



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**LABORATORIO DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR**

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

**AISLAMIENTO, CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA  
SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DEL CEMENTO 1 (CEMP1) EN  
FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS**

**TESIS  
QUE PRESENTA:**

**BRUNO CARMONA RODRÍGUEZ**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**TUTOR: DR. HIGINIO ARZATE**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **Agradecimientos:**

Al Dr. Higinio Arzate. Gracias por darme la oportunidad de formarme como investigador en tu laboratorio. No tengo palabras para expresarte mi agradecimiento por todo lo que me has enseñado, tu asesoría, tus comentarios, sugerencias y observaciones me han enriquecido de forma profesional pero sobre todo de forma personal. Muchas gracias por permitirme colaborar contigo en este proyecto, llegando a concluir esta etapa para poder iniciar la siguiente.

Al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez. Gracias por todo lo que me has enseñado en el laboratorio, gracias por los consejos, las observaciones, las críticas, las discusiones, también gracias por todo lo que hemos convivido fuera del laboratorio (esos inolvidables Biocamps!) pero sobre todo gracias por ser tan buen amigo.

Al Dr. Jorge Membrillo Hernández. Gracias por aceptar participar en mi comité tutorial, por enseñarme a tener un pensamiento más crítico y más analítico, por su asesoría y ayuda, gracias por que todos los comentarios de las evaluaciones siempre fueron aportaciones muy constructivas. Gracias por que en todas las charlas que tuvimos siempre me dejaba algo positivo.

M. en C. Eduardo Villarreal Ramírez. Gracias por todas las discusiones científicas y por las discusiones filosóficas (nunca llegamos a nada pero como nos divertimos), tus comentarios, tu buena disposición a ayudarme siempre, tu punto de vista tan crítico y tus consejos y tu amistad.

A mis demás compañeros del laboratorio y amigos: René, Pedrolas, Ana Lilia, Arge, José Luis y Valentina; gracias por todos sus comentarios, críticas, sus aportaciones y por lo que me han enseñado. Ivet muchas gracias por tu ayuda, por tus comentarios y consejos.

A todas aquellas personas que de alguna forma u otra estuvieron relacionadas directa o indirectamente durante la elaboración de este trabajo y que no mencioné muchas gracias.

Al jurado por dedicarle parte de su tiempo a revisar este trabajo, sus críticas, correcciones y sugerencias lo han enriquecido. Gracias.

A la Universidad Nacional Autónoma de México. Orgullosamente UNAM. Aquí he tenido la oportunidad formarme profesionalmente y culminar una de las etapas mas importantes en mi vida profesional.

La estancia de doctorado fue posible gracias a la beca otorgada por CONACyT.

## **Dedicatoria**

Quiero dedicar este trabajo a las siguientes personas:

A mi familia, mis padres y hermanos. Papá, gracias. Mamá eres el mejor ejemplo que tengo de tenacidad para seguir adelante y conseguir lo que quiero. No siempre es fácil pero me has enseñado que se puede lograr. Te amo. Gisela, Luis Héctor y Mauricio, gracias por el apoyo y el estímulo para iniciar y concluir este trabajo. Este logro es en parte, de ustedes. Los quiero mucho. Regina, Pablo y Sofía los quiero muchísimo.

Vero: Que te puedo decir que no sepas ya? Eres una de las personas más importantes en mi vida. Gracias por tu paciencia, tu buen humor, tus consejos, por todo lo que has querido compartir conmigo y por ponerme los pies en la tierra no sé como agradecerte todo lo que me has dado. Es el primero de muchos logros que compartiremos. Te amo!!!

## **INDICE**

<b>1. Resumen</b>	<b>p.1</b>
<b>2. Abstract</b>	<b>p.2</b>
<b>3. Antecedentes</b>	<b>p.3</b>
<b>4. Periodonto</b>	<b>p.4</b>
<b>4.1. Encía</b>	<b>p.4</b>
<b>4.2. Ligamento Periodontal</b>	<b>p.5</b>
<b>4.3. Hueso Alveolar</b>	<b>p.6</b>
<b>5. Cemento Radicular</b>	<b>p.7</b>
<b>5.1. Cementogénesis</b>	<b>p.8</b>
<b>5.2. Composición Orgánica e Inorgánica del Cemento Radicular</b>	<b>p.11</b>
<b>5.3. Proteínas Colágenas</b>	<b>p.12</b>
<b>5.4. Proteínas No Colágenas</b>	<b>p.13</b>
<b>5.4.1. Amelogenina, Ameloblastina y Enamelina</b>	<b>p.13</b>
<b>5.4.2. Fosfatasa Alcalina</b>	<b>p.15</b>
<b>5.4.3. Sialoproteína Ósea</b>	<b>p.16</b>
<b>5.4.4. Osteocalcina</b>	<b>p.17</b>
<b>5.4.5. Osteopontina</b>	<b>p.17</b>
<b>5.4.6. Proteína de Adhesión del Cemento</b>	<b>p.18</b>
<b>5.5 CEMP1/CP23</b>	<b>p.19</b>
<b>6. Enfermedad Periodontal</b>	<b>p.21</b>
<b>6.1. Gingivitis</b>	<b>p.22</b>
<b>6.2. Periodontitis</b>	<b>p.22</b>
<b>7. Regeneración Periodontal</b>	<b>p.23</b>
<b>8. Planteamiento del Problema</b>	<b>p.34</b>
<b>9. Justificación</b>	<b>p.35</b>
<b>10. Hipótesis</b>	<b>p.36</b>
<b>11. Objetivo General</b>	<b>p.37</b>
<b>12. Objetivos Específicos</b>	<b>p.37</b>
<b>13. Materiales y Métodos</b>	<b>p.38</b>
<b>13.1. Cultivo Celular</b>	<b>p.38</b>
<b>13.2. Construcción del Vector de Expresión pcDNA40-CEMP1 y Transfección de Fibroblastos Gingivales Humanos</b>	<b>p.38</b>
<b>13.3. Proliferación Celular</b>	<b>p.39</b>
<b>13.4. Ensayos de Mineralización</b>	<b>p.40</b>

13.5. Microanálisis de Energía Dispersa de Rayos X	p.40
13.6. Ensayos de Actividad Específica de Fosfatasa Alcalina	p.41
13.7. Análisis por retrotranscripción de la reacción en cadena de la polimerasa RT-PCR	p.41
13.8. Inmunotinciones	p.42
13.9. Hibridación <i>in situ</i>	p.43
13.10. Northern Blot	p.44
13.11. Western Blot	p.45
<b>14. Resultados</b>	<b>p.46</b>
14.1. Expresión de CEMP1 en fibroblastos gingivales humanos	p.46
14.2. Proliferación Celular	p.47
14.3. Mineralización	p.47
14.4. Microanálisis por energía dispersa de rayos X	p.48
14.5. Actividad específica de Fosfatasa Alcalina	p.48
14.6. Caracterización del fenotipo expresado por las células transfectadas de forma estable con CEMP1	p.49
14.7. Inmunocitoquímica	p.50
14.8. Western Blot	p.51
<b>15. Discusión y Conclusiones</b>	<b>p.52</b>
<b>16. Referencias Bibliográficas</b>	<b>p.59</b>
<b>17. Apéndice A Figuras</b>	<b>p.67</b>
<b>18. Apéndice B Publicaciones</b>	<b>p.75</b>

## **INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b>	<b>p.67</b>
<b>Figura 2</b>	<b>p.68</b>
<b>Figura 3</b>	<b>p.69</b>
<b>Figura 4</b>	<b>p.70</b>
<b>Figura 5</b>	<b>p.71</b>
<b>Figura 6</b>	<b>p.72</b>
<b>Figura 7</b>	<b>p.73</b>
<b>Figura 8</b>	<b>p.74</b>

## 1. Resumen

El cemento radicular es el tejido conectivo mineralizado especializado que cubre la superficie radicular de los órganos dentarios. Es un tejido poco conocido a nivel celular y molecular, sin embargo, posee características que lo hacen único. Asimismo, se ha demostrado que su presencia y maduración son esenciales para la regeneración de los tejidos periodontales.

En el presente trabajo se describe el aislamiento, clonación y el efecto de la transfección de fibroblastos gingivales humanos con el gen de la proteína del cemento 1 (CEMP1). Se confirmó la presencia del gen por medio de Northern Blot e Hibridación *in situ*. Analizamos el efecto de la sobre-expresión de este gen en:

1) Proliferación celular, encontrando que las células transfectadas con CEMP1 proliferaron hasta 2.5 veces más que los controles.

2) Cultivo mineralizante, observando un incremento constante en la cantidad y el tamaño de los nódulos y determinando que la razón Ca/P del material depositado fue similar a la hidroxiapatita biológica.

3) Actividad específica de fosfatasa alcalina, detectando un incremento significativo.

4) Análisis de expresión de moléculas asociadas a la biomineralización, como ameloblastina (AMBN), amelogenina (AMEL), enamina (ENAM), fosfatasa alcalina (ALP), osteopontina (OPN), osteocalcina (OCN), sialoproteína ósea (BSP), proteína de adhesión del cemento (CAP), CEMP1, colágeno tipo I (Col I) y un factor de transcripción (Cbfa1) por medio de RT-PCR y Western Blot revelando que las células expresaron las moléculas analizadas lo que sugiere un cambio de fenotipo hacia uno mineralizante.

Los resultados del presente trabajo indican que el gen CEMP1 tiene una participación importante en la regulación positiva de la biomineralización, esto es importante dado que la regeneración de los tejidos periodontales implica necesariamente la nueva formación de cemento y hueso. También es probable que dicho gen participe en la diferenciación celular hacia un fenotipo mineralizante lo que sugiere que puede ser un marcador del linaje cementoblástico, abriendo la posibilidad de estudiar las aplicaciones terapéuticas de este gen en la regeneración periodontal.



## 2. Abstract

Cementum is the specialized mineralized connective tissue that covers tooth roots. It is a poorly understood tissue at the molecular and cellular levels; however it has characteristics which make it unique. It has been shown that its presence and maturation are essential for regeneration of periodontal tissues.

The present work describes the isolation and the effect of cementum protein 1 (CEMP1) transfection into human gingival fibroblasts. We confirmed its presence by Northern Blot, *in situ* Hybridization and Western Blot. CEMP1 promoted proliferation by 2.5 fold when compared to controls. In mineralizing culture conditions we observed more and larger mineralized nodules; furthermore, by EDS-X analysis we determined that the Ca/P ratio was similar to biological hydroxyapatite. Alkaline phosphatase specific activity was significantly increased; the expression of molecules associated with biomineralization such as ameloblastin (AMBN), amelogenin (AMEL), enamelin (ENAM), alkaline phosphatase (ALP), osteopontin (OPN), osteocalcin (OCN), bone sialoprotein (BSP), cementum attachment protein (CAP), CEMP1, collagen I (Col I) and the transcription factor (Cbfa1) by RT-PCR was also increased and Western Blot analysis revealed that cells transfected with CEMP1 expressed the mineralization-related molecules, indicating a change towards a mineralizing phenotype.

The results of the present study indicate that CEMP1 plays an important role in the positive regulation of biomineralization, this is important because periodontal tissue regeneration necessarily involves mineralization which includes new cementum and bone formation.

It is also possible that CEMP1 participates in differentiation, directing cells towards a mineralizing phenotype; this means that it could be used as a marker for the cementoblastic phenotype, which in turn opens new possibilities involving the potential therapeutic applications of this gene in periodontal regeneration.

### 3. Antecedentes

El término periodonto se refiere al conjunto de tejidos que rodean al órgano dentario y lo anclan a los procesos maxilares y mandibular, está constituido por dos tejidos blandos: encía y ligamento periodontal, y dos tejidos mineralizados: hueso y cemento radicular (Lindhe, 2003; Rose *et al.*, 2004). Sus funciones son: proveer el anclaje de los órganos dentarios al alvéolo, distribuir las fuerzas de la masticación y la fonación, mantener el espacio del ligamento periodontal y proveer un reservorio de células para la homeostasis y regeneración o reparación del tejido (Nanci y Bosshardt, 2006). En estado de salud, estos tejidos se desarrollan y funcionan como una unidad, sin embargo, si alguno de estos cuatro tejidos presenta una alteración patológica, sin tratamiento, la repercusión en los demás genera inestabilidad pudiendo llegar hasta la pérdida de los órganos dentarios (Cho y Garant, 2000; Bobaid *et al.*, 2004).

Respecto al desarrollo embrionario del periodonto existe información generada a partir de estudios de expresión de genes durante la odontogénesis. La mayoría de estos estudios se centran en la interacción entre el órgano del esmalte y la papila dental. Sin embargo, se ha prestado menos atención al papel de la activación de genes y regulación de factores de crecimiento en el desarrollo del periodonto (Cho y Garant, 2000).

## **4. Periodonto**

### **4.1. Encía**

Compuesta de epitelio gingival y tejido conectivo, forma parte de la mucosa oral recubriendo los procesos alveolares de la mandíbula y la maxila rodeando los cuellos de los dientes. El tejido conectivo de la encía es muy similar al de la piel, compuesto principalmente de fibras colágenas, proteoglucanos, fibronectina, osteonectina, tenascina y elastina en proporciones variables, dependiendo de la localización. Su función principal es de protección para las estructuras profundas así como un intercambio selectivo con el entorno oral.

Anatómicamente se divide en marginal, adherida o insertada y de áreas interdetales. La encía marginal es aquella que rodea el cuello de los dientes y forma el surco gingival. El surco gingival es el espacio limitado por el cuello del diente de un lado y por el epitelio que recubre a la encía marginal. En humanos clínicamente sanos, se puede medir una profundidad normal de hasta 3mm.

El color de la encía en estado de salud es rosa coral, sin embargo esto varía por la pigmentación de cada persona. La forma, contorno y la textura están determinadas por las estructuras subyacentes (hueso alveolar y eminencias radiculares). Es de consistencia resilente y se encuentra firmemente adherida al hueso. Presenta un aspecto de puntilleo como cáscara de naranja en su porción adherida. Los elementos celulares más abundantes son los fibroblastos (Carranza y Newman, 1996; Bartold *et al.*, 2000, Bartold y Narayanan, 2006).

## 4.2. Ligamento periodontal

Es un tejido conectivo predominantemente fibroso, con un recambio metabólico muy alto, que rodea la superficie radicular y la une al hueso alveolar. Se continúa con el tejido conectivo de la encía y comunica con los espacios medulares a través de canales vasculares en el hueso.

Estructuralmente, los elementos más abundantes son las fibras periodontales las cuales se clasifican en 6 diferentes grupos. Estas son fibras de colágena tipo I y III, producidas por los fibroblastos. Las fibras colágenas que se insertan en uno de sus extremos al cemento y por el otro extremo al hueso, se les llama fibras de Sharpey. También hay proteoglucanos ricos en leucina incluyendo a la fibromodulina y perlecan. Se han detectado otros proteoglucanos como el CD-44 en la superficie de los fibroblastos. La glucoproteína tenascina se localiza en zonas de inserción del hueso alveolar y del cemento radicular. La fibronectina y la vitronectina se localizan en, y rodeando a las fibras colágenas. Los elementos celulares de este tejido son fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos y osteoclastos (Carranza y Newman, 1996; Bartold y Narayanan, 2006). Dentro de la población celular la fibroblástica es la predominante. Son los fibroblastos los que se encargan de sintetizar y remodelar la matriz extracelular. Se ha demostrado que existen diferentes subpoblaciones o subtipos de fibroblastos, dentro de éstos, los que presentan el fenotipo mineralizante, enriquecidos en fosfatasa alcalina, tienen la capacidad de diferenciarse a osteoblastos ó cementoblastos y son responsables de la producción de cemento acelular con fibras extrínsecas y

también se encargan del mantenimiento del espacio del ligamento periodontal (McCulloch *et al.*, 2000; Cho y Garant, 2000; Lindhe, 2003).

### **4.3. Hueso alveolar**

Los procesos maxilares de los humanos se pueden subdividir en dos partes: a) el proceso alveolar que aloja las raíces de los órganos dentarios erupcionados y b) el cuerpo basal no involucrado en esta función. El proceso alveolar consiste del alvéolo que forma la pared de las criptas, las corticales interna y externa y el hueso esponjoso entre ambas corticales. Como los procesos alveolares se desarrollan y sufren remodelación de acuerdo a la formación y erupción dentales, son estructuras óseas dependientes de los órganos dentarios y la forma, localización y función de los dientes determina la morfología ósea. En caso de pérdida de órganos dentarios, el proceso alveolar sufre un proceso de reabsorción dando como resultado la disminución de la dimensión vertical y horizontal (Cho y Garant, 2000). La composición bioquímica no ha sido muy bien determinada. Como en el resto de los tejidos periodontales, dentro del componente orgánico, predominan las colágenas tipo I y III. Los análisis bioquímicos han demostrado la presencia de polipéptidos biológicamente activos como sialoproteína ósea y osteopontina. Los proteoglucanos más abundantes en hueso son ricos en condroitín sulfato (Bartold y Narayanan, 2006).

