



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

**“INMUNOEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA
DEL CEMENTO 1 (CEMP1) Y LA PROTEÍNA DE
ADHESIÓN DEL CEMENTO (CAP) EN TUMORES
ODONTOGÉNICOS Y LESIONES
ÓSEAS RELACIONADAS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
EDMUNDO SANTOS JAIMES

TUTOR:
DR. HIGINIO ARZATE



MÉXICO, D. F.

2012



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:

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser una gran Institución, de la cual formo parte y me siento orgulloso de ello.

Al Dr. Higinio Arzate por permitirme formar parte del Laboratorio de Biología Periodontal y tejidos mineralizados, dándome su apoyo en todo lo que necesitaba.

A mis compañeros de laboratorio, así como compañeros y amigos de la maestría y doctorado: Guillermo, Rita, Lia, Silvia, Georgina, Giroshi, Carlos, Gonzalo, Janet, Meche y Enrique.

A mis profesores de la maestría que me ayudaron a crecer intelectualmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado para la realización de esta investigación.

Al laboratorio de Patología Bucal de la Facultad de Odontología, así como al Dr. Luis Gaitán, Mtro. Fernando Tenorio y C.D. Esp. Daniel Quezada, por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

A Anita y todas ellas que me ayudaron a hacer más llevaderos los complejos trámites en la maestría.

DEDICATORIAS:

A mi madre, por el apoyo incondicional que he recibido de ella a lo largo de toda mi carrera profesional y a lo largo de toda mi vida, sin ella no sería nada.

A mi padre, hermanos y sobrinos que han estado conmigo a lo largo de mi vida.

A José Ángel, por estar conmigo incondicionalmente a lo largo de todo este proceso de formación en la maestría.

A mis amigos, Gerardo, Jorge, Carlos, Dulce, Claudia, Laura y Alfonso quienes siempre me han dado ánimos a lo largo de mi proceso de formación en la maestría. Y a M. Kishimoto por darme tantos buenos momentos a lo largo de estos últimos años.

Y a Dios, que sin él no estaría en este momento en el lugar donde estoy.

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	10
ANTECEDENTES.....	10
TUMORES ODONTOGÉNICOS.....	10
BIOLOGÍA MOLECULAR EN TUMORES ODONTOGÉNICOS.....	13
CEMENTO RADICULAR.....	14
TIPOS DE CEMENTO.....	14
ORIGEN Y DESARROLLO DEL CEMENTO.....	15
COMPOSICIÓN DEL CEMENTO.....	16
PROTEÍNA DEL CEMENTO 1 (CEMP1).....	17
PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO (CAP).....	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	20
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVOS.....	20
MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES.....	49
REFERENCIAS.....	50

RESUMEN

Los tumores odontogénicos son neoplasias que se originan a partir de células que intervienen en la formación de los órganos dentarios y su clasificación se ha basado en las células que dan origen a cada una de estas lesiones; de origen epitelial, ectomesenquimal, mixtas y lesiones óseas relacionadas. Con base a estas características se han ido estudiando cada uno de estos componentes a nivel histológico, hasta a nivel molecular, utilizando marcadores específicos de cada uno de los tejidos que componen a los órganos dentarios. Se han descrito dos proteínas que hasta el momento son específicas del cemento, la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento (CAP). CEMP1 se ha considerado un marcador específico de cementoblastos y las células progenitoras en el ligamento periodontal, se ha demostrado que esta proteína tiene la capacidad de cambiar hacia un fenotipo mineralizante a células no mineralizantes como los fibroblastos gingivales *in vitro*. Además de que participa en procesos de mineralización como la nucleación de cristales de fosfato octacálcico precursor de la hidroxiapatita. CAP se ha inmunolocalizado en la matriz de cemento radicular, espacios endosteales del hueso alveolar y zonas paravasculares del ligamento periodontal; así como en cementoblastos putativos *in vivo* e *in vitro*. Tiene una alta afinidad a la hidroxiapatita, participa en procesos de mineralización *in vitro*. Induce un aumento en la actividad de la fosfatasa alcalina así como promueve la formación de cristales de hidroxiapatita *in vitro*.

Objetivo. Determinar la expresión espacial de la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento (CAP), así como su utilidad como marcador molecular diagnóstico, en diferentes neoplasias de origen odontogénico y lesiones óseas relacionadas.

Metodología. Se emplearon muestras de tejidos de tumores odontogénicos representativos, a los cuales se les realizó inmunohistoquímica para CEMP1 y péptido de CAP para observar su expresión. Se hizo la correlación topográfica de los resultados por medio de histoquímica con H&E y microscopía de fluorescencia evaluando la positividad e intensidad de la expresión de estos anticuerpos.

Resultados. CEMP1 y el péptido de CAP se expresaron en las células que conforman los tumores odontogénicos de origen mixto, con componente epitelial y ectomesenquimatoso, principalmente en células asociadas a mineralización. Además se expresó en las células que se encuentran rodeando el tejido mineralizado descrito como cemento histológicamente en los fibromas osificantes, así como en el condrosarcoma y osteosarcoma de cabeza y cuello. CEMP1 y péptido de CAP no se expresaron en tumores odontogénicos de origen epitelial.

Conclusiones. Los resultados obtenidos nos sugieren que CEMP1 y CAP están implicadas en procesos de mineralización patológica en los tumores odontogénicos y lesiones óseas relacionadas. Además al encontrar estas proteínas adyacentes al tejido cementoide podemos sugerir que este tejido es cemento; debido a sus características histológicas y moleculares, por lo que pueden ser utilizadas como marcadores específicos de células cementoblásticas en las neoplasias de origen odontogénico.

ABSTRACT

Odontogenic tumors are lesions that originate from cells involved in dental organs and their classification is based on cells that originate each one of these lesions; epithelial, ectomesenchymal, mixed and bone related lesions. Based on these characteristics, each of these components has been studied not only on a histological, but also at the molecular level, with specific markers for each of the tissues that form the teeth. Cementum is a barely known tissue in relation to these lesions. CEMP1 has been considered a specific marker for cementoblasts and cementum and its progenitor cells in periodontal ligament. This protein has been proof to have the ability of changing non-mineralizing towards a mineralizing phenotype in vitro on gingival fibroblasts. Besides it takes part in mineralization processes such as octacalcium phosphate crystals nucleation which is a precursor of hydroxyapatite. CAP has been immunolocalized in radicular cementum's matrix, endosteal bone alveolar spaces and paravascular zones in periodontal ligament and putative cementoblasts in vivo and in vitro. It has high affinity to hydroxyapatite, participates in in vitro mineralization processes, induces alkaline phosphatase activity and promotes in vitro formation of hydroxyapatite.

Objective. To determine spatial expression of the cementum protein 1 and cementum attachment protein and their utility as diagnostic markers in different odontogenic neoplasms and their allied bone lesions

Methodology. Immunohistochemical technique was performed on representative odontogenic tumor samples against CEMP1 and CAP peptide to determine their expression. Topographical correlation of results was performed through histochemistry with H&E and fluorescence microscopy evaluating their expression

Results. CEMP1 and CAP peptide were expressed in cells that form mixed odontogenic tumors, specially, in cells related to mineralized tissue. It was also expressed in surrounding cells of mineralized tissue described histologically like cementum in ossifying fibroma as well as in chondrosarcoma and in head and neck osteosarcoma. CEMP1 and CAP were not expressed in epithelial odontogenic tumors.

Conclusions. Our results suggest that CEMP1 and CAP are implied in pathological mineralization processes in odontogenic tumors and allied bone lesions. Also, while finding these proteins surrounding cementoid we can suggest that this tissue is cementum due to its histological and molecular characteristics thus they can be used as specific markers for cementoblastic cells in odontogenic tumors and a useful diagnostic biological marker.

1. ANTECEDENTES

1.1. TUMORES ODONTOGÉNICOS

Los tumores odontogénicos constituyen un grupo de lesiones heterogéneas que van del rango de hamartomas o proliferaciones no neoplásicas hasta neoplasias malignas con capacidad de metástasis. Son neoplasias raras que se derivan del epitelio, ectomesenquima y elementos mesenquimatosos que dan origen a los órganos dentarios. Estos se han encontrado únicamente en la región de los huesos maxilofaciales (intra óseo o centrales) y en los tejidos blandos, (mucosa oral) que rodean a las áreas dentales (extra óseo o periférico) y se presentan en rangos de edad muy amplios. Es importante recalcar que siempre ha existido una correlación entre las características histológicas, clínicas y radiográficas para un diagnóstico preciso de estas neoplasias.^{1, 2} Los tumores odontogénicos comprenden un grupo complejo de lesiones con características histológicas complejas y comportamientos clínicos diversos. Por lo tanto su clasificación se ha basado en varios aspectos, desde su comportamiento como benigno, maligno y no neoplásicos, hasta las características de las células que componen las lesiones y su relación entre ellas. Basándose en esta última instancia se hizo una subdivisión para las lesiones benignas basada en los tipos de tejido odontogénico encontrados histológicamente.¹⁻³ (tabla 1).

**CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA
TUMORES ODONTOGÉNICOS BENIGNOS**

**EPITELIO ODONTOGÉNICO CON ESTROMA FIBROSO MADURO SIN
ECTOMESÉNQUIMA ODONTOGÉNICO**

Ameloblastoma

Tumor odontogénico escamoso

Tumor odontogénico epitelial calcificante

Tumor odontogénico adenomatoide

Tumor odontogénico queratoquístico

**EPITELIO ODONTOGÉNICO CON ECTOMESÉNQUIMA ODONTOGÉNICO
CON O SIN FORMACIÓN DE TEJIDOS DUROS**

Fibroma ameloblástico

Fibrodentinoma ameloblástico

Fibro-odontoma ameloblástico

Odontoma compuesto

Odontoma complejo

Odontoameloblastoma

Tumor odontogénico quístico calcificante

Tumor dentinogénico de células fantasma

**MESÉNQUIMA Y/O ECTOMESÉNQUIMA ODONTOGÉNICO CON O SIN
EPITELIO ODONTOGÉNICO**

Fibroma odontogénico

Mixoma / Mixofibroma odontogénico

Cementoblastoma

LESIONES ÓSEAS RELACIONADAS

Fibroma osificante

Displasia fibrosa

Displasias óseas

Lesión central de células gigantes

Querubismo

Quiste óseo aneurismático

Quiste óseo simple

En cuanto a su etiología y patogénesis de los tumores odontogénicos sigue siendo desconocida, aunque una serie de alteraciones genéticas y moleculares parecen promover el desarrollo y progresión de estos.³ Según lo sugerido anteriormente, basado en las características histológicas de acuerdo a las similitudes con los tejidos dentarios maduros, tejidos parecidos a epitelio, órgano del esmalte, esmalte dental, dentina y cemento, que se observan en diferentes tipos de lesiones odontogénicas, nos han provisto de la clasificación histológica aceptada por la Organización Mundial de la Salud, hasta este momento^{1,2}. Por lo tanto el uso de proteínas asociadas a tejidos dentales pueden ser útiles marcadores para evaluar la diferenciación funcional de las células neoplásicas y para la diferenciación de la matriz extracelular que se encuentra en los tumores odontogénicos. El uso de anticuerpos proteína-específicos puede proveer una importante información con respecto a la histogénesis y la clasificación de los tumores odontogénicos.⁴

1.1.1. BIOLOGÍA MOLECULAR EN TUMORES ODONTOGÉNICOS

Numerosos estudios se han realizado de proteínas específicas de tejidos dentales, así como de proteínas relacionadas con tejidos duros; y sus resultados han aportado un mayor entendimiento en el desarrollo y diferenciación de las células y tejidos que se ven envueltos en estas lesiones. Proteínas de la matriz del esmalte como Amelogenina, Enamelina y Ameloblastina, proteínas no colágenas de matriz de tejidos mineralizados como sialoproteína ósea, osteonectina, osteopontina, osteocalcina, proteína de matriz dentinaria; sialoproteína dentinaria y fosfoproteína dentinaria específicas de dentina, nos han sugerido que estas juegan un rol en la mineralización patológica y/o formación de estos tumores.³ El desarrollo y la progresión de los tumores odontogénicos están afectados por alteraciones de muchos tipos de genes y moléculas. En particular, las características de estas neoplasias parecen depender de mecanismos moleculares asociados al desarrollo dental (odontogénesis), al metabolismo óseo y al potencial de malignidad de estos tumores. Otros estudios moleculares, incluyendo perfiles basados en la genómica y proteómica se requieren para clarificar la etiología y patogénesis de los tumores odontogénicos. Una mejor comprensión de las bases moleculares nos podrían ayudar a predecir el curso de estas neoplasias y conducir al desarrollo de nuevas aplicaciones terapéuticas.³ En los tumores odontogénicos la observación de estructuras que reproducen algún tipo de tejido dentario, como por ejemplo la dentina que es fácilmente identificable porque es una estructura tubular, nos indica su evidencia y por lo tanto su clasificación, así como el origen celular al que pertenece. En estas neoplasias de origen odontogénico se han descrito diferentes tipos de tejidos mineralizados, como la matriz de esmalte, dentina, tejido óseo y la presencia de tejido parecido a cemento, que es definido histológicamente en estas lesiones, como depósitos de material mineralizado pobremente celular, basófilo, bien contorneado y que se cree que puede ser cemento;⁵ sin ninguna base biológica molecular que nos indique el origen de este tejido.

1. 2. CEMENTO RADICULAR

El cemento es un tejido mineralizado, avascular que cubre la superficie de la raíz del órgano dentario. Debido a su posición intermedia, formando la interface entre la dentina radicular y el ligamento periodontal, el cemento en sí, es un componente del mismo diente, y además llega a ser funcionalmente parte del aparato de inserción, que es el periodonto.⁶ El cemento radicular se ha relacionado estrechamente con el tejido óseo por ser un tejido mineralizado con un radio en sus componentes orgánico-inorgánico similar entre los dos tejidos, aunque con algunas diferencias.⁷ Una de las funciones principales del cemento es el anclaje de las fibras colágenas del ligamento periodontal a la raíz del diente, además de que juega un papel crucial en mantener la relación oclusal, proteger la integridad de la superficie radicular (adaptación), la reparación de los defectos de las raíces después de la resorción o fractura y la protección de la pulpa.⁶ El cemento radicular es único en varios aspectos: es avascular y no innervado, no tiene procesos de remodelación como el hueso, pero continúa su crecimiento a lo largo de toda la vida. A pesar de las características antes descritas, es uno de los tejidos menos estudiados en algunos aspectos como su desarrollo, estructura, regeneración, composición molecular y sus funciones potenciales.⁶⁻⁸

1. 2. 1. TIPOS DE CEMENTO

La biología celular, los aspectos microscópicos histológicos, así como la cementogénesis, han propuesto diferentes tipos de cemento clasificados de acuerdo a su origen y sus tipos de fibras.

1. Cemento acelular de fibras extrínsecas (AIFC), es encontrado en la parte media y coronal de la raíz del diente cubriendo del 40 al 70% de esta y contiene a las fibras de Sharpey. Este tipo de cemento es parte importante del aparato de unión y conecta al órgano dentario con el hueso alveolar y tiene un constante crecimiento. AIFC contiene fibras en su matriz que incrementan en longitud y densidad en dirección ápico-coronal. Dentro de

sus roles principales tiene el potencial de adaptarse a las alteraciones funcionales como los desvíos mesiales dentales.^{6,9}

2. Cemento celular de fibras intrínsecas (CIFC), contiene cementocitos embebidos en una matriz de colágena de fibras intrínsecas. Estas fibras colágenas están orientadas la mayoría paralelamente a la superficie de la raíz. Una deposición rápida de la matriz por los cementoblastos, la cual ocurre entre la desviación de la vaina epitelial de Hertwig y la superficie dentinaria parece ser la razón de la incorporación de algunos cementoblastos en su matriz. Se localiza en el tercio apical, en bifurcaciones, en sitios de fractura, juega un papel importante en el proceso de reparación.^{6,10-11}
3. Cemento acelular afibrilar (AAC), el área y localización varía de diente a diente, se deposita a nivel de la unión amelo-cementaria, su principal componente son glicosaminoglicanos.
4. Cemento celular, mixto estratificado (CMFC), estrictamente encontrado en humanos, en las bifurcaciones y en el tercio apical de las raíces; está constituido por capas alternadas de cemento acelular con fibras extrínsecas e intrínsecas conocidas como líneas incrementales.⁶⁻⁹

1. 2. 2. ORIGEN Y DESARROLLO DEL CEMENTO

Aún no es totalmente claro el origen del cemento. Algunos autores consideran que el cemento celular y acelular tienen un origen embriológico distinto, basado en la observación fenotípica de cementoblastos. Algunos estudios sugieren que las células progenitoras de cementoblastos provienen del folículo dental, las cuales tienen un origen ectomesenquimatoso. Sin embargo estudios recientes soportan la idea de que los cementoblastos pueden tener un origen epitelial, que se derivan de la vaina epitelial de Hertwig y que sufren un proceso de diferenciación epitelio-mesénquima.¹²⁻¹³ La cementogénesis inicia con el depósito de matriz sobre la superficie dentinaria por células de la vaina epitelial de Hertwig, las cuales se desorganizan, después las células ectomesenquimales del folículo dental migran y se organizan. Subsecuentemente se diferencian en cementoblastos para

comenzar a secretar su matriz cementaria. Aunque como se mencionó anteriormente el destino de las células epiteliales de la vaina epitelial de Hertwig es controversial, ya que en recientes estudios se ha sugerido la posibilidad de una transformación epitelio-mesénquima que posteriormente dará origen al cemento acelular y celular respectivamente.^{6, 12-14}

