gen 6000 (Qiagen, USA) mediante  $\Delta\Delta Ct$  y posteriormente mediante la prueba estadística ANOVA \* $p < 0.05$ .



**Gráfica 4. OPN.** Análisis por qRT-PCR de la expresión de OPN. Resultado del tratamiento con los péptidos CAP-p15 y CEMP1-p1 en HuPDLcs a diferentes tiempos (T0, 5 y 15 días) respectivamente, donde se puede observar el tiempo 0 (barra negra) y las muestras control (barras azules) comparadas contra las muestras experimentales (barras rojas). Se observa un efecto reducido de las muestras control a los 5 días mientras que a los 15 días hay un ligero aumento en la expresión relativa de mRNA de OPN. La determinación de la expresión en el análisis se realizó por el software Rotor Gen 6000 (Qiagen, USA) mediante  $\Delta\Delta Ct$  y posteriormente mediante la prueba estadística ANOVA \* $p < 0.05$

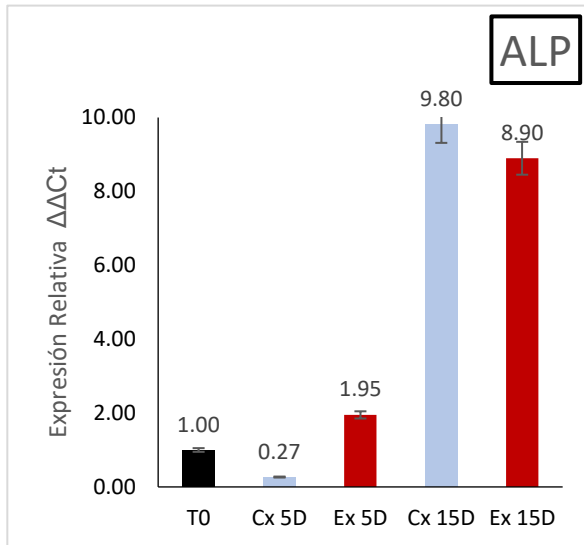
Para la expresión relativa de mRNA de OPN, las muestras experimentales tratadas con ambos péptidos a los 5 días demostraron tener un efecto 1.7 veces menor que las muestras control, mientras que las muestras experimentales a los 15 días tuvieron un efecto 1.3 veces mayor de que las muestras control. Por lo que los dos péptidos en conjunto tienen un efecto menor a corto plazo, pero mayor a los 15 días.



**Gráfica 5. BMP2.** Análisis por qRT-PCR de la expresión de BMP2. Resultado del tratamiento con los péptidos CAP-p15 y CEMP1-p1 en HuPDLcs a diferentes tiempos (T0, 5 y 15 días) respectivamente, donde se puede observar el tiempo 0 (barra negra) y las muestras control (barras azules) comparadas contra las muestras experimentales (barras rojas). Se observa que las muestras experimentales disminuyen la expresión de BMP2 a los 5 días mientras que a los 15 días hay un aumento significativo en la expresión relativa de mRNA de BMP2. La determinación de la expresión en el análisis se realizó por el software Rotor Gen 6000 (Qiagen, USA) mediante  $\Delta\Delta Ct$  y posteriormente mediante la prueba estadística ANOVA \* $p < 0.05$

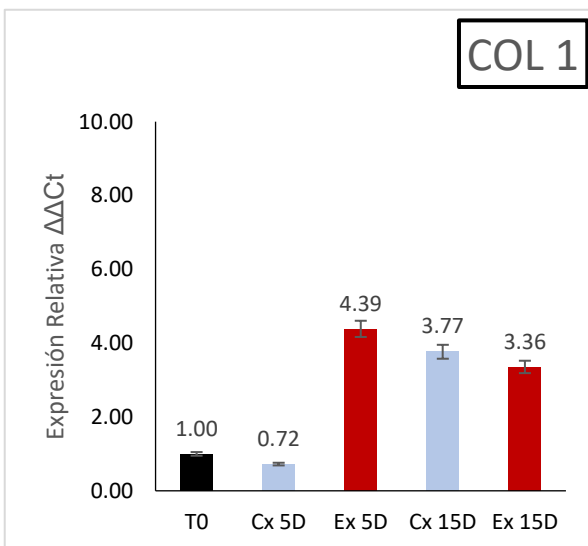
En el caso de la expresión relativa de mRNA de BMP2, las muestras experimentales con CAP-p15 y CEMP1-p1 a los 5 días tuvieron un efecto 3 veces menor, mientras que las muestras experimentales a los 15 días tuvieron un efecto 2.3 veces mayor en comparación con las muestras control. Por lo que ambos péptidos tienen un efecto

menor a los 5 días y este incrementa significativamente a los 15 días en la expresión de mRNA de BMP2.



**Gráfico 6. ALP.** Análisis por qRT-PCR de la expresión de ALP. Resultado del tratamiento con los péptidos CAP-p15 y CEMP1-p1 en HuPDLs a diferentes tiempos (T0, 5 y 15 días) respectivamente, donde se puede observar el tiempo 0 (barra negra) y las muestras control (barras azules) comparadas contra las muestras experimentales (barras rojas). Se observa que las muestras experimentales aumentan la expresión de BMP2 a los 5 días mientras que a los 15 días hay una ligera disminución en la expresión de BMP2. La determinación de la expresión en el análisis se realizó por el software Rotor Gen 6000 (Qiagen, USA) mediante  $\Delta\Delta Ct$  y posteriormente mediante la prueba estadística ANOVA \* $p < 0.05$

En el caso de la expresión relativa de mRNA de ALP las muestras experimentales tratadas con ambos péptidos demostraron tener un efecto 7 veces mayor, mientras que las muestras experimentales a los 15 días tuvieron un efecto 1.1 veces menor en comparación con las muestras control. Por lo que ambos péptidos provocan un efecto mayor a los 5 días, pero un efecto menor a los 15 días.



**Gráfico 7. COL 1.** Análisis por qRT-PCR de la expresión de COL1. Resultado del tratamiento con los péptidos CAP-p15 y CEMP1-p1 en HuPDLs a diferentes tiempos (T0, 5 y 15 días) respectivamente, donde se puede observar el tiempo 0 (barra negra) y las muestras control (barras azules) comparadas contra las muestras experimentales (barras rojas). Se observa que las muestras experimentales aumentan significativamente la expresión de COL1 a los 5 días mientras que a los 15 días hay una ligera disminución en la expresión de COL1. La determinación de la expresión en el análisis se realizó por el software Rotor Gen 6000 (Qiagen, USA) mediante  $\Delta\Delta Ct$  y posteriormente mediante la prueba estadística ANOVA \* $p < 0.05$

Por último, para la expresión relativa de mRNA de COL1, se evaluó el efecto de las muestras tratadas con ambos péptidos en donde tuvieron un efecto 6 veces mayor en

comparación con las muestras control a los 5 días, mientras que a los 15 días las muestras experimentales tuvieron un efecto 1.1 veces menor que las muestras control. Por lo que ambos péptidos provocan un aumento en la expresión relativa de COL1 a los 5 días.

## 9.2. Western Blot

Los resultados del Western Blot muestran el porcentaje expresión relativa de HACD1/CAP y de CEMP1 en células del ligamento periodontal tratadas con distintos péptidos: CEMP1-p1, CAP-p15 y CEMP1-p1+CAP-p15. Los resultados expresan el nivel proteico normalizado contra la expresión endógena de GAPDH y comparados contra los valores de los grupos control.

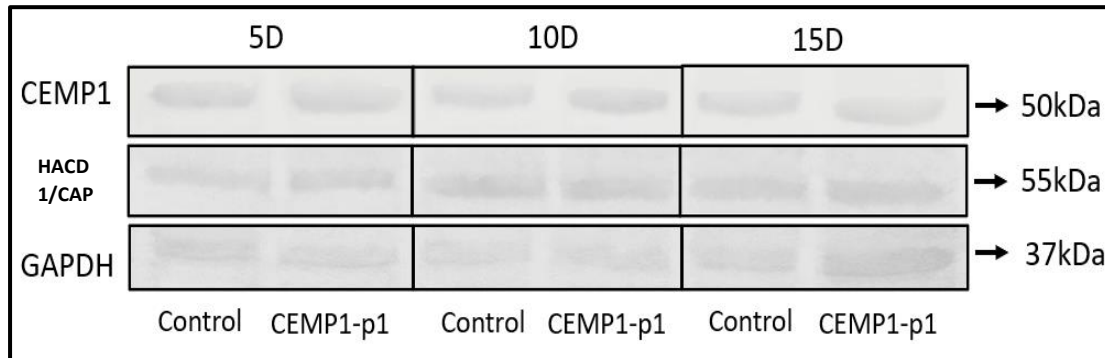
A partir de los resultados obtenidos en el qRT-PCR se encontró que las células derivadas del ligamento periodontal humano formaron colonias positivas a ALP, por lo cual los marcadores asociados a hueso alveolar y ligamento periodontal disminuyeron como BSP1I, OPN, pero incrementan los cementoblasticos. Por lo que en el WB nos enfocamos en los marcadores asociados a un fenotipo cementoblastico para evaluar el efecto con cada grupo experimental.

Los ensayos de Western Blot inmunodetectaron la presencia de proteínas implicadas en procesos de mineralización. Las células HuPDLCs tratadas con 5µg de CEMP1-p1 y 5µg de CAP-p15, aumentan la expresión de proteínas asociadas a mineralización como CEMP1 y HACD1/CAP en todos los tiempos de cultivo en comparación con las muestras cultivo. Se comprobó que CEMP1-p1 induce la expresión de proteínas relacionadas con el fenotipo osteoblastico/cementoblastico en células HuPDLCs *in vitro*.



### 9.2.1. El péptido CEMP1-p1 induce un incremento en los niveles proteicos de HACD1/CAP en células del ligamento periodontal humano.

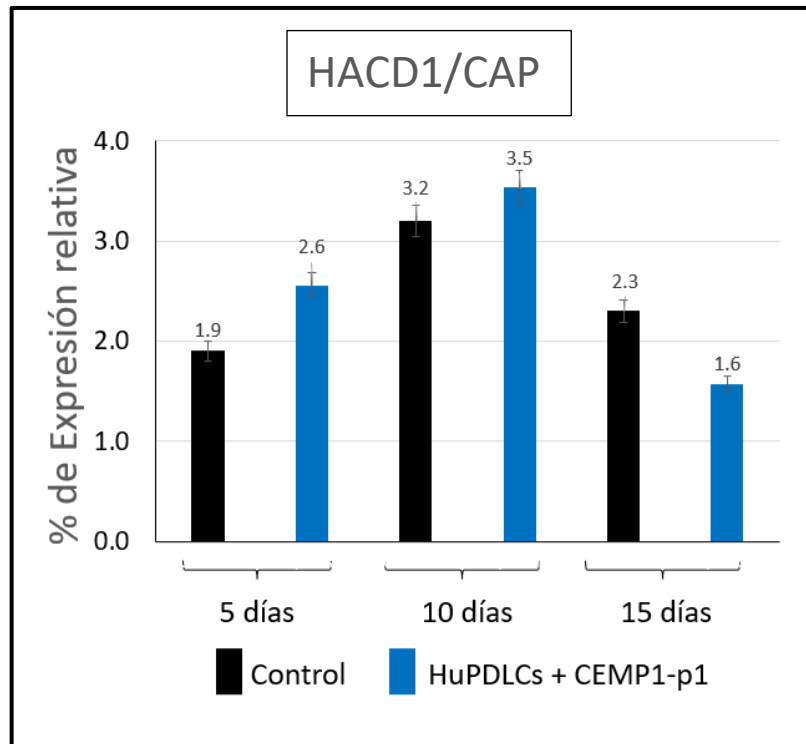
Se midió el nivel proteico de HACD1/CAP y de CEMP1 en células del ligamento periodontal humano que fueron tratadas con el péptido CEMP1-p1 a los 5, 10 y 15 días.