## 5. Cemento Radicular

El cemento radicular es el tejido conectivo especializado mineralizado, no vascularizado, que cubre la superficie radicular de los órganos dentarios, fue descrito por primera vez en 1835 por los alumnos de Purkinje, sin embargo permanece como un tejido pobremente definido a nivel celular y molecular. Uno de los obstáculos principales para su análisis bioquímico es su distribución tan limitada (Narayanan y Bartold, 2006). La información de que se dispone en la actualidad se basa en análisis histológicos y composicionales (Saygin *et al.*, 2000). Es un tejido estructuralmente importante ya que media la inserción de las fibras del ligamento periodontal (fibras de Sharpey) a éste y forma la interfase entre la dentina y el ligamento periodontal, asimismo, juega un papel primordial en la reparación de la superficie radicular. Se ha demostrado que la formación del cemento es un requisito indispensable para el desarrollo y regeneración de las estructuras periodontales (Berry *et al.*, 2003). Estas funciones son perdidas cuando el cemento es afectado por enfermedades inflamatorias tales como gingivitis y periodontitis (Page *et al.*, 1978; Page, 1985) o cuando la formación del cemento es anormal y los dientes se exfolian espontáneamente, como sucede en la hipofosfatasa (Baab *et al.*, 1985).

Por su composición e histología, el cemento radicular presenta características muy similares al hueso y a la dentina, sin embargo las diferencias son lo que lo hacen un tejido único; no está innervado, no presenta vascularización, su recambio metabólico es muy bajo y no sufre procesos de remodelación sino que hay un proceso de aposición constante (Sayginet *et al.*, 2000; Bartold y Narayanan, 2006, Bartold y Narayanan, 1998).

## 5.1. Cementogénesis

En la formación de la raíz, la vaina epitelial radicular de Hertwig (HERS) juega un papel fundamental, está formada por la unión del epitelio interno y externo del esmalte y las células de HERS proliferan en dirección apical. Esta proliferación induce la diferenciación de la papila para que, a su vez, se diferencien en su superficie los odontoblastos radiculares. Cuando se deposita la primera capa de dentina radicular, las células de HERS se fragmentan y pierden su continuidad formando lo que se conoce como restos epiteliales de Malassez, que persisten en los adultos en una posición cercana a la superficie radicular. Una vez que se ha perdido la continuidad de las células de HERS, las células foliculares ectomesenquimatosas comienzan a depositar el cemento radicular sobre la dentina recién depositada y/o sobre la matriz secretada por las células de HERS. La región apical de la raíz en desarrollo contiene células ectomesenquimatosas progenitoras de fibroblastos, preodontoblastos, y precementoblastos (Carlson, 1990; Garant, 2003; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 1999, Zeichner-David, 2006). Un concepto reciente acerca de la función de las células de la HERS postula que éstas producen una membrana basal con proteínas quimiotácticas que dirigen la migración de células precementoblásticas e induce su diferenciación a cementoblastos. Dentro de las moléculas presentes hay proteínas de matriz extracelular, factores de crecimiento, proteínas del esmalte y moléculas de adhesión como la proteína de adhesión del cemento (CAP). Una vez que el órgano dentario ocluye con su antagonista, la proliferación de las células de HERS disminuye y algunas células quedan atrapadas en la matriz mineralizada. También se piensa que las

células de HERS sufren una transformación ecto-mesenquimatosa para convertirse en cementoblastos funcionales, se ha propuesto que existen diferentes tipos de cementoblastos: aquellos originados de HERS y los derivados del folículo dental (Zeichner-David, 2006).

El potencial de desarrollo del folículo dental se ha estudiado con experimentos de trasplante de órganos dentarios en sitios no mineralizantes, como la cámara anterior del ojo, y se ha demostrado que pueden formarse todos los elementos del periodonto, incluso con la formación de hueso y cemento radicular (Cho y Garant, 2000).

El depósito de cemento comienza justo apical al esmalte cervical e histológicamente se ha clasificado en 3 o 4 tipos de cemento de acuerdo al origen de las fibras y la presencia o ausencia de células:

1. Cemento acelular con fibras extrínsecas.
2. Cemento acelular con fibras intrínsecas.
3. Cemento celular con fibras intrínsecas.
4. Cemento celular estratificado mixto (Garant, 2003; Schroeder, 1988; Bartold y Narayanan, 1998).

El cemento acelular afibrilar cubre los dientes a nivel de la unión esmalte-cemento, se compone de una matriz mineralizada pero carece de fibras de colágena y células incluidas. Se deposita sobre esmalte y dentina en forma de parches aislados, su depósito inicia después de la maduración del esmalte y continúa por tiempo indefinido. Este tipo de cemento no es tomado en cuenta por muchos autores por que las células responsables de su producción no se han identificado, se piensa que células del tejido conectivo depositan la matriz cuando contactan la superficie del esmalte.



El cemento acelular con fibras extrínsecas, también se conoce como cemento acelular o primario, se localiza en el tercio cervical radicular ó en la mitad cervical de la raíz. Su desarrollo es muy lento y se considera acelular por que las células que lo forman permanecen en la superficie. Presenta un gran número de fibras de Sharpey insertadas en forma perpendicular a la superficie de la raíz, lo que destaca la importancia de este tejido en el anclaje del órgano dentario. Su formación comienza poco tiempo después de la formación de la raíz y continúa mientras el resto de las estructuras periodontales adyacentes permanezcan intactas. Es producido por los cementoblastos que se diferencian en proximidad a la superficie radicular.

El cemento celular con fibras intrínsecas también llamado cemento secundario o cemento celular se distribuye en el tercio apical de la raíz dental y en los dientes con más de una raíz se localiza en la zona de la furcación. Se produce como tejido de reparación para rellenar defectos creados por resorciones o fracturas y puede localizarse en una posición más coronal. La presencia de fibras colágenas producidas por los cementoblastos (fibras intrínsecas) así como la presencia de células atrapadas dentro de la matriz mineralizada (cementocitos) son características de este tipo de cemento. Forma parte como componente intrínseco del cemento celular estratificado mixto, el cual presenta estratos o capas derivadas del depósito consecutivo de capas alternadas de cemento acelular con fibras extrínsecas y cemento celular con fibras intrínsecas (Grzesik y Narayanan, 2002; Zeichner-David, 2006).

## 5.2. Composición Orgánica e Inorgánica del Cemento Radicular

Se ha demostrado que los extractos proteicos de cemento maduro promueven adhesión celular, migración y estimulan la síntesis de proteínas en fibroblastos gingivales y células del ligamento periodontal. Un análisis más detallado de dichos extractos reveló la presencia de sialoproteína ósea, osteopontina, vitronectina y fibronectina (Saygin *et al.*, 2000). La composición de la matriz extracelular del cemento es muy similar a la del hueso, aproximadamente 50% inorgánica, principalmente hidroxapatita, y 50% orgánica la cual se compone de colágena tipo I como componente predominante (90%) y colágenas tipo III y XII en menor proporción, presenta trazas de colágenas tipo V y VI en localización pericelular y tipo XIV asociada con las fibras de Sharpey (Garant, 2003; Bartold y Narayanan, 2006; Nanci y Bosshardt, 2006; Álvarez-Pérez *et al.*, 2006). Los proteoglicanos se asocian principalmente a los cementoblastos y a los cementocitos, y se han localizado e identificado versican, decorina, biglicano, fibromodulina y lumican. Recientemente se localizó sindecan-2 en cemento acelular. Las proteínas no colágenas, las que en su mayoría también están presentes en el hueso, incluyendo a la sialoproteína ósea (BSP), proteína de matriz dentinaria-1 (DMP-1), sialoproteína dentinaria, fibronectina, osteocalcina, osteonectina, osteopontina, tenascina, proteoglicanos, proteolípidos (Bartold y Narayanan, 2006) y factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento derivado del cemento (CGF) el cual es aparentemente una molécula parecida al factor de crecimiento tipo-insulínico (Saygin *et al.*, 2000; Zeichner-David, 2006) también constituyen la porción orgánica no colágena del cemento radicular. Se ha

reportado la presencia de proteínas del esmalte aunque su localización se restringe a una zona muy pequeña de la región cervical del órgano dentario (Nanci y Bosshardt, 2006). Se considera que la función de la laminina y la fibronectina es participar en la adhesión celular junto con la tenascina, la sialoproteína ósea, la osteonectina y la proteína de adhesión del cemento. La presencia de otras moléculas bioactivas tales como proteínas derivadas del esmalte, osteonectina y factores mitogénicos, todas estas moléculas no colágenas, aparentemente desempeña un papel importante en la migración celular, adhesión, proliferación y síntesis de proteínas (Zeichner-David, 2006).

El análisis de las proteínas expresadas por los cementoblastos no había dado como resultado la identificación de proteínas específicas para este tejido hasta hace algunos años (Saygin *et al.*, 2000), cuando se propusieron 3: la proteína de adhesión del cemento, un factor mitogénico, y una proteína de 72 kDa, sin embargo, no se expresan exclusivamente en cementoblastos sino que, se localizan también en los progenitores putativos del ligamento periodontal (Zeichner-David, 2006).

### **5.3. Proteínas Colágenas**

Comprende a una familia de proteínas muy abundante en el reino animal. Presentan una serie de características que las distinguen de otras moléculas de la matriz extracelular tal como estructura de triple hélice formada por tres cadenas polipeptídicas llamadas cadenas  $\alpha$ . Las cadenas  $\alpha$  presentan un giro a la izquierda, y se entrelazan con las demás cadenas en una triple hélice con giro a la derecha, presentan una secuencia de aminoácidos

característica Gly-X-Y en donde X y Y son cualquier aminoácido excepto glicina, X frecuentemente es prolina y Y hidroxiprolina o hidroxilisina.

Se han descrito por lo menos 19 tipos diferentes de colágena. El más abundante en tejidos de mamíferos, es el tipo I, que está formado por 2 cadenas  $\alpha 1$  y una cadena  $\alpha 2$  (Bartold y Narayanan, 1998). Las 3 cadenas al entrecruzarse forman pozos y zonas de sobreposición. La diferencia de densidad en estas zonas así como la exposición de grupos químicos reactivos es lo que le confiere el aspecto bandeado característico. Además en los pozos y en las zonas de sobreposición se depositan los embriones de cristales de hidroxiapatita o los sitios donde se da la nucleación (Bonucci, 1992).

#### **5.4. Proteínas No Colágenas**

##### **5.4.1. Amelogenina (AMEL), Ameloblastina (AMBN) y Enamelina (ENAM)**

El proceso de inicio y crecimiento de los cristales del hidroxiapatita en el esmalte es controlado y regulado local y temporalmente por la secreción, procesamiento y degradación de proteínas y proteinasas del esmalte que componen la matriz extracelular. Las principales especies que contribuyen a la formación del esmalte son la amelogenina, ameloblastina y enamelina (Pavlic *et al.*, 2007). Análisis filogenéticos han demostrado que los genes de amelogenina y ameloblastina son genes “hermanos” provenientes de una copia del gen de la enamelina, es decir, evolutivamente están relacionadas, provienen de un gen ancestral común y su evolución probablemente es la siguiente: SPARC -> HEVIN -> ENAM -> AMBN -> AMEL (Sire *et al.*, 2006).

La amelogenina pertenece a una familia de proteínas del esmalte dental, resultado del procesamiento (splicing) alternativo de un solo transcrito con 7 exones. Se ha propuesto que participa durante el desarrollo embrionario regulando las interacciones epitelio-ectomesénquima para la diferenciación de los odontoblastos (Janones *et al.*, 2005), y, aunque los mecanismos de biomineralización del esmalte no se conocen, se ha propuesto que la amelogenina participa modulando el hábito cristalino de la fase mineral del esmalte, se ha demostrado también que las células de los tejidos periodontales son reactivas a las amelogeninas, otra función probable es la regulación de la transcripción de genes asociados a la biomineralización (Viswanathan *et al.*, 2003; Yamakoshi *et al.*, 2006; Swanson *et al.*, 2006). Recientemente se le ha localizado en odontoblastos, fibroblastos pulpares, fibroblastos periodontales y cementoblastos, todos relacionados a los órganos dentarios con un origen epitelial y mesenquimatoso. La expresión de amelogenina en tejidos no mineralizados como cerebro de ratón y rata, en células madre hematopoiéticas, macrófagos y megacariocitos, sugieren que su función no está restringida a la mineralización sino que podría tener un papel adicional como se ha descrito recientemente para proteínas con más de una función (Deutsch *et al.*, 2006).

La ameloblastina, aunque representa menos del 5% de las proteínas de la matriz extracelular del esmalte en desarrollo, se considera que juega un papel fundamental en el control del crecimiento de los cristales del esmalte y la subsecuente estructura de los prismas.

La enamelina representa menos del 5% de la matriz del esmalte de los mamíferos, es secretada como un péptido de 186 kDa pero rápidamente es procesada por enzimas proteolíticas, uno de los fragmentos mas abundantes y

mejor caracterizados es la enamelina de 32 kDa (Moradian-Oldak, 2001). Actualmente se sabe que juega un papel crucial en la estructura del esmalte, iniciando la mineralización y regulando el crecimiento de los cristales, se ha demostrado que las mutaciones en este gen provocan amelogenesis imperfecta (Pavlic *et al.*, 2007).

#### **5.4.2. Fosfatasa Alcalina (ALP)**

Pertenece a una familia de metaloenzimas diméricas, con una distribución muy amplia. Su función es catalizar la hidrólisis de fosfomonoésteres a un pH alcalino. Se han identificado al menos 4 isoenzimas en humanos: fosfatasa alcalina (ALP) no-tejido específica (hígado/hueso/riñón), intestinal, placentaria y de células germinales. La producida por los osteoblastos y cementoblastos es del tipo no-tejido específico.

La actividad específica de ALP es un indicador valioso de desarrollo y diferenciación. Su actividad se ha localizado en placas de crecimiento de cartílago, en células endosteales, células de médula ósea, osteoblastos y cementoblastos. En el hueso se ha identificado en el frente de mineralización (Miao y Scutt, 2002). Su participación en la biomineralización, aunque no completamente comprendida es muy significativa. En casos de hipofosfatasa, enfermedad metabólica caracterizada por una disminución en la actividad de ALP no-tejido específica, la formación de cemento es deficiente o nula con la subsecuente exfoliación dental, por lo que se le atribuye un papel importante en la regulación de los niveles de pirofosfato (Nociti *et al.*, 2002; van den Boss y Beertsen., 1999; van den Boss *et al.*, 2005; Nanci y Bosshardt 2006). Su

actividad también ha sido detectada en el ligamento periodontal, con una distribución heterogénea, en sitios adyacentes al hueso y al cemento (zonas de cementogénesis) (Groeneveld *et al.*, 1995).

#### **5.4.3. Sialoproteína Ósea (BSP)**

Constituye del 8 al 12% del total de proteínas no colágenas de hueso y cemento. Tiene un peso molecular de 33-34 kDa y contiene principalmente residuos de ácido glutámico y glicina. Se piensa que el contenido de ácido glutámico está involucrado en la unión a hidroxapatita así como en la nucleación de los cristales de mineral. También tiene una secuencia RGD (Arg-Gly-Asp) involucrada en adhesión celular por medio de integrinas. Se le ha inmunolocalizado en hueso, dentina y cemento, asociándose a la nueva formación de hueso. El papel más destacado que se le atribuye es como nucleador de hidroxapatita, por lo que parece desempeñar un papel importante en las etapas iniciales de mineralización (actividad como nucleador de cristales de hidroxapatita) y, se le considera un marcador de diferenciación de osteoblastos y cementoblastos (Bartold y Narayanan, 1998; Ganss *et al.*, 1999; Viswanathan *et al.*, 2003). Su participación en la cementogénesis se ha sugerido como una molécula promotora de la formación de mineral sobre la superficie radicular así como en adhesión celular por el motivo RGD y su interacción con las integrinas (Nanci y Bosshardt, 2006).

#### **5.4.4. Osteocalcina (OCN)**

También se le conoce como proteína –gla de hueso, tiene una masa de aproximadamente 5.8-6 kDa, fue la primer proteína derivada del hueso que fue caracterizada. Contiene tres residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico los que se asocian con sus propiedades de unión a calcio. La producen los osteoblastos y los osteoclastos completamente diferenciados, y es secretada a la matriz en el frente de mineralización (Bartold y Narayanan, 1998). Se ha inmunolocalizado en hueso alveolar, cemento y dentina. Su papel en la biomineralización se ha determinado parcialmente, se sabe que modelos animales tratados con warfarina (antagonista de la vitamina K, inhibe la carboxilación de los residuos de ácido glutámico) o ratones knockout presentan hipermineralización ósea. Esto sugiere que el papel que la osteocalcina desempeña es probablemente regulando la maduración de los cristales de hidroxiapatita y también en el reclutamiento de osteoclastos, participando en la remodelación ósea (Lian *et al.*, 1998; Sodek y McKee, 2000, Nanci y Bosshardt 2006).

