



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

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

PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS CÉLULAS DERIVADAS  
DEL LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO *IN VITRO* TRATADAS  
CON LA PROTEÍNA DEL CEMENTO 1 (CEMP1).

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

LIA ALIOTH HOZ RODRÍGUEZ

TUTORES:

**DR. HIGINIO ARZATE**

**DRA. GABRIELA ELISA MERCADO CELIS**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados, bajo el apoyo económico de la Universidad Nacional Autónoma de México con el proyecto DGAPA-UNAM IN216711 y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-130950).

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Higinio Arzate por sus enseñanzas, atenciones, por haberme abierto las puertas de su laboratorio, pero sobretodo le agradezco que me haya guiado durante todo este tiempo. Fue un honor y un orgullo el que me permitiera trabajar a su lado. Es Usted un gran ejemplo a seguir donde prevalece la lucha incansable, por lo que su vida tiene mi más profunda admiración.

GRACIAS

A mis revisores de tesis y maestros Dra. Patricia Tato Zaldivar, Dra. Gabriela Mercado Celis, Dra. Elba Rosa Leyva Huerta, Dr. Javier Portilla Robertson, Dr. Luís Felipe Jiménez García por su apoyo, comentarios y sugerencias que permitieron la terminación de este trabajo.

GRACIAS

A mis amigos y compañeros de laboratorio (Anita, Janeth, Mercedes, Silvia, Rita, Carlos, Edmundo, Enrique, Gonzalo) por siempre mostrarme su amistad, apoyo y ayuda incondicional. Pero lo más importante, el que me hayan permitido integrarme a lo que para mi es una singular y única familia denominada "La comunidad del cemento".

GRACIAS

A mis profesores, compañeros de maestría, amigos y todas las personas que en su momento estuvieron cerca de mí, por sus enseñanzas, paciencia, compañía, ayuda y por compartir su valioso tiempo conmigo.

GRACIAS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la máxima casa de estudios, por marcar su huella en mi espíritu de lucha.

GRACIAS

## **DEDICATORIA**

### **A MI MAMÁ:**

Nuestro lazo es mucho más fuerte al paso de los años, quiero que sepas que siempre estas en mi corazón, gracias por confiar en mí y apoyarme en la búsqueda de mis ideales. Este trabajo es para la mujer que ayudo a que este momento llegará.

### **A MI FUTURO ESPOSO:**

Gracias por apoyarme, comprenderme y estar en esta etapa a mi lado. A pesar de que durante mucho tiempo me lamenté por la distancia solo hizo que fortaleciera la verdadera pureza de nuestros corazones. Te amo.

### **A MI FAMILIA:**

Sus bendiciones y muestras de cariño siempre me acompañaron y le dieron luz a mi camino, los quiero ustedes también son parte de este gran momento. Gracias.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ANTECEDENTES	5
1.1 Encía	6
1.2 Ligamento periodontal	6
1.3 Hueso alveolar	8
1.4 Cemento	10
1.4.1 Cementogénesis	10
1.4.2 Proteínas colágenas	12
1.4.3 Proteínas no colágenas	12
1.5 Biomineralización	15
1.5.1 Fosfatasa alcalina	15
1.5.2 Sialoproteína ósea	16
1.5.3 Osteopontina	16
1.5.4 Osteocalcina	17
1.5.5 Proteína de adhesión del cemento	18
1.5.6 Proteína del cemento 1	18
1.6 Enfermedad periodontal	21
1.7 Regeneración periodontal	21
2. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	23
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVO GENERAL	24

5.1	Objetivos específicos	24
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1	Cultivo celular	25
6.2	Purificación	25
6.3	Proliferación celular	26
6.4	Ensayo de actividad específica de fosfatasa alcalina	26
6.5	Ensayo de mineralización	27
6.6	Western blot	27
6.7	Análisis estadísticos	28
7.	RESULTADOS	29
7.1	Proliferación celular	29
7.2	Ensayo de la actividad específica de la fosfatasa alcalina	30
7.3	Western blot	31
7.4	Ensayos de mineralización	34
8.	DISCUSIÓN	36
9.	CONCLUSIONES	41
10.	BIBLIOGRAFÍA	42

## RESUMEN

El punto crítico para lograr la regeneración periodontal es la restauración de la inserción de las fibras de tejido conectivo (fibras de Sharpey) del ligamento periodontal a las superficies radiculares y de hueso alveolar, previamente expuestas por la enfermedad periodontal. Los nuevos avances en la terapia génica como la liberación de proteínas recombinantes a tejidos por períodos de tiempo extensos, constituye una estrategia prometedora para la regeneración de las estructuras periodontales. En el laboratorio de biología periodontal y tejidos mineralizados se ha estudiado la proteína del cemento 1 (CEMP1) que participa en el proceso de mineralización de cementoblastos putativos *in vitro* y más importante aún, se sugiere que induce la diferenciación de fibroblastos gingivales, células que habitualmente no mineralizan *in vivo* o *in vitro*, hacia un fenotipo cementoblástico/osteoblástico. La proteína CEMP1 posee una alta afinidad por la hidroxiapatita y asimismo promueve la nucleación de cristales de fosfato octácalcico, cristal precursor de la hidroxiapatita. Adicionalmente, CEMP1 presenta 48% de homología en su estructura primaria con colágena tipo X, la cual participa en el proceso de mineralización en el cartílago hipertrófico.

En este trabajo se propuso emplear células del ligamento periodontal humano (HPLC), el cual está formado por una población heterogénea de células, predominantemente, fibroblastos, además de presentar células madre mesénquimales.

Los resultados del ensayo de proliferación celular demostraron que CEMP1 en el día 3 de cultivo, a una concentración 0.5  $\mu\text{g/ml}$  promueve una mayor proliferación, con lo cual podemos inferir que esta proteína actúa como un factor de crecimiento.

Por medio del ensayo de la actividad específica de la fosfatasa alcalina, se comprobó que las células del ligamento periodontal humano (HPLC) se diferenciaron hacia un fenotipo mineralizante, observando su expresión más significativa en el día 14 de cultivo, estos resultados se corroboraron mediante la tinción de alizarina roja al 2%, observando la mayor concentración de nódulos de calcio en los grupos tratados con la proteína CEMP1.

En los ensayos realizados por medio de inmunoelectrotransferencia, se determinó la expresión de proteínas específicas como la proteína de adhesión del cemento (CAP), CEMP1, el factor de transcripción SOX9, Agrecano, Colágena tipo II y X, y sialoproteína ósea (BSP), los cuales son marcadores implicados en los fenotipos; cementoblástico, osteoblástico y/o condroblástico.





Finalmente por medio de la tinción de azul de alciano al 3%, se demostró que CEMP1 induce la diferenciación hacia un fenotipo condroblástico, ya que la tinción de las glicoproteínas fue significativa.

Se concluyó que CEMP1 induce la proliferación celular de las células del ligamento periodontal (HPLC) en tiempos tempranos, así como la diferenciación de estas hacia un fenotipo cementoblástico, osteoblástico y condroblástico.

En base a estos resultados se sugiere que CEMP1 puede ser una proteína potencial involucrada en la oscificación endocondral.

## ABSTRACT

The critical goal to achieve periodontal regeneration is the restoration of inserting connective tissue fibers (Sharpey fibers) of the periodontal ligament to the root surfaces and alveolar bone previously exposed to periodontal disease. New advances in gene therapy as the release of recombinant proteins to tissues by extended periods of time, is a promising strategy for the regeneration of periodontal structures.

Our laboratory has studied the protein cement (CEMP1) participates in the mineralization process of putative cementoblasts in vitro and more importantly, suggest that induces the differentiation of gingival fibroblasts, cells that normally do not mineralize in vivo or in vitro, to phenotype cementoblasts / osteoblastic.

CEMP1 protein has a high affinity for hydroxyapatite and also promotes the nucleation of octacalcium phosphate crystals, precursor of hydroxyapatite crystal. Additionally, CEMP1 features 48% homology in their primary structure with collagen type X, which is involved in the process of mineralization in the hypertrophic cartilage.

This paper proposed to use human periodontal ligament cells (HPLC), which consists of a heterogeneous population of cells, predominantly fibroblasts, besides presenting mesenchymal stem cells.

The results showed that CEMP1 cell proliferation on day 3 of culture, at concentrations of 0.5 mg / ml promotes increased proliferation, which we can infer that this protein acts as a growth factor.

Through of the specific activity of alkaline phosphatase assays, it was found that human periodontal ligament cells (HPLC) were differentiated into a mineralizing phenotype, noting its most significant on day 14 of culture, these results were corroborated by alizarin red staining of 2%, with the greatest concentration of calcium nodules in the groups treated with the protein CEMP1.

In studies by Western blot, we investigated the expression of specific proteins such as cement adhesion protein (CAP), CEMP1, the transcription factor SOX9, aggrecan, collagen type II and X, and bone sialoprotein (BSP) markers which are involved in phenotypes, cementoblasts, osteoblastic and / or chondroblasts.

Finally by the alcian blue staining at 3%, showed that CEMP1 induces differentiation



toward a phenotype chondroblastic as the staining of glycoproteins was significant.

CEMP1 was concluded that induces cell proliferation of periodontal ligament cells (HPLC) in early times, as well as differentiation into a phenotype of these cementoblasts, osteoblastic and chondroblasts.

Based on these results suggests that CEMP1 potential may be a protein involved in endochondral oscificación.

## ANTECEDENTES

El periodonto puede ser considerado como un sistema orgánico compuesto de dos tejidos duros (cemento radicular y hueso alveolar) y dos tejidos blandos (ligamento periodontal y encía), que en su conjunto mantienen el funcionamiento adecuado del diente, representa una unidad funcional, derivado del folículo dental durante el desarrollo del ectodermo del primer arco branquial y el ectomesénquima de la cresta neural. Cada uno de los componentes del periodonto tiene una composición bioquímica y arquitectura del tejido conectivo distinta, sin embargo, funcionan como una unidad integrada. (Ten Cate, 1997; Bartold y Narayanan, 1998; Bartold y Narayanan, 2006). La principal función del periodonto es anclar al diente y protegerlo de las fuerzas masticatorias debido a que sufre una constante presión mecánica, así como también estrés bacteriano. El periodonto es un poderoso sistema que examina la homeostasis y la integridad fisiológica en íntimo contacto con tejidos blandos y tejidos mineralizados, bajo la constante influencia de microorganismos y cambios físicos (McCulloch, 2006). El buen funcionamiento del periodonto sólo se logra a través de la integridad estructural y la interacción entre sus componentes. (Nanci y Bosshardt, 2006)

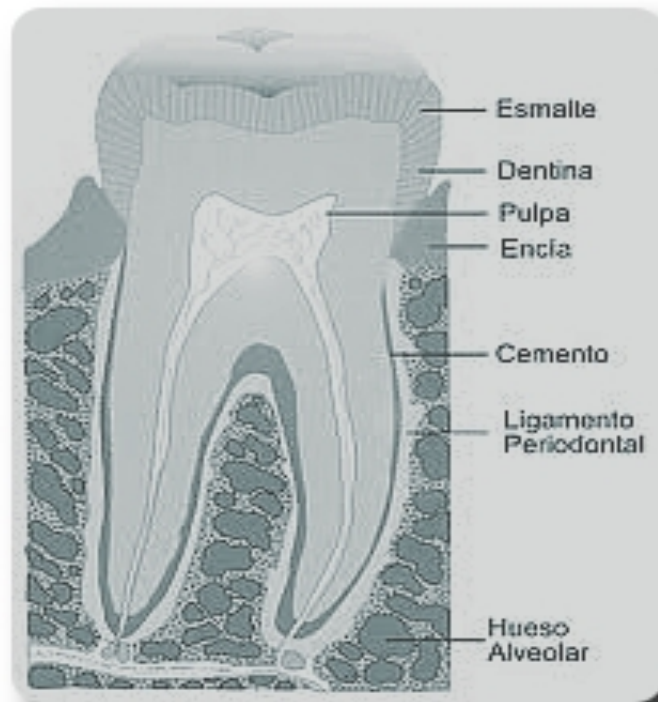


Figura 1. Esquema de los tejidos periodontales.



## 1.1 Encía

La encía está compuesta de epitelio gingival y tejido conectivo, la superficie del epitelio de origen ectodérmico y un tejido adyacente de origen mesodérmico, forma parte de la mucosa oral recubriendo los procesos alveolares de la mandíbula y la maxila rodeando los cuellos de los dientes, su constitución consta predominantemente de fibras de colágena, proteoglicanos, fibronectina, osteonectina, tenasina y elastina, la contribución variable de estas moléculas a la arquitectura gingival depende en gran medida de la ubicación.

El tejido gingival se clasifica de acuerdo su localización anatómica en encía libre marginal, interdental y adherida. La encía libre es color rosa coral y su consistencia es firme, después de la completa erupción del diente, la encía libre marginal es localizada sobre la superficie del esmalte coronal aproximadamente 1.5 – 2 mm de la unión amelo-cementaria. La encía interdental es determinada por las relaciones de contacto entre los dientes, es decir, la anchura proximal de la superficie de los dientes y el trayecto de la unión cemento-esmalte. La encía adherida se extiende en dirección apical a la unión mucogingival, donde se continúa con la mucosa alveolar, su textura es firme de color rosa coral y frecuentemente muestra pequeñas depresiones en la superficie, está delimitada en dirección coronal, por el surco gingival, cuando el surco esta ausente, se limita por un plano horizontal situado a nivel de unión amelo-cementaria. (Lindhe, 2003).

## 1.2 Ligamento periodontal

El ligamento periodontal es tejido conectivo especializado, vascularizado el cual le brinda sostén, nutrición al órgano dentario, es considerado como sistema de amortiguación pues resiste y distribuye las fuerzas de masticación, además que contribuye a la reparación de daño tisular proporcionando homeostasis, esta última es una de las características más interesantes, mide entre 0.15 a 0.38 mm aproximadamente de ancho. Desde la formación del ligamento periodontal, derivado de la capa interna del folículo dental, el tejido conectivo desorganizado es remodelado y su matriz extracelular temporal es convertida en un sistema de fibras organizadas. El tejido reorganizado ahora puede establecer una continuidad en todo

el espacio del ligamento y de este modo asegurar la unión del diente al hueso (Lekic, *et al.* 1996; Nanci y Bosshardt 2006).