**Figura 17.** Western Blot del tratamiento en células HuPDLCs en presencia (barras derechas) y ausencia (barras izquierdas) del péptido CEMP1-p1(10µg) En los tiempos (5, 10 y 15 días respectivamente) para los marcadores CEMP1 (50kDa) y HACD1/CAP (55kDa). Los resultados expresan el nivel proteico normalizado contra la expresión endógena de GAPDH.

El efecto del péptido CEMP1-p1 en las HuPDLCs provocó un incremento 1.4 veces mayor de HACD1/CAP a los 5 días. Mientras que a los 10 días tuvo un efecto 1.1 veces mayor a los 10 días. Pero a los 15 días hubo un decremento en la concentración de HACD1/CAP 1.4 veces menor.

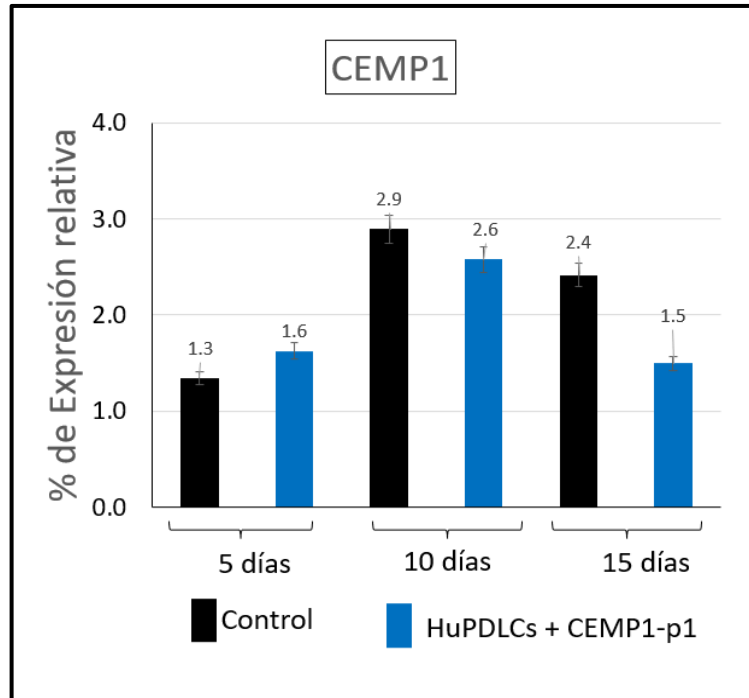
Por lo tanto, no hay diferencias significativas entre las muestras control y las experimentales. En donde se observó el mayor efecto del péptido CEMP1-p1 fue a los 5 días al incrementar los niveles de expresión proteica de HACD1/CAP.



**Gráfica 8. Niveles de expresión proteica de HACD1/CAP. WB de células HuPDLCs tratadas con el péptido CEMP1-p1.** Las mediciones se hicieron a los 5, 10 y 15 días de cultivo. Se observan las muestras control (barras negras) y las barras experimentales (barras azules). Se puede observar que el péptido CEMP1-p1 produce un aumento en la expresión de HACD1/CAP a los 5 y 10 días en comparación con los controles, mientras que a los 15 días hay una ligera disminución. Los resultados expresan el nivel proteico normalizado contra la expresión endógena de GAPDH. La determinación de la expresión en el análisis de proteínas se realizó por la medición de la densidad de la banda de proteínas utilizando el software ImageJ y posteriormente mediante la prueba estadística ANOVA. \* $p < 0.05$ .

El efecto del péptido CEMP1-p1 en las HuPDLCs provocó un incremento 1.3 veces mayor de CEMP1 a los 5 días. Mientras que a los 10 días tuvo un decremento 1.1 veces menor a los 10 días en comparación con el control. Pero a los 15 días hubo un decremento en la concentración de CEMP1 1.6 veces menor en comparación con las muestras control.

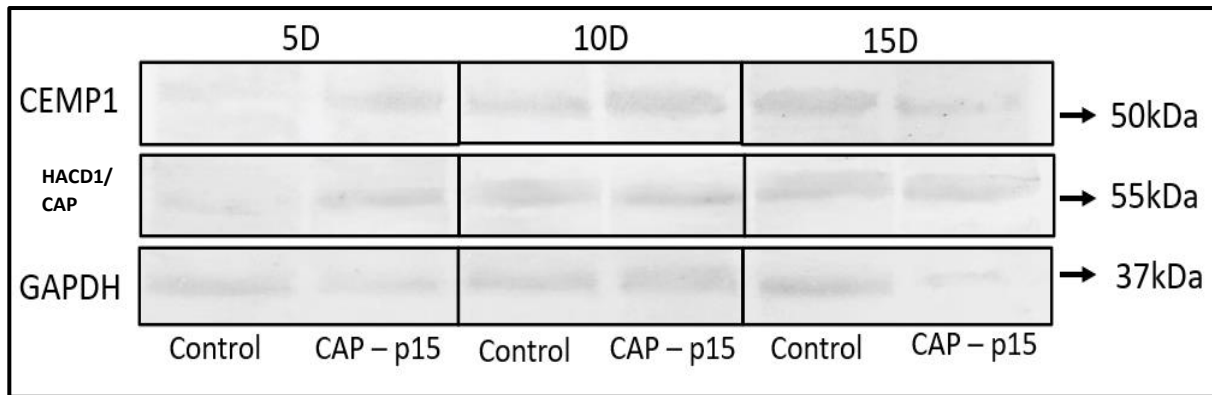
Por lo tanto, no hay diferencias significativas entre las muestras control y las experimentales tratadas con CEMP1-p1. En donde se observó el mayor efecto del péptido CEMP1-p1 fue a los 5 días al incrementar los niveles de expresión proteica de CEMP1.



**Gráfica 9. Niveles de expresión proteica de CEMP1.** WB de células HuPDLCs tratadas con el péptido CEMP1-p1. Las mediciones se hicieron a los 5, 10 y 15 días de cultivo. Se observan las muestras control (barras negras) y las barras experimentales (barras azules). Se puede observar que el péptido CEMP1-p1 induce un aumento en la expresión de CEMP1 a los 5 días en comparación con las muestras control, mientras que a los 10 y 15 días produce una disminución en el porcentaje de expresión en comparación con los controles. Los resultados expresan el nivel proteico normalizado contra la expresión endógena de GAPDH. La determinación de la expresión en el análisis de proteínas se realizó por la medición de la densidad de la banda de proteínas utilizando el software ImageJ y posteriormente mediante la prueba estadística ANOVA. \* $p < 0.05$ .

### 9.2.2. El péptido CAP-p15 incrementa los niveles proteicos de CEMP1 en células del ligamento periodontal humano.

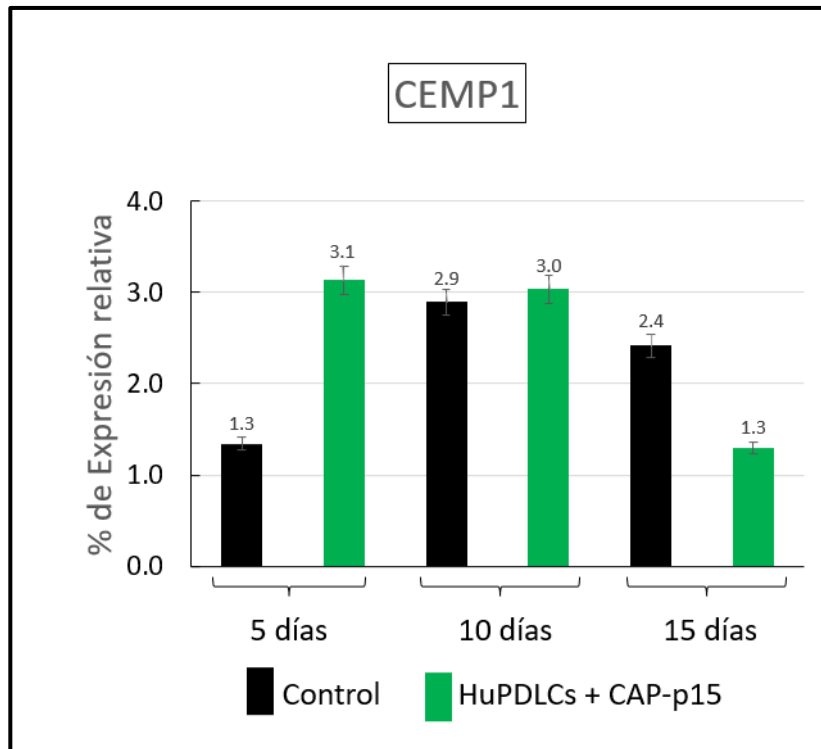
Se midió el nivel proteico de HACD1/CAP y de CEMP1 en células del ligamento periodontal humano que fueron tratadas con el péptido CAP-p15 a los 5, 10 y 15 días.



**Figura 18.** Western Blot del tratamiento en células HuPDLCs en presencia (barras derechas) y ausencia (barras izquierdas) del péptido CAP-p15(10µg) En los tiempos (5, 10 y 15 días respectivamente) para los marcadores CEMP1 (50kDa) y HACD1/CAP (55kDa). Los resultados expresan el nivel proteico normalizado contra la expresión endógena de GAPDH.

El efecto del péptido CAP-p15 en las HuPDLCs provocó un incremento 2.3 veces mayor a nivel proteico de CEMP1, a los 5 días con respecto al control. A los 10 días tuvo un resultado 1 vez mayor en comparación con el control. Y a los 15 días hubo un decremento en el nivel de expresión de CEMP1 que fue 1.8 veces menor en comparación con las muestras control.

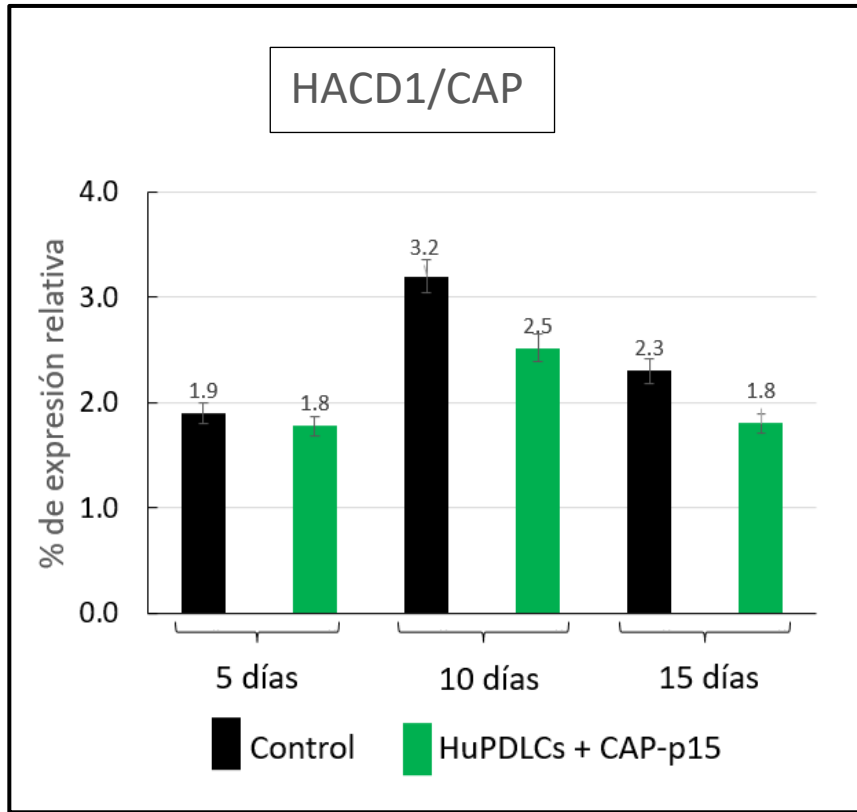
El mayor efecto en las células fue a los 5 días donde hubo un incremento 2.3 veces mayor a diferencia de los 10 y 15 días en donde fue disminuyendo su efecto hasta provocar una disminución en el nivel proteico de CEMP1.