#### **5.4.5. Osteopontina (OPN)**

Es una fosfoproteína glicosilada con una masa molecular de 41.5 kDa con un alto contenido de ácido aspártico, puede estar altamente fosforilada en los residuos de serina y treonina. Contiene sitios putativos de unión a calcio lo que explica su afinidad por los cristales de hidroxiapatita. Presenta también dominios de adhesión celular RGD para interactuar con las integrinas  $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 1$ ,  $\alpha\nu\beta 5$ . Se une a colágena, fibronectina y osteocalcina.



Se localiza en hueso en el frente de mineralización. Aunque se considera un componente principal del hueso, también se localiza en tejidos no mineralizados como riñón, células de músculo liso arterial y en la superficie luminal de células epiteliales en tejidos ductales. También se encuentra en la mayoría de las secreciones corporales como orina, leche, saliva y bilis.

En tejidos mineralizados se han determinado al menos tres funciones para esta enzima: 1) regulación de adhesión celular, 2) regulación de actividad osteoclástica y 3) regulación de la mineralización de la matriz. Se considera que juega un papel importante en la inflamación, biomineralización y resorción ósea (Bartold y Narayanan, 1998; Giachelli y Steitz, 2000). Datos recientes sugieren que su papel en la mineralización está asociado a la regulación del crecimiento de los cristales de hidroxapatita (Nanci y Bosshardt, 2006).

#### **5.4.6. Proteína de Adhesión del Cemento (CAP)**

Se ha aislado, purificado y caracterizado parcialmente a partir de extractos de cemento maduro, es una proteína tipo colágena, tiene un peso molecular de 56 kDa y presenta una secuencia de aminoácidos con cierta homología con colágenas tipo I y XII, aunque, no están inmunológicamente relacionadas (Wu *et al.*, 1996). Se ha inmunodetectado en la matriz del cemento radicular, en células paravasculares de los espacios endosteales (Arzate et al., 1992) y en cementoblastos putativos *in vitro* (Arzate et al., 1998). Se ha demostrado que promueve migración con mayor afinidad para las células del ligamento periodontal y de hueso alveolar que para fibroblastos gingivales hacia la superficie radicular, promueve adhesión celular mediada a través de

las integrinas  $\alpha 5\beta 1$  (Ivanovski *et al.*, 1999), también incrementa la actividad específica de fosfatasa alcalina y promueve la condrogénesis y mineralización en células mesenquimatosas, es decir induce la diferenciación celular (Arzate *et al.*, 1996). En cultivos celulares de folículo dental de bovino se ha demostrado que los progenitores putativos de los cementoblastos expresan esta molécula (Handa *et al.*, 2002). Se ha demostrado también, que fibroblastos tratados con BMP-2 expresan CAP y ALP por lo que BMP-2 puede reclutar progenitores e inducir la diferenciación celular por medio de la expresión de moléculas específicas de cemento (Pitaru, *et al.*, 2002; Álvarez-Pérez *et al.*, 2003). Las vías de señalización intracelular involucradas que se han identificado y se propone participan en proliferación y diferenciación celular son la vía de Smad-1 (vía canónica de señalización de BMP) y la vía MAPK (Komaki *et al.*, 2000).

### **5.5. CEMP1 / CP-23**

Es una proteína de 247 aminoácidos aislada a partir de una biblioteca derivada de cementoblastos putativos humanos cultivados in Vitro. Al analizar *in silico* la secuencia obtuvimos los siguientes resultados: el ADNc de 1374 nucleótidos contiene un marco de lectura abierto de 744 nucleótidos, la búsqueda en bases de datos determinó que tiene 100% de homología con una clona de ADN de *homo sapiens* presente en el cromosoma 16 (gb AC093525.3) y 99% de homología con una clona de ADNc denominada DKFZp313E2215 (gb AL833099). La proteína tiene un peso molecular teórico de 26 kDa, el análisis teórico de las modificaciones postraduccionales dio como

resultado la detección de sitios teóricos de N-glicosilación, fosforilación y miristoilación, también se predice la localización celular como nuclear a pesar de no tener motivos de unión a ADN, no se encontró similitud significativa con ninguna otra proteína presente en las bases de datos. Una región de la proteína (del residuo 30 al 110) presenta 48% de homología con la cadena  $\alpha$  I (1) de colágena humana, 46% con colágena tipo XI y 40% con colágena tipo X, aunque solamente es reconocida por anticuerpos contra colágena tipo X. Inmunológicamente es reconocida por un anticuerpo monoclonal desarrollado contra la proteína de adhesión del cemento por lo que están relacionadas a este nivel. La caracterización bioquímica y estructural de esta proteína está en proceso actualmente en nuestro laboratorio.

Su expresión tanto a nivel de ARNm como de proteína *in vitro* se limita a cementoblastos putativos (células derivadas del cultivo del cementoblastoma humano) y una subpoblación de células derivadas del ligamento periodontal; en cortes histológicos de tejidos periodontales humanos, su expresión y localización está restringida a subpoblaciones del ligamento periodontal con una posición paravascular, cementoblastos y células de los espacios endosteales, por lo que podría constituir un marcador biológico para cementoblastos y los progenitores putativos en el ligamento periodontal (Arzate *et al.*, 2002; Kémoun *et al.*, 2007). No se detectó el ARNm ni la proteína en diferentes tejidos humanos tales como cerebro, corazón, pulmón, hígado y aorta (Álvarez-Pérez *et al.*, 2006).

También se ha demostrado que está involucrada en la regulación de la morfología, el depósito y la composición de los cristales de hidroxapatita así como en la regulación de la expresión de ALP, OPN y BSP en cementoblastos

putativos *in vitro* (Álvarez-Pérez *et al.*, 2003; Álvarez-Pérez *et al.*, 2006), por lo que es probable que juegue un papel destacado en la regulación local de la diferenciación de los cementoblastos y en la mineralización de la matriz extracelular del cemento. Recientemente se utilizó como marcador de cementoblastos derivados de las superficies radiculares de humano y además se confirmó su expresión en cemento, cementoblastos y células del ligamento periodontal (Kitagawa *et al.*, 2006 b). Otro estudio demostró que células derivadas del folículo dental tratadas con extracto derivado de proteínas de matriz del esmalte se diferenciaron a un fenotipo cementoblástico expresando CEMP1 y CAP, activándose la fosforilación de Smad-1 y activando la vía de MAPK para proliferación y diferenciación celular (Kémoun *et al.*, 2007).

## **6. Enfermedad Periodontal**

Las enfermedades que afectan el periodonto se pueden clasificar en dos grandes grupos. El primero incluye las enfermedades hereditarias que son el resultado de defectos genéticos en la estructura de las proteínas; éstos son causados por mutaciones, deleciones o inserciones en los genes. El segundo grupo de enfermedades incluye a las adquiridas, tales como enfermedades infecciosas que afectan al periodonto directamente o aquellas que son secundarias a enfermedades sistémicas, como la diabetes.

Las enfermedades adquiridas del periodonto incluyen gingivitis, periodontitis, agrandamiento (hiperplasia) gingival inducida por medicamentos, y otras enfermedades causadas por agentes etiológicos conocidos o desconocidos.

## **6.1. Gingivitis**

La Academia Americana de Periodontología la define como inflamación gingival (American Academy of Periodontology, 2001). Involucra una serie de eventos que desencadenan una respuesta inflamatoria aguda a la presencia de bacterias que colonizan las superficies dentales adyacentes a la encía, con el paso del tiempo la gingivitis se establece en el tejido conectivo gingival y manifiesta las características de una lesión inflamatoria crónica. Si la respuesta inflamatoria se extiende a tejidos más profundos y hay pérdida del nivel de la cortical ósea, la enfermedad se llama periodontitis.

## **6.2. Periodontitis**

La Academia Americana de Periodontología la define como la inflamación de las estructuras de soporte de los órganos dentarios acompañada de la pérdida de las mismas. Por lo general, es un cambio progresivamente destructivo dando como resultado pérdida de hueso y ligamento periodontal. Es una extensión de la inflamación de la encía hacia el hueso alveolar adyacente y al ligamento periodontal (American Academy of Periodontology, 2001). Comprende a una familia de enfermedades relacionadas que difieren en su velocidad y su patrón de progresión, su historia natural así como su respuesta a la terapia.

La periodontitis es una enfermedad infecciosa, crónica y episódica, que destruye las estructuras de soporte del diente (hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento radicular).

Asimismo, con el incremento actual de una mayor expectativa de vida y la preservación de los dientes hasta la vejez, debido a la fluoración del agua, la educación en salud bucal y la odontología preventiva, gradualmente se ha convertido en la enfermedad bucal de mayor prevalencia a nivel mundial y en un problema de salud pública (Barmes, 2000). El cemento radicular entonces, adquiere relevancia en el tratamiento para la regeneración de los tejidos periodontales destruidos o perdidos debido a la periodontitis, ya que la regeneración, constituye uno de los objetivos principales en la terapéutica periodontal (Zeichner-David, 2006).

## **7. Regeneración periodontal**

El término “regeneración” se refiere a la reproducción o reconstitución de una parte perdida o lesionada, a diferencia del término reparación que consiste en la cicatrización de una herida con tejido que no necesariamente restaura la arquitectura o la función de esa parte (American Academy of Periodontology, 2005).

Mientras más especializado sea un tejido menor es su capacidad de regeneración, los tejidos periodontales conservan la capacidad de división celular durante años y presentan una capacidad de regeneración limitada (Shimono *et al.*, 2003).

La terapia periodontal empleada actualmente está encaminada al control de la formación de la biopelícula, y otros factores de riesgo, tratando de detener la progresión de la enfermedad y lograr la regeneración y/o reparación de los tejidos de soporte, basándose en medidas antiinfecciosas tales como el curetaje, raspado y alisado radicular, regeneración tisular guiada, o el uso de factores de crecimiento. Para lograr la regeneración periodontal, es necesaria la nueva formación de hueso, cemento radicular, ligamento periodontal y encía, sin embargo, ninguno de los tratamientos actuales restaura por completo la arquitectura original del periodonto (Bruce *et al.*, 2005; Zeichner-David, 2006). Esto se debe principalmente a que se conoce poco acerca de los eventos moleculares, biológicos y los factores necesarios para que se lleve a cabo el proceso de la cementogénesis. Asimismo tampoco se conocen las células precursoras de los cementoblastos (Diekwisch, 2001; American Academy of Periodontology, 2005; Lindhe, 2003).

Actualmente, los injertos óseos y la regeneración tisular guiada (RTG) son las dos técnicas más utilizadas y mejor documentadas para lograr la regeneración periodontal.

En síntesis, la colocación de injertos óseos incluye autoinjertos (obtención de hueso de sitios intra o extraorales del propio paciente), aloinjertos (obtención de hueso de otro individuo, a partir de bancos de tejidos), injertos aloplásticos (colocación de injertos sintéticos o materiales inertes) como hidroxiapatita no porosa, cementos de hidroxiapatita, fosfato beta tricálcico, etc., y xenoinjertos (obtención de substitutos de hueso de un donador de diferente especie) también conocidos como hueso anorgánico ya que se procesan de forma tal que todos los componentes celulares y protéicos son

eliminados quedando únicamente un “andamio” bioabsorbible e inerte sobre el cual se supone que hay revascularización, migración osteoblástica y posteriormente la formación de hueso. Los resultados de estudios clínicos son controversiales, hay disminución en la profundidad de sondeo, incremento en el nivel óseo e incremento en el nivel de inserción cuando se comparan con curetajes abiertos, pero la utilidad en regeneración de defectos en furcaciones no está clara ni tampoco el índice de éxito es el mismo en todos los casos (American Academy of Periodontology, 2005).

La RTG consiste en la colocación de barreras ó membranas con la finalidad de permitir seleccionar la población celular que repoblará el sitio del defecto, excluyendo a las células del tejido conectivo gingival y evitando la formación de un epitelio de unión largo. Esto concuerda con los resultados experimentales que demuestran que dentro de las subpoblaciones de fibroblastos periodontales están las células en vías de diferenciación hacia un fenotipo cementoblástico. Estudios experimentales en animales han demostrado la nueva formación de cemento, ligamento periodontal y hueso cuando se usan las membranas para RTG (Academy Report, American Academy of Periodontology, 2005).

Existen barreras no absorbibles (politetrafluoroetileno expandido PTFEe) las cuales presentan como principal desventaja la necesidad de realizar un segundo procedimiento quirúrgico para retirarlas con el riesgo potencial de infección y/o contaminación bacteriana así como el someter al paciente dos veces al procedimiento quirúrgico. También hay barreras bioabsorbibles (colágena, ácido poliláctico) las que ofrecen resultados similares con la ventaja de no requerir un segundo procedimiento quirúrgico.



Es posible combinar los tratamientos, colocando un injerto de hueso y una barrera para tratar de mejorar el resultado clínico. Otro tipo de tratamientos incluyen el acondicionamiento radicular que básicamente es la desmineralización de la superficie radicular con ácido cítrico o con EDTA, inicialmente se sugirió que esto modificaba la superficie radicular y la descontaminaba, a la vez que se exponían las fibras de colágena; sin embargo, los resultados tampoco han sido consistentes (American Academy of Periodontology, 2005).

Las investigaciones más recientes se han centrado en la utilización de proteínas de matriz extracelular y factores de crecimiento. Las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP) han sido utilizadas ampliamente en modelos animales y se ha demostrado que inducen la formación de hueso ectópico y la nueva formación de cemento, sin embargo, en experimentos con perros se observó una alta incidencia de anquilosis cuando se empleó BMP-2. Se considera que aún hacen falta reportes clínicos e histológicos en humanos para establecer con claridad el potencial de estas moléculas en la RTG.

La detección de proteínas del esmalte en el cemento dio origen a la utilización de éstas como una alternativa más a la terapia regenerativa. Actualmente es muy común la utilización de un derivado de proteínas de matriz de esmalte de porcino conocido como Emdogain (EMD), (Bosshardt *et al.*, 2006; Zeichner-David, 2006). Experimentos *in vitro* han demostrado que las células del periodonto son reactivas, incrementando la proliferación y favoreciendo la adhesión, también tienen efecto en la expresión de moléculas asociadas a la biomineralización, regulando positivamente la expresión de OPN y negativamente la expresión de BSP y OCN (Swanson *et al.*, 2006). El EMD

se obtiene a partir de extractos crudos de matriz de dientes en desarrollo, se extraen las proteínas y se purifican obteniendo un material con 3 grupos principales de proteínas de esmalte, principalmente amelogeninas (y sus moléculas precursoras con splicings alternativos y productos de degradación), metaloproteinasas, serina proteasas, factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 (o una sustancia similar), y otros factores de crecimiento no identificados, su efecto sobre las células es a través de la vía de señalización de Smad-2. La actividad inductiva del EMD se ha determinado que es mediada por BMP-2 y BMP-4 (Bosshardt *et al.*, 2006; Zeichner-David, 2006). Los resultados en humanos son controversiales. Se ha demostrado que su utilización en humanos, promueve la expresión de BSP y OPN en el frente de mineralización esto se puede traducir clínicamente como osteogénesis y cementogénesis (Bosshardt *et al.*, 2006). Cultivos de osteoblastos *in vitro* a los que se les adicionó EMD, presentaron incremento en los niveles de ALP y OCN, ambas moléculas relacionadas a la biomineralización (Rincon *et al.*, 2005; Reseland *et al.*, 2006).

Otro material recientemente utilizado es un péptido putativo de unión a colágena, usando un derivado de matriz de hidroxiapatita de bovino anorgánica y una clona sintética de 15 aminoácidos de colágena, aunque a la fecha no se tienen datos histológicos suficientes (American Academy of Periodontology, 2005).

Se han utilizado otros factores de crecimiento principalmente por sus efectos mitogénicos o sobre la diferenciación, como el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento tipo insulínico (IGF) y el factor de crecimiento

fibroblástico (FGF). Los sistemas de liberación o aplicación para estas moléculas son variables, se han utilizado esponjas, geles o membranas de colágena o de gelatina. Esto influye en la cinética de degradación ya que idealmente debe coincidir con el crecimiento del hueso y del cemento. Se ha demostrado en modelos animales, que una degradación rápida del acarreador con la subsecuente liberación de BMP-2 induce la formación de hueso, mientras que una degradación lenta del acarreador con la liberación lenta de éste factor induce la formación de cemento (American Academy of Periodontology, 2005).

Actualmente, la ingeniería de tejidos ha tomado un papel importante en la búsqueda de una terapia regenerativa exitosa, por ejemplo, una propuesta es el auto injerto de células de ligamento periodontal sobre las superficies radiculares tratadas con factores quimiotácticos, autoinjertos de células madre de médula ósea y terapia génica.