1. 2. 3. COMPOSICIÓN DEL CEMENTO RADICULAR

La composición del cemento es muy similar a la del hueso. Este tejido está compuesto por minerales, matriz orgánica y agua. Cerca del 50% es matriz inorgánica que está compuesta principalmente por cristales de hidroxiapatita. La matriz restante que correspondería a cerca de un 50% está compuesta primero por varios tipos de colágena. La colágena tipo I juega un papel estructural como andamio del componente mineral, por lo que es el mayor componente ocupando un 90% de todas las colágenas. Colágena tipo III cubre a la colágena tipo I, ocupando un 5% del total; y en menor proporción colágena tipo XII, trazas de colágena V y VI en localización pericelular y tipo XIV asociadas a las fibras de Sharpey.^{6,15} Se encuentran también proteoglicanos que se asocian principalmente a los cementoblastos y a los cementocitos, se han localizado e identificado versicano, decorina, biglicano, fibromodulina, lumicano, condroitín sulfato, dermatán sulfato y ácido hialurónico.¹⁵ Las proteínas no colágenas del cemento radicular se componen principalmente por Sialoproteína ósea (BSP) y Osteopontina (OPN). Las dos son glicoproteínas sulfatadas y fosforiladas con propiedades de adhesión. Otra de ellas es la osteocalcina, se ha sugerido que tiene que ver con procesos de mineralización. La fosfatasa alcalina participa en los procesos de mineralización y además se han descrito factores de crecimiento que parecen estar relacionados con la diferenciación y proliferación celular, tales como BMP2, BMP3, BMP4, PDGF, α y β FGF, TGF β , PYH e IGF1.^{6,16} Es importante decir que estos componentes también están presentes en hueso, sin embargo han sido descritas moléculas únicas de cemento, una de ellas es la isoforma de IGF-1, factor de crecimiento del cemento (CGF) con propiedades similares a IGF-1.¹⁷ Además se han descrito dos más, que hasta el momento se consideran proteínas

específicas de cemento, la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento (CAP).¹⁸⁻²¹

1. 3. PROTEÍNA DEL CEMENTO 1 (CEMP1)

Es una proteína de 247 aminoácidos con un peso molecular teórico de 25.9 kD, la cual inicialmente fue aislada a partir de una biblioteca aislada de cementoblastos putativos humanos cultivados *in vitro*. Su expresión *in vitro* tanto a nivel de ARNm como de proteína se limita a cementoblastos putativos (células derivadas de un cultivo de un cementoblastoma humano) y una subpoblación de células derivadas del ligamento periodontal con una localización paravascular, cementoblastos y células de los espacios endosteales. Al analizar la secuencia *in silico* se obtuvieron los siguientes resultados: el ADNc de 1374 nucleótidos contiene un marco de lectura abierto de 744 nucleótidos, la búsqueda de 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). Se predice la localización como nuclear a pesar de no tener motivos de unión a ADN, no se ha encontrado similitud significativa con ninguna otra proteína en la base de datos, 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, aunque no tiene las repeticiones clásicas Gly x-y.²² CEMP1 ha sido caracterizada parcialmente a la fecha. Los análisis de dicroísmo circular predicen que la estructura secundaria de esta proteína es principalmente de hojas β (32.4% β anti-paralela, 16.7% giros- β y 5.8% β -paralela), 10% de alfa hélice y 35% de conformación al azar. Presenta además 2 sitios para N-glicosilaciones en los aminoácidos 20 y 25 (Asn-X Ser/Thr). Se ha detectado la presencia de fosforilaciones en CEMP1 utilizando anticuerpos anti-fosfoserina y anti-fosfotreonina. Mediante comparaciones con el peso molecular teórico de CEMP1 se ha logrado deducir que las modificaciones postranscripcionales contribuyen en 43.5% al peso total de la proteína nativa, la cual muestra una movilidad relativa (M_r) de 50,000.^{23, 24} Hasta la fecha no se ha

detectado el ARNm, ni la proteína en otros tejidos humanos como corazón, pulmón, hígado, aorta. Por lo que constituye un marcador biológico para cementoblastos y los progenitores putativos en el ligamento periodontal.^{18, 22, 25} También se demostró que la transfección con el gen de CEMP1 y la sobreexpresión de esta en células no mineralizantes (fibroblastos gingivales adultos) da como resultado la diferenciación de estas células hacia un fenotipo mineralizante.²³ Se ha demostrado que CEMP1 participa en el depósito y composición de los cristales de hidroxiapatita, así como en la regulación de la expresión de las proteínas ALP, OPN, y BSP en cementos putativos *in vitro*.^{26, 27} Por lo que es probable que juegue un papel fundamental en la regulación local de la diferenciación de los cementoblastos derivados de las superficies radiculares de humano y además se confirmó su expresión en cemento, cementoblastos y células del ligamento periodontal.²⁸ Otro estudio demostró que células derivadas del folículo dental tratadas con extracto derivado de proteínas de esmalte se diferenciaron a un fenotipo cementoblástico expresando CEMP1 y CAP, activándose la fosforilación de Smad-1 y activando la vía de MAPK para la proliferación y diferenciación celular.²⁵ 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.^{18, 27, 29}

1.4. PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO (CAP)

El gen de la proteína de adhesión del cemento se localiza en el cromosoma 10p 13-p14, se considera un splicing alternativo del gen PTPLA (se expresa mayoritariamente en el desarrollo y etapas postnatales de músculo cardiaco y en menor medida en músculo esquelético). La proteína de adhesión del cemento tiene 140 aminoácidos y un peso molecular de 14.920 kD, su carga eléctrica es neutra (pl. 7.78) y carece de péptido señal. Es una proteína con una movilidad relativa de 54 a 57 kD que se ha aislado, caracterizado y purificado a partir de extractos de cemento maduro bovino y humano, mediante el empleo de un

anticuerpo monoclonal anti-CAP bovina (3G9). Se ha inmunolocalizado en la matriz del cemento radicular, en espacios endosteales del hueso alveolar y en zonas paravasculares del ligamento periodontal; así como en cementoblastos putativos *in vitro* e *in vivo*.^{19, 20, 30} El papel biológico de la proteína de adhesión del cemento ha involucrado quimiotaxis de células del ligamento periodontal y del hueso alveolar hacia la superficie radicular. Se sugiere que su papel de adhesión podría estar mediado por el receptor de integrinas $\alpha 5\beta 1$, así como una alta afinidad por la fibronectina, hidroxiapatita, dentina y cemento radicular. Incrementa la actividad de la fosfatasa alcalina, así como la expresión de proteínas asociadas al proceso de mineralización. Se ha demostrado que en fibroblastos gingivales, la proteína CAP activa la vía de MAPK, mediada por ERK2 induciendo la expresión de c-fos, el cual es un factor de transcripción que participa en la proliferación celular.³⁰⁻³⁶ CAP se ha descrito como la isoforma 2 del gen de PTPLA (Protein Tyrosine Phosphatase like) (AF114494). Con la diferencia de que en su secuencia de aminoácidos se encuentran los últimos 15 aminoácidos distintivos de CAP, que no se encuentran en otros splicing alternativos de PTPLA. Dichos aminoácidos se indican a continuación en rojo en la secuencia de CAP:

MGRLTEAAAAGSGSRAAGWAGSPPTLLPLSPTSPRCAATMASSDEDGTNGGASEAGEDRE **60**

APGERRRLGVLATAWLTFYDIAMTAGWLVLAIAMVRFYMEKGTNRGLYKSIQKTLKFFQT **120**

FALLE**VSFPSCCFSIAVIFM** **140**³⁷

En estudios recientes con hrCAP a una concentración de 0.5µg/mL se vio que actúa como mitógeno de células troncales derivadas del ligamento periodontal humano. Así como induce un aumento significativo de la actividad específica de la fosfatasa alcalina y promueve la formación de nódulos de calcio, demostrando que está asociada a la formación y composición de cristales de hidroxiapatita, *in vitro*. Todo esto sugiriéndonos que hrCAP juega un papel importante en los procesos de diferenciación de células troncales del ligamento periodontal humano y en el proceso de mineralización.³⁸

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En las neoplasias de origen odontogénico se han descrito diferentes tejidos mineralizados como son; el esmalte, la dentina, el hueso y el tejido cementoide; este último únicamente se ha descrito histológicamente y se ha caracterizado sin ninguna base molecular que nos indique la presencia de cemento. Por esta razón la utilización de marcadores específicos de cemento (CEMP1 y CAP) nos permitirán resolver el problema de la caracterización molecular y por lo tanto el origen celular al que pertenece; indicándonos así su evidencia, como se ha hecho con los demás tejidos mineralizados y sus diferentes marcadores específicos moleculares.