**Gráfica 10. Niveles de expresión proteica de CEMP1. WB de células HuPDLCs tratadas con el péptido CAP-p15.** Las mediciones se hicieron a los 5, 10 y 15 días de cultivo. Se observan las muestras control (barras negras) y las barras experimentales (barras verdes). Se puede observar que el péptido CAP-p15 produce un aumento en la expresión de CEMP1 a los 5 y 10 días en comparación con los controles, mientras que a los 15 días hay una disminución en los niveles proteicos de CEMP1. Los resultados expresan el nivel proteico normalizado contra la expresión endógena de GAPDH. La determinación de la expresión en el análisis de proteínas se realizó por la medición de la densidad de la banda de proteínas utilizando el software ImageJ y posteriormente mediante la prueba estadística ANOVA. \* $p < 0.05$ .

En cuanto al efecto del péptido en las HuPDLCs; a los 5 días hubo un decremento 1.05 veces menor a nivel proteico de HACD1/CAP. A los 10 días igual tuvo un decremento 1.3 veces menor en comparación con el control. Y a los 15 días igualmente un decremento en el nivel de expresión de HACD1/CAP, 1.2 veces menor en comparación con las muestras control.

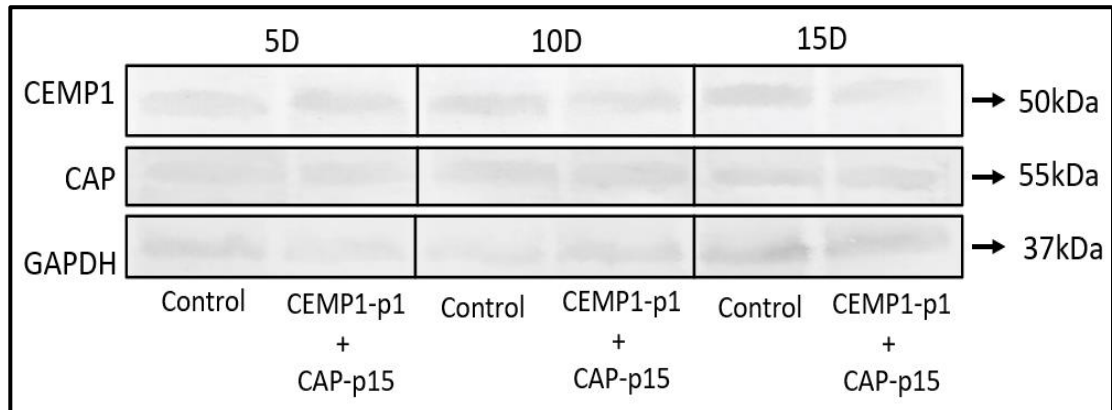
En este caso, el efecto del péptido de CAP-p15 en las células del ligamento periodontal humanos fue menos, provocando una disminución generalizada en los niveles proteicos de HACD1/CAP en las células a los 5, 10 y 15 días. Por lo tanto, el efecto del péptido CAP-p15 en los niveles proteicos de HACD1/CAP no fue significativo.



**Gráfica 11. Niveles de expresión proteica de HACD1/CAP. WB de células HuPDLCs tratadas con el péptido CAP-p15.** Las mediciones se hicieron a los 5, 10 y 15 días de cultivo. Se observan las muestras control (barras negras) y las barras experimentales (barras verdes). Se puede observar que el péptido CAP-p15 produce una disminución generalizada, tanto a los 5, 10 y 15 días de cultivo comparándolas con las muestras control. Los resultados expresan el nivel proteico normalizado contra la expresión endógena de GAPDH. La determinación de la expresión en el análisis de proteínas se realizó por la medición de la densidad de la banda de proteínas utilizando el software ImageJ y posteriormente mediante la prueba estadística ANOVA. \* $p < 0.05$ .

### 9.2.3. El uso de ambos péptidos incrementa los niveles proteicos de CEMP1 y CAP en células del ligamento periodontal humano.

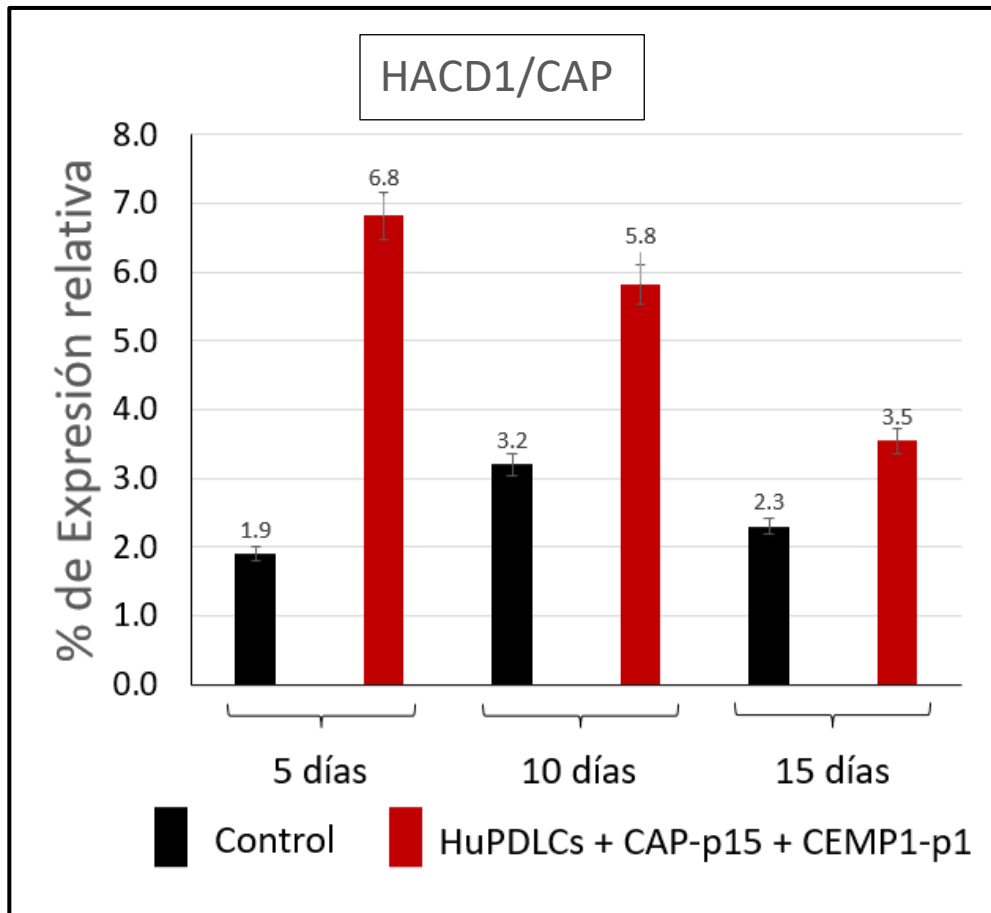
Se midió el nivel proteico de HACD1/CAP y de CEMP1 en células del ligamento periodontal humano que fueron tratadas con los dos péptidos: CAP-p15 y CEMP1-p1 a los 5, 10 y 15 días.



*Figura 19. Western Blot del tratamiento en células HuPDLCs en presencia (barras derechas) y ausencia (barras izquierdas) de los péptidos CAP-p15(10µg) y CEMP1-p1 (10µg). En los tiempos (5, 10 y 15 días respectivamente) para los marcadores CEMP1 (50kDa) y HACD1/CAP (55kDa). Los resultados expresan el nivel proteico normalizado contra la expresión endógena de GAPDH.*

Se midió el efecto del péptido CEMP1-p1 y CAP-p15 en conjunto en las HuPDLCs y se encontró que a los 5 días hubo un efecto significativo 3.6 veces mayor a nivel proteico de HACD1/CAP en comparación con el control. A los 10 días igualmente tuvo un efecto 1.8 veces mayor en comparación con el control. Y a los 15 días tuvo un aumento 1.1 en el nivel proteico de CAP 1.5 veces mayor en comparación con las muestras control.

En este caso el efecto sinérgico de ambos péptidos en las células del ligamento periodontal humano provocó un aumento generalizado en los niveles proteicos de HACD1/CAP a los 5, 10 y 15 días. Por lo tanto, los péptidos en conjunto incrementan los niveles proteicos de HACD1/CAP.



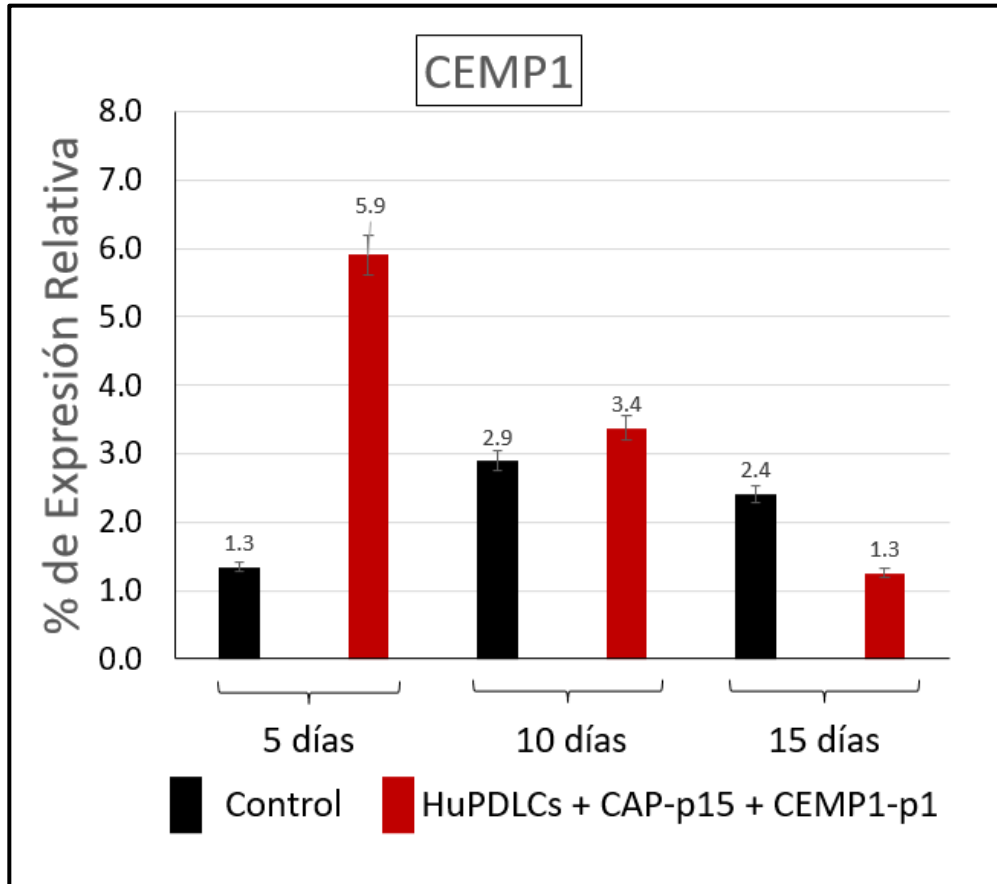
**Gráfica 12.** Niveles de expresión proteica de HACD1/CAP. WB de células HuPDLCs tratadas con los péptidos CAP-p15 y CEMP1-p1. Las mediciones se hicieron a los 5, 10 y 15 días de cultivo. Se observan las muestras control (barras negras) y las barras experimentales (barras rojas). Se puede observar que el uso de ambos péptidos: CAP-p15 y CEMP1-p1 producen un aumento significativo en los niveles proteicos de HACD1/CAP a los 5, 10 y 15 días en comparación con los controles. Los resultados expresan el nivel proteico normalizado contra la expresión endógena de GAPDH. La determinación de la expresión en el análisis de proteínas se realizó por la medición de la densidad de la banda de proteínas utilizando el software ImageJ y posteriormente mediante la prueba estadística ANOVA. \* $p < 0.05$ .

Se midió el efecto de los péptidos CEMP1-p1 y CAP-p15 en conjunto en las HuPDLCs; a los 5 días hubo un aumento significativo 4.5 veces mayor a nivel proteico de CEMP1 en comparación con el control. A los 10 días igualmente tuvo un aumento 1.2 veces mayor en comparación con el control. Y a los 15 días hubo una disminución 1.2 veces menor en comparación con las muestras control.