El conocimiento sobre la localización de los precursores de los cementoblastos en el ligamento periodontal del adulto y de los factores que regulan el proceso de diferenciación, son limitados a la fecha. Las células de ligamento periodontal obtenidas de roedores y los explantes marcados *in vitro* y examinados a través de autoradiografía, revelaron la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en células paravasculares en el grosor del ligamento periodontal, lo cual indica que estas células darían origen a células progenitoras que a su vez se diferenciarían en los diversos linajes celulares presentes en el ligamento periodontal (McCulloch y Melcher, 1983 a, b., McCulloch, 1985., McCulloch y Bordin, 1991). Análisis fenotípicos de estas poblaciones celulares, hacen hincapié en su capacidad de expresar el fenotipo fibroblástico u osteogénico,

dependiendo de las condiciones de cultivo. Por ejemplo, las células de ligamento periodontal en cultivo expresan fosfatasa alcalina y responden a la hormona paratiroidea y a la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ , incrementando la producción de cAMP y osteocalcina, respectivamente (Groenveld *et al.*, 1995, Nojima *et al.* 1990). Asimismo, la dexametasona incrementa el fenotipo osteogénico en estos cultivos (Nohutcu *et al.*, 1995).

Células obtenidas de ligamento periodontal humano adulto, de bovino y de rata expresan propiedades de células con capacidad osteogénica como la expresión de osteocalcina, fosfatasa alcalina, la formación de nódulos mineralizados y exhiben una capacidad proliferativa alta *in vitro* en presencia de dexametasona y  $\beta$ -glicerofosfato (Arceo *et al.*, 1991, Cho *et al.*, 1992, Cheng *et al.*, 1994, Ramakrishnan *et al.*, 1995). Todas estas evidencias tomadas en conjunto sugieren que entre otros linajes celulares (diferentes linajes fibroblásticos y el linaje osteoblástico), la población o subpoblaciones celulares del ligamento periodontal podrían contener el linaje cementoblástico, el cual se originaría de las zonas paravasculares del ligamento periodontal (Gould *et al.*, 1977, 1980, Piche *et al.*, 1989). Los factores que disparan la proliferación de los precursores de los cementoblastos, controlan la migración celular dirigida hacia la superficie radicular y regulan su diferenciación en el periodonto adulto hacia el fenotipo requerido (Nanci y Bosshardt, 2006), permanecen como preguntas abiertas. Para contestar estas interrogantes es necesario identificar, aislar y caracterizar poblaciones celulares que expresen el fenotipo del cemento radicular. Sin embargo, existen dos principales dificultades para lograr este objetivo. Por su localización, su distribución y sus relaciones con los demás tejidos del periodonto, el aislamiento de una población celular que represente el

fenotipo cementoblástico sin la presencia de otro tipo de células del ligamento periodontal es técnicamente complejo y el número de células es escaso (Bartold y Narayanan, 2006). Otra de las dificultades para caracterizar este tejido a nivel molecular, es que comparte muchos marcadores moleculares con el hueso, sin embargo, recientemente se han aislado proteínas presentes en el cemento que a la fecha constituyen los únicos marcadores biológicos de éste tejido. Uno de ellos se conoce como proteína de adhesión del cemento (CAP) la cual sirve como marcador putativo de las células progenitoras de los cementoblastos (Arzate *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1997). El otro, es una proteína derivada del medio condicionante de un cementoblastoma humano llamado proteína del cemento (CP). Ambas proteínas parecen estar relacionadas inmunológicamente. Los anticuerpos generados contra estas proteínas reconocen la capa cementoide, la capa cementoblástica, cementocitos, células progenitoras localizadas en la zona paravascular en el ligamento periodontal y en espacios endosteales del hueso (McCulloch, 1985), cementoblastos putativos *in vitro*, células derivadas del folículo dental y células del ligamento periodontal humano (Bosshardt, 2005). Por lo que la estrategia que se desarrolló para este fin fue el cultivo de células derivadas de un explante de cementoblastoma humano (Arzate *et al.*, 1992; Arzate *et al.*, 1998). A partir de éste cultivo se han aislado proteínas derivadas del cemento radicular cuyo papel en la cementogénesis y por lo tanto en la biomineralización se desconocen (Álvarez-Pérez *et al.*, 2006).

Partiendo del cultivo de células derivadas del cementoblastoma humano se desarrolló la siguiente estrategia:

Se construyó una biblioteca de ADNc en un vector  $\lambda$ -ZAP Express EcoRI/XhoI usando el ARNm obtenido de las células derivadas del cementoblastoma. Se recuperaron los insertos de ADNc como plásmidos Bluescript escindiéndolos de la biblioteca  $\lambda$ -ZAP usando el fago ayudador ExAssist.

Se prepararon cajas de cultivo para llevar a cabo el protocolo de panning de acuerdo al método descrito previamente (Wysocky y Sato, 1978). Brevemente, las cajas de cultivo se cubrieron con un anticuerpo de cabra IgG anti-conejo. Se bloquearon con albúmina sérica de bovino en solución amortiguadora de fosfatos. Se transfectaron células COS-7 usando lipofectamina, con el ADN plasmídico recuperado de la biblioteca. Después de 24 a 48 horas, las células se despegaron de la caja de cultivo y se resuspendieron en solución amortiguadora de fosfatos salinos (PBS) con 10mM de EDTA y 5% de suero fetal bovino (SFB) que contenía un anticuerpo policlonal anti-CP a una dilución 1:1000, se incubaron en hielo una hora. Se diluyeron las células 1:1 con PBS 1mM EDTA y 0.05% NaN<sub>3</sub> y 10 ml de PBS, 1 mM EDTA y 0.05% NaN<sub>3</sub> con 2% de Ficoll 400. Se centrifugaron y el sobrenadante se retiró, el botón de células se resuspendió en PBS 1 mM EDTA/5% SFB. Las células se incubaron durante dos horas en las placas previamente cubiertas con el anticuerpo IgG, posteriormente se lavaron con suavidad tres veces con PBS y 1mM EDTA/5% SFB. Las células que permanecieron adheridas se retiraron con un raspador de células y el plásmido fue recuperado. El ADN fue utilizado para transformar células competentes de *E.coli*, las colonias resultantes fueron agrupadas y crecieron en medio LB con kanamicina (50 $\mu$ g/ml). El proceso de panning se repitió tres veces o más para

enriquecer la cantidad de clonas positivas. Los plásmidos obtenidos de colonias individuales fueron analizados por el tamaño del inserto a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los arrancadores T3 y T7. Finalmente el plásmido fue digerido con las enzimas de restricción apropiadas. El plásmido también fue secuenciado de forma bidireccional usando un secuenciador de ADN ABI Prism (Dye-termination chemistry). Los cambios de nucleótidos fueron detectados por la presencia de dobles picos en el cromatograma para la muestra de ADN heterocigota y se confirmó por la secuenciación de la dirección opuesta.

En nuestro laboratorio hemos aislado esta proteína derivada del cemento llamada proteína del cemento-1 (CEMP-1) o CP-23 (GenBank Accession Number NM\_001048212; HGNC: ID 32553). El ARNm se detectó en células derivadas de cementoblastoma y fibroblastos del ligamento periodontal, no se detectó en fibroblastos gingivales ni osteoblastos alveolares, el análisis en diferentes tejidos de humano por medio de hibridación *in-situ* y RT-PCR determinó que el ARNm no se expresa en cerebro, hígado, placenta, músculo esquelético, riñón páncreas, pulmón, bazo y colon. Se ha demostrado que se expresa de forma importante a nivel de ARNm y proteína en cementoblastos y células progenitoras de los espacios endosteales (Álvarez-Pérez *et al.*, 2006), y participa en el proceso de mineralización de cementoblastos cultivados *in vitro*, regulando la morfología, crecimiento y composición de los cristales de hidroxiapatita (Álvarez-Pérez *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren que CEMP1 puede ser una molécula con actividad biológica trascendente, participando en la regulación de la biomineralización, al mismo tiempo puede

ser utilizada como marcador biológico para la identificación del fenotipo cementoblástico.



## 8. Planteamiento del Problema

La gingivitis y la periodontitis son enfermedades de prevalencia mundial que pueden afectar a cerca del 90% de la población y son de etiología multifactorial con componentes genéticos, nutricionales, bacterianos, ambientales ó como manifestación de otras patologías (Bruce *et al.*, 2005). La terapia periodontal empleada en la actualidad no ofrece resultados predecibles por lo que el conocimiento de moléculas nuevas que participan en la cementogénesis nos dará información valiosa de los mecanismos moleculares involucrados durante la cementogénesis, lo que puede traducirse en un futuro en el replanteamiento de la terapéutica periodontal actual. Nuestros hallazgos abren las expectativas para definir el fenotipo molecular y para el estudio de los mecanismos reguladores del proceso de la cementogénesis *in vitro* por primera vez. Esto traería como consecuencia entender el papel regulador y posiblemente la comprensión de cómo el cemento podría ser el tejido clave para lograr la regeneración de los tejidos periodontales perdidos debido a la periodontitis.

## 9. Justificación

La identificación y aislamiento de un gen específico del cemento radicular abre por primera vez la oportunidad para identificar, aislar y caracterizar el linaje cementoblástico y más importante aún, para determinar los mecanismos celulares y moleculares que regulan el proceso de la cementogénesis durante el desarrollo y la regeneración del periodonto tanto *in vivo* como *in vitro*. Este conocimiento, contribuirá substancialmente al entendimiento de los determinantes fundamentales de la regeneración de los tejidos periodontales y podría ayudar al desarrollo de nuevas terapias para reconstruir el periodonto.

## **10. Hipótesis**

La transfección del gen CEMP1 en células no esqueléticas como los fibroblastos gingivales humanos (HGF), inducirá el cambio hacia un fenotipo mineralizante, con expresión de moléculas relacionadas con el proceso de biomineralización como fosfatasa alcalina (ALP), ameloblastina (AMBN), amelogenina (AMEL), sialoproteína ósea (BSP), proteína de adhesión del cemento (CAP), el factor de transcripción core binding factor alpha 1 (Cbfa1), colágena tipo I (COL I), enamelina (ENAME), osteopontina (OPN) y osteocalcina (OCN).

## **11. Objetivo General**

Determinar la actividad biológica del gen CEMP1 en la expresión de moléculas asociadas al proceso de biomineralización en una línea celular no esquelética (no mineralizante) *in vitro*.

## **12. Objetivos Específicos**

- Transfectar fibroblastos gingivales humanos con el gen CEMP1.
- Determinar el cambio en el perfil de expresión de los genes de ALP, AMBN, AMEL, BSP, Cbfa-1, COL I, CEMP1, ENAM, OCN, OPN, COL I.
- Inmunodetectar los productos génicos de ALP, AMBN, AMEL, BSP, Cbfa-1, CEMP1, OCN, OPN.
- Determinar si las células transfectadas son capaces de producir una matriz mineralizada.
- Cuantificar la cantidad de calcio depositado en cultivo.
- Analizar el tipo de mineral depositado por EDS-X

## **13. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **13.1. Cultivo Celular**

Se aislaron y se cultivaron fibroblastos gingivales humanos (HGF), como se ha descrito previamente (Narayanan y Page, 1976). En algunos casos las células se incubaron hasta 96 horas en medio esencial mínimo modificado (DMEM) con 5% de suero fetal bovino (SFB) (proliferación celular) o en medio mineralizante (10% SFB, 10mM  $\beta$ -glicerofosfato y 50  $\mu$ g/ml de ácido ascórbico preparado recientemente). Para todos los procedimientos experimentales se usaron HGF entre el 2° y 5° pasaje.

### **13.2. Construcción del vector de expresión pcDNA40-CEMP1-6XHis y transfección de fibroblastos gingivales humanos.**

Se clonó la región codificante del gen CEMP1 (GenBank Accession No AY584596) en el vector pENTR/SD/D (Invitrogen, Carlsbad, CA). El ADNc resultante de esta construcción pENTR/SD/D-CEMP1 se ligó al vector pcDNA40 (+) usando los sitios de restricción EcoR1, el vector cuenta con una bandera de 6 histidinas en la terminal carboxilo, y este vector codifica para la resistencia a G418, para selección de clonas.

El plásmido resultante, pcDNA40-CEMP1 se transfectó en HGF usando lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA.) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las células control se transfectaron usando el vector vacío pcDNA40 usando el mismo procedimiento. Dos días después de la expresión

estable del producto de pcDNA40-CEMP1, las células HGF se seleccionaron usando 600 µg/ml de G418 (Sigma Chemical, Co. St. Louis, MO) durante ocho semanas. Las clonas positivas para el DNA introducido fueron monitoreadas por Western Blot (anti 6X His COOH) y por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los arrancadores específicos para CEMP1. Después de las ocho semanas, los cultivos expandidos de HGF que expresaban CEMP1 de forma estable fueron mantenidas en medio DMEM suplementado de la forma descrita anteriormente y G418 a una concentración de 200 µg/ml.

### **13.3. Proliferación celular**

Para determinar si las HGF-pcDNA40-CEMP1 (HGF-CEMP1) y las HGF pc-DNA40 tenían diferente grado de proliferación, se sembraron  $2.5 \times 10^3$  células en cajas de cultivo de 48 pozos y se incubaron 24 horas en medio DMEM 10% SFB. El día siguiente (día 0) se cambió el medio por medio DMEM con SFB 10% y las células se cultivaron hasta 96 horas. Las células se tripsinizaron (0.05% tripsina y 0.02% EDTA) y se contaron con un contador de cultivo modelo ZBI (Coulter Electronics, Hialeah, FL). El número de células se valoró a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas. Los experimentos se hicieron por triplicado y se repitieron dos veces.

#### **13.4. Ensayos de Mineralización**

Se sembraron HGF-CEMP1 y HGF-pcDNA40 a alta densidad ( $2 \times 10^5$  células) en cajas de cultivo de 6 pozos y se incubaron 24 horas para que se adhirieran. Se trataron con medio DMEM suplementado con SFB 10% y medio mineralizante (10 mM  $\beta$ -glicerofosfato y 50  $\mu$ g/ml de ácido ascórbico recién preparado). El medio se cambió cada 2 a 3 días y las células se cultivaron hasta por 3, 7 y 14 días. Al término de cada período las células se fijaron con etanol al 96% durante 10 minutos, y el depósito de mineral se determinó usando una solución saturada de alizarina roja S pH 4.2 (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO), añadiéndosela a las células fijadas durante 5 minutos. Para la cuantificación, el colorante se extrajo con ácido acético 10% (v/v), se centrifugó y los sobrenadantes se colocaron en una placa de ELISA y la absorbancia se leyó a 405 nm (Gregory *et al.*, 2004). La concentración de alizarina roja se determinó comparando los valores de absorbancia con los valores obtenidos con una curva estándar de alizarina roja S. Los experimentos se hicieron por triplicado y se repitieron tres veces.

#### **13.5. Microanálisis de energía dispersa de Rayos X**

La composición de la matriz extracelular formada por HGF-CEMP1 y HGF-pcDNA40 se analizó por medio de un microscopio electrónico de barrido Leica-Cambridge 440, el cual tiene una microsonda Pentafet para microanálisis de energía dispersa de rayos X. Las superficies de cultivo se recubrieron con una película de oro de 100nm de grosor aproximadamente

para evitar cargas electrónicas que afectaran el microanálisis. Todos los análisis se hicieron a 20kV durante 300 segundos.

### **13.6. Ensayos de actividad específica de fosfatasa alcalina**

Se sembraron  $20 \times 10^4$  HGF-CEMP1 y HGF-pcDNA40 en cajas de cultivo de 24 pozos y se cultivaron durante 3, 7 y 14 días en las mismas condiciones descritas anteriormente. La actividad de la fosfatasa alcalina se determinó como se ha descrito con anterioridad (Lowry *et al.*, 1954). Las muestras se analizaron en condiciones que aseguraron linealidad con respecto al tiempo y a la concentración de proteína. La actividad se expresa como nanomoles de p-nitrofenol por minuto por miligramo de proteína. El contenido de proteína se determinó usando albúmina sérica bovina BSA como estándar como se ha descrito previamente (Bradford, 1976). Los experimentos se hicieron por triplicado y se repitieron tres veces.

### **13.7. Análisis por retrotranscripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)**

Se sembraron  $5 \times 10^4$  HGF-CEMP1 y HGF-pcDNA40 en cajas de cultivo de seis pozos y se cultivaron durante 3, 7 y 14 días de la misma forma que se describe anteriormente. Se aisló el ARN celular total usando el kit RNeasy Mini Kit (Quiagen, Valencia CA, USA) como se ha descrito previamente (Arzate *et al.*, 2005). Se utilizó  $1\mu\text{g}$  de ARN total para la reacción de one step RT-PCR (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las indicaciones del fabricante



durante 35 ciclos en un termociclador (MJ Research, Watertown, MA, USA). Se utilizaron secuencias de arrancadores y condiciones para las reacciones previamente publicadas para la amplificación de las siguientes moléculas: amelogenina (AMEL), ameloblastina (AMBN), enamelina (ENAME), fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN), colágena tipo I (COL I), sialoproteína ósea (BSP), core binding factor a (CBFA-1), proteína del cemento 1 (CEMP1), gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y proteína de adhesión del cemento (CAP). Los productos de la reacción se separaron y se visualizaron en geles de agarosa 2% con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, su identidad se confirmó secuenciando los productos. Los experimentos se repitieron tres veces.