3. HIPÓTESIS

La proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento (CAP) son marcadores moleculares del cemento, por lo tanto se expresarán en los linajes celulares asociados a la formación del cemento en tumores de origen odontogénico y lesiones óseas relacionadas.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la expresión espacial de la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento (CAP) y su utilidad como marcadores diagnósticos en diferentes neoplasias de origen odontogénico y lesiones óseas relacionadas.

Objetivos específicos

Identificar el papel que juega la presencia de la proteína del cemento 1 (CEMP1) en la formación de cemento y tejidos mineralizados en tumores odontogénicos y lesiones óseas relacionadas.

Identificar el papel que juega la presencia de la proteína de adhesión del cemento (CAP) en la formación de cemento y tejidos mineralizados en tumores odontogénicos y lesiones óseas relacionadas.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Obtención de la muestra

Las muestras utilizadas fueron proporcionadas por el laboratorio de Patología Bucal del Departamento de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología y corresponden a pacientes con tumores odontogénicos benignos. Se utilizaron muestras representativas de las neoplasias odontogénicas de acuerdo a la Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (tabla 2). Se utilizaron 2 diferentes muestras de tejido neoplásico correspondiente a cada neoplasia, por la rareza de algunas de ellas.

5.2. Procesamiento de los especímenes

Los especímenes se encontraban fijados en formaldehído al 10% y fueron descalcificados previamente con EDTA 10%, pH 7.4 disuelto en 0.5% de formaldehído a 4°C por 5 semanas.¹⁸ De ellos se obtuvieron cortes histológicos a 5 micras de grosor para realizar la tinción con Hematoxilina y Eosina que sirvieron para la revisión del material histológico que se encontrara en buenas condiciones, reevaluando los diagnósticos histológicos de acuerdo a los parámetros histopatológicos descritos por la OMS.²

5.3. Inmunofluorescencia

Para detectar la proteína del péptido de CAP y CEMP1 en tejidos tumorales, las laminillas se desparafinaron en xileno (2 veces por 10 minutos), se hidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 90%, 70%, 50% y 30%) durante 9 minutos, seguidas de un lavado con PBS al 10X (5 minutos). Las secciones se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-PEP-CAP así como para anti-CEMP1 a una concentración de 1:100 diluido en BSA, se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto y se dejó incubando durante toda la noche a 4°C como se ha descrito en

revisiones anteriores.²⁴ Al día siguiente, se lavaron con PBS 10X más Tween 1X (por 5 minutos) y 2 lavados más de PBS 10X (5 minutos) y se incubaron con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo y la enzima conjugada Isotiocinato de fluoresceína siguiendo las instrucciones del fabricante a una concentración de 1:75 diluido en 10X PBS por 2 horas a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, se realizaron los lavados de la misma forma descrita en la incubación del anticuerpo primario, se montaron con DABCO. Como controles negativos se hizo el mismo procedimiento a cada uno de los tumores pero en ausencia del anticuerpo primario. Todos los lavados se realizaron en agitación constante.

5.4. Análisis de resultados

Las laminillas montadas se observaron al microscopio de fluorescencia, tomando fotografías a 20x y 40x utilizando el programa (Zeiss, Thornwood, NY). Dichas imágenes se utilizaron para la descripción de la expresión de la inmunotinción celular. Las laminillas de inmunofluorescencia fueron comparadas con su correspondiente laminilla teñida con la tinción de rutina (hematoxilina y eosina), en orden para establecer la relación topográfica entre las áreas positivas de las diferentes neoplasias.³⁹ La positividad e intensidad de la inmunotinción, fueron evaluadas de acuerdo a consenso de diferentes evaluadores, como se ha descrito en artículos relacionados, tomando como parámetros negativo (-), positivo ligero (+) y positivo intenso (++)⁴⁰.

Tabla 2.

CLASIFICACIÓN OMS	NEOPLASIAS ANALIZADAS
Epitelio odontogénico con estroma fibroso maduro sin ectomesénquima odontogénico	Ameloblastoma sólido multiquístico Tumor odontogénico adenomatoide

<p>Epitelio odontogénico con ectomesénquima odontogénico con/sin formación de tejidos duros</p>	<p>Fibroma ameloblástico Fibro-odontoma ameloblástico Odontoma tipo complejo Odontoma tipo compuesto Tumor quístico odontogénico calcificante</p>
<p>Mesénquima y/o ectomesénquima odontogénico con/sin epitelio odontogénico</p>	<p>Cementoblastoma</p>
<p>Lesiones óseas relacionadas</p>	<p>Fibroma osificante periférico Fibroma osificante central</p>
<p>Tumores malignos relacionados</p>	<p>Osteosarcoma maxilar Condrosarcoma maxilar</p>

6. RESULTADOS

Los resultados para inmunofluorescencia por los anticuerpos contra CEMP1 y PEP-CAP se muestran en la tabla 2. Y se describen a continuación de acuerdo a la clasificación de la OMS.

Tabla 2. Inmunolocalización de la proteína del cemento 1 (CEMP1) y el péptido de CAP en neoplasias odontogénicas y lesiones óseas relacionadas. (-) negativo, (+) positivo ligero, (++)positivo intenso.

EPITELIO ODONTOGÉNICO		
Ameloblastoma	-	-
Tumor odontogénico adenomatoide	-	++
EPITELIO Y ECTOMESENUQUIMA ODONTOGÉNICO		
Fibroma ameloblástico	+ epitelio	+ epitelio
Fibro-odontoma ameloblástico	+ mesénquima	+ mesénquima
Odontoma complejo	+ mesénquima	+ mesénquima
Odontoma compuesto	++ mesénquima	++mesénquima
Tumor quístico odontogénico calcificante	+ epitelio	++ epitelio y mesénquima
ECTOMESENUQUIMA ODONTOGÉNICO		
Cementoblastoma	++	++
LESIONES ÓSEAS RELACIONADAS		
Fibroma osificante	++	+
Fibroma osificante periférico	++	++
NEOPLASIAS MALIGNAS MAXILARES		
Osteosarcoma	+	++
Condrosarcoma	++	++

TUMORES ODONTOGÉNICOS

Epitelio odontogénico. Ameloblastoma sólido multiquístico

Los especímenes revisados están clasificados de subtipo histológico folicular o plexiforme que consiste en islas de epitelio odontogénico en un estroma fibroso. Típicamente estas islas se componen de células columnares alineadas en un patrón de empalizada y su núcleo está desplazado del lado contrario a la membrana basal y en el centro de estas islas se observan células que recuerdan a retículo estrellado. Estas neoplasias no demostraron una reacción a cualquiera de los dos anticuerpos antiCEMP1 y anti PEP CAP. Fueron negativos tanto en el epitelio que conforma estas lesiones como en el estroma de tejido conectivo. (Figura 1).