En este caso el efecto sinérgico de ambos péptidos en las células del ligamento periodontal humano provocó un aumento significativo a los 5 días en los niveles proteicos de CEMP1, mientras que a los 10 y 15 días empieza a tener una disminución



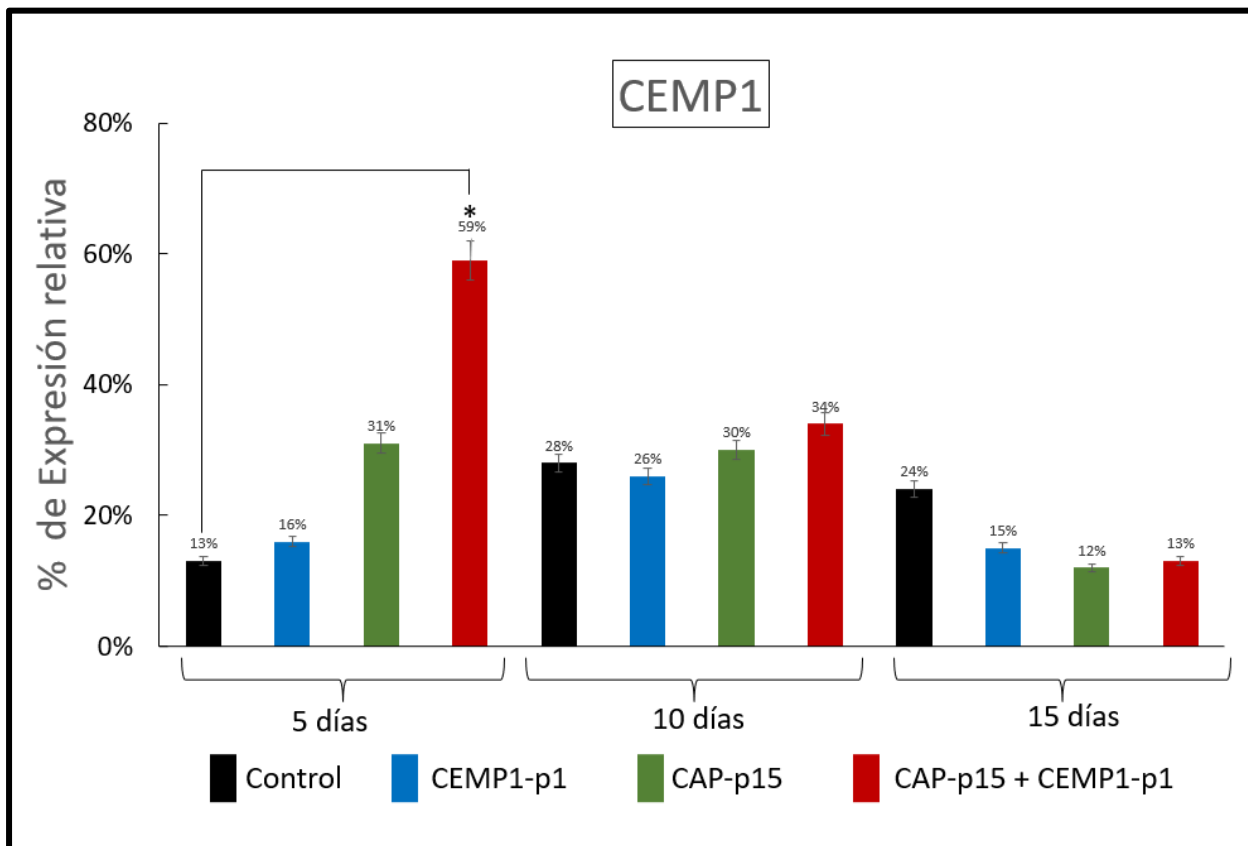
en sus efectos. Entonces, los péptidos en conjunto incrementan significativamente los niveles proteicos de CEMP1 a los 5 días..



**Gráfica 13. Niveles de expresión proteica de CEMP1. WB de células HuPDLCs tratadas con los péptidos CAP-p15 y CEMP1-p1.** Las mediciones se hicieron a los 5, 10 y 15 días de cultivo. Se observan las muestras control (barras negras) y las barras experimentales (barras rojas). Se puede observar que el uso de ambos péptidos: CAP-p15 y CEMP1-p1 producen un aumento significativo en los niveles proteicos de HACD1/CAP a los 5 y 10 días de cultivo, mientras que a los 15 días hay una disminución en comparación con los controles. Los resultados expresan el nivel proteico normalizado contra la expresión endógena de GAPDH. La determinación de la expresión en el análisis de proteínas se realizó por la medición de la densidad de la banda de proteínas utilizando el software ImageJ y posteriormente mediante la prueba estadística ANOVA. \* $p < 0.05$ .

#### 9.2.4. El uso de ambos péptidos incrementa los niveles proteicos de CEMP1 en comparación con los péptidos solos.

Con el fin de saber si los péptidos de HACD1/CAP y CEMP1 usados en conjunto producen un efecto sinérgico, se compararon los efectos entre los péptidos, por lo que se realizó un gráfico comparativo en dónde las células del ligamento periodontal tratadas con ambos péptidos tuvieron mejores resultados que los que tuvieron los péptidos por sí mismos, al incrementar los niveles proteicos de CEMP1.



**Gráfica 14. Comparativa de los efectos de todos los péptidos en los niveles proteicos de CEMP1.** Las mediciones se hicieron a los 5, 10 y 15 días de cultivo. Se observan las muestras control (barras negras) y las barras experimentales del grupo 1 con CEMP1-p1 (barras azules), el grupo 2 con CAP-p15 (barras verdes) y el grupo 3 con ambos péptidos (barras rojas). Se observan las diferencias significativas con \*. Se observa que los mayores efectos fueron a los 5 días con el grupo con ambos péptidos mientras que los grupos con los péptidos usados individualmente tienen un efecto menor en todos los días de cultivo. Se observan los resultados expresan el nivel proteico normalizado contra la expresión endógena de GAPDH. La determinación de la expresión en el análisis de proteínas se realizó por la medición de la densidad de la banda de proteínas utilizando el software ImageJ y posteriormente mediante la prueba estadística ANOVA. \* $p < 0.05$ .

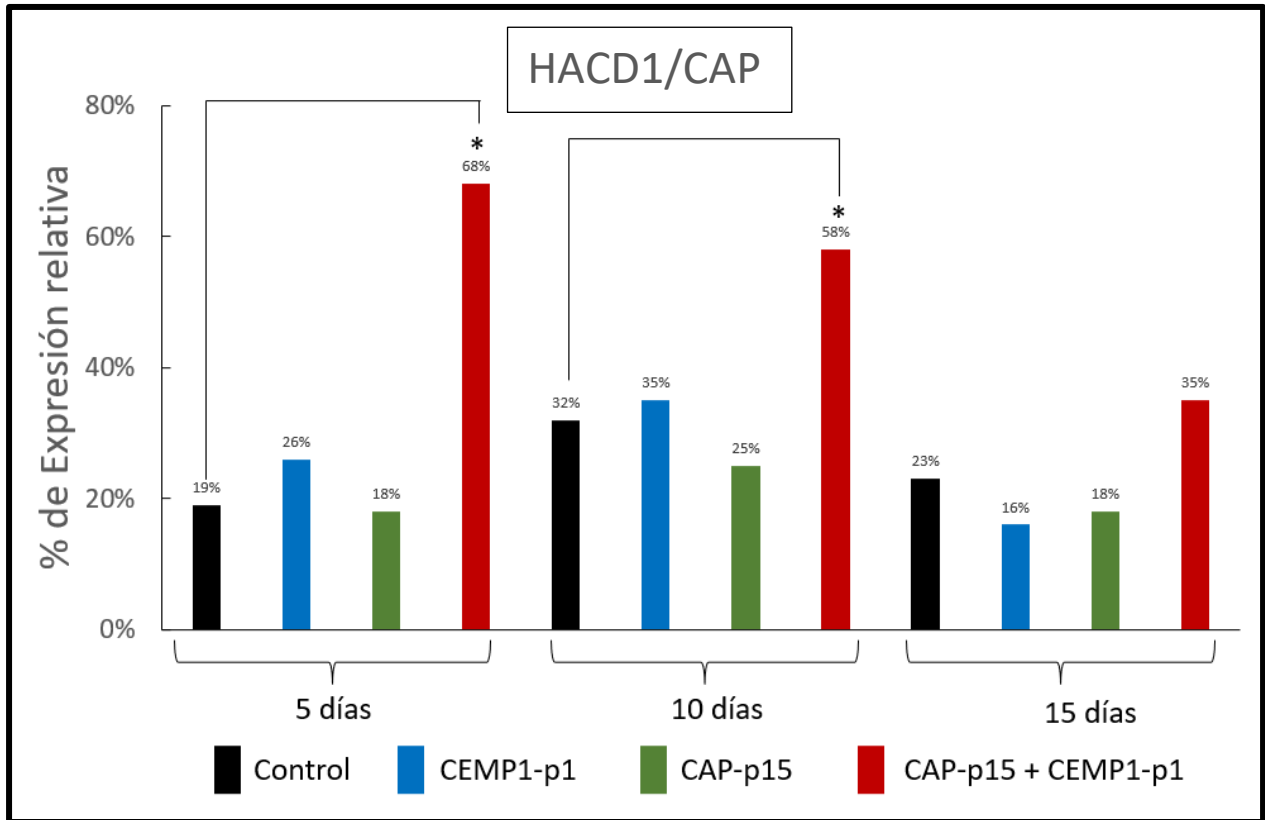
En este caso, el uso de ambos péptidos a los 5 días tuvo un efecto 4.5 veces más que el control, 3.6 veces más que con el péptido de CEMP1-p1 y 2 veces más que el péptido de CAP-p15, demostrando que a los 5 días tiene un efecto muy significativo al incrementar los niveles proteicos de CEMP1 en comparación con los otros péptidos.

Posteriormente, a los 10 días, todos los péptidos demuestran un decremento en sus efectos, pero el uso de ambos péptidos demostró incrementó los niveles proteicos de CEMP1 al tener un efecto 1.2 veces mayor que el control, 1.3 veces mayor que el péptido de CEMP1-p1 y 1 vez más que el péptido de HACD1/CAP.

Por último, a los 15 días, se observa una mayor disminución en los efectos de todos los péptidos, donde el uso de ambos péptidos tuvo un efecto 1.8 veces menor que el control, 1.1 veces menor que el péptido de CEMP1-p1 y 1.08 veces mayor que el péptido de CAP-p15.

#### 9.2.5. El uso de ambos péptidos incrementa los niveles proteicos de HACD1/CAP en comparación con los péptidos solos.

Del mismo modo, para saber si los péptidos de HACD1/CAP y CEMP1 usados en conjunto producen un efecto sinérgico al incrementar los niveles proteicos de HACD1/CAP, se realizó un gráfico comparativo en donde las células del ligamento periodontal tratadas con ambos péptidos tuvieron mejores resultados que los que tuvieron los péptidos por sí mismos.



**Gráfica 15. Comparativa de los efectos de todos los péptidos en los niveles proteicos de HACD1/CAP.** Las mediciones se hicieron a los 5, 10 y 15 días de cultivo. Se observan las muestras control (barras negras) y las barras experimentales del grupo 1 con CEMP1-p1 (barras azules), el grupo 2 con CAP-p15 (barras verdes) y el grupo 3 con ambos péptidos (barras rojas). Se observan las diferencias significativas con \*. Se observa que ambos péptidos inducen un aumento generalizado en los niveles proteicos a los 5, 10 y 15 días en comparación con los otros grupos experimentales con los péptidos en solitarios. Aunque se observa una disminución del efecto conforme pasan los días de cultivo. Se los resultados expresan el nivel proteico normalizado contra la expresión endógena de GAPDH. La determinación de la expresión en el análisis de proteínas se realizó por la medición de la densidad de la banda de proteínas utilizando el software ImageJ y posteriormente mediante la prueba estadística ANOVA. \* $p < 0.05$ .