### **13.8. Inmunotinciones**

Se sembraron  $5 \times 10^2$  HGF-CP23 y HGF-pcDNA40 en portaobjetos de cultivo de ocho pozos Lab-Tek; permitiéndoseles adherirse toda la noche y cultivándolas durante tres días en las condiciones descritas anteriormente. Las células se fijaron con paraformaldehído 4% y se permeabilizaron con PBS con Tritón X-100. Posteriormente se bloquearon con PBS con albúmina sérica bovina al 2% toda la noche, y después se incubaron una hora las siguientes diluciones de anticuerpos: 1:300 de anticuerpo (IgG) policlonal de conejo anti-hrCP-23, 1:1000 de anticuerpo monoclonal anti-His (C-term), 1:1000 de anticuerpo monoclonal anti-OCN (Calbiochem, Germany), 1:500 de anticuerpo policlonal anti-BSP, 1:500 de anticuerpo policlonal anti-OPN (ambos obsequios del Dr. Larry W. Fisher, NIH, Bethesda, MD, USA), 1:500 de anticuerpo

monoclonal anti-CAP de bovino (3G9) (obsequio del Dr. Narayanan, Seattle, WA), 1:500 de anticuerpo policlonal de cara anti-fosfatasa alcalina humana (Santa Cruz Biotech. Santa Cruz, CA). Las células se inmunotificaron como se ha descrito anteriormente (Arzate *et al.*, 1996). Los controles negativos fueron laminillas incubadas sin el primer anticuerpo o con suero pre-inmune de conejo. Los experimentos se repitieron dos veces.

### **13.9. Hibridación *in situ***

Se sembraron  $5 \times 10^2$  HGF-CEMP1 y HGF-pcDNA40 en portaobjetos de cultivo de ocho pozos Lab-Tek permitiéndoles adherirse toda la noche y cultivándolas durante tres días en las condiciones descritas anteriormente. Al término de este tiempo, las laminillas se trataron con proteinasa K (20  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 30 minutos, se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído 4% durante 1 hora, y se lavaron con trietanolamina (TEA) 0.1M pH 8.0; con anhídrido acético en 0.1 M TEA, pH 8.0, seguido de PBS. Se incubaron durante toda la noche a 68°C con solución amortiguadora estándar de hibridación con 100 ng/ml de sonda sentido o antisentido marcadas con digoxigenina. Después de la hibridación, las laminillas se lavaron en 5X SSC a 50°C durante 5 minutos y se incubaron con RNAsa A (40  $\mu\text{g/ml}$ ) a 37°C durante 30 minutos. Las laminillas se lavaron con solución de lavado 1X a 37°C durante 5 minutos y se procedió a la detección inmunológica con el ensayo de detección anti-DIG (Boheringer Mannheim, Germany). La reacción se detuvo lavando con PBS pH 6.5, las laminillas se lavaron con agua, se montaron con DABCO y se analizaron con microscopia de luz (Zeichner-David *et al.*, 2003).

### 13.10. Northern Blot

Se extrajeron 5  $\mu$ g de RNA de HGF-CEMP1 y HGF-pcDNA40 usando el kit Oligotex Direct mRNA Mini Kit (Quiagen, Valencia, CA). Los ARNm se separaron electroforéticamente, en un gel de agarosa 1% con formaldehído y se transfirieron a membranas de nylon N+ (Schleicher & Schuell) por difusión capilar (Álvarez-Pérez *et al.*, 2006). Para inmovilizar a los ARNm a las membranas se fijaron entrecruzándolos con luz UV. Las membranas se prehibridaron en 10 ml de amortiguador DIG-Easy-Hyb (Boehringer Mannheim, Germany) a 68°C durante 2 horas y se hibridaron con una sonda del ADNc completo de CEMP1 marcado con DIG (500 ng/ml). Se adicionaron 10 ml de la sonda marcada a la solución de prehibridación y se incubaron toda la noche en las mismas condiciones descritas para la prehibridación. Posteriormente se lavaron las membranas dos veces, 5 minutos cada vez en 2X SSC (1X SSC: 150mM NaCl, 15 mM citrato de sodio pH 7.0, 0.1% SDS) a temperatura ambiente y dos veces por cinco minutos en 0.1X SSC/0.1% SDS a 68°C. Para detectar la hibridación ARN-ARN, las membranas se incubaron durante 1 hr en solución bloqueadora y después se incubaron durante 30 minutos con el anticuerpo conjugado anti-DIG-AP (1:10,000). Se lavaron dos veces por 15 minutos y después las membranas se equilibraron en amortiguador de detección durante 5 minutos. La detección se llevó a cabo con el sistema CDPStar (Boehringer Mannheim, Germany) listo para usarse. El tiempo de exposición de la película radiográfica varió desde 15 segundos hasta toda la noche para la detección de la señal.

### 13.11. Western Blot

Se sembraron  $5 \times 10^4$  HGF-CEMP1 y HGF-pcDNA40 en cajas de cultivo de seis pozos y se cultivaron durante 3, 7 y 14 días de la misma forma que se describe anteriormente, el medio condicionante se retiró a los diferentes tiempos como se ha descrito previamente. Al medio condicionante recolectado, se le adicionó fenilmetilsulfonilfluoruro 1mM, leupeptina 5  $\mu$ g y aprotinina 10 $\mu$ g/ml. Se separaron las proteínas en un gel de poliacrilamida-SDS 12% y posteriormente se transfirieron las proteínas electroforéticamente a una membrana Immobilon-P (PVDF) de nitrocelulosa (Millipore Corp., Bedford, MA). Las membranas se bloquearon con leche descremada 5% durante 1 hora y después se incubaron las siguientes diluciones de anticuerpos: 1:300 anticuerpo policlonal de conejo anti-hrCP-23, 1:5000 anticuerpo monoclonal anti-6XHis (C-term) HRP, 1:500 anticuerpo policlonal de cabra anti-fosfatasa alcalina de humano, 1:500 anticuerpo monoclonal anti-CAP de bovino, 1:500 anticuerpo policlonal de conejo anti-OPN humana, 1:500 anticuerpo policlonal de conejo anti-BSP humana, y 1:500 anticuerpo monoclonal anti-OCN, durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavar las membranas, se incubaron con una dilución 1:1000 de anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano ó 1:1000 de anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano durante 1 hora, y después se lavaron con PBS. Los Western Blots se revelaron usando quimioluminiscencia (enhanced chemiluminiscent HRP substrate (Millipore Billerica, MA)). Los Western Blots se repitieron tres veces, como control interno se usó la proteína  $\beta$ -actina.

## 14. RESULTADOS

### 14.1. Expresión de CEMP1 en fibroblastos gingivales humanos

Para determinar el probable papel de la CEMP1 como inductor de mineralización, se utilizaron fibroblastos gingivales humanos (HGF) los cuales son células no mineralizantes y además, estas células no expresan ni el ARNm de CEMP1 ni la proteína. Se introdujo el gen CEMP1 a los HGF usando una construcción con el vector pcDNA40-CEMP1. Para confirmar la transfección estable de CEMP1, la expresión del ARNm de CEMP1 se determinó por medio de Northern Blots, hibridizando una sonda de ADNc marcada con DIG, la cual se observó en las células transfectadas con CEMP1 como una banda de aproximadamente 5.0 Kb. Esta banda no estaba presente en el ARNm transfectado con el vector pcDNA40 vacío. El análisis de hibridación *in situ* usando una sonda correspondiente a la región codificante de CEMP1 claramente demuestra el alto nivel de expresión en las HGF transfectadas y que expresan establemente el ARNm de CEMP1 (Figura1). No se detectó expresión en HGF transfectados con el vector pcDNA40 vacío. Para asegurar que el ARNm estaba siendo traducido a proteína se hicieron análisis por western blot usando un anticuerpo monoclonal anti-6XHis y un anticuerpo policlonal anti-hrCP-23, ambos análisis reconocieron una banda de 50 kDa, confirmando la expresión de la proteína CEMP1 (Figura 2).

## **14.2. Proliferación celular**

Para determinar si la expresión de CEMP1 tenía un efecto en la proliferación celular, ésta última fue analizada. Como se observa en la figura 2, las células HGF transfectadas con CEMP1 presentaron un nivel de proliferación 2.5 veces mayor que las células transfectadas con el vector vacío en todos los periodos de tiempo analizados. Estos resultados indican que la expresión de la proteína CEMP1 incrementa los niveles de proliferación de las células HGF (Figura 3).

## **14.3. Mineralización.**

Para determinar si la expresión de CEMP1 tiene un efecto en el proceso de diferenciación de HGF hacia un fenotipo celular “de tipo mineralizante” se cultivaron HGF-pcDNA40-CEMP1 y HGF-pcDNA40 en medio mineralizante. Durante los períodos de proliferación y diferenciación, se detectó la formación de nódulos de calcio característicos de células de “tipo mineralizante” por medio de tinción con alizarina roja S. Los nódulos de calcio no se detectaron en las células HGF control transfectadas únicamente con el vector vacío. Por el contrario, las células transfectadas que expresaban CEMP1 fueron positivas a la tinción con alizarina, lo que indica que CEMP1 induce la mineralización en células que normalmente no mineralizan. Los fibroblastos gingivales humanos que expresaban establemente CEMP1 presentaron niveles de calcio 6 y 3.8 veces más que los controles a los 7 y 14 días (Figura 4).

#### **14.4. Micro-análisis por EDS-X**

La composición y la razón Ca/P de la matriz extracelular depositada por los HGF que expresaban CEMP1 reveló picos de energía prominentes para calcio y fósforo similares a los de la apatita biológica. Las células HGF-CEMP1 tuvieron un porcentaje atómico de calcio de 68, 70 y 63 a los 3, 7 y 14 días respectivamente, mientras que el fósforo representaba un porcentaje atómico de 24, 21 y 32. Los valores de la razón Ca/P fueron de 1.7, 1.2 y 1.9 a los 3, 7 y 14 días de cultivo y coinciden con los valores de hidroxiapatita de origen biológico. Los cultivos control tuvieron valores mínimos de calcio (0.7, 0.0 y 0.25 a los 3, 7 y 14 días respectivamente); el porcentaje atómico del fósforo fue de 0.31, 0.36 y 0.99 a los 3, 7 y 14 días de cultivo. La razón Ca/P fue de 0.2, 0.0 y 0.1 a los 3, 7 y 14 días. Estos datos confirman que los fibroblastos gingivales humanos no mineralizan aún en presencia de “medio mineralizante” mientras que la expresión de CEMP1 promueve la mineralización y la formación de nódulos mineralizados “de tipo apatita” en estas células (Figura 5).

#### **14.5. Actividad específica de fosfatasa alcalina.**

La inducción de la actividad específica de fosfatasa alcalina es un mecanismo a través del cual CEMP1 podría promover la mineralización de los fibroblastos gingivales humanos. Por lo tanto, se examinó la actividad específica de fosfatasa alcalina para analizar el efecto en la diferenciación de los HGF hacia un fenotipo mineralizante por la expresión de CEMP1. La

actividad específica de fosfatasa alcalina se midió a los 3, 7 y 14 días. Los niveles de actividad específica de ALP a los 3, 7 y 14 días fue 4, 5 y 4.5 veces mayor en HGF que expresaban CEMP1 que en HGF, la diferencia fue significativa ( $P=0.001$ ,  $n=3$ ) usando la prueba de t de Student. Estos resultados indican que CEMP1 puede alterar la actividad de ALP y así inducir la mineralización ya sea por el incremento en la producción de ALP o fomentando la actividad de la enzima la cual se ve aún más incrementada después de la diferenciación (Figura 6).

#### **14.6. Caracterización del fenotipo expresado por las células transfectadas de forma estable con CEMP1.**

El fenotipo de las células HGF transfectadas con CEMP1 se examinó inicialmente usando RT-PCR y se comparó con células HGF transfectadas con el vector vacío. Como las células transfectadas producen una matriz mineralizante, se limitó el análisis a aquellos genes que se asocian a la formación del esmalte, hueso y cemento radicular. Se hizo RT-PCR de un paso (one-step) usando arrancadores (iniciadores) para el gen constitutivo GAPDH y arrancadores (iniciadores) para los genes a estudiar. El único ARNm expresado por las células HGF fue colágena I. No se expresó ningún otro ARNm en estas células a excepción de una banda discreta de ALP a los 14 días de cultivo. Sorprendentemente, la expresión del ARNm de amelogenina (AMEL), una molécula asociada al esmalte, se indujo a los 3 y 7 días de cultivo, mientras que el ARNm de ameloblastina (AMBN), asociada al esmalte y al cemento se indujo hasta los 14 días en las células transfectadas con CEMP1. La expresión



de enamelina, un gen específico del esmalte se indujo en los tres períodos de tiempo y alcanzó su máximo nivel a los 14 días de cultivo. Todos los marcadores de tejido mineralizado que se analizaron se expresaron de forma importante en las HGF transfectadas con CEMP1 en todos los períodos de tiempo analizados. El ARNm de la proteína de adhesión del cemento (CAP) se expresó claramente a los 3 días de cultivo. El ARNm del factor de transcripción y marcador de mineralización core binding factor alpha-1 (Cbfa-1) también se expresó y se mantuvieron niveles similares a los 3, 7 y 14 días. Estos hallazgos en conjunto, podrían indicar que las células HGF transfectadas con CEMP1 adquieren un fenotipo mineralizante el cual incluye una mezcla de características de cemento y hueso (Figura 7).

#### **14.7. Inmunocitoquímica**

La expresión a nivel de proteína se determinó inicialmente usando microscopía de inmunofluorescencia. Se colectaron células a los 3 días de cultivo y se analizó la expresión de cada una de las moléculas (ALP, AMBN, AMEL, ENAME, BSP, CAP, CEMP1, OCN y OPN) en células HGF transfectadas con CEMP1 y en HGF transfectadas con el vector vacío. Los resultados demuestran que la expresión de todas las moléculas se observaron en el citoplasma y la expresión de CEMP1 también fue perinuclear. Los fibroblastos gingivales humanos transfectados con el vector vacío expresaban de forma casi imperceptible ALP.

## 14.8. Western Blot

Para confirmar la expresión de las proteínas se hicieron análisis de inmunodetección por Western Blot. Los resultados se correlacionan con los obtenidos de los análisis por RT-PCR, lo que indica que los cambios en el fenotipo de las células HGF que expresan CEMP1 también se dieron a nivel de expresión de proteínas. Nuevamente, las células HGF no expresaron ninguno de los genes analizados, que se sabe están asociados a la mineralización, con la excepción de la expresión discreta de ALP. Las células transfectadas expresaron ALP, BSP, CAP, CEMP1, OCN y OPN en los días analizados. Los análisis de densitometría indicaron que los niveles de BSP alcanzaron el nivel máximo a los 7 días y decrecieron a los 14 días. La osteocalcina alcanzó su nivel máximo al final del período de cultivo (14 días). Las proteínas amelogenina y ameloblastina fueron inmunodetectadas a los 3, 7 y 14 días de cultivo. La proteína de adhesión del cemento, un marcador biológico del cemento, mantuvo niveles homogéneos de expresión en los tres tiempos analizados. CEMP1 también se expresó en los tres tiempos, sin embargo, alcanzó su valor máximo a los 14 días de cultivo. Los resultados indican que la expresión de CEMP1 promueve cambios fenotípicos importantes ya que CEMP1 induce la expresión de marcadores de tejido mineralizado en fibroblastos gingivales humanos, los cuales son células que no están involucradas ni en el proceso de mineralización ni en el proceso de cementogénesis (Figura 8).

## 15. Discusión y Conclusiones

El tratamiento de la enfermedad periodontal, gracias a los avances en biología, medicina y odontología, ha evolucionado a partir de solamente combatir a los microorganismos hasta intentar eliminarlos, detener la progresión del daño a los tejidos y tratar de regenerar los tejidos perdidos o dañados. Aunque las técnicas de regeneración han estado disponibles desde hace algunos años, y algunas han ofrecido resultados prometedores, ninguna de las técnicas ha demostrado 100% de efectividad (Zeichner-David, 2006), porque aún no se conocen los mecanismos que regulan la diferenciación de los precursores mesenquimales hacia un fenotipo cementoblástico, ya que es difícil determinar cuales son los factores necesarios para lograr la regeneración periodontal (Kémoun *et al.*, 2007).

La regeneración de los tejidos periodontales depende de 4 componentes básicos. Las señales apropiadas, los elementos celulares, el aporte sanguíneo y el andamiaje necesario para el relleno del defecto de los tejidos. Cada uno de estos elementos juega un papel fundamental en el proceso de curación. Las células proveen la maquinaria necesaria para el nuevo crecimiento tisular y diferenciación. Los factores de crecimiento o morfógenos modulan la actividad celular y proveen los estímulos necesarios para que las células se diferencien y produzcan la matriz extracelular del tejido en desarrollo. Los nuevos lechos vasculares proveen el aporte nutricional necesario para el crecimiento y la homeostasis del tejido. Finalmente, los andamios guían y crean una estructura

(templado) tridimensional para facilitar los procesos descritos y promover la regeneración del tejido (Taba *et al.*, 2005).