En dirección coronal, el ligamento periodontal se continua con la lamina propia de la encía. Está delimitado por las fibras que conectan la cresta del hueso alveolar con el cemento radicular denominándolas fibras de Sharpey, compuestas de colágena tipo I y III co-distribuidas con colágenas tipo V, XII y VI.

Las fibras de colágena han sido divididas por su localización y estructura en grupos de ahí el origen de su nombre; fibras de la cresta alveolar, fibras horizontales, fibras oblicuas y fibras apicales. La organización fibrilar y suprafibrilar del ligamento periodontal es regulada por proteoglicanos como decorin, versican, biglycan (principales proteínas de matriz extracelular) fibronectina, fibromodulina, lumican. (Lindhe 2003; Bartold *et al.* 2006; Komatsu, 2010). El ligamento periodontal tiene características muy similares al tendón con respecto a la estructura de sus densas fibras de colágena y su capacidad de absorber el estrés mecánico durante la actividad fisiológica normal, sin embargo, actualmente se ha demostrado la presencia de marcadores tendo-especificos, como *Scleraxis* y *Tem* (tenomodulina) el cual se cree que desempeña un papel regulador durante el desarrollo y la regeneración del ligamento periodontal. (Seo, *et al.*, 2004; Itaya *et al.*, 2009).

El ligamento periodontal contiene poblaciones celulares heterogéneas, que incluyen fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos, células de los restos epiteliales de Malassez, y células endoteliales. Las células más abundantes del ligamento periodontal son los fibroblastos responsables del metabolismo de los componentes de la matriz extracelular, las células del ligamento periodontal tienen la capacidad de diferenciarse en osteoblastos y cementoblastos, es más, los análisis de perfiles de expresión indican que los osteoblastos del hueso alveolar están estrechamente relacionados con las células del ligamento periodontal por lo que, un simple cambio en las condiciones de mineralización podría transformar el fenotipo (Dangaria *et al.*, 2011), expresando proteínas de biomineralización como fosfatasa alcalina (ALP) y sialoproteína ósea (BSP). La interacción epitelio-mesénquima modula la expresión de estos marcadores en células putativas de los restos epiteliales de Malassez y los fibroblastos del ligamento periodontal interaccionando en el mantenimiento del ligamento periodontal. También son responsables de la producción de las fibras extrínsecas acelulares del cemento en el ligamento periodontal maduro a través de las



células formadoras de colágena, en estudios recientes se ha demostrado su capacidad de diferenciarse en adipocitos. Recientes hallazgos, demostraron que dentro del ligamento periodontal existe un reservorio de células troncales mesenquimales que podrían derivar desde un nicho perivascular, por lo que esto sugiere la capacidad de desarrollar y diferenciar hacia distintos linajes celulares, así como también la propiedad regenerativa para restaurar tejido conectivo y tejido mineralizado (Cho *et al.*, 2000; Lekic *et al.* 2001; Seo, *et al.*, 2004; Shimonishi *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2011).

### 1.3 Hueso Alveolar

Los órganos dentarios están localizados dentro del proceso alveolar del maxilar y la mandíbula, en el humano pueden subdividirse en dos categorías: a) el proceso alveolar que envuelve a las raíces de los dientes erupcionados y b) el cuerpo basal el cual esta constituido por tejido óseo de los maxilares y la mandíbula. El proceso alveolar consiste propiamente en una delgada capa de hueso alveolar que forma la pared de la cavidad del órgano dentario en donde se insertan las fibras de Sharpey. Estos procesos se desarrollan y sufren remodelación de acuerdo a la formación y erupción de los dientes. La forma, localización y función de los órganos dentarios determina la morfología ósea. Durante el desarrollo de las raíces, comienzan los principales cambios como la altura del proceso alveolar, por lo que esto se encuentra íntimamente relacionado con la formación del ligamento periodontal y el cemento radicular. Las funciones generales del proceso alveolar son anclar a las raíces dentales, absorber y distribuir el constante stress de las fuerzas de los contactos oclusales.

El principal componente de la matriz del hueso alveolar es la colágena tipo I y co-distribuida con colágena tipo III, que constituyen la mayor parte de las fibras de Sharpey. La colágena tipo I es expresada predominantemente en los osteoblastos, y por los osteocitos en áreas de remodelación. Otros componentes del hueso alveolar son las proteínas no colágenas específicas del hueso; osteocalcina, sialoproteína ósea, y componentes no específicos como la proteína osteopontina y osteonectina. (Bartold y Narayanan, 1998; Cho y Garant; 2000).

## 1.4 Cemento

El cemento es un tejido conectivo heterogéneo mineralizado que recubre la superficie de la raíz del diente, es de los componentes más importantes del aparato de inserción porque es el sitio donde se insertan las fibras de Sharpey. Histológicamente, el cemento es muy similar al hueso y al diente; sin embargo, análisis químicos y físicos indican que el cemento es menos calcificado que la dentina. Dentro de las características que lo diferencian con el hueso están: ausencia de vasos sanguíneos, vasos linfáticos, no tiene inervación, no sufre reabsorción fisiológica o remodelación, pero es caracterizado por su continua deposición durante toda la vida. Las funciones más importantes de este particular tejido son: revestir y anclar las fibras principales del ligamento periodontal, la participación en el mantenimiento de la relación oclusal (adaptación), la reparación de los defectos de las raíces después de la resorción o fractura, y la protección de la pulpa. (Bosshardt, 2005)

### 1.4.1 Cementogénesis

Durante el desarrollo del diente, después de finalizar formación de la corona y matriz extracelular del esmalte, el mesénquima apical continúa proliferando y migrando para formar el periodonto en desarrollo, y la vaina epitelial de Hertwig (HERS), formada por la unión del epitelio interno y externo del esmalte.

En el desarrollo del cemento se han encontrado diferencias dependiendo de las especies donde ha sido estudiado (roedores, conejos, cerdos, perros, bovino, humano). En los humanos existe una fina capa de matriz epitelial (capa hialina) depositada sobre la superficie de la dentina recién formada por células epiteliales que la cubren, que parece estar involucrada en los tejidos de soporte del diente porque contiene proteínas epiteliales y derivadas del esmalte, lo cual se cree que puede ser parte de la matriz del cemento acelular (Ten Cate, 1997; Bartold y Narayanan, 1998).

La formación del cemento inicia cuando las células de la vaina epitelial de Hertwig y las células mesenquimales del folículo dental se encuentran en proximidad con el desarrollo de la superficie de la raíz, la contribución de cada uno de los tejidos aún no es clara, por lo que





existen diferentes hipótesis para la explicación biológica de la cementogénesis.

La teoría clásica donde se sugiere que la células mesénquimales del folículo dental se diferencian hacia cementoblastos y secretan cemento una vez que atraviesan la vaina epitelial de Hertwig, proponiendo que las células del folículo dental entran en contacto con la dentina radicular después de fragmentar a las células de la HERS, sin embargo se puede entender como un proceso más activo y es descrito como migración celular. (Thomas, 1995; Bartold y Narayanan, 1998; Diekwisch, 2001).

La segunda teoría propone a la cementogénesis como un proceso que es originado de las células epiteliales, basada en estudios de la transformación epitelio-mesénquima de las células de la vaina epitelial de Herwig, donde también se produce una membrana basal que contiene proteínas quimiotácticas, las cuales sirven para dirigir a las células pre-cementoblásticas e inducen su diferenciación. Recientemente, se ha sugerido que proteínas del esmalte pueden estar involucradas en el desarrollo de la superficie de la raíz actuando directamente en la diferenciación de las células de HERS hacia cementoblastos. En la última parte de la cementogénesis, que inicia cuando el diente entra en oclusión y el cemento celular es formado, la proliferación de las células HERS es considerablemente reducida, y algunas células son atrapadas en la matriz mineralizada (Zeichner-David *et al.*, 2003; Zeichner-David, 2006; Nuñez *et al.*, 2010).

Actualmente estas dos teorías son válidas puesto que las dos en su conjunto postulan la existencia de diferentes tipos de cementoblastos: los originados de las células de la vaina epitelial de Herwig por medio de la transformación epitelio-mesénquima (formando el cemento acelular) y los que derivan de las células del folículo dental (formando el cemento celular).

La biología del cemento, los aspectos moleculares y celulares de la cementogénesis han propuesto diferentes tipos de cemento clasificados de acuerdo a su origen y sus fibras.

1. Cemento acelular de fibras extrínsecas (AIFC), es encontrado en la parte media y coronal de la raíz y contiene principalmente fibras de Sharpey. Este tipo de cemento es parte importante el aparato de unión y conecta al órgano dentario con el hueso alveolar, las que producen este tipo de cemento tienen una matriz parecida a pequeños paquetes de fibras de colágena que incrementan en longitud y densidad en dirección apico-coronal.

2. Cemento celular de fibras intrínsecas (CIFC), contiene cementocitos embebidos en la matriz de fibras de colágena, estas se encuentran orientadas principalmente paralelas a la superficie de la raíz, ubicadas principalmente en la reabsorción y contiene fibras intrínsecas y cementocitos.
3. Cemento acelular afibrilar (AAC), generalmente depositado en las superficies del esmalte maduro, es decir durante la formación y erupción del órgano dental, localizado por arriba del esmalte cervical y la unión amelo-cementaria, el principal componente son los glicosamoniglucanos.
4. Cemento celular, mixto estratificado (CMFC), esta presente en el tercio apical de las raíces dentales y en las furcas, se sabe que le proporciona un sistema de remodelación la superficie de la raíz compensando el desplazamiento de los órganos dentales en sus cavidades alveolares, contiene fibras intrínsecas, y extrínsecas así como también cementocitos.

El cemento está constituido aproximadamente de 50% de hidroxapatita y 50% de proteínas colágenas y no colágenas (Saygin *et al.*, 2000).



### 1.4.2 Proteínas colágenas

La composición orgánica de la matriz extracelular del cemento es principalmente de colágenas, de tipo I predominantemente, la cual juega un papel estructural así como morfogénico, además de proveer el andamiaje para los cristales de hidroxiapatita (HA), y brinda resistencia a la tracción. La colágena tipo III, la cual cubre a las fibras de colágena tipo I, se encuentra en altas concentraciones durante el desarrollo, reparación y regeneración de los tejidos mineralizados. En pequeñas cantidades se han localizado otros tipos de colágenas, como la tipo V, VI y tipo XIV, en extractos de cemento maduro. Sin embargo, estos pueden ser contaminantes provenientes del ligamento periodontal asociados con las fibras insertadas dentro del cemento. (Nanci y Bosshardt, 2006; Grzesik *et al.*, 2002; Saygin *et al.*, 2000)

### 1.4.3 Proteínas no colágenas

Las proteínas de matriz no colágenas que a la fecha han sido identificadas, son la sialoproteína osea (BSP), la proteína de la matriz de la dentina 1 (DMP-1), sialoproteína dentinaria (DSP), fibronectina (FN), osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN), osteonectina, tenascina, proteoglicanos, proteolípidos, y varios factores de crecimiento incluyendo el factor de crecimiento tipo insulina (IGF) (ver Tabla 1). Estas proteínas se comporten con la matriz extracelular del hueso, con la diferencia de que existen proteínas exclusivas del cemento como son; la proteína de adhesión del cemento (CAP), la proteína del cemento 1 (CEMP1). En hallazgos recientes se demostró la presencia de proteínas propias del esmalte, que se sabía que participaban en la formación del cemento, y se encontró la presencia de amelogenina (AMEL) dentro del núcleo de los cementoblastos, comportándose como un factor de crecimiento relacionado en los procesos de proliferación y diferenciación, así como la presencia de la proteína ameloblastina (AMBN), que actúa en sinergismo con AMEL, en los procesos de regulación de la diferenciación de los cementoblastos. (Grzesik *et al.*, 2002; Nanci y Bosshardt, 2006; Alvarez-Pérez *et al.*, 2006, Hirata, *et al.*, 2009, Nuñez *et al.*, 2010).

**Tabla 1. Factores de crecimiento detectados en el cemento radicular, cementogénesis y su actividad biológica.**

<b>Factores de crecimiento</b>	<b>Actividad Biológica</b>
IGF (factor de crecimiento tipo insulina) *	Proliferación, diferenciación, síntesis de matriz extracelular
FGF (factor de crecimiento fibroblástico)	Proliferación, diferenciación, síntesis de matriz extracelular, angiogénesis
PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas)	Proliferación, diferenciación, síntesis de matriz extracelular
TGF- $\beta$ (factor de crecimiento transformante) °	Síntesis de matriz extracelular, angiogénesis, quimiotáxis
BMPs (proteínas morfogénicas del hueso) BMP-2,-3,-4,-7. °	Síntesis de matriz extracelular, diferenciación (epitelio-mesénquima) (Preosteoblastos – cementoblastos)
EGF (factor de crecimiento epidermal)	Proliferación, diferenciación
CGF (factor de crecimiento derivado del cemento) *	Proliferación y diferenciación

\* CFG es una isoforma de IGF. ° BMPs pertenecen a la familia de TGF- $\beta$ . (Adaptado de Grzesik WJ, Narayanan AS., Cementum and periodontal wound healing and regeneration., Crit Rev Oral Biol Med. 2002;13(6):474-84.

La proporción de las proteínas no colágenas es diferente pues varía entre tejido y tejido, todo depende de los requerimientos funcionales. Estas proteínas son producidas por células de tejido conectivo y se encuentran principalmente en la matriz extracelular. Esta clasificación está compuesta por proteoglicanos, que en conjunto son moléculas de suma importancia en los eventos de desarrollo, reparación, patológicos e incluso en las etapas de mineralización (ver Tabla 2). (Mariotti, 1993; Hall y Embery, 1997; Bartold y Narayanan, 1998; Yamamoto *et al.*, 2004; Bosshardt, 2005; Miao *et al.*, 2011).

**Tabla 2. Composición de la matriz extracelular de los cementoblastos.**

<b>Proteínas de matriz extracelular</b>	<b>Funciones</b>
<b>Fibronectina</b>	Adhesión celular, morfología, organización del citoesqueleto, migración celular y quimiotaxis, fagocitosis, hemostasis y trombosis, induce apoptosis en caso de enfermedad periodontal
<b>Laminina</b>	Media la unión y el estado diferenciado de las células epiteliales de colágeno tipo IV, promueve el crecimiento celular
<b>Tenascina</b>	Facilita las interacciones epitelio-mesénquima; desestabiliza las adhesiones célula-matriz
<b>Elastina</b>	Facilita la elasticidad, compresión o distorsión del tejido debido a fuerzas aplicadas, actividad quimiotáctica

Adaptado de Mariotti A., The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues., *Periodontol* 2000., 1993 Oct;3:39-63.