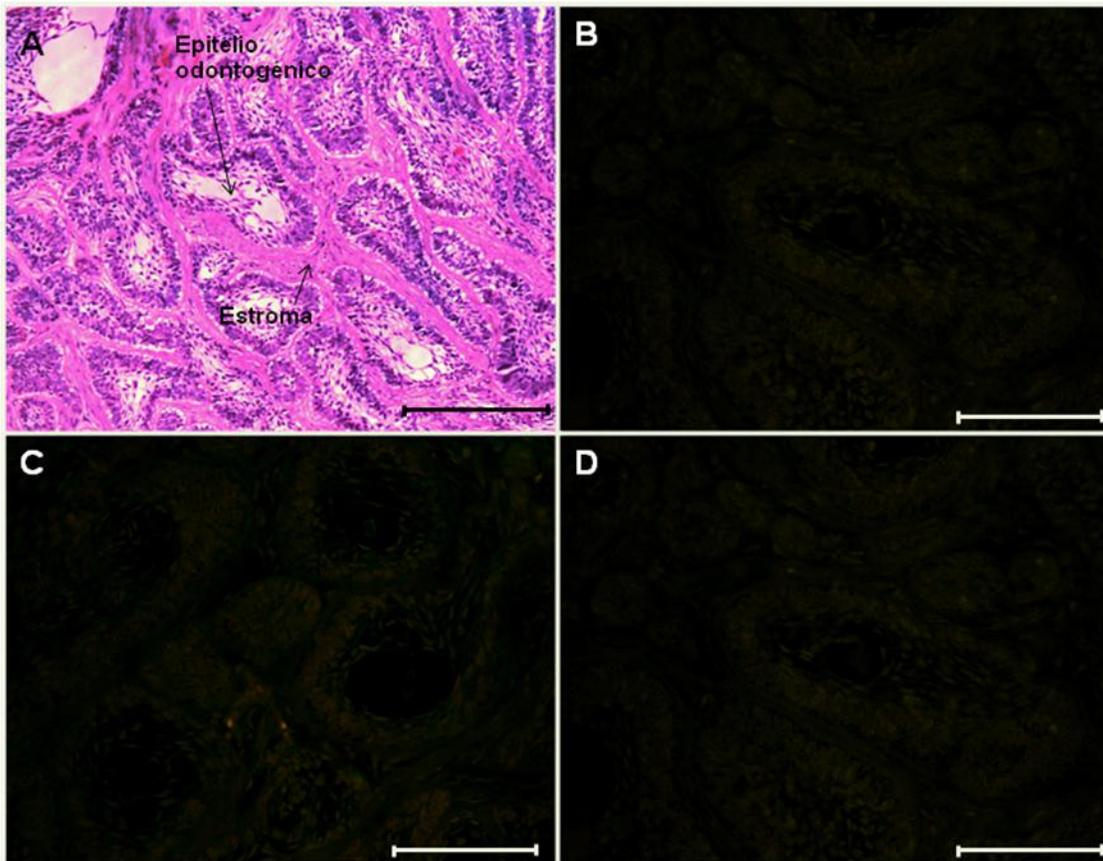


Figura 1. Inmunohistoquímica del ameloblastoma sólido multiquístico 40X. A. H&E Islas de epitelio odontogénico en un estroma fibroso denso. B. BSA utilizado como control negativo. C. Negatividad tanto en epitelio odontogénico, como en estroma fibroso para Anti-CEMP1. D. Negatividad para Anti Pep-CAP en epitelio odontogénico y estroma.

Tumor odontogénico Adenomatoide

Se revisaron los especímenes del tumor odontogénico adenomatoide que histológicamente se componen de patrones diferentes de epitelio odontogénico que forma nódulos, estructuras tipo rosetas o de apariencia ductal, con un material eosinófilo amorfo en el centro. Las células epiteliales que componen este tumor comúnmente son columnares a cuboidales y dentro de las características raras de esta neoplasia es que se ha descrito material displásico u osteodentina calcificada formando parte de ellos. Las células tumorales de epitelio odontogénico fueron negativas para el anticuerpo contra CEMP1; mientras que para el anticuerpo contra PEP-CAP hay una reacción positiva en las células epiteliales que conforman este tumor, así como en el material amorfo que se encuentra en el centro de células que conforman los tipo conductos, siendo esta reacción inmunohistoquímica mucho más intensa que en las células neoplásicas (fig. 2d). No se observó tejido mineralizado en alguna de las muestras revisadas. (Figura 2).

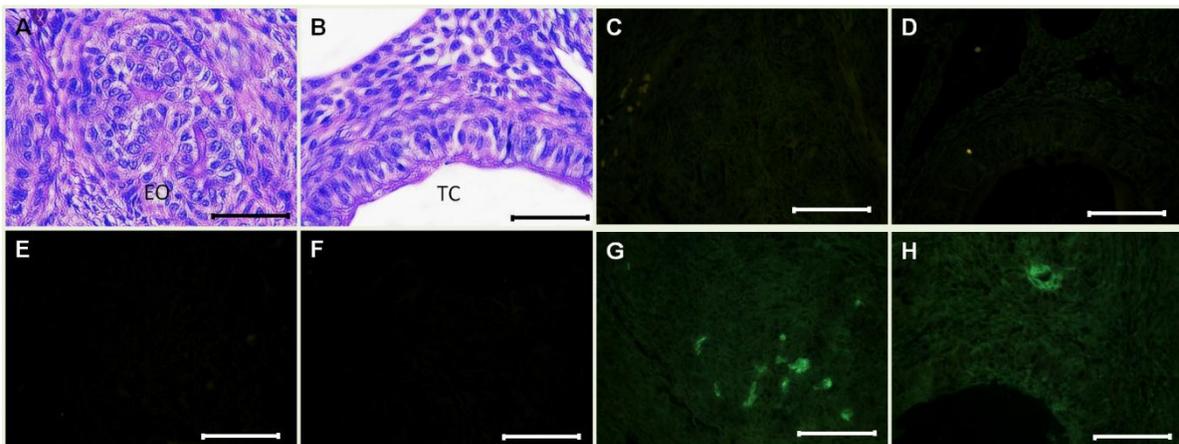


Figura 2. Inmunohistoquímica del Tumor odontogénico adenomatoide (TOA) a 40X. A. H&E Nódulos de epitelio odontogénico neoplásico con material eosinófilo amorfo en su centro (EO). B. H&E formaciones tipo ductales que conforman parte de la neoplasia (TC). C y D. Controles negativos con BSA. E y F. Negativo para Anti-CEMP1. G. Se observa un positivo para el anticuerpo de PEP-CAP en las células epiteliales que conforman los nódulos de epitelio odontogénico y una intensidad mayor en el material eosinófilo en su centro. H. De la misma forma hay positividad para anti-PEP-CAP en las células epiteliales que están conformando los pseudoconductos que conforman la neoplasia.

Epitelio odontogénico con ectomesénquima odontogénico con/sin formación de tejidos duros.

Fibroma ameloblástico

Esta neoplasia rara que la mayoría de los casos se da en personas jóvenes y consiste histológicamente de ectomesénquima odontogénico parecido a la papila dental, así como nidos y cordones de epitelio odontogénico parecidos al órgano del esmalte en la odontogénesis, pero que no presenta tejidos dentales duros. No se observó expresión de CEMP1 o PEP-CAP en los especímenes revisados en la parte que compone el ectomesénquima mixoide. Aunque en la parte que compone el epitelio de tipo ameloblástico se observa una ligera y difusa positividad en los núcleos de este componente (Figura 3).

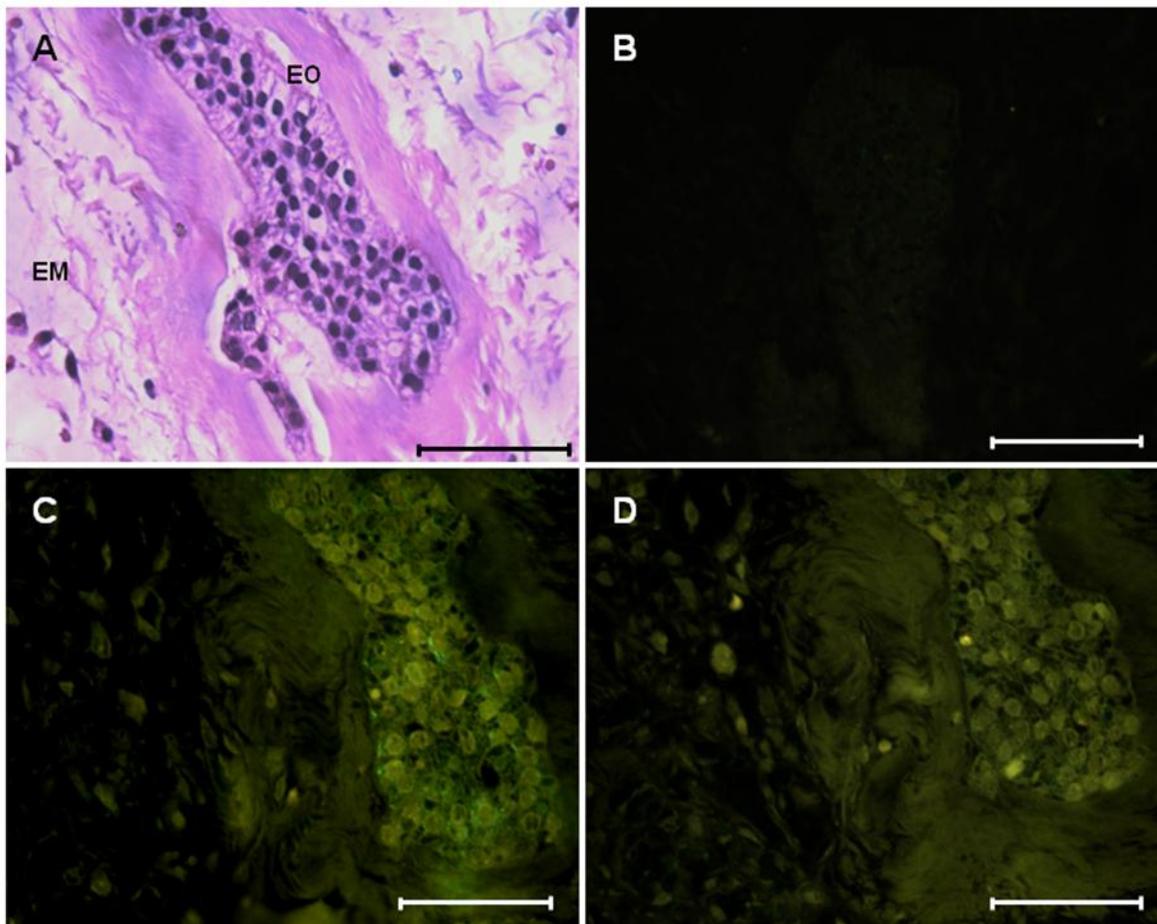


Figura 3. Inmunohistoquímica del fibroma ameloblástico 40X. A. H&E donde se observa una isla de epitelio odontogénico tipo ameloblástico (EO), rodeado de un hialinización de colágena, en un estroma mixoide de ectomesénquima odontogénico (EM). B. Control negativo con BSA. C. Positividad ligera en epitelio odontogénico para el anticuerpo anti-CEMP1 y negatividad en las células ectomesenquimales. D. De la misma forma se observa una positividad ligera en el nido de epitelio odontogénico rodeado de ectomesénquima negativo para el anticuerpo anti-PEP-CAP.