En los últimos años se ha puesto especial énfasis en la identificación y el aislamiento de las moléculas informacionales derivadas de la matriz extracelular de los tejidos periodontales (Shimono *et al.*, 2003), en este caso en particular, la matriz del cemento, con la finalidad de conocer con detalle su mecanismo de acción durante la cementogénesis y su posible aplicación en la terapia de regeneración periodontal.

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que la función de CEMP1 se encuentra asociada al proceso de biomineralización y que está involucrada en procesos celulares críticos como la diferenciación ya que induce la transcripción y expresión de genes asociados a tejidos mineralizados en células no mineralizantes, estudios previos han demostrado que CEMP1 es uno de los factores que regulan el depósito de mineral en cementoblastos putativos de humano *in vitro*.

La producción de una matriz mineralizada solamente la presentaron las células transfectadas con el gen CEMP1 ya que las células transfectadas con el vector vacío permanecieron con un fenotipo no mineralizante. La matriz mineralizada se analizó con EDS-X y los valores de las razones Ca/P fueron similares a los de la hidroxiapatita de origen biológico (1.64). Para que se lleve a cabo la biomineralización se requiere de la participación de ALP en los estadios iniciales, proveyendo los Pi los que aparentemente son los iniciadores de la formación de mineral, por lo que los niveles de actividad específica son indicadores tempranos de la mineralización de la matriz (Van den Bos *et al.*, 1999) y el incremento en la transcripción en la traducción a proteína y el

aumento en los niveles de actividad específica de ALP se puede correlacionar con el inicio de la biomineralización, ya que son indicadores de un estadio de diferenciación celular mineralizante. Nuestros resultados sugieren que el ARNm de ALP se incrementó durante la proliferación celular, la maduración de la matriz y la mineralización subsecuente, por lo que el aumento en la actividad es a nivel de regulación positiva de transcripción y traducción.

También observamos un incremento en la proliferación celular, lo que es un fenómeno reportado previamente cuando se transfectan genes a células que no los expresan normalmente (Kim *et al.*, 2006; Tu *et al.*, 2006).

Para caracterizar el fenotipo celular, seleccionamos genes asociados al fenotipo cementoblástico y determinamos si habían adquirido este fenotipo, analizándolos a nivel de ARNm y de proteína. Las moléculas asociadas a la fase mineral regulando la nucleación, el crecimiento y maduración de los cristales de hidroxiapatita, como BSP, OCN y OPN en las células transfectadas con CEMP1 fueron regulados positivamente. Los niveles máximos de ARNm y proteína de BSP se presentan durante las etapas iniciales de mineralización y decrecen durante las etapas posteriores de mineralización de la matriz. Esto significa que BSP puede estar actuando como nucleador de los cristales de hidroxiapatita en las etapas iniciales de mineralización y como inhibidor dirigiendo el crecimiento de los cristales durante las etapas posteriores de mineralización (Hunter y Goldberg, 1993). En nuestros experimentos, la osteocalcina alcanzó su nivel máximo de expresión en los estadios iniciales de mineralización, pero a nivel de proteína observamos un incremento temporal alcanzando el nivel máximo cuando se presenta la mineralización probablemente actuando como promotor e inhibidor/regulador

de la mineralización, esto sugiere que la proteína OCN es esencial en la regulación de la mineralización de la matriz (Yagami, 1999).

Los niveles de ARNm de OPN se mantuvieron bajos de forma constante durante el período de cultivo y decrecieron durante la fase de mineralización, pero a nivel de proteína se observó un incremento con el transcurso del tiempo. Es probable que interactúe con la hidroxiapatita actuando como inhibidor de mineralización en etapas tardías. Los niveles de expresión de colágena I que observamos coinciden con el concepto que postula que la colágena define el armazón o andamio para el depósito de mineral, pero por sí sola no es capaz de actuar como nucleador de cristales de hidroxiapatita. Nuestros resultados nos permiten pensar que las células transfectadas con CEMP1 favorecen la cristalización de hidroxiapatita por la participación de las proteínas no colágenas.

La expresión de BSP y OPN, son características de los tejidos mineralizantes, se han localizado en hueso y en cemento radicular y entre las funciones que se les atribuyen, está la de fijar iones de calcio y actuar como nucleadores y reguladores de la mineralización. El aumento en la actividad de la ALP incrementa los iones de fosfato disponibles, favoreciendo la precipitación de complejos de fosfato de calcio, los cuales se convierten en los primeros cristales de hidroxiapatita, para posteriormente crecer entre las fibras de colágena y mineralizar el tejido por completo, durante este proceso se piensa que la OPN actúa inhibiendo y regulando el crecimiento de los cristales (Gronthos *et al.*, 2003; Sommer *et al.*, 1996).

La actividad de ALP se asocia a la biomineralización (osteogénesis) y la cementogénesis por lo que su expresión se empleó como marcador de

diferenciación temprana para las células formadoras de tejido mineralizado, ya que esta enzima es responsable de proveer los fosfatos necesarios para la formación de los fosfatos de calcio (Groeneveld *et al.*, 1995, Liu *et al.*, 1997) y se ha demostrado que es esencial para la formación y crecimiento del cemento (van den Boss and Beertsen, 1999).

El factor de transcripción Cbfa1 es considerado como un regulador maestro que controla la osteogénesis temprana, se ha detectado también en odontoblastos, células del ligamento periodontal y cementoblastos (Bronckers, 1991) y actúa activando o regulando otros genes asociados a tejido mineralizado corriente abajo como fosfatasa alcalina, osteocalcina y osteopontina entre otros para promover las etapas posteriores de la diferenciación osteogénica y la subsecuente mineralización de la matriz (Gronthos *et al.*, 2003) de modo que el aumento tanto en transcripción como en traducción en HGF CEMP1 tiene un efecto directo en el incremento de la expresión de ALP, OCN y OPN.

La presencia de moléculas asociadas al esmalte ha sido demostrada a nivel de ARNm y proteína en cemento radicular (Zeichner-David *et al.*, 2006) por lo que decidimos investigar si la expresión de CEMP1 induce la expresión de otras moléculas relacionadas al esmalte. Encontramos que los fibroblastos transfectados con CEMP1, expresaron amelogenina, ameloblastina y enamelinina, la expresión de estas moléculas puede ser resultado de la inducción por Cbfa1, el cual a su vez es un regulador de la transcripción del gen de AMBN.

La amelogenina, además de participar en la regulación del crecimiento de los cristales de hidroxiapatita, promueve la expresión de algunas moléculas

asociadas a la biomineralización (Viswanathan *et al.*, 2003), esto permite pensar que podría participar en la regulación de genes asociados con la cementogénesis. La diferencia en los niveles del transcrito y de proteína para la amelogenina y la ameloblastina puede explicarse por un procesamiento rápido de los transcritos y es probable que las proteínas permanezcan en la matriz y sean liberadas lentamente participando en la regulación de la mineralización. El ARNm de amelina alcanzó su nivel máximo en la etapa de mineralización. Se ha reportado que la expresión de CAP es regulada positivamente por amelogenina. Los niveles de expresión de ARNm y la proteína CAP durante el curso del experimento, sugieren que las células adquirieron un fenotipo cementoblástico (Kitagawa *et al.*, 2006 a).

En conclusión, CEMP1 está asociada de forma importante a la biomineralización, regulando positivamente la expresión de otras moléculas necesarias para que se lleve a cabo la biomineralización de la matriz extracelular. La inducción de la expresión de CAP y de CEMP1, ambas moléculas marcadoras de cementoblastos, nos permite inferir que el fenotipo adquirido por las células es mineralizante, de tipo cementoblástico, por lo que también podría participar en la diferenciación temprana de células progenitoras hacia un fenotipo mineralizante.

Aunque aún no conocemos el mecanismo molecular de interacción de CEMP1, los datos presentados sugieren que esta proteína podría jugar un papel importante en la diferenciación celular de células progenitoras del periodonto hacia un fenotipo mineralizante de tipo cementoblástico. El trabajo subsecuente de nuestro laboratorio a mediano plazo está encaminado a



dilucidarlo, una vez logrado, se abre una serie de posibilidades con una aplicación clínica en terapia periodontal regenerativa.

## 16. Referencias Bibliográficas:

Álvarez-Pérez MA, Narayanan AS, 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**: 409-419.

Álvarez Pérez MA, Pitaru S, Álvarez Fregoso O, Reyes Gasga J, Arzate H. Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line. *J Struct Biol* 2003; **143**:1-13.

American Academy of Periodontology. Academy Report. Position Paper. Periodontal Regeneration. *J. Periodontol* 2005; **76**:1601-1622.

American Academy of Periodontology. Glossary of Periodontal Terms. (2001) 4<sup>th</sup> edition.

Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, Foster RA, Somerman MJ. Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *J Periodontol* 1991; **62**:499-503

Arzate H, Alvarez MA, Narayanan AS. Cyclosporin A promotes mineralization by human cementoblastoma-derived cells in culture. *J Periodont Res* 2005; **40**:218-224.

Arzate H, Álvarez-Pérez MA, Aguilar-Mendoza ME, Álvarez-Fregoso O. Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells in Vitro. *J Periodont Res* 1998; **33**: 249-258.

Arzate H, Chimal-Monroy J, Hernández-Lagunas L, Díaz de León L. Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *J Periodont Res* 1996; **31**: 144-148.

Arzate H, Olson SW, Page RC, and Narayanan AS. Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in culture. *Bone and Mineral*. 1992; **18**: 15-30.

Arzate H, Jiménez-García LF, Álvarez-Pérez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. Immunolocalization of a Cementoblastoma-conditioned Medium-derived Protein. *J Dent Res* 2002; **81**:541-546.

Arzate H, Álvarez-Pérez MA, Alvarez-Fergoso O, Wusterhaus-Chávez A, Reyes Gasga J, Ximenez-Fyvie LA. Electron microscopy, micro analysis, and X-ray diffraction characterization of the mineral-like tissue deposited by human cementum tumour derived cells. *J Dent Res* 2000; **79**:28-34.

Baab DA, Page RC, Morton T. Studies of a family manifesting premature exfoliation of deciduous teeth. *J Periodontol* 1985; **56**:403-9.

Barmes DE. Public policy on oral health and old age: a global view. *J Public Health Dent* 2000; **60**:335-7.

Bartold PM and Narayanan AS. *Biology of the Periodontal Connective Tissues*. Quintessence Publishing Co, Inc. 1998 Carol Stream, Illinois, U.S.A.

Bartold PM and Narayanan AS. Molecular and Cell Biology of Healthy and Diseased Periodontal Tissues. *Periodontology 2000* 2006; **40**:29-49.

Bartold PM, Walsh LJ and Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontology 2000* 2000; **24**:28-55.

Berry JE, Zhao M, Jin Q, Foster LB, Viswanathan H, Somerman MJ. Exploring the Origins of Cementoblasts and their Trigger Factors. *Connective Tissue Research* 2003; **44**: 97-102.

Bobaid F, Gibson CW, Kuehl MA, Berry JE, Snead ML, Nociti FH, Katchburian E, and Somerman MJ. Leucine-Rich Amelogenin Peptide: A Candidate Signalling Molecule During Cementogenesis. *J. Periodontol* 2004; **75**:1126-1136.

Bonucci E. Calcification in Biological Systems. 1992. CRC Press, Chapter 2, Role of Collagen Fibrils in Calcification. Pp. 19-39.

Bosshardt DD. Are Cementoblasts a Subpopulation of Osteoblasts or a Unique Phenotype? *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2005; **84**: 390-406.

Bosshardt DD, Sculean A, Donos N, Lang P. Pattern of mineralization after regenerative periodontal therapy with enamel matrix proteins. *Eur J Oral Sci* 2006; **114**: 225-231.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal Biochem* 1976; **72**:248-254.

Bronckers ALLJJ, Farach-Carson MC, Van Waveren E, Butler WT. Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin and dentin sialoprotein during dental formation and early cementogenesis in rat. *J Bone Miner Research*. 1994. **9**:833-841.

Bruce PL, Bryan MS, Newell JW. Periodontal Diseases. Seminar. *The Lancet* 2005; **366**: 1809-1820.

Carranza FA and Neuman MG. *Clinical Periodontology* 8th edition. Section One. The Normal Periodontium. W.B. Saunders Company. 1996. U.S.A.

Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 1994; **134**:277-86.

Cho MI and Garant RP. Development and general structure of the periodontium. *Periodontology 2000* 2000; **24**:9-27.

Cho MI, Matsuda N, Lin WL, Moshier A, Ramakrishnan PR. In vitro formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat. *Calcif Tissue Int* 1992; **50**:459-67.

Diekwisch TGH. Developmental Biology of Cementum. *Int J Dev Biol* 2001; **45**: 695-702.

Deutsch D, Haze-Filderman A, Blumenfeld A, Dafni L, Leiser Y, Shay B, Gruenbaum-Cohen Y, Rosenfeld E, Fermon E, Zimmerman B, Haegewald S, Bernimoulin, J-P, Taylor AL. Amelogenin, a major structural protein in mineralizing enamel, is also expressed in soft tissues: brain and cells of the hematopoietic system. *Eur J Oral Sci* 2006; **114**:183–189

Ganss B, Him RH and Sodek J. Bone Sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; **10**:79-98.

Garant PR. Oral Cells and Tissues. Quintessence Books. (2003) Chapter 7: Root Formation and Cementogenesis, Quintessence Publishing Co, Inc. Chicago, Berlin, Tokyo, Copenhagen.

Giachelli CM and Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biology* 2000; **19**:615-622.

Gould TR, Melcher AH, Brunette DM. Location of progenitor cells in periodontal ligament of mouse molar stimulated by wounding. *Anat Rec* 1977; **188**:133-41.

Gould TR, Melcher AH, Brunette DM. Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding. *J Periodontal Res* 1980; **15**:20-42.

Gómez de Ferraris ME y Campos Muñoz A. Histología y Embriología Bucodental. (1999) Capítulo 4. Editorial médica Panamericana. España.

Gregory CA, Grady Gunn W, Peister A, Prockop DJ. An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Annal Biochem* 2004; **329**: 77-84.

Grzesik WJ y Narayanan AS. Cementum and Periodontal Wound Healing and Regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; **13**:474-484.

Groeneveld MC, Everts V, and Beertsen W. Alkaline Phosphatase Activity in the Periodontal Ligament and Gingiva of the Rat Molar: Its Relation to Cementum Formation. *J Dent Res* 1995; **74**:1374-1381.

Gronthos S, Chen S, Wang C, Robey PG, and Shi S. Telomerase Accelerates Osteogenesis of Bone Marrow Stromal Stem Cells by

Upregulation of CBFA1, Osterix, and Osteocalcin. *Journal of Bone and Mineral Research* 2003; **18**: 716-722.

Handa K, Saito M, Yamauchi M, Kiyono T, Sato S, Teranka T, Narayanan AS. Cementum Matrix Formation In Vivo by Cultured Dental Follicle Cells. *Bone* 2002; **31**:606-611.

Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 8562-8565.

Ivanovski S, Komaki M, Bartold PM, Narayanan AS. Periodontal-derived cells attach to cementum attachment protein via  $\alpha 5 \beta 1$  integrin. *J Period Res* 1999; **34**:154-159.

Janones DS, Massa LF, Arana-Chavez VE. Immunocytochemical examination of the presence of amelogenin during root development of rat molars. *Archives of Oral Biology* 2005; **50**:527-532.

Kémoun P, Laurencin-Dalicioux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Cote-Auriol F, Briand-Mesange F, Gadelorge M, Arzate H, Narayanan AS, Brunel G, Salles JP. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Research* 2006; **329**:283-94

Kim Y, Kim H, Park E, Lee B, Ryoo H, Kim S, Kim I, Stein JL, Lian JB, Stein GS, Van Winjen AJ, Choi J. The bone related Zn finger transcription factor Osterix promotes proliferation of mesenchymal cells. *Gene* 2006; **366**:145-151.

Kitagawa M, Kudo Y, Ogawa I, Abiko Y, Miyauchi M, and Takata T. Effect of F-spondin on cementoblastic differentiation of human periodontal ligament cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006 a; **309**: 1050-1056.

Kitagawa M, Tahara H, Kitagawa S, Oka H, Yasusei K, Sato S, Ogawa I, Miyachi M, Takata T. Characterization of established cementoblast-like cells from human cementum-lining cells in vitro and in vivo. *Bone* 2006 b; **39**: 1035-1042.

Komaki M, Kang M, Narayanan AS. Role of MAP Kinases  $p42^{erk-2}/p44^{erk-1}$  in Cementum-derived Attachment-protein-mediated Cell Attachment. *J Dent Res* 2000; **79**:1789-1793.