## 1.5 Biomineralización

El proceso inicial de la mineralización biológica de los tejidos duros derivados del mesodermo, tales como el hueso, la dentina, el cemento radicular, el cartílago calcificado o bien el cartílago hipertrófico son conocidos por su papel inductor mineral *de novo*, iniciando con la formación de vesículas en la matriz, utilizando este término debido a que son pequeños cuerpos esféricos (20 – 200 nm) observados en la matriz pre-mineralizada antes de la subsecuente mineralización de la matriz. La biomineralización es un proceso regulado por interacciones de minerales y moléculas orgánicas extracelulares, es decir donde existe una estrecha relación entre las proteínas colágenas y las proteínas no colágenas. El paso inicial es la formación de los cristales de hidroxapatita dentro de las vesículas de la matriz extracelular. En la fase orgánica de la mineralización predomina la presencia de fibras de colágena, ya que actúan como andamio para otras proteínas las cuales forman núcleos minerales y regulan su crecimiento. (Takano *et al.*, 2000; Li Y. *et al.*, 2008; Golub E., 2009; Lyngstadaas SP. *et al.*, 2009., Behrens y Bäurelein, 2007).

### 1.5.1 Fosfatasa Alcalina

Es una enzima lisosomal, en 1923, Robison sugirió que está implicada en los procesos de la mineralización del hueso y la calcificación del cartílago, debido a que tiene dominios de unión a las colágenas tipos I, II, y X. Se ha encontrado su presencia en osteoblastos, fibroblastos y neutrófilos, así como en el suero y también en el fluido gingival crevicular, en este último relacionada con el incremento de la inflamación gingival. Inclusive la actividad de la fosfatasa alcalina también se observa en el ligamento periodontal que recubre al cemento acelular, células de la médula ósea, células endosteales y cementoblastos. La actividad de ALP puede diferenciar a los fibroblastos del ligamento periodontal hacia osteoblastos o cementoblastos, no así a los fibroblastos gingivales. Es una fosfoproteína necesaria para la iniciación y maduración de la formación del cristal de hidroxapatita esto a través de la hidrólisis del pirofosfato por lo tanto, es una molécula que incrementa su actividad una vez iniciada la mineralización. En la ausencia de ALP, como sucede en una hipofosfatasa se



presenta una mineralización anormal en el desarrollo esquelético y en cavidad oral se observa escasez de cemento, y la pérdida prematura de los órganos dentales (Bartold y Narayanan, 1998; Embery y Waddington, 1994; Mouri *et al.*, 2003; Lallier *et al.*, 2007; Whyte, 2010; Orimo, 2010).

### 1.5.2 Sialoproteína ósea

Aislada por primera vez de hueso bovino, constituye el 15% del total de las proteínas no colágenas en hueso, la secuencia polipeptídica contiene 301 aminoácidos, por lo que su peso molecular es de 33.6 kDa y debido a las modificaciones postraduccionales, ya que es altamente glicosilada, su peso molecular varía y se identificó en la banda de 80 kDa (Wuttke *et al.*, 2001). Cerca del carboxilo terminal, contiene la región RGD (arginina, glicina y ácido aspártico) secuencia de unión celular, que interacciona con las integrinas, y dos distintas regiones de ácido glutámico que contribuyen a la unión de las células de hueso a la matriz extracelular y nucleación en la formación de cristales de hidroxiapatita y afinidad por el calcio (Harris *et al.*, 2000; Ganss *et al.*, 1999). La BSP es expresada en tejidos mineralizados como cemento, cartílago, dentina, en la formación de hueso e incluso, hallazgos recientes indican que también es expresada en los ameloblastos, por lo que se considera como marcador específico de diferenciación inicial hacia fenotipo mineralizante, inclusive en los eventos de regeneración, lo que le da un papel importante durante la osteogénesis y la cementogénesis ya que es un factor molecular fundamental durante estos procesos (Macneil *et al.*, 1994; Nanci y Bosshard, 2006).

### 1.5.3 Osteopontina

Descrita por primera vez como una fosfoproteína de transformación específica de 60 kDa, en 1979 por Senger, el nombre de la proteína osteopontina (OPN) fue dado debido a que refleja el potencial para servir como puente entre las células y los cristales de HA a través del dominio RGD (Arg-Gly-Asp), contiene sitios de fosforilación y glicosilación. Se ha

encontrado en múltiples tejidos incluyendo hueso, dentina, cemento, cartilago hipertrófico, riñón, cerebro, células endometriales derivadas de la médula ósea, células glandulares, tejidos vasculares, saliva, glándulas sudoríparas, conductos pancreáticos y biliar, túbulos renales e intestino, así como en los macrófagos activados y linfocitos, sugiriendo que su presencia en los diferentes tejidos es debida a que juega una papel durante la regeneración. En estudios recientes se ha demostrado que la OPN es capaz de inducir a las células características de cáncer (Johnston *et al.*, 2008). Es sintetizada por osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, células epiteliales y células del músculo liso. Sin embargo, la presencia significativa en hueso y cemento radicular indica su función en los frentes de mineralización para la formación de tejido nuevo, además participa en la nucleación de la formación del cristal mineral y el crecimiento de los mismos por lo que es, una proteína expresada durante el inicio de la cementogénesis. En combinación con HA y oxalato de calcio puede mediar la unión celular hacia las estructuras del cristal mineral (Bartold y Narayanan, 1998; Sodek *et al.*, 2000; Mouri *et al.*, 2003).

#### 1.5.4 Osteocalcina

Es también nombrada como la proteína Gla del hueso, es altamente conservada entre las especies, se conoce como marcador de tejidos calcificados, maduración de osteoblastos, odontoblastos y cementoblastos. Se ha observado su expresión en riñón, pulmón, corazón, cartilago, células del músculo liso y las paredes de los vasos sanguíneos. Es una proteína de 84 – 100 aminoácidos y un peso molecular de 5.8 kDa, dentro de su secuencia contiene cinco residuos de ácido glutámico (Gla), de ahí el origen de su nombre. Dentro de sus funciones se sabe que une a los iones de calcio y cristales de HA, que influye en el movimiento y proliferación de los osteoclastos, y además que regula el frente de mineralización. Recientemente se ha sugerido que actúa como hormona, ya que influye en el metabolismo de la energía por la regulación de la secreción de insulina. (Proudfoot y Shanahan, 2006; Nanci y Bosshardt, 2006; Mariotti, 1993; Lee *et al.*, 2007)





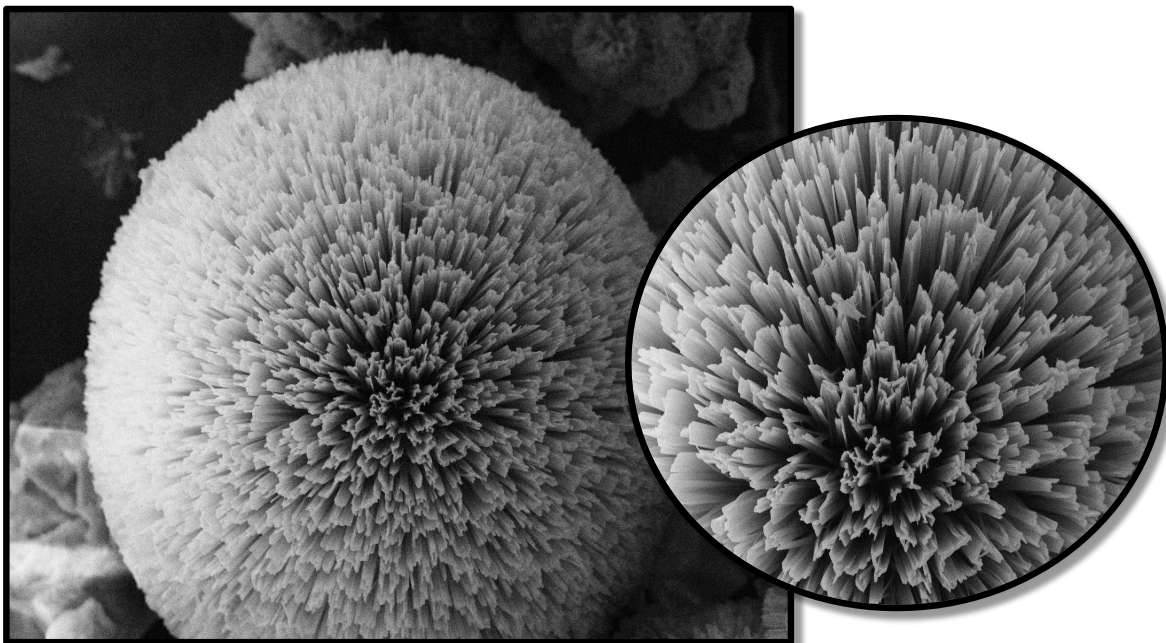
### 1.5.5 Proteína de adhesión del cemento (CAP)

Es una proteína que se aisló, caracterizó y purificó a partir de extractos de cemento maduro, bovino y humano. Presenta homología con la colágena tipo I y XVII, sin embargo no existe relación inmunológica entre ellos (Arzate *et al.*, 1992; Saito *et al.*, 2001). Es una proteína propia del cemento radicular con un peso molecular de 56 kDa, es expresada en los cementoblastos, es capaz de mantener la migración, adhesión de fibroblastos, osteoblastos, células periodontales, la orientación del tejido conectivo a la superficie de la raíz e incluso media la adhesión de células del músculo liso y células endoteliales, y esta propiedad es mediada a través de integrinas  $\alpha\beta 1$  (Olson *et al.*, 1991; Ivanovski *et al.*, 1999). Promueve la propagación de células mesenquimales, por lo que CAP puede interactuar selectivamente con cierto tipo de células y subtipos celulares, y afectan sus actividades por lo tanto juegan un papel de determinación durante la formación y regeneración de tejido conectivo periodontal, actuando como mitógeno y como molécula inductora de la diferenciación hacia un fenotipo mineralizante (Arzate *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996; BarKana *et al.*, 2000; Arzate *et al.*, 2002; Zeichner-David, 2006)

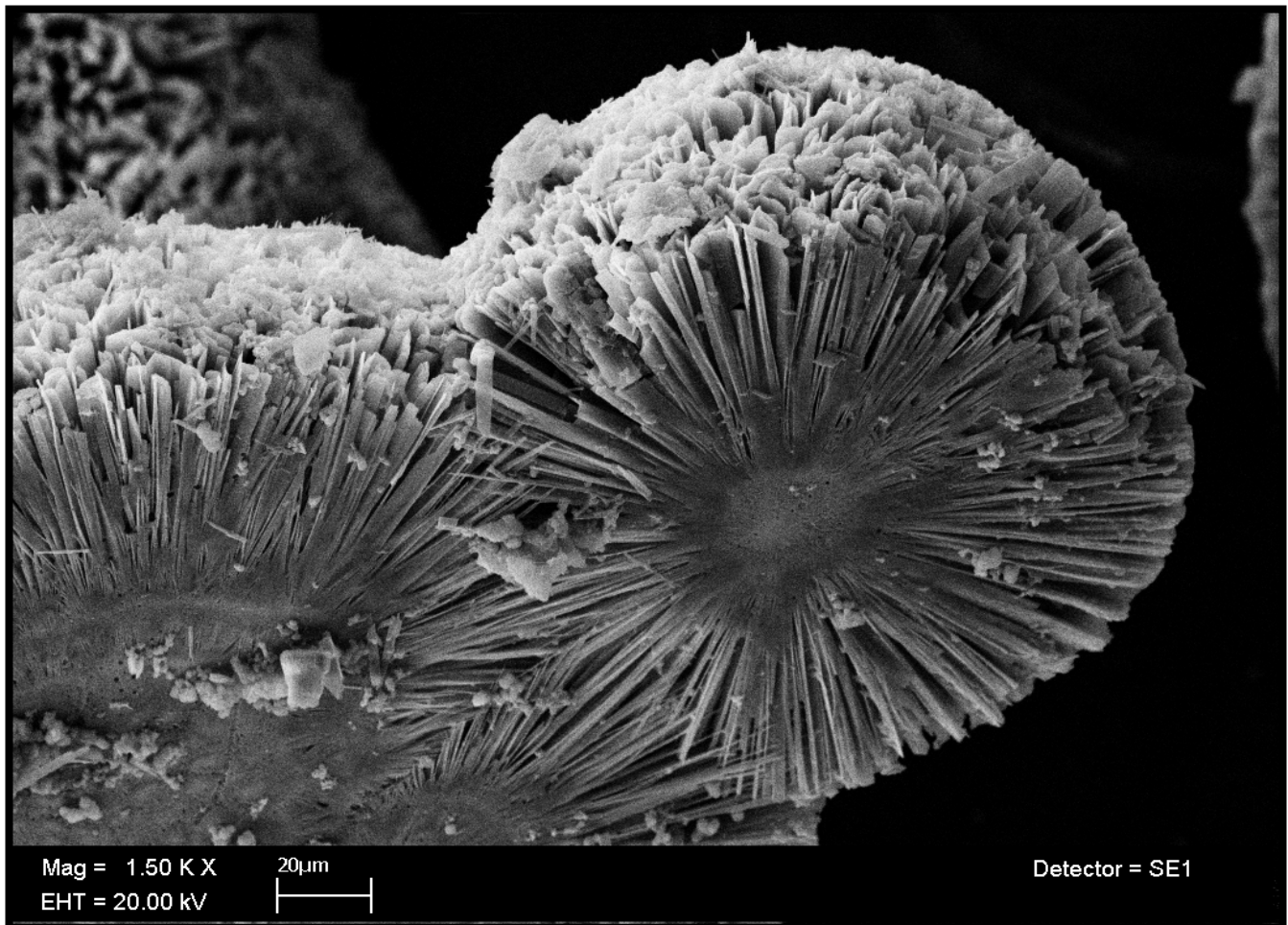
### 1.5.6 Proteína del cemento 1 (CEMP1)