En este caso, el uso de ambos péptidos a los 5 días tuvo un efecto 3.6 veces mayor que el control, 2.6 veces mayor que el péptido de CEMP1-p1 y 3.8 veces más que el péptido de CAP-p15, por lo que a los 5 días ambos péptidos tienen un efecto significativo en comparación con los otros péptidos.

A los 10 días, todos los péptidos demuestran un decremento en sus efectos, pero los dos péptidos usados en conjunto aumentaron los niveles proteicos de HACD1/CAP; al tener un efecto 1.8 veces mayor que el control, 1.6 veces mayor que el péptido CEMP1-p1 y 2.3 veces mayor que el péptido CAP-p15.

Por último, a los 15 días, se observa una mayor disminución en los efectos de todos los péptidos, pero persiste el efecto de ambos péptidos al provocar un aumento 1.5 veces mayor que el control, 2.1 veces mayor que el péptido de CEMP1-p1 y 1.9 veces mayor que el péptido de CAP-p15. Por lo que en todos los tiempos el uso de ambos péptidos provocó un aumento en los niveles proteicos de HACD1/CAP en comparación con los dos péptidos usados en solitario.

## 10. Discusión

El periodonto es un sistema biológico complejo constituido por diversos tejidos como la encía, el ligamento periodontal, el hueso alveolar y el cemento radicular. La pérdida de estos tejidos puede deberse a diversas patologías, tales como la enfermedad periodontal, traumatismos, la edad, enfermedades sistémicas, genética, etc. La reparación del periodonto y la regeneración de los tejidos periodontales siguen siendo unos de los mayores objetivos en el tratamiento de la enfermedad periodontal.

En el caso del periodonto, la reparación completa implica la cementogénesis y osteogénesis *de novo*, además de la formación de fibras de ligamento periodontal.

Se sabe que la formación del periodonto inicia con la formación de la raíz, seguida la formación de la corona (51), en este proceso se ven involucradas muchas moléculas reguladoras, que son factores determinantes de la regeneración periodontal.

También se ha reconocido que la recolonización de células del ligamento periodontal en la superficie radicular es necesaria para la regeneración periodontal, donde estas células pueden diferenciarse a cementoblastos y osteoblastos, debido también a la presencia de células troncales multipotentes, por esto se consideran como células prometedoras para la inducción de la reparación de estructuras periodontales dañadas.

De hecho, en diversos estudios se han trasplantado células derivadas del ligamento periodontal para la regeneración de hueso y ligamento periodontal, (52) pero estos estudios llegan a tener limitaciones al regenerar la arquitectura periodontal.

Es bien aceptado que, para mejorar la reparación periodontal, el acondicionamiento y alisado radicular es necesario para la migración de células mesenquimales y de su posterior adherencia a la superficie radicular expuesta. Y, teniendo en cuenta que las estrategias actuales para la reparación están basadas en medidas anti-infecciosas como el raspado y alisado radicular, la regeneración tisular guiada (con o sin injertos de hueso), así como el uso de factores de crecimiento.

Por ejemplo, el tratamiento de la regeneración tisular guiada en conjunto con diversos injertos óseos como Bioglass o PerioGlas (partículas de hueso sintético), puede lograr

una reparación de hueso y una regeneración del cemento superior a otros materiales. Aunque estas estrategias están enfocadas en mejorar la reparación del hueso alveolar y el ligamento periodontal, no se enfocan en la cementogénesis. (51)

Hasta ahora ninguna de las terapias ha logrado restaurar la arquitectura del periodonto original, ninguno ha logrado un 100% de efectividad. (51).

Uno de los mayores retos para estas terapias y materiales es la formación de nuevo cemento radicular, debido a que la neoformación de cemento es un evento clave para la regeneración periodontal. Se sabe que diversas proteínas están implicadas en la cementogénesis; de manera general la colágena tipo I y III, la fosfatasa alcalina (ALP), fosfoproteínas como Osteopontina (OPN), sialoproteína Ósea (BSP), Osteocalcina (OCN), las proteínas morfogénicas Óseas 2 y 4 (BMP 2 y 4), la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión al cemento (CAP), además de factores de crecimiento como TGF- $\beta$ , estas proteínas son necesarias para la iniciación y maduración del cemento radicular. (31)

Por tal motivo, han surgido nuevos materiales y terapias enfocadas en la regeneración de tejidos, en este caso del cemento radicular. Entre estas terapias, una línea de investigación de dos proteínas que son propias del cemento radicular ha tomado relevancia; estas proteínas son la proteína del Cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión al cemento (HACD1/CAP). En diversos estudios se reportó la ventaja del uso de estas proteínas recombinantes en la regeneración de tejidos periodontales y de biomineralización; pero por su costo de producción y sus posibles reacciones adversas se han buscado otras alternativas; por lo que en la última década los péptidos sintéticos han ganado notoriedad al tener un gran rango de aplicaciones en la medicina y biotecnología.

Estos péptidos son fragmentos de proteína que llevan a cabo funciones biológicas, actúan como moléculas de señalización, también interfieren con interacciones proteína-proteína, que son indispensables en los procesos biológicos. Los péptidos exploran el espacio medio entre moléculas pequeñas químicas y biológicas debido a su peso molecular, tienen las ventajas de fármacos moleculares (mejor permeabilidad) y de las proteínas terapéuticas como (selectividad, potencial para unirse a su objetivo),

excluyendo las desventajas como efectos adversos, interacciones medicamento-medicamento, e impermeabilidad de la membrana. (34)

Tomando en cuenta estas ventajas, en este estudio se usaron dos péptidos derivados de las proteínas del cemento radicular (HACD1/CAP y CEMP1), se realizaron análisis para determinar si los dos péptidos en conjunto pueden potenciar sus propiedades de regeneración al incrementar la expresión de factores de mineralización y de diferenciación hacia un fenotipo cementoblástico.

De manera similar, Correa R. en 2016 realizó estudios por primera vez combinando diversos péptidos sintéticos de HACD1/CAP y de CEMP1, para estudiar la nucleación de cristales de fosfato de calcio *in vitro*, mediante un sistema de contradifusión en gel de silicato libre de células; se evaluó si existía alguna acción sinérgica o antagonista para la nucleación. Los resultados fueron prometedores ya que las combinaciones entre distintos péptidos podrían generar efectos inhibidores y potenciadores, dependiendo de los aminoácidos que los pudieran componer; (12) Pero en este estudio resalta que el uso de un péptido de HACD1/CAP y otro péptido de CEMP1 tuvieron un efecto sinérgico y promueven la formación de estructuras similares a la HAp. Debido a que el estudio fue realizado en un sistema libre de células, se abrió un área de investigación, pero enfocado a otros estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, usando combinaciones de péptidos derivados de las proteínas del cemento.

También en otro estudio se usaron dos péptidos dentro de un hidrogel de PEG, el primero un péptido con motivo RGD (es un péptido de unión a integrinas) y otro péptido con secuencia GFOGER (es un péptido que media las interacciones a integrinas con colágena tipo I por la integrina  $\alpha 2\beta 1$ ), esto para identificar un andamio de hidrogel prometedor en la regeneración de tejidos periodontales. Aquí se vieron resultados similares a lo encontrado con los péptidos de CEMP1 y de HACD1/CAP, se encontraron dos tipo de subpoblaciones de células del ligamento periodontal positivas a ALP con expresión génica distinta. Los dos péptidos tuvieron mayor actividad en comparación con los péptidos solos, incrementaron la concentración de integrina  $\alpha 2\beta 1$ , desencadenaron la expresión elevada de marcadores cementoblásticos y osteoblásticos, y ambos lograron formación de tejido parecido a hueso *in vivo*.



Por tal motivo, aquí se compararon los efectos en tres grupos experimentales de células del ligamento periodontal humano con los péptidos: 1) CEMP1-p1, 2) CAP-p15 y 3) CEMP1-p1 + CAP-p15; además del grupo control sin péptidos.

CEMP1-p1 y CAP-p15 son péptidos con características y propiedades distintas, además pueden mantener las funciones biológicas de las proteínas nativas, y se ha demostrado que los péptidos tienen funciones óptimas a una concentración de 5µg cada uno. (53) Por ejemplo, Hoz L., et al. en 2021 usaron el péptido CEMP1-p1, a la misma concentración de 5µg, éste actuó como un poderoso modulador de la reparación de heridas periodontales en un modelo *in vivo*. Además, en este estudio se demostró que las células responsables de la nueva deposición de cemento son de origen mesenquimal, lo que implica el reclutamiento y diferenciación de células mesenquimales debido a una señal de CEMP1-p1. (53)

Esto es clave ya que, si los péptidos pueden mantener las mismas funciones que las proteínas nativas, podría ser una de las posibles explicaciones de la sinergia encontrada en este estudio.

Para explicar el efecto de los péptidos se puede tomar como referencia un estudio (Komaki et al., 2012) en el cual investigaron el efecto de células del ligamento periodontal humanas que expresan CEMP1 durante la diferenciación osteoblástica; en donde se observó que CEMP1 disminuye la expresión de marcadores osteoblásticos y del ligamento periodontal, lo que induce la expresión de marcadores cementoblásticos *in vitro*; lo cual es consistente con los datos obtenidos en nuestro estudio.

Realizaron una comparación de la expresión a nivel proteico y de mRNA de factores asociados a la mineralización, en donde observaron que el mRNA de OPN tuvo niveles bajos en los primeros días y que fue aumentando, lo cual ocurre en este estudio donde la expresión relativa de mRNA de OPN fue menor a los 5 días de cultivo, pero a los 15 días de cultivo hubo un efecto 1.3 veces mayor que las muestras control, mientras que sus niveles proteicos tenían una expresión alta los primeros días de cultivo. Se sabe que OPN regula la adhesión celular, la actividad de los osteoclastos y la mineralización de la matriz extracelular.

En cuanto a BSP y COL I los niveles de expresión de mRNA fueron mayores los primeros días de cultivo y fueron disminuyendo con los días. (54) Sin embargo, en este estudio se demostró que ambos péptidos inducen una disminución en la expresión de mRNA de BSP de las huPDLCs. Esto puede deberse a la presencia del péptido de CEMP1 y a que se sabe que BSP es un marcador de diferenciación de osteoblastos y osteoclastos en estados tardíos; en cuanto a COL I los resultados fueron similares a los reportados por Komaki et al. Esto indica que los péptidos, promueve su expresión en los primeros días de cultivo debido a que es necesario para iniciar la formación de la matriz mineralizante.

En el mismo estudio se reportó que las células del ligamento periodontal forman dos colonias, una positiva a ALP y otra negativa a ALP en los ensayos de cultivo; en donde las células del ligamento periodontal positivas a ALP expresan niveles altos de genes asociados a la diferenciación oste-cementoblástica, formando subpoblaciones celulares (55); esto puede ser debido a que las poblaciones de células derivadas del ligamento periodontal son heterogéneas, y se ha encontrado que consisten en dos linajes principales: el linaje fibroblástico y un linaje de células formadoras de tejido mineralizado, el cual comprende un subconjunto osteoblástico y otro cementoblástico. (56)

Este dato es relevante ya que es consistente con los resultados obtenidos en este estudio; donde se observó que los dos péptidos provocaron un efecto altamente estimulante en fases tempranas de la mineralización al incrementar 7 veces la expresión relativa de mRNA de la fosfatasa alcalina en comparación con las muestras control; pero la expresión a los 15 días de cultivo disminuyó, esto debido al recambio de matriz extracelular ya que las muestras experimentales tuvieron un efecto 1.1 veces menor en comparación con las muestras control.