Lian BJ, Stein GS, Stein J, and van Winjen AJ. Osteocalcin Gene Promoter: Unlocking the Secrets for Regulation of Osteoblast Growth and Differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry Supplements* 1998; **30/31**:62-72.

Lindhe J. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. En: Karting K, Lang KP Editores. Editorial Médica Panamericana. España (2003): 19-67.

Liu HW, Yacobi R, Savion N, Narayanan AS, and Pitaru S. A Collagenous Cementum-Derived Attachment Protein Is a Marker for Progenitors of the Mineralized Tissue-Forming Cell Lineage of the Periodontal Ligament. *Journal of Bone and Mineral Research*. (1997; **12**:1691-1699).

Lowry OH, Roberts NR, Wu M-L, Hixon WS, Crawford EJ. The quantitative histochemistry of brain I. Enzyme measurement. *J Biol Chem* 1954; **207**: 19-37.

McCulloch CAG. Progenitor Cell Populations in the Periodontal Ligament of Mice. *The Anatomical Record* (1985); **211**: 258-262.

McCulloch CA, Melcher AH. Cell migration in the periodontal ligament of mice. *J Periodontal Res* 1983 a; **18**:339-52.

McCulloch CA, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodontal Res* 1991; **26**:144-54.

McCulloch CA, Melcher AH. Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice. *Am J Anat* 1983 b; **167**:43-58.

McCulloch CAG, Lekic P and McKee MD. Role of physical forces regulating the form and function of the periodontal ligament. *Periodontology* 2000 2000; **24**:56-72.

Miao D and Scutt A. Histochemical Localization of Alkaline Phosphatase Activity in Decalcified Bone and Cartilage. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2002; **50**:333-340.

Moradian-Oldak J. Mini-review. Amelogenins: assembly, processing and control of crystal morphology. *Matrix Biology* 2001; **20**:293-305

Nanci A and Bosshardt DD. Structure of Periodontal Tissues in Health and Disease. *Periodontology* 2000 2006; **40**:11-28.

Narayanan AS, Page RC. Biochemical characterization of collagens synthesized by fibroblasts derived from normal and diseased human gingiva. *J. Biol. Chem.* 1976; **251**:5464-5471.

Nociti FH Jr, Berry JE, Foster BL, Gurley KA, Kingsley DM, Takata T, Miyauchi M and Somerman MJ. Cementum: A Phosphate-sensitive Tissue. *J Dent Res* 2002; **81**:817-821.

Nohutcu RM, Somerman MJ, McCauley LK. Dexamethasone enhances the effects of parathyroid hormone on human periodontal ligament cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 1995; **56**:571-7.

Nojima N, Kobayashi M, Shionome M, Takahashi N, Suda T, Hasegawa K. Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *J Periodontal Res* 1990; **25**:179-85.

Page RC. Oral health status in the United States: prevalence of inflammatory periodontal diseases. *J Dent Educ* 1985; **49**:354-67.

Page RC, Engel LD, Narayanan AS, Clagett JA. Chronic inflammatory gingival and periodontal disease. *JAMA*. 1978; **240**:545-50.

Pavlic A, Petelin M y Battelino T. Phenotype and enamel ultrastructure characteristics in patients with ENAM gene mutations g.13185–13186insAG and 8344delG. *Archives of Oral Biology* 2007; **52**:209-217.

Piche JE, Carnes DL Jr, Graves DT. Initial characterization of cells derived from human periodontia. *J Dent Res* 1989; **68**:761-7.

Pitaru S, Pritzki A, Bar-Kana I, Grosskopf A, Savion N, Narayanan AS. Bone morphogenetic protein 2 induces the expression of cementum attachment protein in human periodontal ligament clones. *Connect Tissue Res* 2002; **43**:257-64.

Ramakrishnan PR, Lin WL, Sodek J, Cho MI. Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 1995; **57**:52-9.

Reseland JE, Reppe S, Larsen AM, Berner HS, Reinholt FP, Gatuvi K, Slaby I, Lyngstadaas SP. The effect of enamel matrix derivative on gene expression in osteoblasts. *Eur J Oral Sci* 2006; **114**: 205-211.

Rincon JC, Xiao Y, Young WG, Bartold PM. Enhanced proliferation, attachment and osteopontin expression by porcine periodontal cells exposed to Emdogain. *Archives of Oral Biology* 2005; **50**:1047-1054.

Rose FL, Mealey LB, Genco JR, Cohen DW. Mosby Inc. (2004), Periodontics Medicine, Surgery and Implants. Part I. Basic Concepts in Periodontal Pathobiology. Chapter 1 Anatomy, Development and Physiology of the Periodontium. pp 2-18.

Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontol 2000* 2000; **24**:73-98.

Schroeder EH Origin, Structure and Distribution of Cementoblasts and its Possible Role in Local Periodontal Treatment. *Periodontology Today* 1988: 32-40.

Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, Matsuzaki H, Hashimoto S, Muramatsu T, Shima K, Matsuzaka K and Inoue T. Regulatory Mechanisms of Periodontal Regeneration. *Microscopy Research and Technique* 2003; **60**:491-502.

Sire J-Y, Delgado S, Girondot M. The amelogenin story: origin and evolution. *Eur J Oral Sci* 2006; **114**: 64–77.

Sodek J and McKee MD. Molecular and cellular biology of bone. *Periodontology 2000* 2000; **24**:99-126.

Sommer B, Bickel M, Hofstetter W, and Wetterwald A. Expression of Matrix Proteins During the Development of Mineralized Tissues. *Bone* 1996; **19**: 371-380.

Swanson EC, Fong HK, Foster BL, Paine ML, Gibson CW, Snead ML, Sommerman MJ. Amelogenins regulate expression of genes associated with cementoblasts in vitro. *Eur J Oral Sci* 2006; **114**:239-243

Taba M Jr, Jin Q, Sugai JV, Giannobile WV. Current concepts in bioengineering. *Orthod Craniofacial Res* 2005, **8**: 292-305.

Tu Q, Valverde P, and Chen J. (2006) Osterix enhances proliferation and osteogenic potential of bone marrow stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2006; **341**:1257-65.

van den Boss T, Beertsen W. Alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament: age effect and relation to cementum growth rate. *J Period Res* 1999; **34**:1-6.

van den Bos T, Handoko G, Niehof A, Ryan LM, Coburn SP, Whyte MP, Beertsen W. Cementum and dentin in hypophosphatasia. *J Dent Res.* 2005 **84**:1021-5.

Viswanathan HL, Berry JE, Foster BL, Gibson CW, Li Y, Kulkarni AB, Snead ML, Somerman MJ. Amelogenin: A Potential Regulator of Cementum-Associated Genes. *J. Periodontol* 2003; **74**:1423-1431.

Wu D, Parker T, Saito M, Narayanan S. Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein. *Bone and Mineral Research.* 1996; **11**:686-592.

Wysocky LJ and Sato VL. "Panning" For Lymphocytes: A Method for Cell Selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**:2844-2848.

Yamakoshi Y, Hu JC-C, Fukae M, Yamakoshi F, Simmer JP. How do enamelysin and kallikrein 4 process the 32-kDa enamelin? *Eur J Oral Sci* 2006; **114**: 45–51

Zeichner-David M. Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited. *Periodontol 2000* 2006; **41**:196-217.

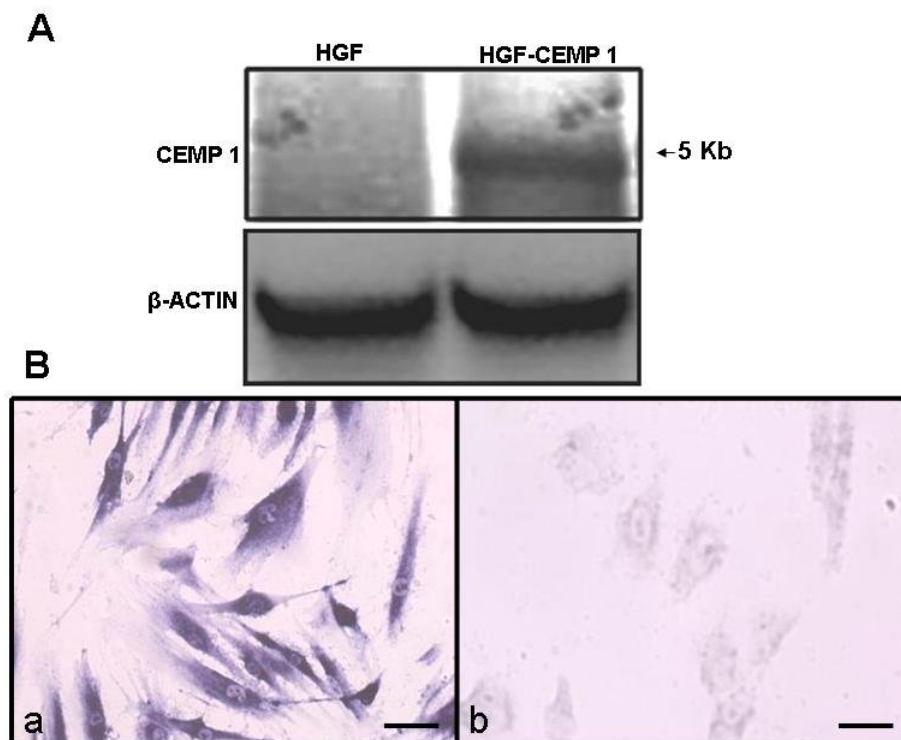
Zeichner-David M, Chen LS, Hsu Z, Reyna J, Caton J, Bringas P. Amelogenin and ameloblastin show growth-factor like activity in periodontal ligament cells. *Eur J Oral Sci* 2006; **114**:244-53



Zeichner-David M, Oishi K, González E, Su Z, Zakartchenko V, Chen LS, Arzate H, Bringas P. Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Dev Dyn* 2003; **228**:651-663.

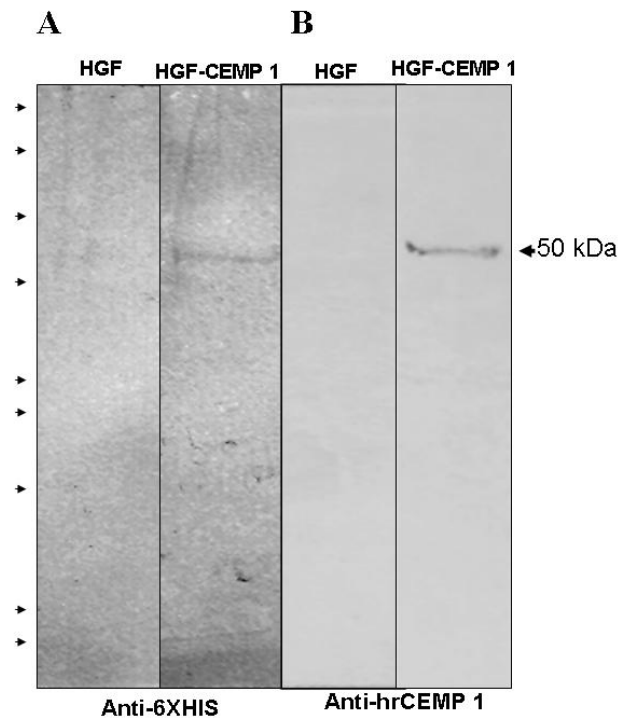
## 17. Apéndice A. Figuras

Figura 1



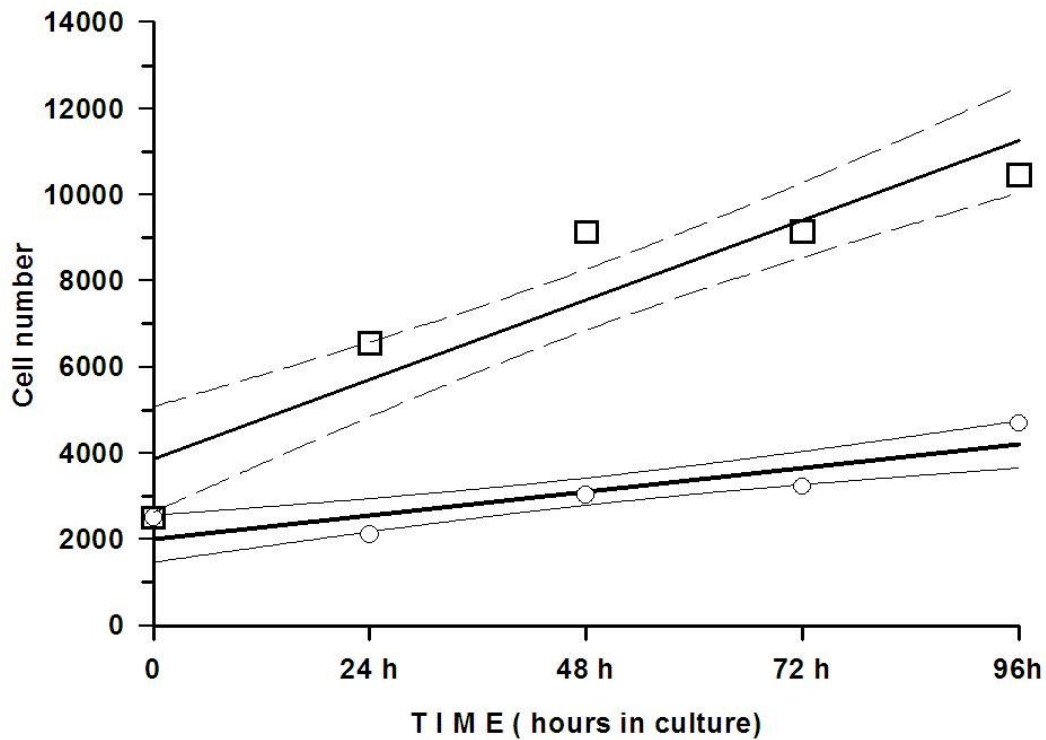
**Figura 1.** La expresión del gen se analizó por medio de Northern blot e hibridación *in situ*. El Northern blot confirmó que los HGF no expresaban el ARNm después de la transfección y selección con G418 y en los HGFCEMP1 se detectó una banda de 5 Kb (figura 1 A). La expresión del gen se analizó también por medio de hibridación *in situ*. Los HGF transfectados con CEMP1 expresan el transcrito para CEMP1 (figura 1B-a), y los HGF transfectados con el vector vacío no lo expresan después de la transfección y selección con G418 (figura 1B-b). Barra= 100  $\mu$ m.

Figura 2



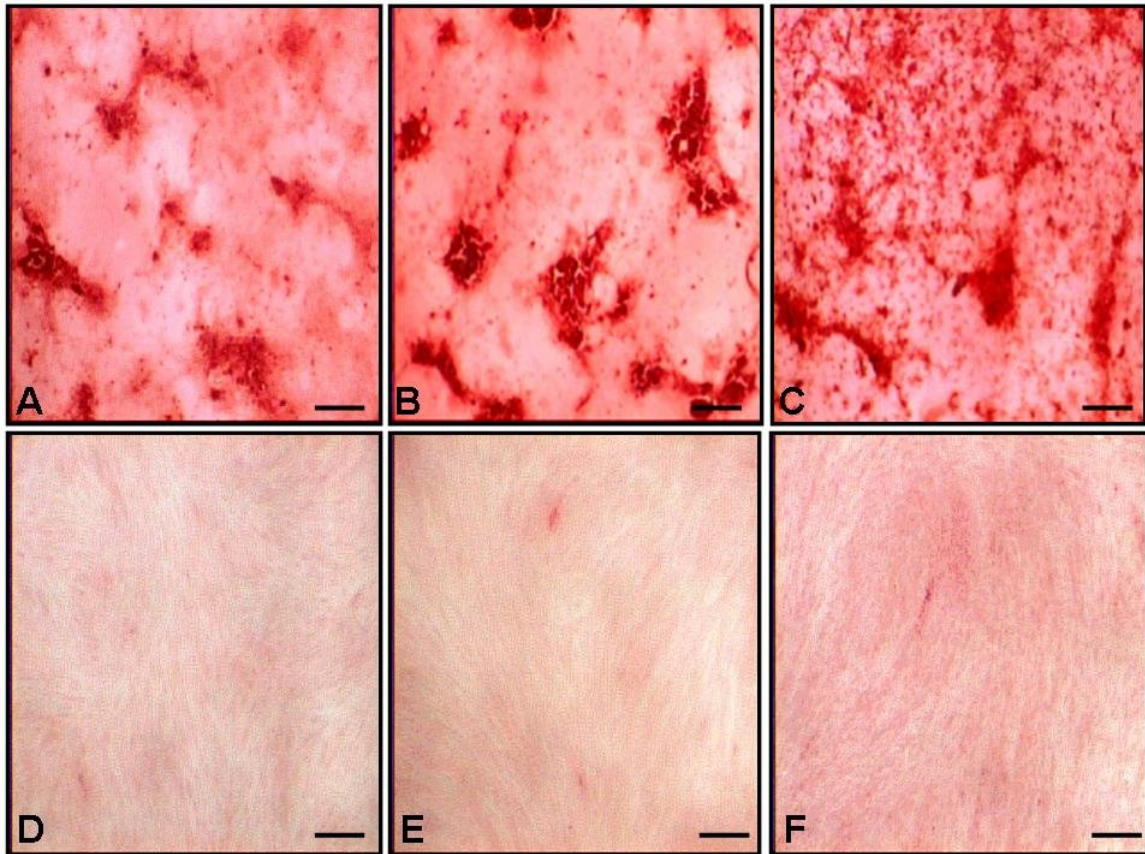
**Figura 2.** Western blots para 6xHIS-COOH and CEMP1. Los HGF transfectados con CEMP1 expresaban una proteína de 50 kDa reconocida por ambos anticuerpos. Los HGF transfectados con el vector vacío fueron negativos para ambos anticuerpos (figuras 2A y 2B).