Es una proteína de 247 aminoácidos con un peso molecular teórico de 25.9 kDa, aislada a través del medio condicionado de línea celular derivada de un cementoblastoma humano *in vitro*. El ADNc de 1374 nucleótidos contiene un marco de lectura abierto de 744 nucleótidos, la búsqueda en las bases de datos determinó que tiene 100% de homología con una clona de ADN de *Homo sapiens* presente en el cromosoma 16 (Gene Bank AC093525.3). Es una proteína citoplasmática, sin embargo se ha especulado que su localización podía ser nuclear pero no contiene motivos de unión a ADN. No se ha encontrado similitud significativa con ninguna otra proteína, sin embargo una región de la proteína (del residuo 30 al 110) presenta 40% de identidad con la colágena tipo X, además de presentar reacción cruzada con anticuerpos específicos contra la colágena X. Los resultados a través del dicroísmo circular de CEMP1 determina que presenta estructura

secundaria principalmente compuesta de hojas  $\beta$ , 10% de  $\alpha$ -hélice y 35% de conformación al azar, presenta dos sitios de para *N*-glicosilaciones en los aminoácidos 20 y 25 (Asn-X-Ser/Thr), además se detectó la presencia de fosforilaciones utilizando anticuerpos anti-fosfoserina y anti-fosfotreonina. Se ha logrado dilucidar que las modificaciones pos-transcripcionales contribuyen en 43% al peso total de la proteína nativa, por lo que tiene una movilidad relativa de (Mr) 50,000 (Alvarez-Pérez *et al.*, 2006; Carmona-Rodríguez *et al.*, 2007; Villarreal-Ramírez *et al.*, 2009). Su expresión e inmunolocalización es específica de los cementoblastos, subpoblación de células del ligamento periodontal y células paravasculares del ligamento periodontal, así como también en espacios endosteales del hueso (Arzate *et al.*, 2002). CEMP1 promueve la adhesión celular, proliferación y la diferenciación, incluso mediante la transfección a células no mineralizantes (fibroblastos gingivales humanos) se demostró el cambio de fenotipo de los fibroblastos hacia mineralizante. Actualmente nuestros conocimientos sobre la proteína específica del cemento radicular nos dice que tiene una alta afinidad por la hidroxiapatita y que participa en los procesos de mineralización; regulando el crecimiento y morfología a través de la nucleación de cristales de fosfato octacálcico (OCP) (cristal precursor de la hidroxiapatita) (Arzate *et al.*, 1996; Alvarez Pérez *et al.*, 2003; Carmona-Rodríguez *et al.*, 2007; Romo-Arévalo *et al.*, 2009).



**Figura 2. Morfología de los cristales de fosfato de octacálcico (OCP).** Formación y crecimiento de cristales de la proteína rhCEMP1, obtenidos a través de ensayos libres de células. Donación del Laboratorio de biología periodontal y tejidos mineralizados. UNAM.



**Figura 3. Morfología de los cristales de fosfato de calcio.** Los cristales se formaron a través de un núcleo con la proteína de cemento 1 (rhCEMP1). Donación del Laboratorio de biología periodontal y tejidos mineralizados. UNAM.

## 1.6 Enfermedad periodontal

La periodontitis es la principal causa de pérdida dental. Es una enfermedad caracterizada por la destrucción de los tejidos de soporte del periodonto; encía, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. La inflamación debido a la progresión de la enfermedad conduce a la degradación de las propiedades físicas que termina en la pérdida de la inserción y la función, ocasionando la formación de bolsas periodontales, que dependiendo de su profundidad y extensión pueden albergar células bacterianas hasta una densidad de  $10^9$ . (Loesche *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2007). Las enfermedades periodontales se encuentran entre las afecciones más frecuentes que atacan a niños, adolescentes y adultos, incluyendo gingivitis, periodontitis crónica ya sea localizada o generalizada, formas agresivas y asociadas a enfermedades sistémicas. En la búsqueda de tratamientos que puedan revertir la destrucción, incluyendo la regeneración de neoformación de hueso, cemento y ligamento periodontal, incrementan los intentos de comprensión tanto de los mecanismos celulares como moleculares y los factores de regulación de la formación de estos tejidos durante el desarrollo y regeneración (Oh *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2004)

## 1.7 Regeneración periodontal

La regeneración del periodonto es el principal objetivo en el tratamiento cuando ha afectado por la enfermedad periodontal, las terapias regenerativas puede ser definidas como la reproducción o la neo- formación de los tejidos que han sido perdidos o dañados como resultados de lesión ó infección. El concepto de regeneración difiere de reparación, y es caracterizado por el reemplazamiento de los tejidos deteriorados con algo que puede ser inferior al tejidos original tanto estructuralmente como funcionalmente.

Existen numerosas técnicas en la clínica como son el curetaje, el raspado y alisado radicular, incluyendo injertos óseos, uso de membranas para lograr una regeneración tisular guiada, así como también factores de crecimiento, terapias génicas utilizando proteínas morfogénicas de hueso, proteínas del esmalte (ENDOGAIN), factores de crecimiento, además del uso de vectores (retrovirus, adenovirus, no virales, plásmidos) y estrategias de



diseño han mejorado con el fin de lograr controlar y detener la progresión de la enfermedad y llegar a reparar o regenerar los tejidos afectados. La terapia de la regeneración periodontal puede incluir el uso de células troncales capaces de diferenciarse hacia el linaje celular deseado, desde la perspectiva biológica lo que realmente se busca es que ocurra la disponibilidad de modificarse hacia un tipo celular apropiado, junto con el favorable ambiente que promueva la migración celular, la adhesión, proliferación y la diferenciación, todo el contexto necesario y que esté coordinado en tiempo y espacio. Actualmente lo que realmente parece funcionar es la combinación de varias técnicas, en las que se usen células seleccionadas, un biomaterial o andamio, moléculas señalizadoras y componentes de la matriz extracelular (Shimono et al.,2003; Zohar y Tenenbaum et al., 2005; Ivanovski et al., 2006; Bosshardt, 2008; Scheller y Krebsbach, 2009; Fischer *et al.*,2011).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad el cuidado de la higiene oral sigue siendo considerada, por parte de los programas de salud, como un aspecto fundamental dentro del equilibrio general de salud de cada individuo. Por lo contrario, las consecuencias de la prevalencia de la enfermedad periodontal, como son la gingivitis y la periodontitis en la población, es cada vez mayor, y trae como consecuencia la pérdida del órgano dentario como resultado de la inflamación de los tejidos de sostén. Es importante resaltar que la etiología de estas enfermedades son multifactoriales, por lo que los tratamientos empleados logran eliminar a el agente causal, pero sin conseguir la regeneración periodontal, pues es un proceso complejo que busca la reparación de la encía, el ligamento periodontal, el hueso y el cemento radicular, este último juega un papel crítico para lograr la maduración apropiada del periodonto durante la regeneración de estructuras periodontales.

## 3. JUSTIFICACIÓN

La terapéutica de hoy en día está encaminada hacia la ingeniería de tejidos, es decir, la medicina regenerativa, mediante el uso de células madre, factores de crecimiento, moléculas y proteínas involucrados en un proceso en el cual se requiere la interacción de las señales apropiadas, los elementos celulares, el aporte sanguíneo y el andamiaje necesario para rellenar del defecto de los tejidos. En la regeneración periodontal, el evento principal es la reinscripción de las fibras de colágena en el interior del cemento y la neoformación del cemento radicular, motivo por el cual, proponemos que la proteína del cemento 1 (CEMP1) puede interactuar con las células de ligamento periodontal e inducir su diferenciación logrando la restauración de los tejidos afectados o en algunos casos ausentes.



#### **4. HIPÓTESIS**

La proteína del cemento 1 (CEMP1) es un factor clave para la diferenciación de células del ligamento periodontal humano hacia fenotipos: cementoblástico, osteoblástico y/o condroblástico, y la subsecuente mineralización de la matriz extracelular durante la formación de tejido mineralizado *in vitro*.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la proteína del cemento 1 (CEMP1) induce la proliferación y la diferenciación de las células derivadas del ligamento periodontal humano hacia un fenotipo cementoblástico, osteoblástico y/o condroblástico.

##### **5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar la expresión de los productos génicos que participan en el proceso de mineralización: fosfatasa alcalina (ALP), sialoproteína ósea (BSP), la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento (CAP).

Determinar la expresión de los productos génicos que participan en la diferenciación hacia un fenotipo condroblástico: colágena tipo II (COL II), colágena tipo X (COL X), el factor de transcripción (SOX9) y el proteoglicano (AGRECANO).

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Cultivo celular

Se aislaron y cultivaron células derivadas del ligamento periodontal humano (HPLC), el aislamiento se llevó a cabo a través de la técnica de explante celular, como se ha descrito previamente (Arazate *et al.*, 1998, 2000); las células fueron incubadas en cajas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> en medio DMEM, suplementado con Suero Fetal Bovino al 10% y antibióticos (100 µg/ml estreptomicina y 100 U/ml penicilina, Sigma Chemical CO, Saint Louis MO). En un ambiente 100% de humedad a 37° C, 5% de aire de CO<sub>2</sub>. Las células del ligamento periodontal humano se usaron en el segundo pasaje para todos los procedimientos experimentales utilizando medio mineralizante (10% SFB, 10mM β-glicerolfosfato y 50 µg/ml de ácido ascórbico y 10<sup>-7</sup>M dexametasona).

### 6.2 Purificación de la proteína

Se construyó el vector pES-DEST42/CEMP1 que contó con una etiqueta de 6 histidinas y un epítoto en el COOH terminal. El plásmido resultante se introdujo en células de *Escherichia coli* BL21 (E. Coli BL21 Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células de *E. coli* BL21 que contenían la construcción DEST42/CEMP1, se crecieron a 37° C hasta alcanzar una D.O. de 0.4 a 600 nm, en medio LB (Luria-Bertani) que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 34 µg/ml de cloranfenicol. Las células se recuperaron después de una noche de incubación mediante centrifugación a 4700 rpm a 4 °C durante 15 minutos. El botón celular se resuspendió en amortiguador de ruptura (4ml de amortiguador de ruptura por cada 100 ml de medio LB) y sonicó durante cinco ciclos de un minuto con intervalos de un minuto entre cada uno. Una vez sonicado, se le adicionó lisozima a una concentración final de 1 mg/ml, DNAsa y RNAsa a una concentración final de 5 µg/ml cada una, inhibidores de proteasas (PMSF, N-etilmaleimida, aprotinina 1 µg/ml, leupeptina y pepstatina 0.5 µg/ml) y se incubó a 4° C con agitación durante 1 hora. Se recuperó el sobrenadante por medio de dos ciclos de centrifugación.





Posteriormente se realizó una precipitación del extracto de proteínas y por último, se purificó a través de cromatografía de afinidad utilizando columnas de níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) e hidroxapatita (HA Ultrogel).

### 6.3 Proliferación celular

Para determinar si la proteína CEMP1 causaba un efecto en la proliferación celular, las células derivadas del ligamento periodontal humano (HPLC), se sembraron en cajas de cultivo de 96 pozos a una densidad de  $2.5 \times 10^3$  células por pozo. A el día siguiente, que se asignó como día 0, se cambió el medio y se trataron con DMEM 10% SFB, DMEM 2% SFB (grupos controles), DMEM + CEMP1 ( $.1 \mu\text{g/ml}$ ), DMEM + CEMP1 ( $.5 \mu\text{g/ml}$ ) (grupos experimentales). Se retiró el medio de cultivo se le añadieron  $10 \mu\text{l}$  de MTT ( $0.5 \text{ mg/ml}$ ) incubándolo por 3 horas, se retiró el MTT y se agregaron  $100 \mu\text{l}$  de DMSO, se incubó por 15 minutos y se leyó la absorbancia a  $570 \text{ nm}$ . El número de células se evaluó en los días 0, 1, 2, 3, 4, y 5. Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron dos veces.

### 6.4 Ensayo de actividad específica de fosfatasa alcalina

Se sembraron  $2 \times 10^4$  células HPLC por triplicado en cajas de 24 pozos (Costar Cambridge MA, USA). Las células fueron cultivadas en medio mineralizado durante 3, 7, 14 y 21 días en las mismas condiciones descritas anteriormente. La actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) se determinó por medio de la técnica de Lowry *et al* (1954). Las monocapas celulares fueron suspendidas en un amortiguador con  $10 \text{ mM}$  Tris-HCL, a un pH 7.4 y  $0.1\%$  de Triton X-100, para posteriormente ser sonicadas. La actividad enzimática se analizó usando  $8 \text{ mM}$  p-nitrofenil-disodio-fosfato (PNP) como sustrato y  $2 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  en amortiguador de  $0.1 \text{ M}$  Tris-HCL, a pH 9.8 e incubando a  $37^\circ \text{ C}$  por 30 minutos. La reacción se detuvo por adición de  $50 \mu\text{l}$  de  $0.05 \text{ N}$  NaOH y la absorbancia se determinó a  $405 \text{ nm}$ . Las muestras se analizaron en



condiciones que aseguraron linealidad con respecto al tiempo y a la concentración de la proteína. La concentración de la proteína se determinó de acuerdo a método de Bradford (1976) usando albúmina (BSA) como estándar. Los ensayos se hicieron por triplicado y se repitieron tres veces.

## 6.5 Ensayo de mineralización

Las células derivadas del ligamento periodontal humano se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^4$  por triplicado en cajas de 24 pozos (Costar Cambridge MA, USA) y fueron tratadas como se menciona con anterioridad. Los cultivos se mantuvieron durante 3, 7, 14 y 21 días. En cada período de tiempo, las células se fijaron con etanol al 70% por 10 minutos y se tiñeron con alizarina roja (2%) para detectar sales de calcio y con azul de alciano (3%) para determinar la presencia de subpoblaciones celulares que expresen las glicoproteínas de fenotipo condroblástico.