Esto puede deberse a que la fosfatasa alcalina es altamente expresada en células del ligamento periodontal donde desempeña un papel en el metabolismo del fosfato, de forma particular participa en la formación del cemento acelular en etapas tempranas del cultivo. (57)

Estos datos son apoyados por diversos estudios realizados por en Carmona-Rodríguez et al. en donde la transfección de CEMP1 en fibroblastos gingivales humanos y en células del ligamento periodontal induce el incremento de marcadores específicos del cemento, por lo que también se vieron afectados y disminuyeron los niveles de expresión de RUNX2 y OCN, que son marcadores osteoblásticos. (54)

Komaki et al. observaron que CEMP1 se expresó preferentemente en células del ligamento periodontal positivos a ALP, pero la expresión de CEMP1 se redujo cuando las células estuvieron bajo condiciones osteogénicas. Sin embargo, la sobreexpresión de CEMP1 reguló positivamente la expresión de marcadores cementogénicos como CEMP1 y HACD1/CAP. (55)

También es consistente con lo encontrado en otro estudio (Hoz L. et al., 2012) donde probaron la proteína recombinante de CEMP1 en la diferenciación de células del ligamento periodontal en tres medios de cultivo distintos.

Aquí sugieren que CEMP1 tiene un rol en la diferenciación de poblaciones de células de ligamento periodontal humano, teniendo la capacidad de seleccionar poblaciones de células troncales en el cultivo de huPDLCs, lo que provee un reservorio único de células en función de diferenciar hacia distintos tipos de fenotipos. (58)

La presencia de CEMP1 en las subpoblaciones de huPDLCs, es debido a que estas células representan precursores de cementoblastos u osteoblastos (Álvarez et al., 2006). (58) Confirmando así, que el uso de ambos péptidos indujo una sobreexpresión de las proteínas CEMP1 y HACD1/CAP, marcadores cementoblásticos.

Tomando en cuenta que ambos péptidos disminuyeron la expresión de los marcadores osteogénicos en el qRT-PCR, esto se relaciona con que hrCEMP1 inhibe la mineralización en medios de inducción osteogénicos, esto puede deberse en parte a la expresión de reguladores negativos de la mineralización en células del ligamento periodontal; por ejemplo, OCN, MSX2, PLAP-1 y TWIST (Yoschizawa et al., 2004, Komaki et al., 2007). (55) meter referencia de OCN

Una vez determinado que los marcadores osteogénicos disminuyeron, se evaluaron los efectos de los 3 grupos experimentales en el mensajero y a nivel proteico en la

expresión de CEMP1 como de HACD1/CAP se realizó qRT-PCR y ensayo de western Blot; del qRT-PCR solo se evaluó al grupo experimental 3 con ambos péptidos, mientras que en el ensayo con Western Blot se hizo la comparación entre los 3 grupos control.

Los datos más significativos se encontraron en el Western Blot, en donde lo más interesante fue que, los dos péptidos demostraron tener la capacidad de inducir la expresión relativa del mensajero y además aumentar los niveles proteicos de CEMP1 y HACD1/CAP, también se demuestra que los péptidos en conjunto logran una sinergia al superar los resultados obtenidos por los péptidos por sí solos, en todos los tiempos de cultivo.

En el caso de HACD1/CAP los resultados son aún más sorprendentes, ya que la expresión del mensajero es menor a los 5 días comparado con el grupo control, a nivel traduccional se induce una respuesta considerablemente mayor a los 5 días y que disminuye al pasar el tiempo, esto sigue siendo una expresión alta en comparación con las muestras control y de los péptidos por sí solos.

Esto es importante ya que previamente se ha mencionado (Liu H., et al., en 1997), que la capacidad de las células progenitoras para unirse a HACD1/CAP está directamente relacionada a la expresión de ALP y su capacidad para formar tejido parecido al mineralizado en cultivo.

Por lo tanto, HACD1/CAP y ALP son marcadores para linajes hacia un fenotipo cementoblástico en poblaciones heterogéneas de células del ligamento periodontal. (56) Por lo que la sobreexpresión de HACD1/CAP inducida por la combinación de los péptidos (a nivel proteico los péptidos tuvieron una expresión 3.6 veces mayor que el control, 2.6 veces mayor que el péptido de CEMP1-p1 y 3.8 veces más que el péptido de CAP-p15) podría promover la inducción de las células progenitoras a formar tejido parecido al mineralizante. Esto es consistente con lo reportado en otro estudio (Aguilar V. en 2020) donde se formó tejido parecido al mineralizante en un modelo de regeneración periodontal en ratas Wistar, solo que aquí usaron una concentración del péptido CAP-p15 de 20µg, donde hubo una sobreexpresión de marcadores cementoblásticos (59).

Se demostró que el uso de ambos péptidos induce la expresión de factores asociados a la diferenciación cementoblástica; la cual es vital para el proceso de cementogénesis; pero ¿cómo logran los péptidos inducir estas funciones y cómo logran una sinergia?

Los dos péptidos tienen características distintas debido a su composición: por ejemplo, el péptido CEMP1-p1 tiene una secuencia que corresponde a 20 aminoácidos MGTSSSTDSQQAGHRRRCSTSN en el dominio del extremo amino terminal, se ha reportado que esta secuencia tiene un efecto significativo en la formación de cristales de Hidroxiapatita.

Además, el péptido CEMP1-p1 es 100% intrínsecamente desordenado, lo que le confiere la propiedad de interactuar con los cristales minerales al promover la formación de uniones iónicas. Además, en su composición tiene aminoácidos polares, cargados positiva y negativamente, (péptido hidrofílico), por lo que su superficie cargada en agua le permite una mayor interacción con iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_3^{-4}$ , lo que incrementa las interacciones intermoleculares en la unión péptido-mineral.

Además, CEMP1-p1 se une a otras moléculas objetivo que completan la función en la formación de tejido mineralizado; donde demostró la regulación de la expresión génica, diferenciación celular y la regeneración de hueso *in vivo* al mimetizar las funciones de la proteína nativa. (9)

También al tener en su secuencia diversos aminoácidos básicos como histidina y arginina, podría ser considerado un péptido de penetración celular (Cell Penetrating Peptide, CPP); estos péptidos representan un gran avance para el transporte de moléculas grandes que pueden ser útiles en aplicaciones clínicas, estos son ricos en arginina, histidina y lisina, son capaces de translocarse en las membranas y de entrar al interior de la células. Usando endocitosis y la penetración directa como los mecanismos principales. Esto podría explicar cómo el péptido actúa dentro de la célula. (60)

Ya dentro de la célula podría desencadenar vías de señalización como la de las MAP cinasas, tal cual lo hace la proteína recombinante; por ejemplo, Romo et al. en 2016 reportaron que hrCEMP1 es una lectina de tipo C, donde los sitios de unión a carbohidratos en hrCEMP1 reconocen las cadenas de manopiranosido. Esto es

relevante ya que la unión de una lectina con glucoconjugados a lo largo de la superficie celular, lo que lleva a la formación de una dimerización u oligomerización inducida por ligando, esto activa los receptores celulares y por lo tanto a la transducción de señales. (32)

Este efecto es el que se reportó en otro estudio donde hrCEMP1 induce la fosforilación y translocación de las cinasas JNK y p38, que son responsables de vías de señalización celular relacionadas con la proliferación y diferenciación de cementoblastos *in vitro*, esto debido a la interacción de esta proteína con un receptor en la membrana celular por una interacción lectina-carbohidratos. (61; 32)

Se ha demostrado que la activación de las MAP cinasas está involucrada en la diferenciación de células osteoblásticas, así como de células cementoblásticas, además de que media la estimulación de ALP. La proteína hrCEMP1 promueve la translocación de p38 al núcleo y la activación de c-JUN componente del factor de transcripción AP-1, el cual está involucrado con la diferenciación y el proceso de proliferación de las células cementoblásticas. Aquí puede estar la clave de la diferenciación, ya que si el péptido CEMP1-p1 conserva las propiedades de la proteína nativa, este podría ser el mecanismo por el cual induzca la diferenciación cementoblástica. (61)

Esto mismo es reportado en un estudio de Perez S. de 2015, en donde determinaron que el péptido CEMP1-p1 conserva las vías de señalización que normalmente utilizan las células hPDLs y preserva los tiempos en los que se llevan a cabo. Por tal motivo participa aumentando los procesos de proliferación e inicios de diferenciación. (11)

El péptido CAP-p15 proviene de la proteína nativa de 140 aminoácidos, la cual mediante un splicing alternativo de la porción C-terminal sustituye el sitio de actividad de la proteína HACD1 con la secuencia (VSFPSCCFSIIVIFM). Por lo que se propuso que la modificación genera un cambio en la función de la proteína, lo que hace única esta región.

En su secuencia presenta aminoácidos como valina, fenilalanina, prolina, isoleucina, alanina y metionina que le confieren un comportamiento hidrofóbico al estar en contacto con soluciones acuosas, el péptido adquiere una carga negativa al encontrarse en una

disolución a un pH fisiológico (pH~7.4) debido a un proceso de desprotonación; esta carga le permitirá interactuar con cationes divalentes como el calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ), un elemento imprescindible en el proceso de biomineralización.

Como se observó en los resultados, el péptido de CAP-p15 promovió la expresión de la proteína HACD1/CAP en las células del ligamento periodontal. Esto está relacionado con lo mencionado por Komaki M. et al. en el 2000, donde menciona que la adherencia a las superficies que contienen HACD1/CAP produce diversos eventos de señalización clásicos, desencadenados por otras proteínas de adhesión; entre estos incluyen la fosforilación de la tirosina de FAK y otras moléculas de señalización.

ERK2 y ERK1 son miembros relevantes de la vía de señalización de las MAP cinasas, la cual está involucrada en procesos de proliferación y diferenciación; en este caso la MAP cinasa 2 reguladora de señal extracelular ( $\text{p42}^{\text{ERK2}}$ , ERK-2) es también una tirosina fosforilada. Esto indica que la adhesión a superficies de membrana que tienen HACD1/CAP activan la vía de señalización de las MAP cinasas, aunado a esto se produjo una activación tardía y sostenida (alrededor de 2-3 hrs después de la adhesión), y duró hasta 12 hrs posteriores a la adhesión (62). Entonces, ambos péptidos al inducir una mayor expresión de HACD1/CAP podría activar la vía de las MAP cinasas y así generar una diferenciación hacia un fenotipo cementoblástico.

Se sabe que las células del ligamento periodontal se unen a su matriz extracelular (ECM) por medio de integrinas, proteínas transmembranales emparejadas que traducen las señales físicas y bioquímicas que regulan la actividad celular.

Ivanofski S. et al. en 1999 reportaron que HACD1/CAP usa un medio de adhesión a las células periodontales vía un motivo RGD, un medio de adhesión mediado por integrinas  $\alpha_5$  (subunidad de la fibronectina) y  $\beta_1$  (subunidad presente en muchos receptores de matriz extracelular), lo cual ayuda a la adhesión de HACD1/CAP a las células periodontales. (63)

Por lo que el papel de los péptidos de CAP-p15 y CEMP1-p1 al promover la expresión de HACD1/CAP, es inducir la atracción y posterior adherencia de subpoblaciones de células progenitoras del ligamento periodontal humano que se diferenciaron a un

fenotipo cementoblástico a través de la unión a integrina  $\alpha_5 \beta_1$ . Esto está confirmado por un estudio de Metzger et al. en 1998; donde compararon el efecto quimiotáctico de HACD1/CAP en dos tipos de células, en los fibroblastos gingivales humanos y en las células derivadas del ligamento periodontal humano; aquí reportaron que HACD1/CAP tuvo un efecto quimiotáctico 3 veces mayor en las células del ligamento periodontal humano que en los fibroblastos gingivales humanos, teniendo HACD1/CAP mejores resultados que la fibronectina; esto indica una gran capacidad de HACD1/CAP para atraer las células del ligamento periodontal el cual representa un camino natural por el cual los progenitores cementoblásticos son atraídos a la superficie radicular durante la regeneración. (64)

Claro está que los péptidos individualmente logran estas funciones y en conjunto las regulan para no antagonizarse, por lo que es evidente que entre CEMP1-p1 y CAP-p15 existe una sinergia.

Tomados estos datos en conjunto indican que los péptidos pueden inducir la diferenciación de las células derivadas del ligamento periodontal humano hacia un fenotipo mineralizante cementoblástico.