Fibro-odontoma ameloblástico

Esta neoplasia es una lesión mucho más rara que el fibroma ameloblástico y que comúnmente se presenta en niños y jóvenes, además de que tiene las mismas características histológicas que el fibroma ameloblástico, en conjunto con tejidos mineralizados como dentina y esmalte. En cuanto a los resultados obtenidos que se observaron, fue la positividad en la expresión de CEMP1 en las células ectomesenquimáticas únicamente que se encontraban alrededor de tejidos mineralizados como la dentina. La inmunexpresión del anticuerpo anti-PEP-CAP fue similar a la proteína del cemento 1. Únicamente en las células ectomesenquimáticas alrededor de los tejidos mineralizados (figura 4).

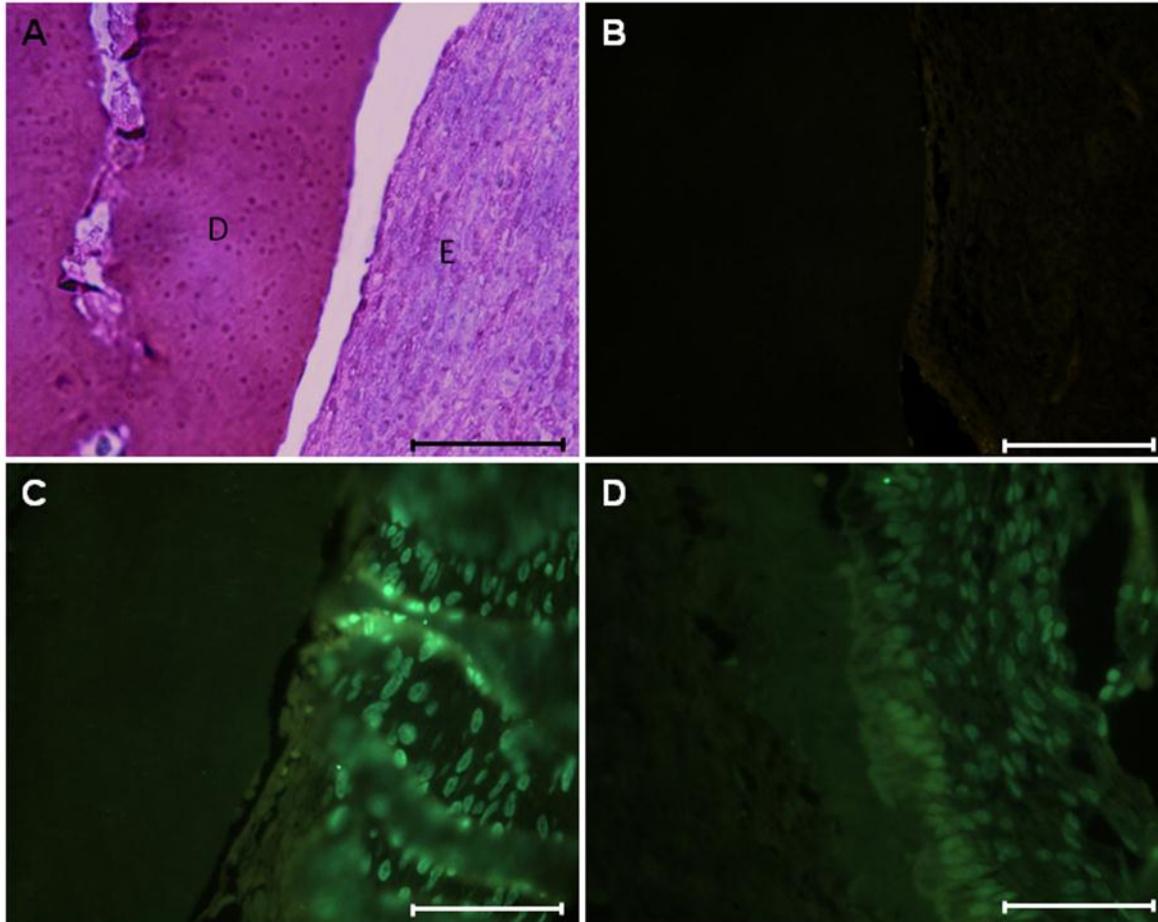


Figura 4. Inmunohistoquímica del fibro-odontoma ameloblástico 40X. A. H&E de un área donde se observa una formación de tipo dentinoide (D), rodeada de un estroma altamente celular, compuesto por células de aspecto ectomesenquimáticas (E). B. Control negativo con BSA. C. Inmunoexpresión de CEMP1, en el núcleo de las células que se encuentran alrededor de la formación dentinoide. D. Positividad de anti-PEP-CAP de la misma forma en los núcleos de las células que se encuentran alrededor de la formación dentinoide.

Odontoma tipo complejo

Esta neoplasia considerada de tipo hamartomatosa, la cual se compone de tejidos duros al azar, como dentina, esmalte y algunas veces se ha descrito tejido tipo cemento, con cantidades variables de tejido ectomesenquimatoso y epitelio odontogénico, mostró una positividad difusa en algunas áreas celulares que componen a los especímenes revisados, principalmente en las que rodean a las

formaciones de tejidos duros, tanto para el anticuerpo anti-CEMP1, como para el anti-PEP-CAP (figura 5).