## 6.6 Western Blot

Se sembraron  $2 \times 10^4$  HPLC en cajas de cultivo de 24 pozos por triplicado, y se cultivaron durante 3, 7, 14 y 21 días de la misma manera que se describe anteriormente, el medio condicionante de los grupos controles y experimentales se retiró a los tiempos establecidos, en cada plazo, las células se rasparon, se resuspendieron en PBS frío y se centrifugaron por 5 minutos a 2000 rpm. Los botones celulares fueron lisados en buffer de lisis frío (1 mM EDTA, pH 8.0), 10 mM Hepes, 50 mM NaCl, 0.5% Tritón X-100, 1 mM fenilmetisulfonil fluorado, 5  $\mu$ g leupeptina y 10  $\mu$ g/ml aprotinina. Se separaron las proteínas electroforéticamente y posteriormente se transfirió a una membrana Immobilon-P (PVDF) de nitrocelulosa (Millipore Corp., Bedford, MA), con la concentración 10  $\mu$ g/ $\mu$ l. Las membranas se boquearon con leche descremada 5% durante 1 hora y después se incubaron con anticuerpos policlonales (1:1000) contra BSP, CEMP1, CAP, SOX9, Agrecano o Colágena tipo II y X toda



la noche a 4° C. Después del lavado, las membranas se incubaron con una dilución 1:1000 del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasas anticuerpo de cabra anti- IgG de conejo por 2 horas, después se lavaron con PBS, y se revelaron con diaminobenzidina (DAB). Los blots se escanearon y se analizaron con un sistema de análisis y documentación Kodak para electroforesis (EDAS) 290. Los resultados se expresaron como porcentajes de intensidad de proteína obtenida en cultivo control y respecto a la expresión de GAPDH como proteína constitutiva.

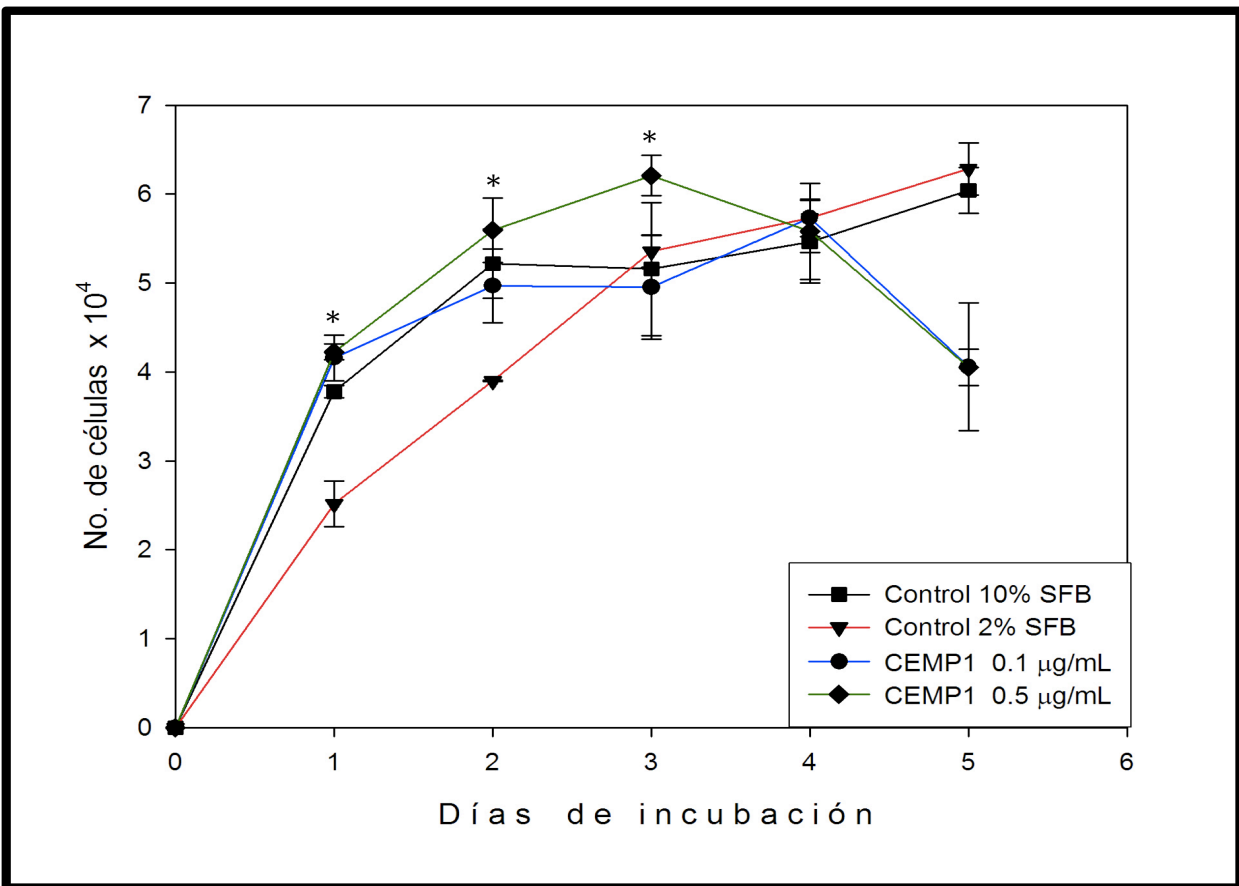
## **6.7 Análisis Estadísticos**

Los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación celular, actividad específica de la fosfatasa alcalina, se llevaron a cabo utilizando la prueba t de Student, utilizando el software Sigma Plot 10.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Proliferación celular

Para determinar si la expresión de CEMP1 tenía un efecto en la proliferación celular, las células derivadas del ligamento periodontal humano fueron tratadas con dos diferentes concentraciones de la proteína CEMP1 ( 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) ( 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) utilizando como controles puro medio DMEM a 2% y 10% de suero fetal bovino (SFB). Esto demostró que la concentración de la proteína CEMP1 0.1  $\mu\text{g/ml}$  y 0.5  $\mu\text{g/ml}$  tuvieron un comportamiento muy similar hasta el día 2 de incubación, sin embargo la concentración efectiva de CEMP1 por la proliferación fue de 0.5  $\mu\text{g/m}$  hasta el día 4 de cultivo donde se observa una drástica elevación del conteo celular, no así en los grupos controles (Figura 4).

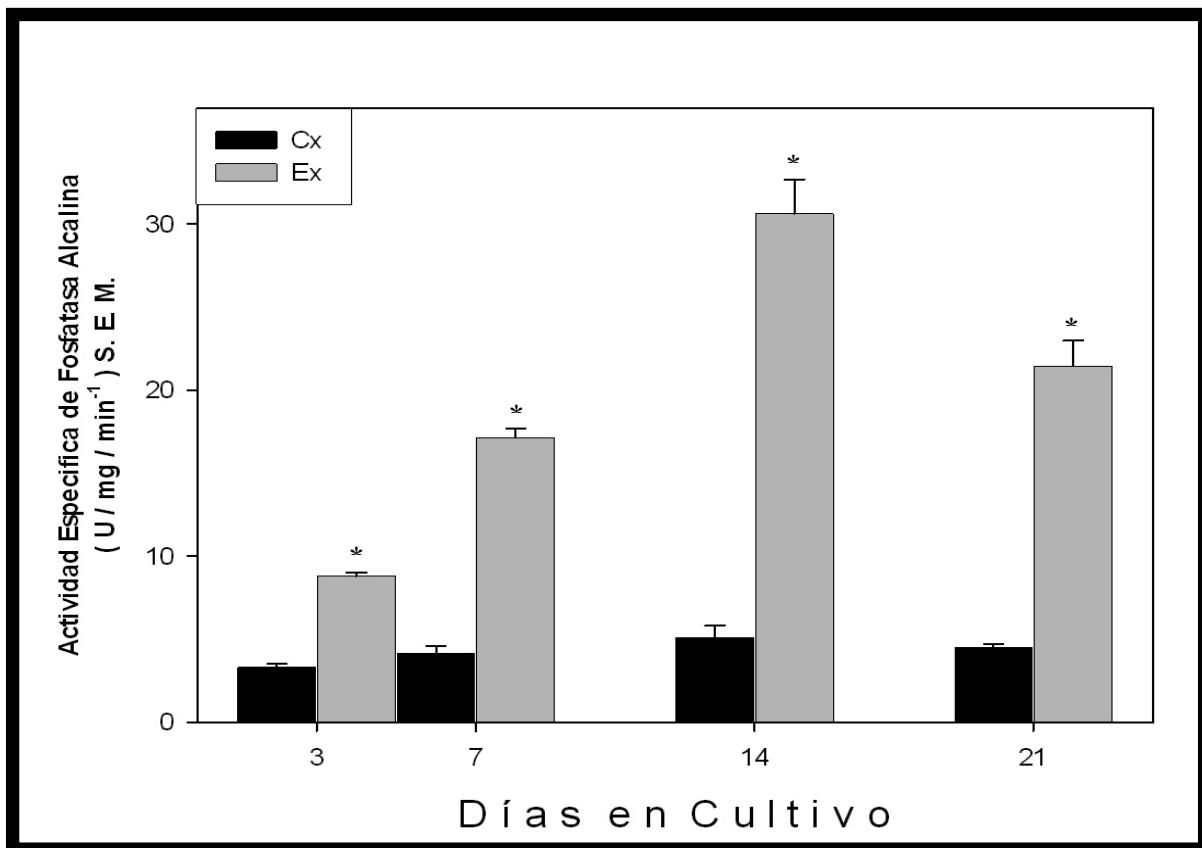


**Figura 4. Efecto de la proteína CEMP1 en cultivo de células derivadas del ligamento periodontal humano.** Utilizaron dos concentraciones (0.1 y 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) en medio libre de SFB, comparado con los controles (DMEM a 2 % y 10% de SFB) ( $p < 0.05$ ).



## 7.2 Ensayo de la actividad específica de la fosfatasa alcalina

Se determinó, a través del ensayo enzimático, que la proteína CEMP1 induce y eleva la expresión de la actividad específica de la fosfatasa alcalina, se promueve la diferenciación y mineralización de las células derivadas del ligamento periodontal humano, medidos a los días 3, 7, 14 y 21. Indicando que al tercer día hubo un aumento al doble en el grupo experimental, y la subsecuente expresión significativamente mayor en hasta el día 14 de tratamiento. La actividad disminuyó al día 21 con respecto al 14 que siguió siendo significativa con respecto al control. Ésta diferencia significativa en los grupos experimentales, se evaluó con la prueba estadística t-student ( $p < 0.001$ ,  $n = 2$ ). Por lo que esto nos indica que CEMP1 tiene una influencia directa asociada con la diferenciación hacia una fenotipo mineralizante. (Figura 5).



**Figura 5. Actividad específica de ALP en los cultivos de células derivadas del ligamento periodontal humano.** Se observa incremento significativo en los grupos experimentales, ( $p < 0.001$ ).

### 7.3 Western Blot

Se confirmó la expresión de las proteínas implicadas en el fenotipo cementoblástico, osteoblástico y condroblástico mediante el análisis de inmunodetección por la técnica de western blot (Figura 4 y 5) en las células derivadas del ligamento periodontal humano inducidas con CEMP1 a 5  $\mu$ l/ml, en a los días 3, 7, 14 y 21, de tratamiento como control de carga la proteína constitutiva, gliceraldeído 3 – fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Nuestros resultados del análisis de densitometría indican que las proteínas expresadas en el fenotipo cementoblástico / osteoblástico como son CAP, BSP y CEMP1, mostraron un incremento en el día 3 en los grupos experimentales, en el día 21 existe una expresión menos prominente, excepto en el resultado de CEMP1, sugiriendo que se éste auto – regulando su presencia (Figura 6).

En los resultados de la expresión de las proteínas involucradas en la diferenciación hacia el fenotipo condroblástico, se observa la presencia de la proteína SOX9 y colágena II en el día 3 de cultivo y el día 7 para la glicoproteína AGRECANO. Así como una expresión incrementada en el día 21 de la colágena tipo X (COL X), evidenciando la presencia del marcador del cartílago hipertrófico, involucrado en la osificación endocondral. (Figura 7).

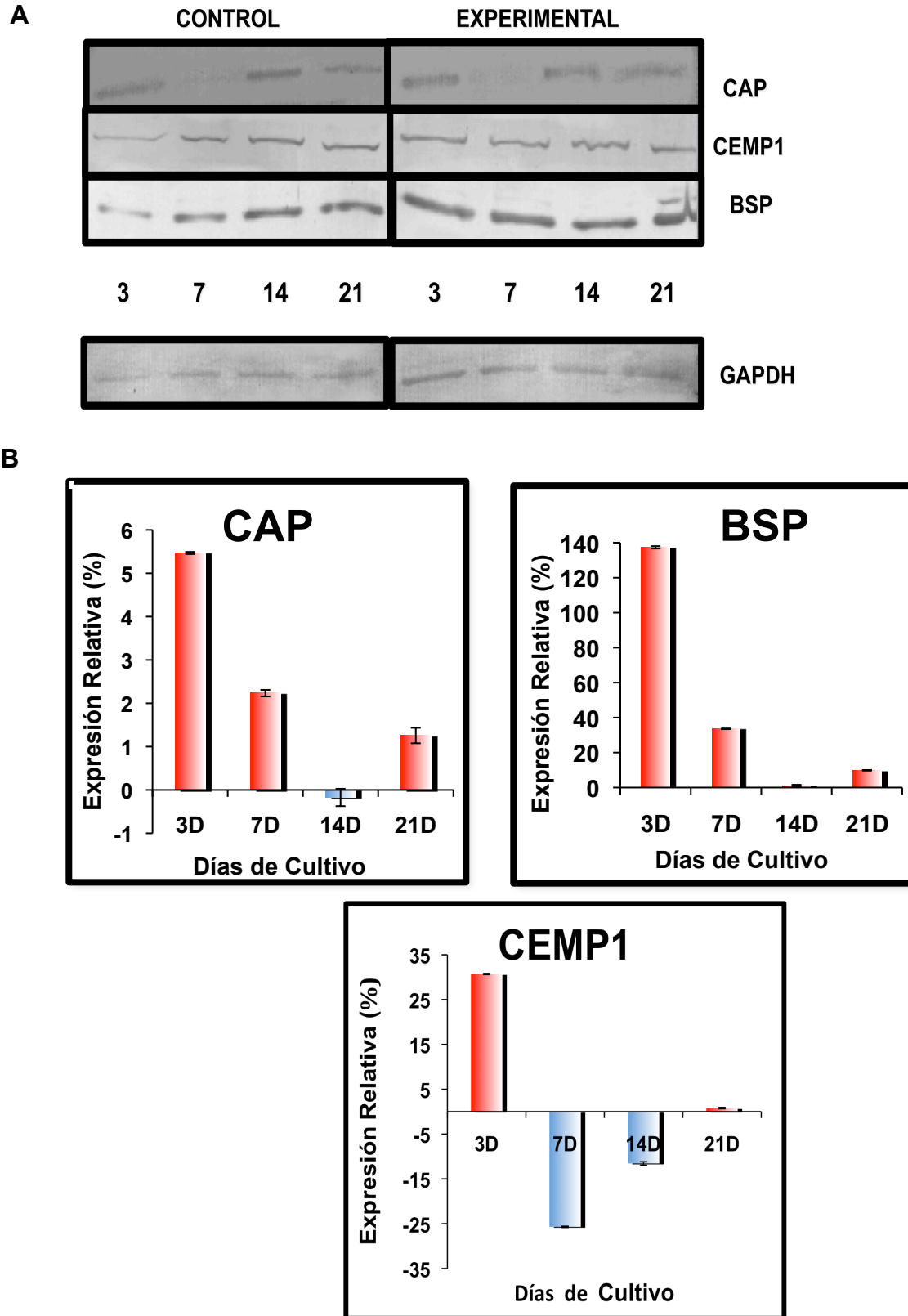


Figura 6. Expresión de las proteínas a través de inmunoelectrotransferencia. En el grupo experimental se utilizaron 5  $\mu$ g/ml de CEMP1, como control de carga se usó la proteína GAPDH (A). Gráficas del análisis de densitometría, comparado con el grupo control como el 100% (B).