Figura 3



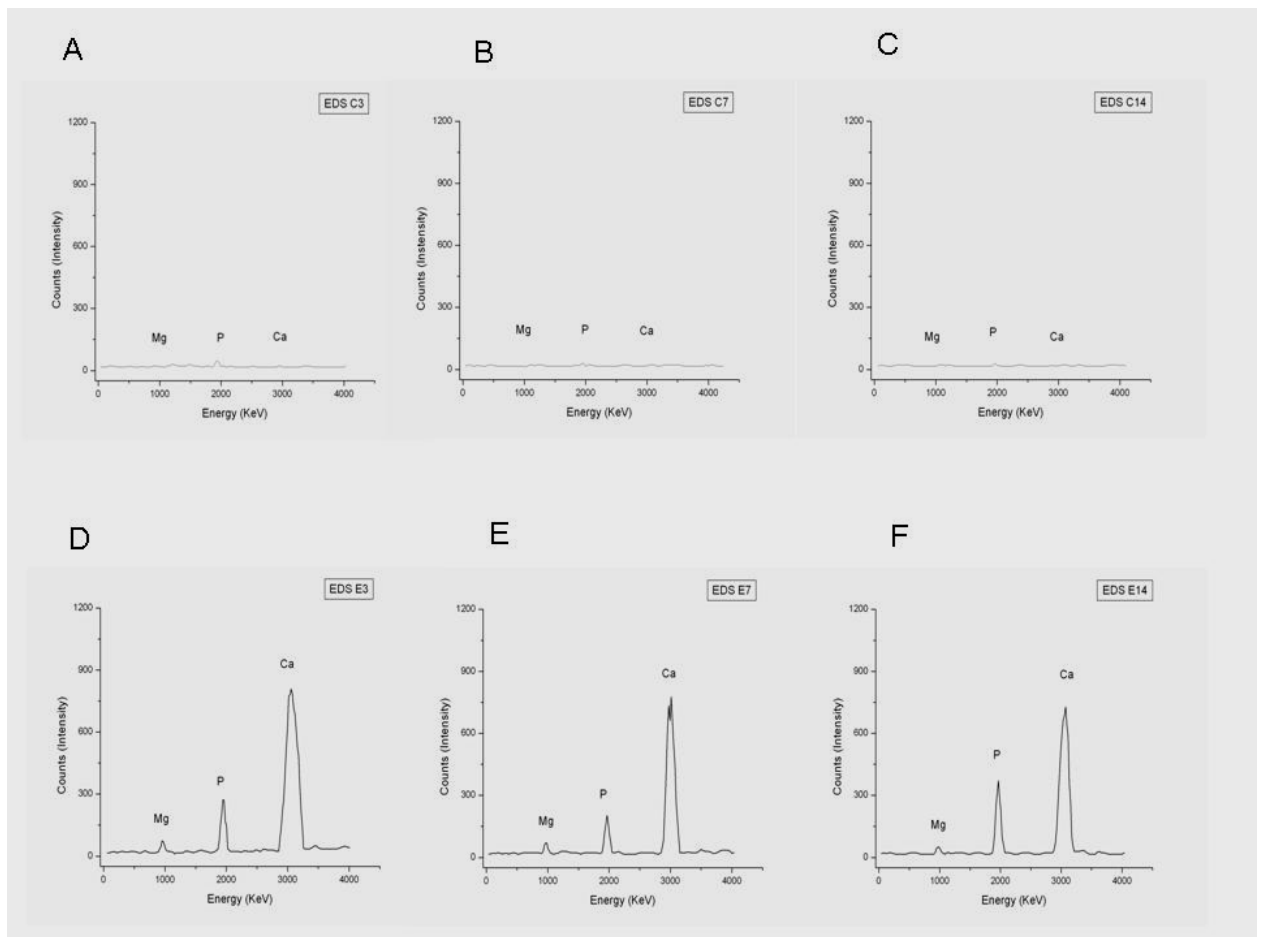
**Figura 3.** La transfección y expresión estable de CEMP1 en HGF incrementa su nivel de proliferación. Los HGF que expresan CEMP1 (□) presentaron una proliferación lineal la cual se trazó (coeficiente de correlación  $r=0.90$ ) y se calculó la ecuación de regresión ( $y=1852(x)+3854$ ). Los intervalos de confianza de 95% se muestran (líneas discontinuas). Los HGF transfectados con el vector vacío (○) presentaron también una proliferación lineal; la cual fue trazada (coeficiente de correlación  $r=0.81$ ) y se calculó la ecuación de regresión ( $y=547(x)+2012$ ). Los intervalos de confianza de 95% se muestran (líneas continuas). Se sembraron 2,500 células en cajas de cultivo de 48 pozos y el número de células se calculó cada 24 horas.

Figura 4



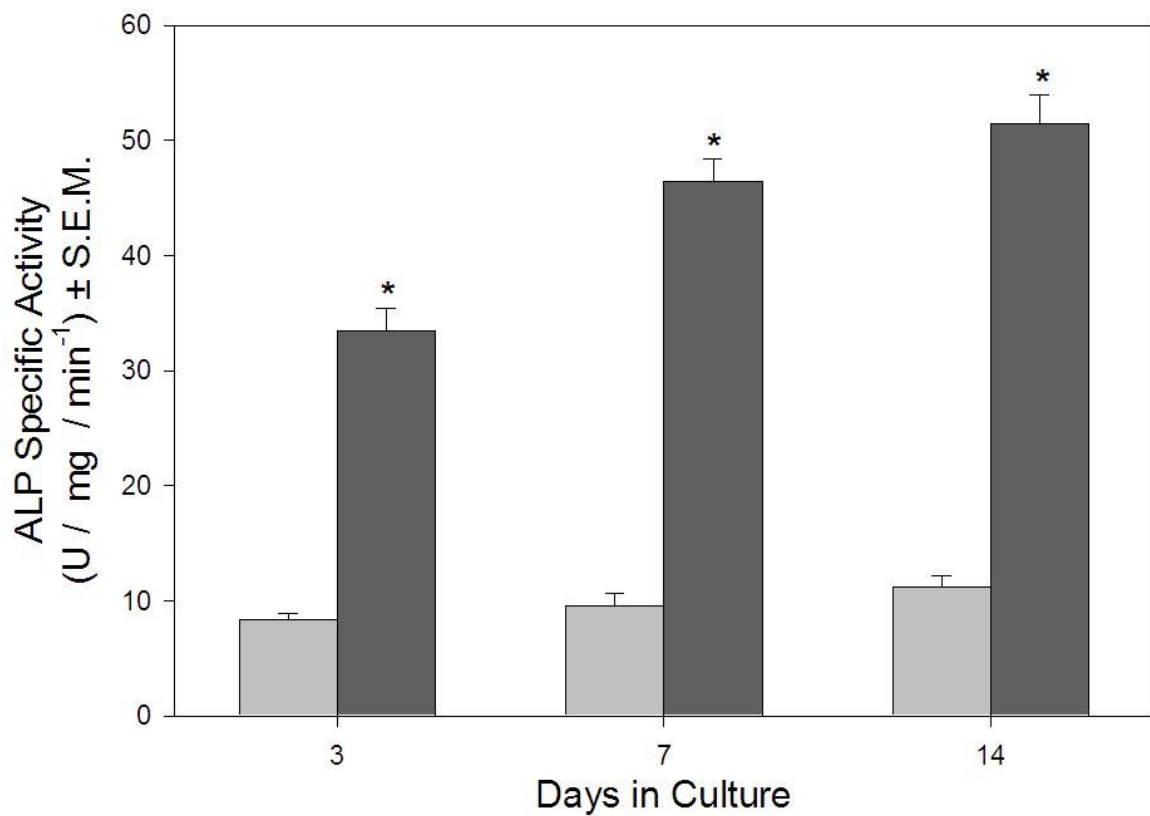
**Figura 4.** La expresión de CEMP1 en HGF promueve la formación de nódulos mineralizados. Panel superior tinción con alizarina roja s a los 3, 7 y 14 días A, B y C respectivamente. Panel inferior HGF transfectados con el vector vacío a 3 7 y 14 días D, E y F.

Figura 5



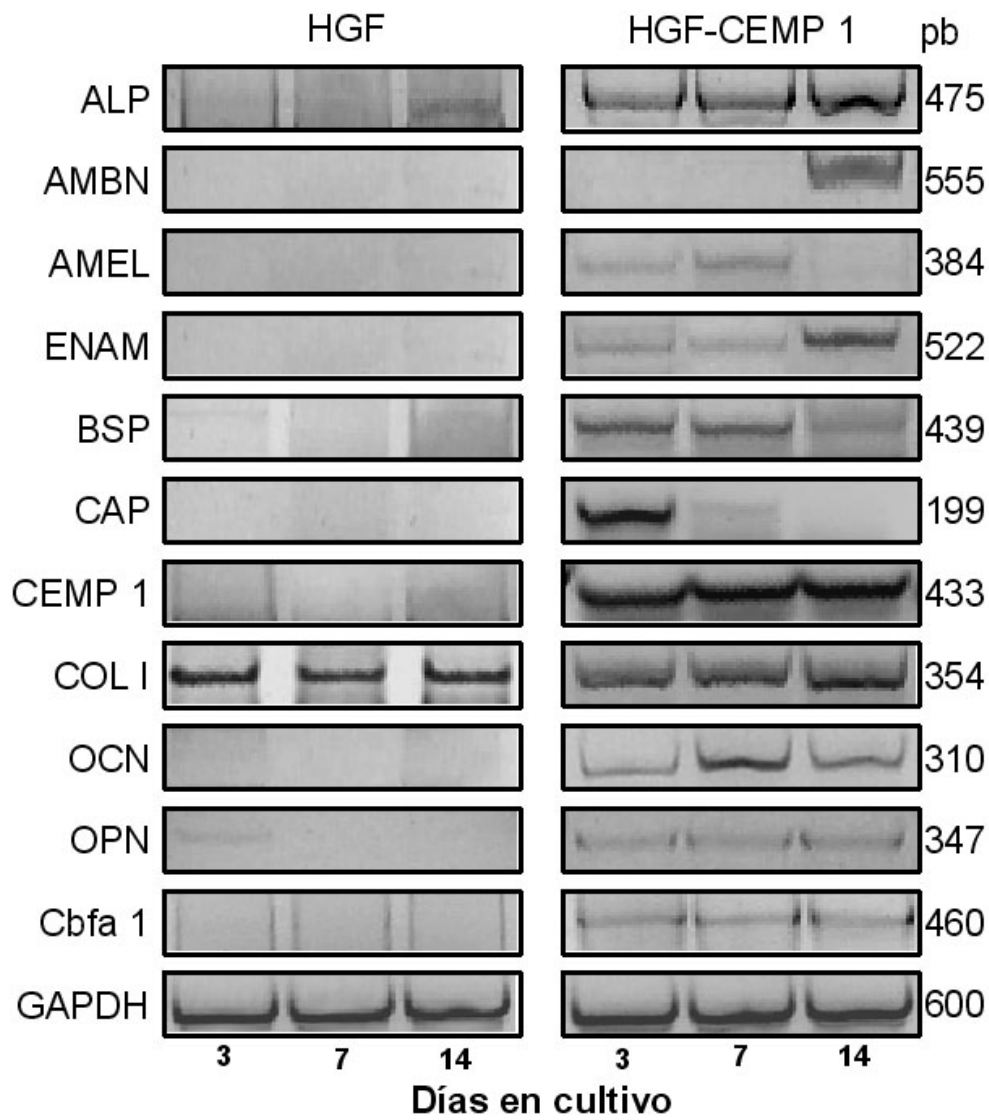
**Figura 5.** Aspecto representativo de microanálisis de energía dispersiva de rayos-X. A, B y C espectro de HGF transfectados con el vector vacío a los 3, 7 y 14 días. En D, E y F se observan picos prominentes de energía para calcio y fósforo en las zonas de mineralización similares a los de hidroxiapatita de origen biológico a los 3, 7 y 14 días respectivamente en HGF CEMP1.

Figura 6



**Figura 6.** La actividad específica de ALP se determinó por un método bioquímico, los HGF CEMP1 (■) presentaron actividad de ALP incrementada 4, 4.5 y 5 veces más que los HGF transfectados con el vector vacío (□) a los 3, 7 y 14 días. El asterisco indica diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.001$ ).

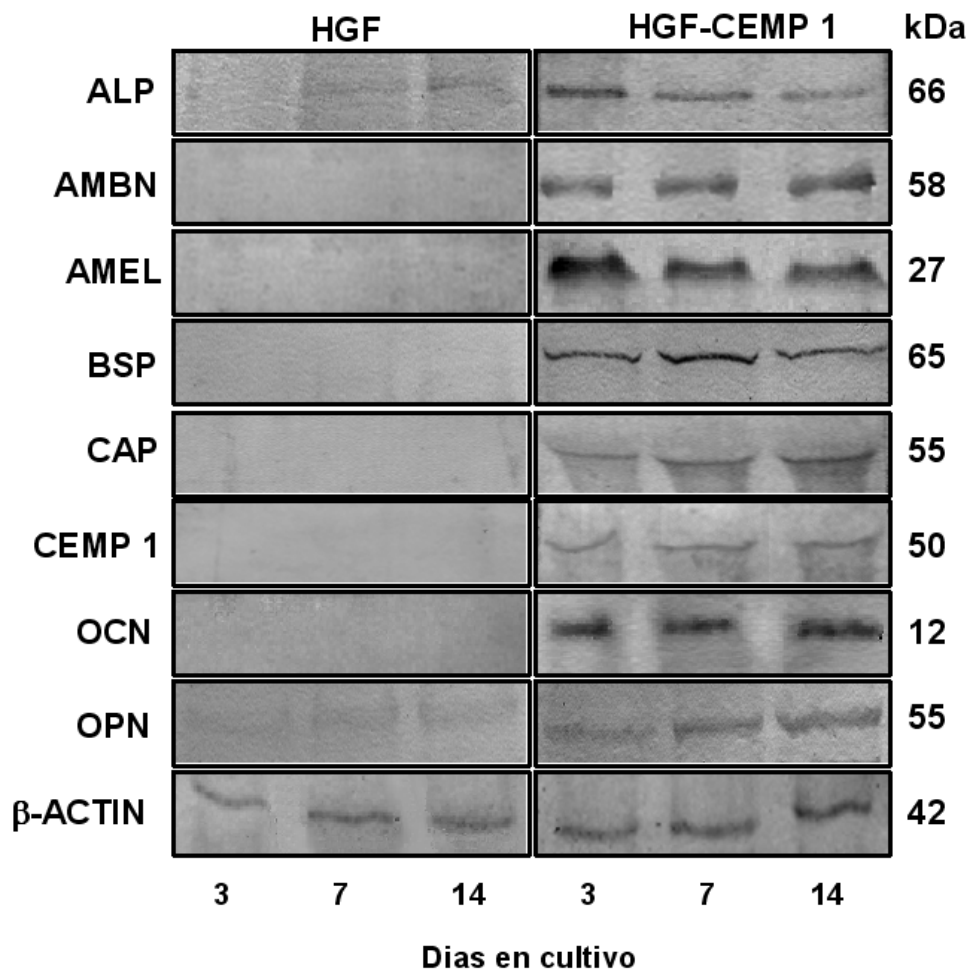
Figura 7



**Figura 7.** Imagen representativa del análisis de RT-PCR para ARNm de moléculas de matriz extracelular características de el fenotipo osteoblástico – cementoblástico (ALP, AMBN, AMEL, ENAM, BSP, CAP, COL I, CP23; OCN y OPN) y el factor de transcripción Cbfa1 importante en la formación de cemento y hueso en HGF y en HGFCEMP1.



Figura 8



**Figura 8.** Los fibroblastos transfectados con CEMP1 secretan moléculas asociadas al hueso y al cemento. El análisis por Western blot detectó la presencia de ALP, AMBN, AMEL, BSP, CAP, CEMP1, OCN y OPN. Las moléculas se detectaron en el medio condicionante. Panel izquierdo HGF transfectadas con el vector vacío, panel derecho HGF CEMP1.

## 18. Apéndice B Publicaciones