## 11. Perspectivas a Futuro

Entendiendo que el objetivo de este trabajo se enfocó en determinar que el uso en conjunto de los péptidos de HACD1/CAP y CEMP1, logran tener un efecto sinérgico en la diferenciación de células derivadas del ligamento periodontal hacia un fenotipo cementoblástico, el enfoque fue hacia la expresión de mRNA y a nivel proteico de marcadores asociados a fenotipos cementoblásticos y osteoblásticos.

Hay que aclarar que hace falta realizar más experimentos para poder decir cuál es el efecto completo que produce el usar dos péptidos con características tan importantes enfocadas a la regeneración periodontal. Por lo tanto, en un futuro sería adecuado ahondar más en las propiedades de cada péptido y como interactúan entre ellos, por ejemplo, con un diseño de un modelo de dinámica molecular que ayude a identificar los arreglos moleculares que sufren los péptidos y su interacción con los planos cristalinos.

Además, se propone realizar estudios de inmunofluorescencia, WB, qRT-PCR en distintas poblaciones celulares como fibroblastos gingivales humanos y cementoblastos, para analizar con detalle los posibles efectos de la combinación de ambos péptidos.

Por ejemplo, algo que sería interesante realizar sería estudios de inmunolocalización de los péptidos, por ejemplo, en un estudio (Arroyo R. et al., en 2020), evalúan los efectos de otro péptido derivado de CEMP1 (CEMP1-p4), en HOMSCs, en donde reportan que el péptido se queda en los primeros minutos alrededor de la célula y posteriormente se internaliza. (65) Así podríamos hipotetizar lo que pasa con ambos péptidos en las célula del ligamento periodontal.

Por último, sería interesante el uso de una herramienta de mapeo de identificación de proteínas por huella peptídica (Multidimensional Protein Identification Technology, MudPIT), el cual es un poderoso enfoque para caracterizar con detalle las proteínas. Esto podría abrir un panorama acerca de los efectos en la célula con ambos péptidos, no solo con proteínas asociadas a mineralización, sino a transducción de señales, crecimiento celular, división celular, etc. (66) Con lo cual podría ayudarnos a comprender de mejor manera como funcionan los péptidos a nivel celular.

## 12. Conclusiones

A lo largo de los años se ha reportado algunos beneficios de usar péptidos bioactivos, por ejemplo: al tener una cadena corta de aminoácidos pueden ser sintetizados con mayor pureza y a menor costo.

También al ser moléculas de menor tamaño evitan el proceso de degradación proteolítica y eliminan o disminuyen una respuesta inflamatoria causada por el sistema inmune. Esto hace que los péptidos bioactivos sean buenos candidatos para la ingeniería de tejidos, al emplearlos como moléculas de señalización, ya que tienen la capacidad de influir en el comportamiento celular, dando como resultado una mejora en la adhesión, proliferación, migración, diferenciación, angiogénesis y biomineralización celular.

En este estudio se observó que los dos péptidos demostraron tener funciones inductoras importantes, ya que promovieron la expresión relativa de mRNA de factores asociados a fases precoces del proceso de biomineralización como ALP y COL, así como de factores asociados a las fases intermedias y tardías como son BMP2, OPN y BSP1. Esto prueba que los péptidos pueden inducir la diferenciación de las células derivadas del ligamento periodontal humano hacia un fenotipo mineralizante *in vitro*.

También se demostró que los péptidos en conjunto logran una sinergia al superar los resultados obtenidos por los péptidos por sí solos, en todos los tiempos de cultivo al inducir la expresión relativa del mensajero y aumentar los niveles proteicos de CEMP1 y HADC1/CAP de manera significativa *in vitro*.

Estos resultados nos sugieren que al usar ambos péptidos podríamos obtener mejores resultados a corto plazo, se podrían acelerar los procesos de diferenciación y de mineralización, así como obtener mejores resultados en la regeneración en futuros estudios *in vivo*. Que, por lo que se ha visto en los estudios previos con los péptidos individuales, es posible que podamos observar mejores resultados si usamos estos péptidos derivados del cemento radicular en conjunto.

Aunque aún falta realizar más estudios en donde se evalúen más marcadores, se hagan distintos ensayos, aquí se abren nuevas posibilidades de investigación acerca del uso a corto y largo plazo de los péptidos CAP-p15 y CEMP1-p1, en distintos microambientes y en distintas combinaciones, pero que prometen ser importantes candidatos para la regeneración de tejidos.

Como diversos investigadores previamente mencionan, no hay un tratamiento eficaz que pueda ser usado en todos los pacientes con enfermedad periodontal, tal vez una combinación de diferentes tratamientos que se ajusten a cada caso en específico podría ser una buena opción en un futuro, donde estos péptidos pueden ser una opción muy prometedora.

## **13. Tabla de Ilustraciones**

<b>Figura 1.</b> Estructura y Componentes del Periodonto.....	15
<b>Figura 2.</b> Desarrollo del diente y periodonto.....	16
<b>Figura 3.</b> Tipos de encía.....	17
<b>Figura 4.</b> Micrografía ilustrando el ligamento periodontal (PL).....	18
<b>Figura 5.</b> Fibras del Ligamento Periodontal. ....	19
<b>Figura 6.</b> Micrografía electrónica de un fibroblasto.....	20
<b>Figura 7.</b> Células troncales dentales.....	21
<b>Figura 8.</b> Esquema del hueso alveolar.....	22
<b>Figura 9.</b> Inicio de la cementogénesis. ....	26
<b>Figura 10.</b> Adherencia inicial de colágeno del cemento a la predentina. ....	27
<b>Figura 11.</b> Formación del Cemento radicular. ....	27
<b>Figura 12.</b> Cascadas de Señalización de la cementogénesis. ....	29
<b>Figura 13.</b> Secuencia de aminoácidos de la Isoforma 1 HACD1.....	30
<b>Figura 14.</b> Secuencia de aminoácidos de la isoforma 2 HACD1/CAP .....	30
<b>Figura 15.</b> Western Blot del tratamiento en células HuPDLCs en presencia(barras derechas) y ausencia (barras izquierdas) del péptido CEMP1-p1(10µg) .....	56
<b>Figura 16.</b> Western Blot del tratamiento en células HuPDLCs en presencia (barras derechas) y ausencia (barras izquierdas) del péptido CAP-p15(10µg). ....	59
<b>Figura 17.</b> Western Blot del tratamiento en células HuPDLCs en presencia (barras derechas) y ausencia (barras izquierdas) de los péptidos CAP-p15(10µg) y CEMP1-p1 (10µg). ....	62

## **14. Tabla de Gráficos**

<b>Gráfica 1.</b> CAP. Análisis por qRT-PCR de la expresión de CAP.....	50
<b>Gráfica 2.</b> CEMP1. Análisis por qRT-PCR de la expresión de CEMP1.. ..	51
<b>Gráfica 3.</b> BSP II. Análisis por qRT-PCR de la expresión de BSP II.....	51
<b>Gráfica 4.</b> OPN. Análisis por qRT-PCR de la expresión de OPN. ....	52
<b>Gráfica 5.</b> BMP2. Análisis por qRT-PCR de la expresión de BMP2. ....	52
<b>Gráfica 6.</b> ALP. Análisis por qRT-PCR de la expresión de ALP. ....	53
<b>Gráfica 7.</b> COL 1. Análisis por qRT-PCR de la expresión de COL1. ....	53
<b>Gráfica 8.</b> Niveles de expresión proteica de CAP. WB de células HuPDLCs tratadas con el péptido CEMP1-p1.....	57
<b>Gráfica 9.</b> Niveles de expresión proteica de CEMP1. WB de células HuPDLCs tratadas con el péptido CEMP1-p1.....	58
<b>Gráfica 10.</b> Niveles de expresión proteica de CEMP1. WB de células HuPDLCs tratadas con el péptido CAP-p15.....	60
<b>Gráfica 11.</b> Niveles de expresión proteica de CAP. WB de células HuPDLCs tratadas con el péptido CAP-p15. ....	61
<b>Gráfica 12.</b> Niveles de expresión proteica de CAP. WB de células HuPDLCs tratadas con los péptidos CAP-p15 y CEMP1-p1. ....	63
<b>Gráfica 13.</b> Niveles de expresión proteica de CEMP1. WB de células HuPDLCs tratadas con los péptidos CAP-p15 y CEMP1-p1 .....	64
<b>Gráfica 14.</b> Comparativa de los efectos de todos los péptidos en los niveles proteicos de CEMP1. ....	65
<b>Gráfica 15.</b> Comparativa de los efectos de todos los péptidos en los niveles proteicos de CAP. ....	67

## 15. Referencias

1. **Almaguer A., Villagómez J. G.** *Ecología Oral*. Ciudad de México : El Manual Moderno, 2018. 30-33.
2. **Lindhe J., Lang N.P.** *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. 5ta Ed. Editorial Médica Panamericana, 2017. pp. 3-40.
3. **Gómez de Ferraris M. E., Campos A.** *Histología y Embriología Bucodental*. 2a Ed. Madrid : Médica Panamericana, 2002. pp 341-354.
4. **Arzate H., Zeichner M., Mercado G.** *Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration*. *Periodontology* 2000, 2015. Vol. 67, 211-233.
5. **Montoya G., Arenas J., Romo E., Zeichner M., Alvarez M., Narayanan A., Velázquez U., Mercado G., Arzate H.** *Human recombinant cementum attachment protein (htPTPLa/CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation in vitro and bone healing in vivo*. *Bone*, 2014. 68:154-164.
6. **Valdés De Hoyos A, Hoz-Rodríguez L, Arzate H, Narayanan AS.** *Isolation of protein-tyrosine phosphatase-like member-a variant from cementum*. *J Dent Res*. 2012, Vols. 91(2):203-209.
7. **Montoya, G.** *Estudio de cristales inducidos con el péptido de la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP) en un sistema libre de células*. Tesis, UNAM, 2014.
8. **Salgado, F.** *Inducción de la regeneración ósea en defectos óseos severos por el efecto del péptido novel derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (PTPLA/CAP)*. Tesis, UNAM, 2014.
9. **Montoya G, Correa R, Arenas J, et al.** *Cementum protein 1-derived peptide (CEMP 1-p1) modulates hydroxyapatite crystal formation in vitro*. *J Pept Sci*. Vol. 2019;25(10).
10. **Correa R., Arenas J., Montoya G., Hoz L., López S., Salgado F., Arroyo R., Salmerón N., Romo E., Zeichner-David M & Arzate H.** *Synthetic Cementum Protein 1-Derived peptide regulates mineralization in vitro and promotes bone regeneration in vivo*. *The FASEB Journal*, 2018. (33) 1-12.
11. **Perez A. Soria.** *Efecto biológico de un péptido de la proteína del cemento 1 (CEMP1) en el proceso de diferenciación de células derivadas del ligamento periodontal humano*. Tesis UNAM, 2015.
12. **Correa Prado R.** *Nucleación y/o inhibición del proceso de mineralización in vitro a partir de péptidos derivados de proteínas del cemento*. Tesis UNAM, 2016.
13. **Eley B. M., Soory m., Manson J.D.** *Periodoncia*. 6ta Ed. Barcelona (España) Elsevier, 2012. pp. 1-16.
14. **Alvares O.F.** *Periodontal Diseases*. *Nutr Asp Aging*, 2018, Vol. 2. 3:159-174.
15. **Newman M.G., Takei H.H.** *Periodontología Clínica de Carranza*. 11va Ed. Elsevier Saunders, 2012. pp. 12-30.
16. **H. Choi, W. Noh, J. Park, J. Lee, and J. Suh.** *Analysis of gene expression during mineralization of cultured human periodontal ligament cells*. *Journal of Periodontal and Implant Science*. 2011. Vols. 41. no. 1. pp. 30–43.
17. **B. M. Seo, M. Miura, S. Gronthos et al.** *Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament*. *The Lancet*, 2004, Vols. 364. 9429, pp. 149–155.