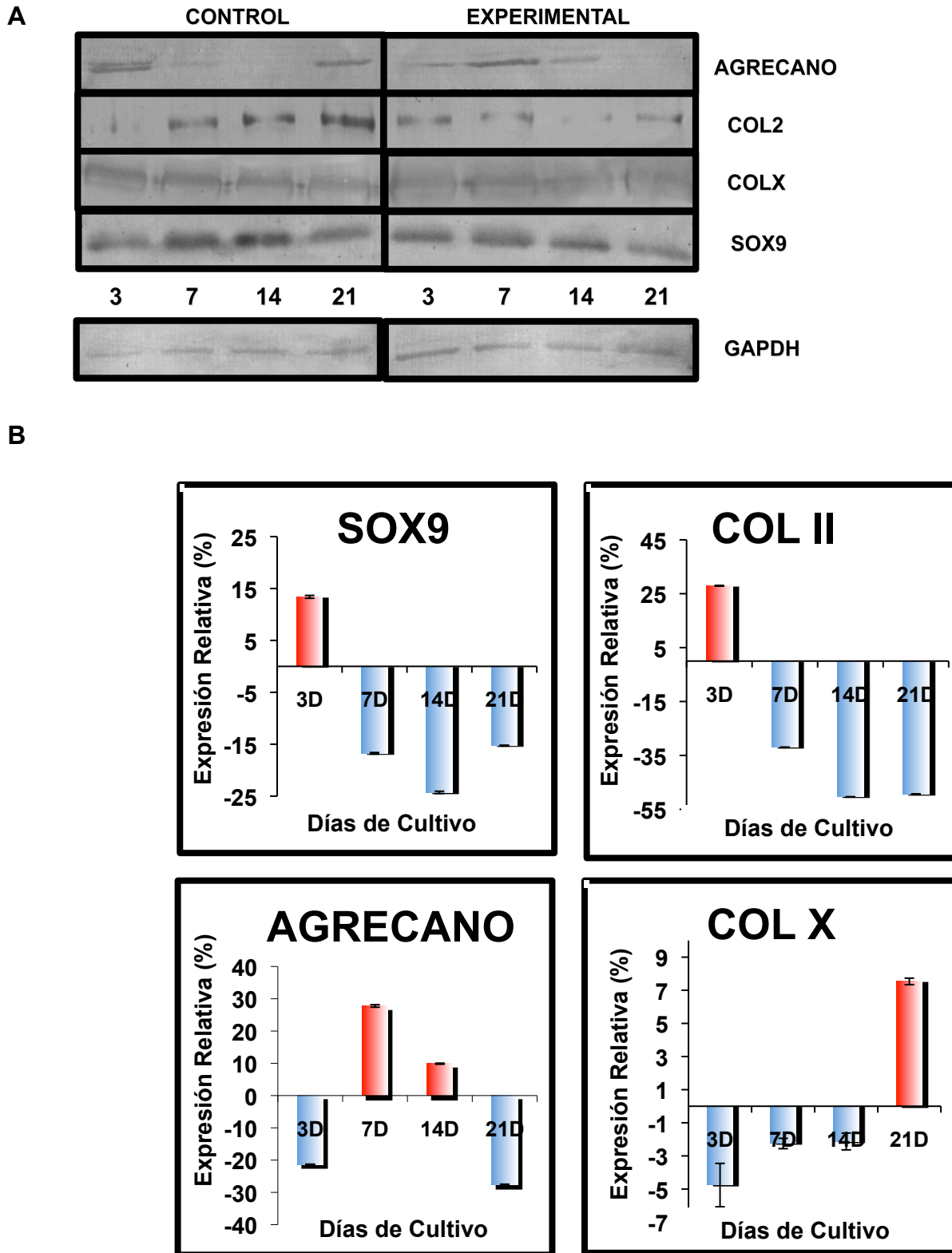


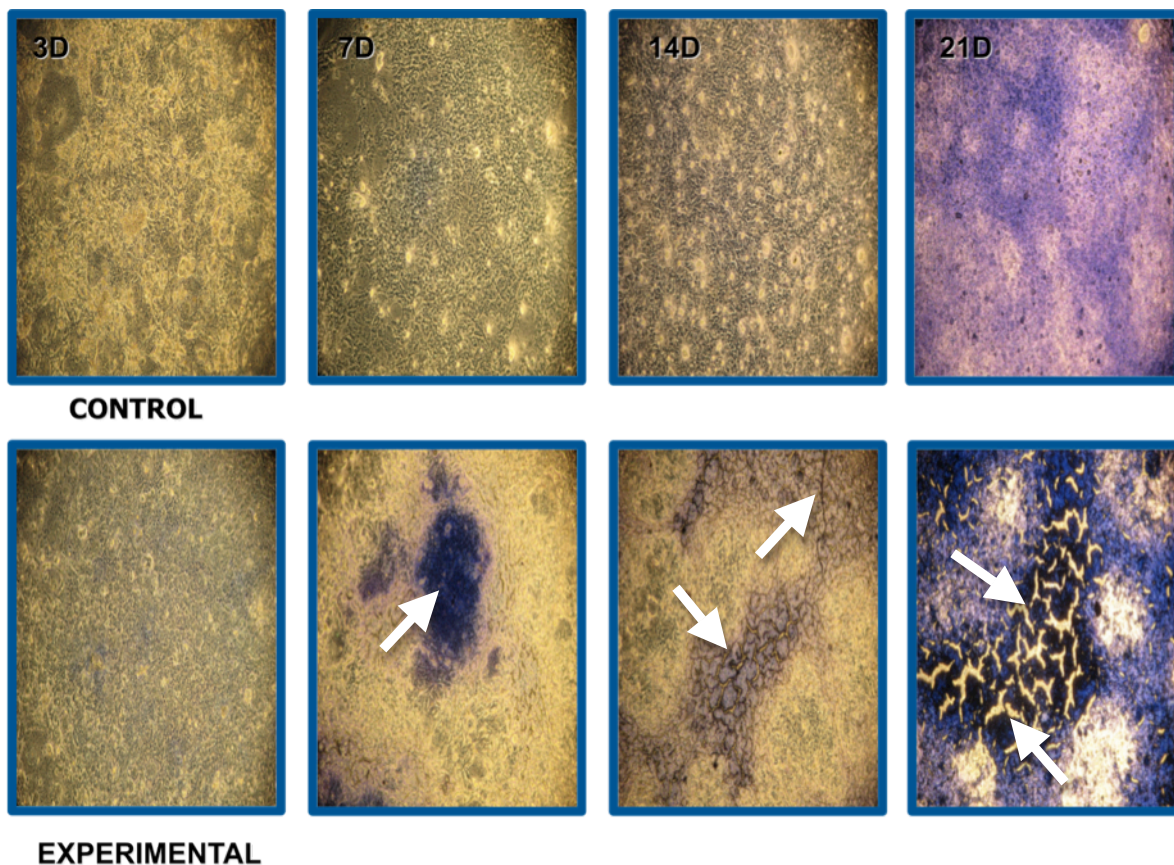
Figura 7. Expresión de las proteínas realizado a través de inmunoelectrotransferencia. En el grupo experimental se utilizaron 5  $\mu$ g/ml de CEMP1 (A). Gráficas del análisis de densitometría, comparado contra el grupo control como el 100% (B).



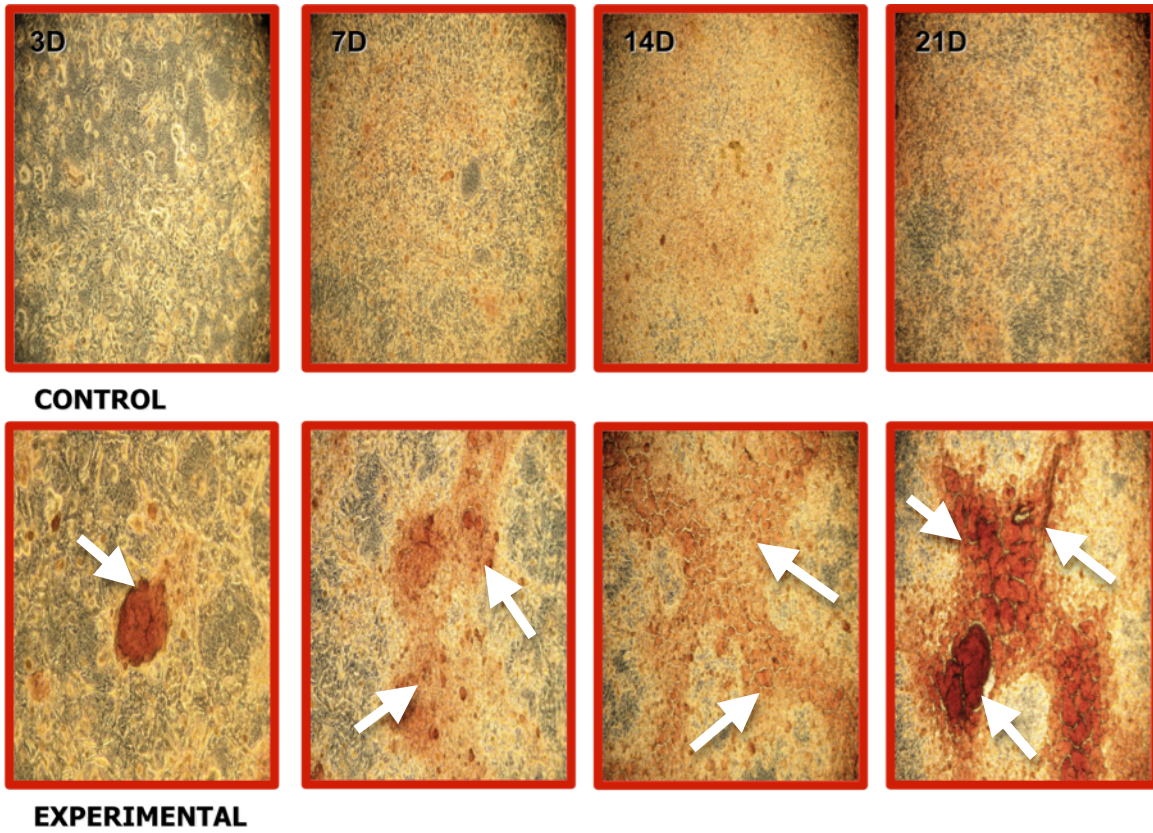


## 7.4 Ensayos de mineralización

Por medio de tinciones se determinó la presencia, de manera cualitativa, de la mineralización de las células derivadas del ligamento periodontal humano, utilizando azul de alciano al 3%, observando la tinción de las glicoproteínas involucradas hacia el fenotipo condroblástico, donde se obtuvo una tinción proporcional a los días de incubación, no así en los grupos controles (Figura 8). De la misma forma se realizó la tinción con alizarina roja al 2%, indicando que en los grupos experimentales existe la formación de nódulos de calcio (Figura 9), concluyendo que CEMP1 es un potencializador de la diferenciación hacia fenotipo condroblástico y / o cementoblástico y / o osteoblástico.



**Figura 8. Ensayo de mineralización realizado con azul de alciano.** En el panel superior el grupo control comparado con el experimental en el panel inferior, cultivados a los 3, 7, 14 y 21 días de tratamiento (las flechas indican los sitios de mayor concentración de glicoproteínas) .



**Figura 9. Ensayo de mineralización realizado con alizarina roja.** Se observa la presencia de nódulos en el grupo experimental (las flechas indican los sitios de mineralización).



## 8. DISCUSIÓN

El periodonto es un sistema integral que mantiene la homeostasis, soporta las fuerzas de masticación y ancla al órgano dental manteniendo su integridad fisiológica; puede ser alterado debido a diversas causas multifactoriales causando la pérdida del aparato de inserción, por lo que el conocimiento de las células que integran a los tejidos periodontales es la clave fundamental para llevar a cabo su adecuada regeneración.

La regeneración periodontal implica la inducción de la cementogénesis, a lo largo de la superficie de la raíz expuesta con la re-inserción de nuevas fibras de Sharpey. (Ripamonti et al., 2009). La matriz extracelular del cemento contiene factores de crecimiento y mitógenos regulados por la unión del ligamento periodontal que proporciona el sistema de regulación de varios componentes, involucrados en procesos de reparación, regeneración y remodelación, (Ripamonti y Petit; 2009). La preservación del espacio del ligamento periodontal (tejido suave) proporciona el mantenimiento del equilibrio dinámico con el dominio del tejido mineralizado; hueso y cemento alveolar. El ligamento periodontal es reservorio de células heterogéneas incluyendo células troncales que tienen la capacidad de diferenciarse hacia distintos fenotipos inclusive a nervios periféricos, glía y músculos esqueléticos, esto debido a su origen ectomesenquimal proveniente de la cresta neural durante la odontogénesis, dirigiendo así la homeostasis y la regeneración tisular. (Lekic *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2004; Techawattanawisal et al., 2007; Zhou *et al.*, 2008).