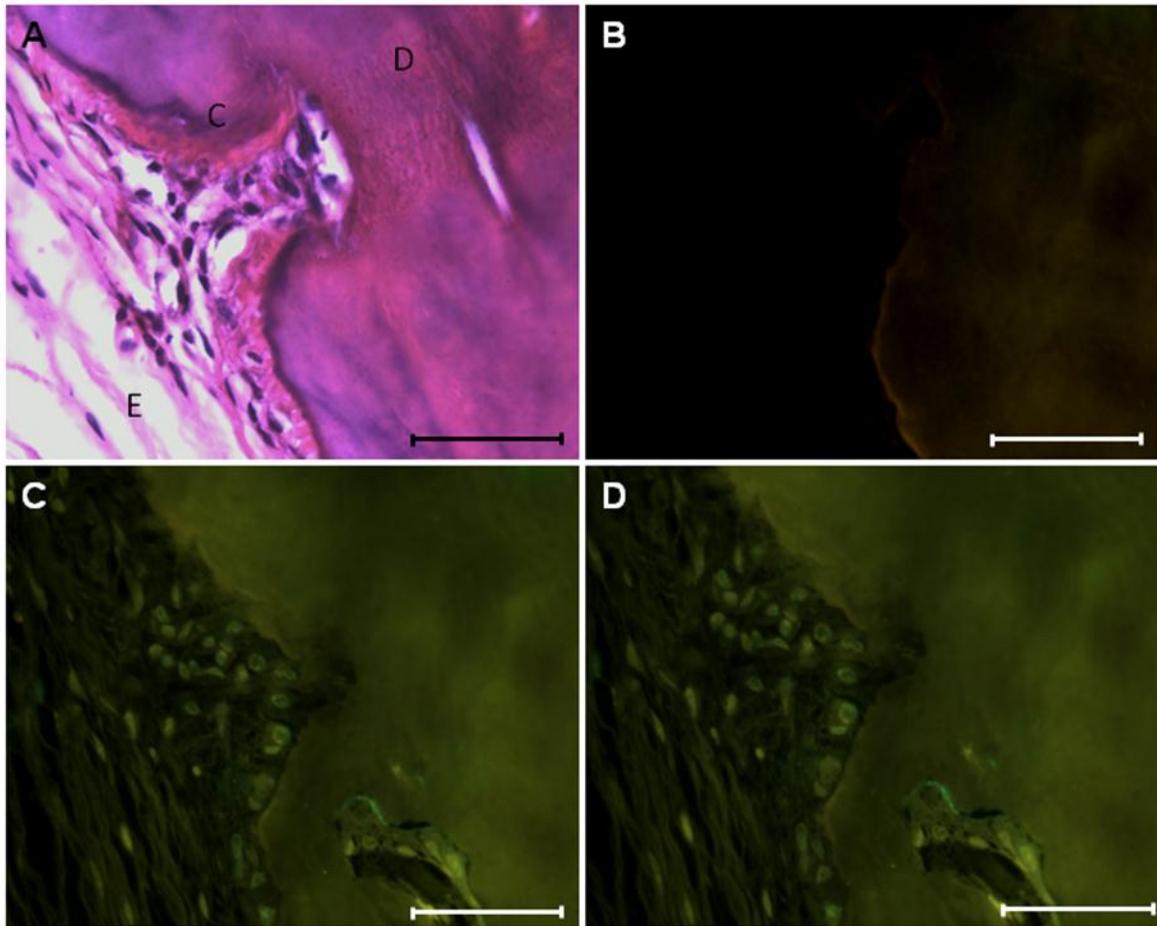


Figura 5. Inmunohistoquímica del odontoma complejo 40X. A. H&E Se observa un área de tejido mineralizado de tipo dentinoide (D), rodeado de un material más basófilo parecido a cemento (C), rodeado de un estroma compuesto por células ectomesenquimales (E). B. Control negativo con BSA. C. Inmunoreacción positiva ligera en las células que se encuentran rodeando a los tejidos mineralizados con anti-CEMP1. D. Positividad nuclear ligera de las mismas células con el anticuerpo anti-PEP CAP en la misma zona.

Odontoma tipo compuesto

La neoplasia de tipo hamartomatosa más común y que se compone de odontoides (elementos tipo dientes), fue positiva para el anticuerpo anti-PEP-CAP en las células que se encuentran en las formaciones tipo pulpa dentro de los odontoides,

así como en las células del folículo dental que rodea a estas lesiones. Mientras que para CEMP1 no hubo expresión en ninguno de los especímenes revisados. (Figura 6).

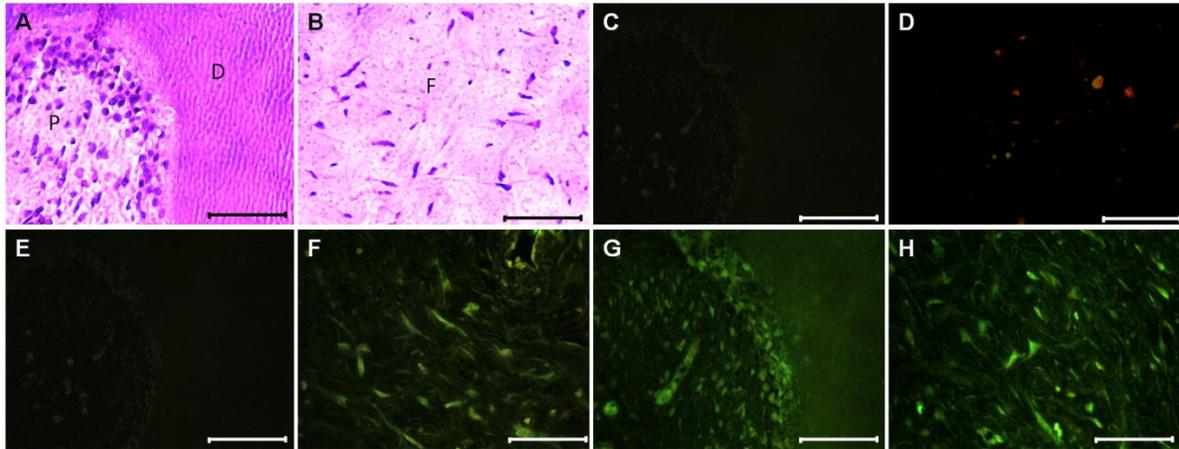


Figura 6. Inmunohistoquímica del odontoma tipo compuesto 40X. A. H&E donde se observa un dentinoide bien conformado por dentina (D) y pulpa (P). B. H&E del folículo dental que envolvía a la lesión en el que se puede observar las células de tejido conjuntivo laxo de tipo mixoide (F). C. y D. Control negativo con BSA. E. Anti-CEMP1 del área del dentinoide donde se observa negatividad en las células que lo componen para este anticuerpo. F. Células del folículo algunas positivas para anti CEMP1. G. Anti-PEP-CAP en el que se puede observar la positividad de las células de la pulpa. H. Células del folículo dental positivas para el anticuerpo del PEP-CAP.

Tumor quístico odontogénico calcificante

Los especímenes revisados de esta neoplasia se caracterizaban principalmente por contener una cantidad variable de calcificaciones de tipo cementoide, con poca cantidad de epitelio tipo ameloblástico. Además de que se encontraron algunas células fantasmas asociadas a áreas de tejidos mineralizados. En cuanto a los resultados obtenidos con el anticuerpo contra CEMP1, se observó una ligera positividad en las células fantasmas, así como en las islas de epitelio odontogénico de tipo ameloblástico. También se observó que CEMP1 fue negativo en las células que rodean las calcificaciones de tipo cementoide. Por el contrario el péptido anti-CAP se observó una positividad intensa en las células fantasmas, en

las islas de epitelio odontogénico, así como en las áreas celulares asociadas a estos cementículos que se encontraban conformando la lesión. (Figura 7).

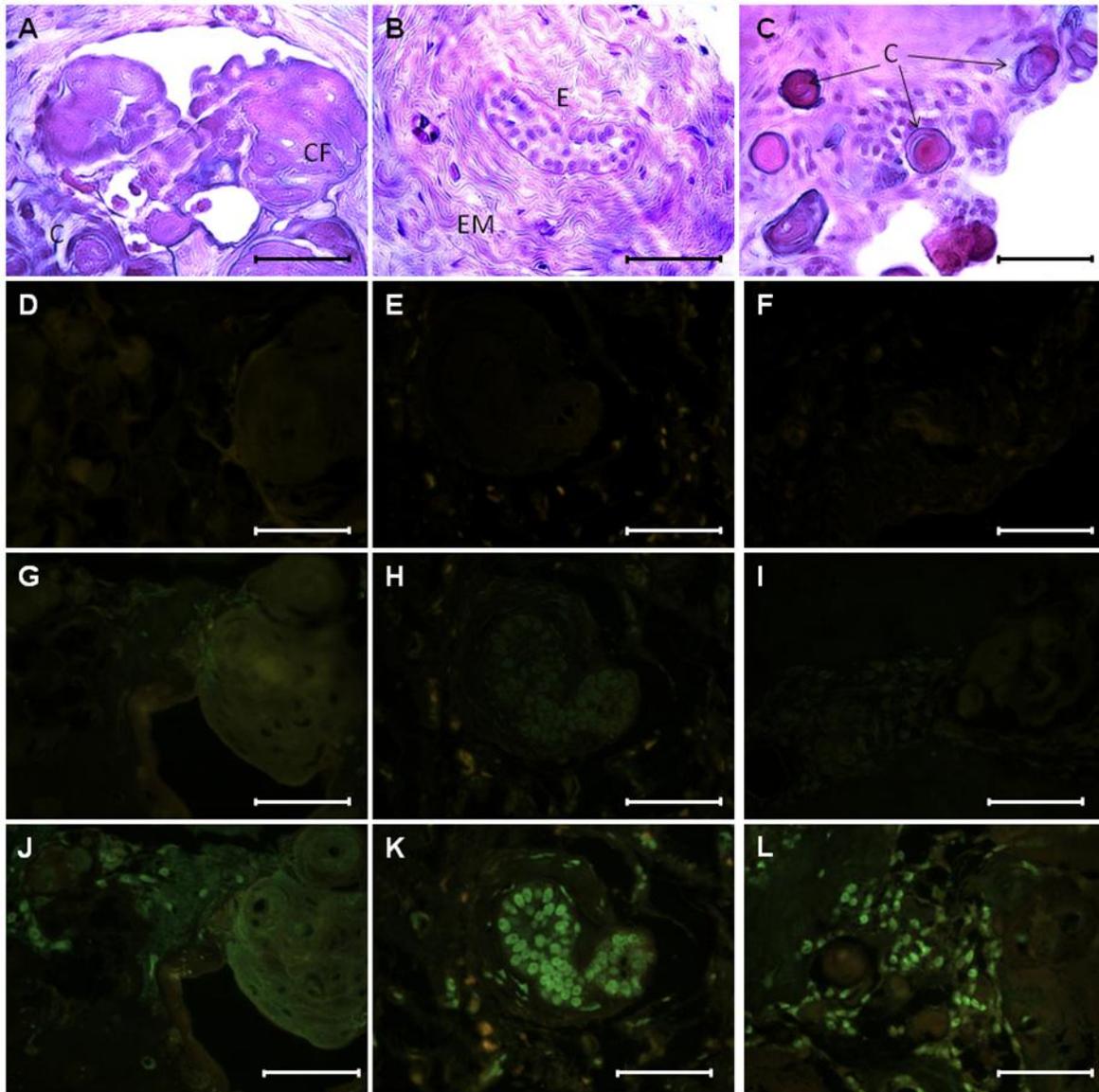


Figura 7. Inmunohistoquímica del tumor quístico odontogénico calcificante 40X. A. H&E En la cual se puede observar un área de células fantasma (CF) y en la parte inferior de la microfotografía un área de tejido mineralizado (C). B. H&E de una isla de epitelio odontogénico (E) en un estroma de tejido de tipo ectomesenquimatoso (EM). C. H&E en el cual se observan varias calcificaciones de tipo cemento (C), rodeadas de células epiteliales. D, E y F. Controles negativos con BSA. G. Ligera positividad en las células