18. **N. Wada, D. Menicanin, S. Shi, P. M. Bartold, and S. Gronthos.** *Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells.* Journal of Cellular Physiology, 2009, Vols. 219 pp. 667–676.
19. **Tomokiyo, A., Wada, N., and Maeda, H.** *Periodontal ligament stem cells: regenerative potency in periodontium.* Stem Cells Dev. 2019. Vols. 28. 974–985.
20. **Trubiani, O., Pizzicannella, J., Caputi, S., Marchisio, M., Mazzon, E., Paganelli, R., et al.** *Periodontal ligament stem cells: current knowledge and future perspectives.* Stem Cells Dev. 2019. Vols. 28. 995–1003.
21. **Son, H., Jeon, M., Choi, H. J., Lee, H. S., Kim, I. H., Kang, C. M., et al.** *Decellularized human periodontal ligament for periodontium regeneration.* PLoS One. 2019. Vol. 14:e0221236.
22. **Jönsson D, Nebel D, Bratthall G, Nilsson BO.** *The human periodontal ligament cell: a fibroblast-like cell acting as an immune cell.* J Periodontal Res. 2011. Vol. Apr:46(2). 153-7
23. **Villareal-Ramírez, E., Moreno, A., Mas-Oliva, J., Chávez-Pacheco, J. L. Narayanan, A. S., Gil-Chavarria, I., Arzate, H.** *Characterization of Recombinant Human Cementum Protein 1 (hrCEMP1): Primary role in biomineralization.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009. 384 (1), 49-54.
24. **Baranova J, Büchner D, Götz W, Schulze M, Tobiasch E.** *Tooth Formation: Are the Hardest Tissues of Human Body Hard to Regenerate?* Int J Mol Sci. 2020. Jun 4: Vol. 21(11):4031.
25. **Ikeda M, Kanao Y, Yamanaka M, et al.** *Characterization of four mammalian 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases involved in very long-chain fatty acid synthesis.* FEBS Lett. 2008: Vols. 582(16):2435-2440.
26. **Pitaru, S., Narayanan, S. A., Olson, S., Savion, N., Hekmati, H., Alt, I., & Metzger, Z.** *Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces.* Journal of periodontal research. 1995. Vols. 30(5), 360–368.
27. **M., Nidome.** *Estudio de plegamiento y estabilidad estructural de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP).* Maestría Tesis UNAM, 2018.
28. **Arzate, H., et al.** *Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum.* FASEB J, 1992, Vol. 6(11). p. 2990-5.
29. **Saito, M., Iwase, M., Maslan, S., Nozaki, N., Yamauchi, M., Handa, K., Takahashi, O., Sato, S., Kawase, T., Teranaka, T., & Narayanan, A. S.** *Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis.* Bone. 2001. Vols. 29(3): 242-248.
30. **Handa K, Saito M, Yamauchi M, et al.** *Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells.* Bone. 2002. Vols. 31(5):606-611.
31. **Villegas C. E., Agredano L. T., Bermúdez M., Segura M. L., Arzate H., Del Toro E. F., Jiménez L. F.** *Cementum Protein 1 transfection does not lead to ultrastructural changes in nucleolar organization of human gingival fibroblasts.* Journal of Periodontal Research. 2018. 00:1-7.
32. **Romo-Arévalo E., Arzate H., Montoya G., Rodríguez A.** *High-level expression and characterization of a glycosylated human cementum protein 1 with lectin activity.* Febs letters, 2016. 590:129-138.

33. **Wang, L., Wang, N., Zhang, W. et al.** *Therapeutic peptides: current applications and future directions*. Sig Transduct Target Ther. 2022. Vols. 7, 48.
34. **Apostolopoulos V, Bojarska J, Chai TT, Elnagdy S, Kaczmarek K, Matsoukas J, New R, Parang K, Lopez OP, Parhiz H, Perera CO, Pickholz M, Remko M, Saviano M, Skwarczynski M, Tang Y, Wolf WM, Yoshiya T, Zabrocki J, Zielenkiewicz P, AlKhazindar M, Barriga V.** *A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives*. *Molecules*. 2021 Jan 15;26(2):430.
35. **Setiawati, R., & Rahardjo, P. 2.** *Bone Development and Growth*. *Osteogenesis and Bone Regeneration*. IntechOpen. (2018). <https://doi.org/10.5772/intechopen.8245>.
36. **Salhotra A, Shah HN, Levi B, Longaker MT.** *Mechanisms of bone development and repair*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 . Nov;21(11):696-711.
37. **Nakae, H., Narayanan, A., Raines, E., Page, R.** *Isolation and partial characterization of mitogenic factors from cementum*. *Biochemistry*. 1991. Vols. 20. pp. 7047-7052.
38. **Smith DM, Cooper GM, Mooney MP, Marra KG and Losee JE.** *Bone morphogenetic protein 2 therapy for craniofacial surgery*. *J Craniofac Surg*. 2008, 19:1244–1259.
39. **Mohan S, Baylink DJ.** *Bone Growth factor*. *Clin Orthop*. 1991. 260:30-48.
40. **Wozney JM, Rosen V, et al.** *Novel regulations of bone formation molecular clones and activities*. *Science*. 1988. Vols. 242:1528–1534. .
41. **Date T, Doiguchi Y, Nobuta M and Shindo H.** *Bone morphogenetic protein-2 induces differentiation of multipotent C3H10T1/2 cells into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes in vivo and in vitro*. *J Orthop Sci*. 2004. Vols. 9:503–508. .
42. **White, M., Peck, W.** *Alkaline phosphatase: physiological role explored in hypophosphatais*. *Bone and mineral research*. 1989. Vols. 6: pp. 175-218.
43. **Hernández, F., Marichi, F., Álvarez, M.** *Determinación de sialoproteína ósea en ligamento periodontal al inducir fuerzas ortodónticas*. *Revista Odontológica mexicana*, 2011, Vols. 15 (1), pp. 21-26.
44. **Kagayama, M, Sasano, Y., Zhu, J., Hirata, M., Mizohuchi, I., Kamakura, S.** *Epithelial rest colocalize with cementoblast forming acellular cementum but not with cementoblast forming cellular cementum*. *Acta Anat*, 1998, Vols. 163, pp. 1-9.
45. *Osteocalcin gene promoter. Unloding the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation*. **Lian, B., Stein, G., Stein J., van Winjen, A. s.l.** : *J Cell Bio Supplements*, 1998, Vols. 30, pp. 62-72.
46. **Bartold, P., & Narayanan, A.** *Biology of the periodontal connective tissues*. USA: Quintessence Publishing Co, Inc., 1998.
47. **Nazir, MA.** *Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention*. *Int J Health Sci (Qassim)*. Vols. 2017;11(2):72-80.
48. **Magan A, Ripamonti U.** *Biological aspects of periodontal tissue regeneration: cementogenesis and the induction of Sharpey's fibres*. *SADJ*. 2013. 68: 304- 306, 8-12, 14.



49. **M., Zeichner-David.** *Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited.* Periodontol 2000. 2006. 41: 196- 217.
50. **Jolene L. Lau, Michael K. Dunn.** *Therapeutic peptides: Historical perspectives, current developments trends, and future directions.* Bio & Med Chem. 2018. Vols. 26 2700-2707.
51. **M., Zeichner-David.** *Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited.* Periodontol 2000. 2006;41:196-217.
52. **Xiao-Tao He, Rui-Xin Wu, Fa-Ming Chen.** *Principles of Tissue Engineering Chapter 66: Periodontal tissue engineering and regeneration.* Fifth Edition. 2020, Pp 1221-1249.
53. **Hoz L, López S, Zeichner-David M, Arzate H.** *Regeneration of rat periodontium by cementum protein 1-derived peptide.* J Periodontal Res. 2021 Dec;56(6):1223-1232.
54. **Carmona-Rodríguez B, Alvarez-Pérez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, Molina-Guarneros J, García-Hernández AL, Suárez-Franco JL, Chavarría IG, Villarreal-Ramírez E, Arzate H.** *Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts.* Biochem Biophys Res Commun. 2007. Jul 6;358(3):763-9.
55. **Komaki M, Iwasaki K, Arzate H, Narayanan AS, Izumi Y, Morita I.** *Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells.* J Cell Physiol. 2012 Feb;227(2):649-57.
56. **Liu HW, Yacobi R, Savion N, Narayanan AS, Pitaru S.** *A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitors of the mineralized tissue-forming cell lineage of the periodontal ligament.* J Bone Miner Res. 1997. Oct;12(10):1691-9.
57. **Gibson, W. A., & H. M. Fullmer.** *Histochemistry of the periodontal ligament II. The phosphatases.* Periodontics 5. 1967. Vols. (5): 226-32.
58. **Hoz L, Romo E, Zeichner-David M, Sanz M, Nuñez J, Gaitán L, Mercado G, Arzate H.** *Cementum protein 1 (CEMP1) induces differentiation by human periodontal ligament cells under three-dimensional culture conditions.* Cell Biol Int. 2012 Feb;36(2):129-36.
59. **Aguilar S. V.** *Regeneración del defecto periodontal in vivo, inducido a través de un péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (CaP-p15).* Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 2020.
60. **Madani F, Lindberg S, Langel U, Futaki S, Gräslund A.** *Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides.* J Biophys. 2011;2011:414729.
61. **Maldonado S, Romo E, Serrano J, Pérez A, Guerra C, Zeichner-David M, Mercado G and Arzate H.** *Cementum protein 1 (CEMP1) activates p38 and JNK during the mineralization process by cementoblast-like cells in vitro.* Cell Biol Int Rep. 2013. 21, 8–16.
62. **Komaki M, Kang M, Narayanan AS.** *Role of MAP kinases p42erk-2/p44erk-1 in cementum-derived attachment-protein-mediated cell attachment.* J Dent Res. 2000. Oct;79(10):1789-93.
63. **Ivanovski S, Komaki M, Bartold PM, Narayanan AS.** *Periodontal-derived cells attach to cementum attachment protein via alpha 5 beta 1 integrin.* J Periodontal Res. 1999. Apr;34(3):154-9. .

64. Metzger Z, Weinstock B, Dotan M, Narayanan AS, Pitaru S. *Differential chemotactic effect of cementum attachment protein on periodontal cells*. J Periodontal Res. 1998. Feb;33(2):126-9.
65. Arroyo R, López S, Romo E, Montoya G, Hoz L, Pedraza C, Garfias Y, Arzate H. *Carboxy-Terminal Cementum Protein 1-Derived Peptide 4 (cemp1-p4) Promotes Mineralization through wnt/ $\beta$ -catenin Signaling in Human Oral Mucosa Stem Cells*. Int J Mol Sci. 2020. Feb 15;21(4):1307.
66. Link AJ, Washburn MP. *Analysis of protein composition using multidimensional chromatography and mass spectrometry*. Curr Protoc Protein Sci. 2014. Nov 3;78:23.1.1-23.1.25.
67. Serrano J, Romo E, Bermúdez M, et al. *Bone regeneration in rat cranium critical-size defects induced by Cementum Protein 1 (CEMP1)*. PLoS One. 2013. Vol. 8(11):e78807.
68. McAllister, B., A. S. Narayanan, Y. Miki & R. C. Page. *Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum*. J Periodontal Res. 1990. Vols. 25 (2): 99-105.
69. Liu, W., Y. Cao, J. Shen, Q. Xu, Z. Zhu, & Q. Li. *Design and evaluation of a kind of biomimetic peptides of dentin matrix protein- 1*. Hua Xi Kpu Qiang Yi Xue Za Zhi. 2013. Vols. 31 (4): 341-344.
70. Álvarez-Pérez, M. A., Narayanan, S., Zeichner-David, M., Rodríguez Carmona, B., & Arzate, H. *Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23)*. Bone, 2006. 38(3), 409-419.
71. Icer, M. A., & Gezmen-Karadag, M. *The multiple functions and mechanisms of osteopontin*. Clinical biochemistry, 2018. 59,17-24.
72. K. Henriksen, M.A. Karsdal. *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin*. Structure, Function and Biomarkers, 2019. 1-12.
73. Bermúdez M, Imaz-Rosshandler I, Rangel-Escareño C, Zeichner-David M, Arzate H, Mercado-Celis GE. *CEMP1 Induces Transformation in Human Gingival Fibroblasts*. PLoS One. 2015. May 26;10(5).