Existen mecanismos asociados con regeneración natural como la dediferenciación, la cual implica células diferenciadas que regresan a un estado indiferenciado dentro de su propio linaje (capa germinal). Este proceso permite a la célula proliferar de nuevo antes de re-diferenciarse, dando lugar a la sustitución de las células que se han perdido, sin embargo la respuesta ante una lesión, daño o pérdida no han logrado la regeneración del tejido. Existe otro método de diferenciación nombrado transdiferenciación, donde es posible diferenciarse en otro tipo celular a través de una regulación negativa de su programación genética o bien una regulación positiva (Jopling *et al.*, 2011), utilizando biomoléculas inductoras que puedan lograr esa plasticidad celular de re-diferenciarse, cambiando su estado característico hacia otro linaje. Estos nuevos avances en la medicina regenerativa incluyen la terapia génica para la liberación de proteínas recombinantes a tejidos por períodos de tiempo extensos, siendo

una estrategia prometedora en la regeneración de las estructuras periodontales (Giannobile *et al.*, 2001; Ramseiser *et al.*, 2006) por lo que, el punto crítico de la regeneración periodontal radica en la neo-formación de cemento con el fin de reinsertar las nuevas fibras de colágena. En nuestro laboratorio se ha aislado un marcador específico del cemento radicular nombrado proteína del cemento 1 (CEMP1), que participa en el proceso de mineralización de cementoblastos putativos *in vitro* (Kemoun *et al.*, 2007 a,b).

La función de CEMP1 como proteína con alta afinidad por la hidroxiapatita, además de promover la adhesión, diferenciación y mineralización, regula nucleación de cristales de fosfato octacalcico (cristal precursor de la HA).

El incremento de la proliferación celular tratando las células del ligamento periodontal con CEMP1 a la concentración de 0.5  $\mu\text{g/ml}$  nos indica su alta actividad en la multiplicación de las células del ligamento periodontal en los primeros días de tratamiento, el pico más elevado fue el tercer día de incubación, con un comportamiento similar en la concentración de CEMP1 0.1  $\mu\text{g/ml}$ , dejando por abajo la curva de crecimiento de los controles por lo que, se podría sugerir que actúa como un factor de crecimiento hecho que se soporta en el contexto de activación a vías asociadas a mitógeno como ERK 1 y 2 (Paula – Silva *et al.*, 2010), las nuevas estrategias utilizan estas moléculas para inducir la migración, proliferación y diferenciación, inclusive algunas proteínas como la fibronectina (FN) y CAP, son capaces de potencializar la migración de los fibroblastos, la adhesión y orientación de los tejidos conectivos (Zeichner-David, 2006).

En los eventos de mineralización fue medida la actividad específica de la fosfatasa alcalina (ALP), marcador importante en el metabolismo del fosfato, y esta enzima es responsable de proveer fosfatos necesarios para la formación de los fosfatos de calcio, encontrada en los procesos de diferenciación hacia la maduración de los fenotipos cementoblástico, osteoblástico y condroblástico, (Asahina *et al.*, 1993; Kirsch *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997; van den Bos y Beertsen, 1999). La actividad de este marcador se observó un aumento significativo en el día 14 con una disminución en el día 21 de cultivo que sigue siendo mayor con respecto al control. Éste evento se debe a que la actividad de la fosfatasa alcalina es mayor en los primeros días de tratamiento, ya que incrementa las concentraciones locales de fosfatos y una vez que se ha completado la deposición del mineral esta tiende a disminuir (Alvarez – Pérez *et al.*, 2006). Se corroboró el efecto inductor



de hrCEMP1 en la mineralización (Carmona-Rodríguez *et al.*,2007), obteniendo un resultado similar cuando se utilizan factores de crecimiento como el TGF- $\beta$  (Abrahamsson *et al.*, 2010).

En cuanto a la expresión de los productos génicos relacionados con el fenotipo cementoblástico y osteoblástico, está significativamente más elevado el día 3 de cultivo mediante el análisis de expresión proteica, confirmando la función mineralizante de hrCEMP1. Este hecho comprueba la función de las proteínas CAP, BSP y CEMP1, consideradas como iniciadoras del frente de mineralización, por su capacidad de formar núcleos en este proceso (Harris *et al.*, 2000, Romo-Arévalo *et al.*,2010). Se ha sugerido que CAP puede actuar en sinergismo con CEMP1, ya que son marcadores específicos del cemento radicular. El día 7 de cultivo la expresión de CAP y BSP se disminuyen y CEMP1 esta ausente en los siguientes días de cultivo, lo que nos sugiere su auto – regulación. La presencia de CAP es conocida por la potencialización de la diferenciación de las células putativas cementoblásticas, es expresada también en osteoblastos y células del ligamento periodontal (BarKana *et al.*, 2000; Kemoun *et al.*,2007). BSP asociada con la diferenciación hacia osteoblastos, implicado también en la iniciación de la formación de la mineralización a través de hueso nuevo, mantiene una íntima interacción con las fibras de colágena de la matriz extracelular y juega un papel importante durante la cementogénesis (Bartold y Narayanan *et al.*, 1998; Ganss *et al.*, 1999; Yu *et al.*,2009).

Por otro lado, los resultados obtenidos en las proteínas involucradas con el fenotipo condroblástico siguen el patrón de expresión secuencial de la osificación endocondral, es decir es el proceso iniciado por la diferenciación de las células mesénquimales que dan origen a células de la cresta neural del ectodermo que a su vez desarrollan huesos craneofaciales (Goldring *et al.*,2006).

La osificación endocondral principia con la condrogénesis que es el proceso que resulta en la formación de cartilago intermedio, y dirige a este hacia la mineralización durante el desarrollo del hueso (Mackie *et al.*,2008). Tomando en cuenta que comparten el mismo origen, las células de la cresta neural del ectodermo y las células del ligamento periodontal que es una población heterogénea que contiene células madre mesénquimales (Seo *et al.*, 2004) lo que explica la expresión de proteínas en el grupo control.

El papel inductor de CEMP1 se refleja en los grupos con tratamiento y la expresión de SOX9, factor de transcripción involucrado en la condrogénesis y estrechamente vinculado

con la aparición de proteínas de matriz extracelular como colágena tipo II y la glicoproteína agregano confirmando los hallazgos encontrados en nuestros resultados (Sekiya *et al.*, 2000; Robins *et al.*, 2005) las cuales se expresaron el día 7 y 14 respectivamente. Posteriormente durante el proceso de osificación existe un recambio en la composición de la matriz extracelular de los condrocitos donde se destaca la aparición de la colágena tipo X, por lo su expresión en el día 21 de cultivo de los grupos con tratamiento de CEMP1 corrobora su participación en el proceso de maduración del cartílago hipertrófico (Shen G., 2004).

La presencia de proteoglicanos en la matriz extracelular, como es el caso de la proteína agregano, tiene una asociación directa con la deposición de mineral (Boyan *et al.*, 1989) su principal función es proporcionar densidad a los tejidos con alta carga a la compresión, como el tendón, sin embargo es muy específico del cartílago (Heinegard, 2009). El incremento de la síntesis de proteoglicanos observada mediante la tinción con azul de alciano, utilizada para identificar la formación de subpoblaciones con fenotipo condroblástico, se identificó gradual y proporcionalmente a los días de cultivo. En estudios previos observaron la condrogénesis con extractos de cemento humano, estos resultados confirman la participación específica de CEMP1 promoviendo la presencia de los proteoglicanos en la matriz extracelular (Arzate *et al.*, 1996).

La tinción con alizarina roja nos señala el incremento de los nódulos de calcio paulatinamente con la secuencia de los días de cultivo, comprobando la deposición de mineral en las células del ligamento periodontal, lo que asegura el cambio de fenotipo hacia la mineralización, ya que la presencia de calcio no discierne entre cementoblasto, osteoblasto y condroblasto (maduro o hipertrófico) (Mwale *et al.*, 2002). Existen estudios donde reportan a moléculas que juegan un papel importante en la inducción de la diferenciación ya sea hacia fenotipo condroblástico u osteoblástico (Asahina *et al.*, 1993), pero ninguna involucrada en la cementogénesis o la diferenciación hacia este fenotipo particular. Siempre se ha caracterizado la estrecha similitud que comparte el cemento radicular con el hueso, sin embargo son bien marcadas e identificadas las diferencias entre estos dos tejidos. No obstante los conocimientos acerca del origen de los tejidos, el cemento y el cartílago comparten similitud en el contenido de las fibras de colágena, no poseen vasos sanguíneos, nervios, ni vasos linfáticos y no sufren remodelación. La diferencia más radical está en la maduración de los condrocitos ya que se inicia la irrigación sanguínea y su



diferenciación hacia hueso.

La regulación de los mecanismos por los cuales los fibroblastos del ligamento periodontal mantienen su fenotipo y la diferenciación hacia cementoblastos u osteoblastos sigue siendo desconocida, incluso la expresión de muchos factores de crecimiento que se expresan durante la diferenciación (Cho y Garant 2000).

La proteína del cemento 1 (CEMP1) es una proteína de muy reciente descubrimiento, es marcador específico del cemento radicular, tiene una región (del residuo 30 al 110) que presenta 40% de identidad con la colágena tipo X, la cual participa en los procesos de mineralización del cartílago hipertrófico, además de tener un papel nucleador en el proceso de mineralización (Alvarez-Pérez *et al.*, 2006; Villarreal-Ramírez *et al.*, 2009; Romo-Arévalo *et al.*, 2010).

A la fecha, las funciones biológicas de CEMP1 no se conocen completamente, sin embargo se sabe que es una proteína con amplio potencial para regenerar las estructuras del periodonto y que podría ser una opción en la medicina regenerativa.

Los resultados obtenidos nos brindan un panorama más amplio y ofrece la posibilidad de explicar, entender y comprender muchos de los eventos que suceden durante la cementogénesis.

Nuestras observaciones refuerzan fuertemente el argumento de que CEMP1 es un factor clave para la diferenciación de células del ligamento periodontal humano hacia fenotipos cementoblástico, osteoblástico y/o condroblástico. Este último, basándonos en nuestros hallazgos, se puede sugerir que mantiene íntima participación en el proceso de la osificación endocondral. Además, CEMP1 induce la proliferación celular, actuando de manera similar a un mitógeno. De acuerdo a las funciones que se han mencionado, se podría especular que realiza una función parecida a un factor de crecimiento, sin embargo es necesario seguir trabajando en estudios encaminados a discernir la participación de esta importante proteína y su relación con cada uno de los procesos aquí plasmados.



## **9. CONCLUSIONES**

La proteína del cemento 1 (CEMP1) induce la proliferación celular, de las células del ligamento periodontal en tiempos tempranos de incubación.

CEMP1 mantiene una participación directa durante la diferenciación hacia fenotipo mineralizante, a través de la expresión de la actividad específica de la fosfatasa alcalina y la presencia de nódulos de calcio.

La proteína CEMP1 regula la expresión de marcadores específicos promoviendo la diferenciación de las células hacia fenotipo cementoblástico, osteoblástico y condroblástico.





## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Asahina I, Sampath TK, Nishimura I, Hauschka PV., Human osteogenic protein-1 induces both chondroblastic and osteoblastic differentiation of osteoprogenitor cells derived from newborn rat calvaria., *J Cell Biol.* 1993 Nov;123(4):921-33.
- Abrahamsson CK, Yang F, Park H, Brunger JM, Valonen PK, Langer R, Welter JF, Caplan AI, Guilak F, Freed LE., Chondrogenesis and mineralization during in vitro culture of human mesenchymal stem cells on three-dimensional woven scaffolds., *Tissue Eng Part A.* 2010 Dec;16(12):3709-18.
- Alvarez-Pérez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodríguez Carmona B, Arzate H., Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23)., *Bone.* 2006 Mar;38(3):409-19. Epub 2005 Nov 2.
- Alvarez Pérez MA, Pitaru S, Alvarez Fregoso O, Reyes Gasga J, Arzate H., Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line., *J Struct Biol.* 2003 Jul;143(1):1-13.
- Arzate H, Olson SW, Page RC, Gown AM, Narayanan AS., Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum., *FASEB J.* 1992 Aug;6(11):2990-5.
- Arzate H, Olson SW, Page RC, Narayanan AS., Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in culture., *Bone Miner.* 1992 Jul;18(1):15-30.
- Arzate H, Chimal-Monroy J, Hernández-Lagunas L, Díaz de León L., Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells., *J Periodontal Res.* 1996 Feb;31(2):144-8.
- Arzate H, Jiménez-García LF, Alvarez-Pérez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S., Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein., *J Dent Res.* 2002 Aug;81(8):541-6.
- Arzate H, Portilla Robertson J, Aguilar Mendoza ME., Recombination of epithelial root sheath and dental papilla cells in vitro., *Arch Med Res.* 1996 Winter;27(4):573-7.
- BarKana I, Narayanan AS, Grosskop A, Savion N, Pitaru S., Cementum attachment protein enriches putative cementoblastic populations on root surfaces in vitro., *J Dent Res.* 2000 Jul;79(7):1482-8.
- Bartold PM, Narayanan AS. *Biology of periodontal connective tissues.* Quintessence publishing Co, Inc 1998 Carol Stream, Illinois U.S.A.
- Bartold PM, Narayanan AS., *Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues.*, *Periodontol* 2000. 2006;40:29-49. Review
- Behrens P., Bauerlein E., *Handbook of Biomineralization.*, Wiley-VCH GMBH & Co. KGaA., 2007.
- Bosshardt D.D., Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype?., *J Dent Res.* 2005 May;84(5):390-406.
- Bosshardt DD., Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels., *J Clin Periodontol.* 2008 Sep;35(8 Suppl):87-105.
- Bosshardt DD, Nanci A., Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth., *J Clin Periodontol.* 2004 Mar;31(3):184-92.
- Boyan BD, Schwartz Z, Swain LD, Khare A., Role of lipids in calcification of cartilage., *Anat Rec.* 1989 Jun;224(2):211-9.
- Bradford, M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding., *Anal. Biochem.*, 1976., 72:248-254.



Carmona-Rodríguez B, Alvarez-Pérez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, Molina-Guarneros J, García-Hernández AL, Suárez-Franco JL, Chavarría IG, Villarreal-Ramírez E, Arzate H., Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts., *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jul 6;358(3):763-9.

Cho MI, Garant PR., Development and general structure of the periodontium., *Periodontol* 2000. 2000 Oct;24:9-27.

Choi HD, Noh WC, Park JW, Lee JM, Suh JY., Analysis of gene expression during mineralization of cultured human periodontal ligament cells., *J Periodontal Implant Sci*. 2011 Feb;41(1):30-43.

Dangaria SJ, Ito Y, Luan X, Diekwisch TG., Differentiation of Neural-Crest-Derived Intermediate Pluripotent Progenitors into Committed Periodontal Populations Involves Unique Molecular Signature Changes, Cohort Shifts, and Epigenetic Modifications., *Stem Cells Dev*. 2011 Jan;20(1):39-52.

Diekwisch TG., The developmental biology of cementum., *Int J Dev Biol*. 2001 Sep;45(5-6):695-706. Review.

Embery G, Waddington R., Gingival crevicular fluid: biomarkers of periodontal tissue activity., *Adv Dent Res*. 1994 Jul;8(2):329-36.

Fischer J, Kolk A, Wolfart S, Pautke C, Warnke PH, Plank C, Smeets R., Future of local bone regeneration - Protein versus gene therapy., *J Craniomaxillofac Surg*. 2011 Jan;39(1):54-64.

Ganss B, Kim RH, Sodek J., Bone sialoprotein., *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(1):79-98.

Giannobile WV, Lee CS, Tomala MP, Tejeda KM, Zhu Z., Platelet-derived growth factor (PDGF) gene delivery for application in periodontal tissue engineering., *J Periodontol*. 2001 Jun;72(6):815-23.

Grzesik WJ, Narayanan AS., Cementum and periodontal wound healing and regeneration., *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(6):474-84.

Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K., The control of chondrogenesis., *J Cell Biochem*. 2006 Jan 1;97(1):33-44.

Golub EE., Role of matrix vesicles in biomineralization., *Biochim Biophys Acta*. 2009 Dec;1790(12):1592-8. Epub 2009 Sep 26. Review.

Hall RC, Embery G., The use of immunohistochemistry in understanding the structure and function of the extracellular matrix of dental tissues., *Adv Dent Res*. 1997 Nov;11(4):478-86

Harris NL, Rattray KR, Tye CE, Underhill TM, Somerman MJ, D'Errico JA, Chambers AF, Hunter GK, Goldberg HA., Functional analysis of bone sialoprotein: identification of the hydroxyapatite-nucleating and cell-binding domains by recombinant peptide expression and site-directed mutagenesis., *Bone* 2000, Dec; 27(6): 795 – 802.

Heinegård D., Proteoglycans and more--from molecules to biology., *Int J Exp Pathol*. 2009 Dec;90(6):575-86.

Hirata A, Sugahara T, Nakamura H., Localization of runx2, osterix, and osteopontin in tooth root formation in rat molars., *J Histochem Cytochem*. 2009 Apr;57(4):397-403

Ho SP, Marshall SJ, Ryder MI, Marshall GW., The tooth attachment mechanism defined by structure, chemical composition and mechanical properties of collagen fibers in the periodontium., *Biomaterials*. 2007 Dec;28(35):5238-45.

Itaya T, Kagami H, Okada K, Yamawaki A, Narita Y, Inoue M, Sumita Y, Ueda M., Characteristic changes of periodontal ligament-derived cells during passage., *J Periodontal Res*. 2009 Aug;44(4):425-33.



- Ivanovski S, Komaki M, Bartold PM, Narayanan AS., Periodontal-derived cells attach to cementum attachment protein via alpha 5 beta 1 integrin., *J Periodontal Res.* 1999 Apr;34(3):154-9.
- Ivanovski S, Gronthos S, Shi S, Bartold PM., Stem cells in the periodontal ligamento., *Oral Dis.* 2006 Jul;12(4):358-63.
- Johnston NI, Gunasekharan VK, Ravindranath A, O'Connell C, Johnston PG, El-Tanani MK., Osteopontin as a target for cancer therapy., *Front Biosci.* 2008 May 1;13:4361-72.
- Jopling C, Boue S, Izpisua Belmonte JC., Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration., *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Feb;12(2):79-89.
- Kémoun P, Laurencin-Dalicioux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Conte-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 Res.* 2007 Aug;329(2):283-94 a
- Kémoun P, Laurencin-Dalicioux S, Rue J, Vaysse F, Roméas A, Arzate H, Conte-Auriol F, Farges JC, Salles JP, Brunel G., Localization of STRO-1, BMP-2/-3/-7, BMP receptors and phosphorylated Smad-1 during the formation of mouse periodontium., *Tissue Cell.* 2007 Aug;39(4):257-66 b
- Kirsch T, Nah HD, Shapiro IM, Pacifici M., Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes., *J Cell Biol.* 1997 Jun 2;137(5):1149-60.
- Komatsu K., Mechanical strength and viscoelastic response of the periodontal ligament in relation to structure., *J Dent Biomech.* 2010; 2010: 502318.
- Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M., Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton., *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(1):46-62
- Macneil RL, Sheng N, Strayhorn C, Fisher LW, Somerman MJ., Bone sialoprotein is localized to the root surface during cementogenesis., *J Bone Miner Res.* 1994 Oct;9(10):1597-606.
- Mariotti A., The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues., *Periodontol* 2000. 1993 Oct;3:39-63.
- McCulloch CA., Proteomics for the periodontium: current strategies and future promise., *Periodontol* 2000. 2006;40:173-83. Review
- Miao D, Fenno JC, Timm JC, Joo NE, Kapila YL., The *Treponema denticola* chymotrypsin-like protease dentilisin induces matrix metalloproteinase-2-dependent fibronectin fragmentation in periodontal ligament cells., *Infect Immun.* 2011 Feb;79(2):806-11. Epub 2010 Nov 29.
- Mouri Y, Shiba H, Mizuno N, Noguchi T, Ogawa T, Kurihara H., Differential gene expression of bone-related proteins in epithelial and fibroblastic cells derived from human periodontal ligament., *Cell Biol Int.* 2003;27(7):519-24
- Mwale F, Tchétina E, Wu CW, Poole AR., The assembly and remodeling of the extracellular matrix in the growth plate in relationship to mineral deposition and cellular hypertrophy: an in situ study of collagens II and IX and proteoglycan., *J Bone Miner Res.* 2002 Feb;17(2):275-83.
- Nanci A, Bosshardt DD., Structure of periodontal tissues in health and disease., *Periodontol* 2000. 2006;40:11-28.
- Núñez J, Sanz M, Hoz-Rodríguez L, Zeichner-David M, Arzate H., Human cementoblasts express enamel-associated molecules in vitro and in vivo., *J Periodontal Res.* 2010 Dec;45(6):809-14.



- Lallier TE, Spencer A., Use of microarrays to find novel regulators of periodontal ligament fibroblast differentiation., *Cell Tissue Res.* 2007 Jan;327(1):93-109
- Lee, N. K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J. D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P. J., McKee, M. D., Jung, D. Y., Zhang, Z., Kim, J. K., Mauvais-Jarvis, F., Ducy, P., and Karsenty, G. (2007). Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130, 456–469.
- Lekic P, McCulloch CA., Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue., *Anat Rec.* 1996 Jun;245(2):327-41. Review.
- Lekic P, Rojas J., Birek C., Tenenbaum H., McCulloch CAG., Phenotypic comparison of periodontal ligament cells in vivo and in vitro., *J Periodont Res.*, 2001;36;:71-79.
- Lindhe J. Periodontología clínica e implantología odontológica. En: Karting K, Lang KP Editores. Editorial médica panamericana. España 2003: 19-67.
- Li Y, Nakayama H, Notani T, Ahmad M, Tabata MJ, Takano Y., Phosphatase actions at the site of appositional mineralization in bisphosphonate-affected bones of the rat., *J Med Dent Sci.* 2008 Sep;55(3-4):255-65.
- Liu HW, Yacobi R, Savion N, Narayanan AS, Pitaru S., A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitors of the mineralized tissue-forming cell lineage of the periodontal ligament., *J Bone Miner Res.* 1997 Oct;12(10):1691-9
- Loesche WJ, Grossman NS., Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment., *Clin Microbiol Rev.* 2001 Oct;14(4):727-52
- Lowry OH., Roberts NR, Wu ML., Hixon WS, Crawford EJ., The quantitative histochemistry of brain. II. Enzyme measurements., *J Biol Chem.* 1954 Mar;207(1):19-37.
- Lyngstadaas SP, Wohlfahrt JC, Brookes SJ, Paine ML, Snead ML, Reseland JE., Enamel matrix proteins; old molecules for new applications., *Orthod Craniofac Res.* 2009 Aug;12(3):243-53. Review.
- Oh TJ, Eber R, Wang HL., Periodontal diseases in the child and adolescent., *J Clin Periodontol.* 2002 May;29(5):400-10.
- Olson S, Arzate H, Narayanan AS, Page R. C., Cell attachment activity of cementum proteins and mechanism of endotoxin inhibition. 1991. *J Dent Res* 70:1272-1277.
- Orimo H., The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease., *J Nippon Med Sch.* 2010 Feb;77(1):4-12. Review.
- Paula-Silva FW, Ghosh A, Arzate H, Kapila S, da Silva LA, Kapila YL., Calcium hydroxide promotes cementogenesis and induces cementoblastic differentiation of mesenchymal periodontal ligament cells in a CEMP1- and ERK-dependent manner., *Calcif Tissue Int.* 2010 Aug;87(2):144-57. Epub 2010 May 4.
- Proudfoot D, Shanahan CM., Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein., *Nephrology (Carlton).* 2006 Oct;11(5):455-61.
- Ramseier CA, Abramson ZR, Jin Q, Giannobile WV., Gene therapeutics for periodontal regenerative medicine., *Dent Clin North Am.* 2006 Apr;50(2):245-63
- Ripamonti U, Petit JC, Teare J., Cementogenesis and the induction of periodontal tissue regeneration by the osteogenic proteins of the transforming growth factor-beta superfamily., *J Periodont Res.* 2009 Apr;44(2):141-52. Epub 2008 Oct 7. Review.



Robins JC, Akeno N, Mukherjee A, Dalal RR, Aronow BJ, Koopman P, Clemens TL., Hypoxia induces chondrocyte-specific gene expression in mesenchymal cells in association with transcriptional activation of Sox9., *Bone*. 2005 Sep;37(3):313-22.

Romo-Arévalo E., Villarreal-Ramírez E., Chávez-Pacheco Juan L., Piña-Barba C., Aguilar-Franco M., Arzate H., *In vitro* effects of cementum protein 1 (CEMP1) on calcium phosphate cristal formation and its role during the mineralization process., 2009, *Mater.Res.Soc.Symp.Proc.* vol. 1244

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

Scheller EL, Krebsbach PH., Gene therapy: design and prospects for craniofacial regeneration., *J Dent Res*. 2009 Jul;88(7):585-96.

Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A, Noda M., SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6., *J Biol Chem*. 2000 Apr 14;275(15):10738-44.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S., Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligamento., *Lancet*. 2004 Jul 10-16;364(9429):149-55.

Shen G., The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage., *Orthod Craniofac Res*. 2005 Feb;8(1):11-7.

Shimonishi M, Hatakeyama J, Sasano Y, Takahashi N, Komatsu M, Kikuchi M., Mutual induction of noncollagenous bone proteins at the interface between epithelial cells and fibroblasts from human periodontal ligament., *J Periodont Res* 2008; 43: 64–75.

Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, Matsuzaki H, Hashimoto S, Muramatsu T, Shima K, Matsuzaka K, Inoue T. Regulatory mechanisms of periodontal regeneration., *Microsc Res Tech*. 2003 Apr 1;60(5):491-502.

Sodek J, Ganss B, McKee MD., Osteopontin., *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(3):279-303.

Takano Y, Sakai H, Baba O, Terashima T., Differential involvement of matrix vesicles during the initial and appositional mineralization processes in bone, dentin, and cementum., *Bone*. 2000 Apr;26(4):333-9.

Techawattanawisal W, Nakahama K, Komaki M, Abe M, Takagi Y, Morita I., Isolation of multipotent stem cells from adult rat periodontal ligament by neurosphere-forming culture system., *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jun 15;357(4):917-23

Ten Cate AR., The development of the periodontium--a largely ectomesenchymally derived unit., *Periodontol* 2000. 1997 Feb;13:9-19. Review.

Thomas HF., Root formation., *Int J Dev Biol*. 1995 Feb;39(1):231-7.

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

Villarreal-Ramírez E, Moreno A, Mas-Oliva J, Chávez-Pacheco JL, Narayanan AS, Gil-Chavarría I, Zeichner-David M, Arzate H., Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): primary role in biomineralization., *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Jun 19;384(1):49-54. Epub 2009 Apr 23.

Whyte MP., Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia., *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Mar;1192:190-200. Review.



Wu D, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan AS., Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein., *J Bone Miner Res.* 1996 May;11(5):686-92.

Wu L, Wei X, Ling J, Liu L, Liu S, Li M, Xiao Y., Early osteogenic differential protein profile detected by proteomic analysis in human periodontal ligament cells., *J Periodontol Res.* 2009 Oct;44(5):645-56.

Wuttke M, Müller S, Nitsche DP, Paulsson M, Hanisch FG, Maurer P., Structural characterization of human recombinant and bone-derived bone sialoprotein. Functional implications for cell attachment and hydroxyapatite binding., *J Biol Chem.* 2001 Sep 28;276(39):36839-48. Epub 2001 Jul 17.

Yamamoto T, Domon T, Takahashi S, Arambawatta AK, Wakita M., Immunolocation of proteoglycans and bone-related noncollagenous glycoproteins in developing acellular cementum of rat molars., *Cell Tissue Res.* 2004 Sep;317(3):299-312.

Yu H, Ren Y, Sandham A, Ren A, Huang L, Bai D., Mechanical tensile stress effects on the expression of bone sialoprotein in bovine cementoblasts., *Angle Orthod.* 2009 Mar;79(2):346-52.

Zhao M, Jin Q, Berry JE, Nociti FH Jr, Giannobile WV, Somerman MJ. Cementoblast delivery for periodontal tissue engineering., *J Periodontol.* 2004 Jan;75(1):154-61.

Zeichner-David M, Oishi K, Su Z, Zakartchenko V, Chen LS, Arzate H, Bringas P Jr., Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development., *Dev Dyn.* 2003 Dec;228(4):651-63.

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

Zohar R, Tenenbaum HC., How predictable are periodontal regenerative procedures?., *J Can Dent Assoc.* 2005 Oct;71(9):675-80.