fantasma con anti-CEMP1. H e I. Se observa una baja intensidad en las células epiteliales con anti-CEMP1. J. Células fantasma positivas con el anticuerpo PEP-CAP. K. Isla de epitelio odontogénico con una alta intensidad para el anticuerpo PEP-CAP, así como algunas de las células mesenquimatosas positivas alrededor en el estroma. L. Células intensamente positivas con el anticuerpo PEP-CAP que se encuentran rodeando varios cementículos.

Mesénquima y/o ectomesénquima odontogénico con/sin epitelio odontogénico

Cementoblastoma

Esta neoplasia que consiste de una masa de material acelular tipo cemento, en un escaso estroma de tipo fibroso, adherido a la raíz de un órgano dentario, se revisaron los especímenes correspondientes; y que tuvieran las características histológicas de esta lesión. En cuanto a los resultados obtenidos, la Proteína del Cemento 1, fue positiva en las áreas de cementoblastos de la periferia de la neoplasia y en los que se encuentran en las líneas reversas que forman columnas radiales compuestas por un centro de cementoblastos rodeados de tejido mineralizado; en algunas de las células que se encuentran alrededor de los vasos sanguíneos, en las islas periféricas de estroma de tejido conectivo con cementoblastos y áreas de mineralización así como en los escasos cementocitos que se encontraron en las masas de tejido mineralizado altamente basófilo tipo cemento. Para el anticuerpo PEP-CAP fueron resultados parecidos, observándose intensamente positivos cementoblastos de las áreas periféricas y cementocitos de las áreas centrales del cementoblastoma, siendo negativo en las áreas de islas periféricas encontradas en la lesión. (Figura 8).

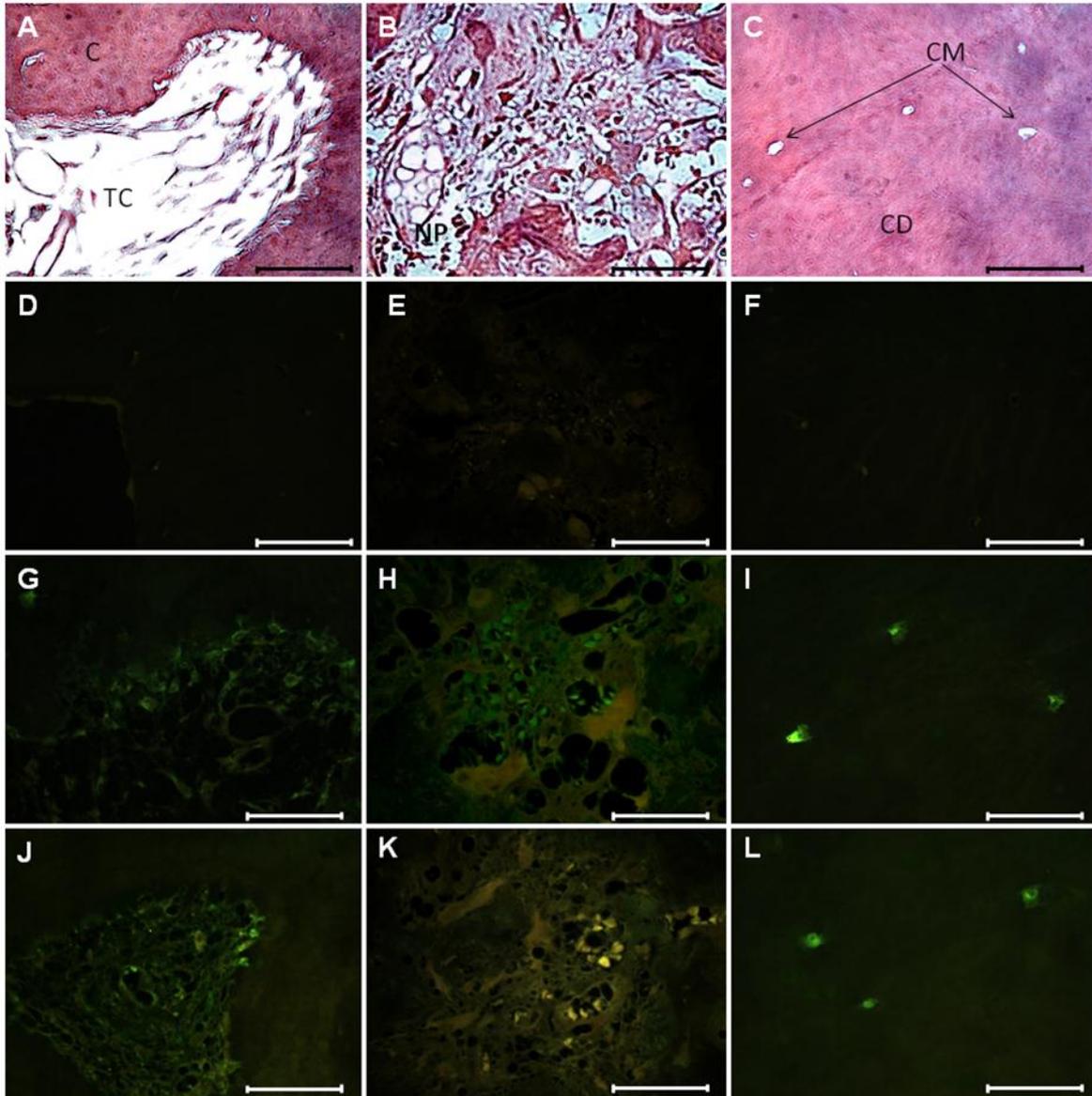


Figura 8. Inmunohistoquímica del cementoblastoma 40X. A. H&E un área de la lesión con un estroma de tejido conectivo(TC), se observar cementoblastomas formando cemento (C). B. H&E de una isla periférica de tejido no mineralizado (NP), con áreas de neoformación de tejidos mineralizados. C. H&E de la parte central del cementoblastoma con algunos cementocitos en sus lagunas. D, E y F. Control negativo con BSA. G. Positividad con CEMP1 en los cementoblastos del área periférica de la lesión. H. Isla periférica con positividad nuclear a CEMP1. I. Cementocitos intensamente positivos al anticuerpo anti CEMP1. J. Cementoblastos positivos en la periferia de la lesión para PEP-CAP. K. Área de células negativas a anti- PEP-CAP de una isla periférica. L. Positividad a PEP-CAP en cementocitos en la parte media de la neoplasia.

Fibroma osificante

Esta lesión que está compuesta por un tejido fibrocelular y material mineralizado de apariencia variable; dentro de nuestros especímenes revisados fueron del subtipo clásico (FO) el cual se compone de una cantidad variable de áreas celulares y el componente mineralizado de hueso laminar y depósitos basófilos suavemente contorneados descritos como probable cemento, se valoraron con las dos proteínas cemento específicas CEMP1 y CAP, siendo relevante recalcar que fueron intensamente positivas para el anticuerpo contra la Proteína del Cemento 1 en las células que componen esta lesión intraósea, tanto en las áreas completamente celulares como en las que rodean los cementículos y las áreas de hueso lamelar. Por el contrario fueron ligeramente positivas para el péptido de la Proteína de Adhesión del Cemento, en la cual la positividad fue más marcada en las áreas celulares alrededor de los tejidos mineralizados que en las áreas sin mineralización. (Figura 9).

Fibroma osificante periférico

Una lesión que no se considera dentro de las neoplasias de origen odontogénico por no ser invasiva y no cumplir con las características de una neoplasia; únicamente descrita de origen reactivo inflamatorio. Se decide conjuntar a este estudio por su origen descrito, el cual se ha indicado que se origina a partir de células del ligamento periodontal, además de que histológicamente se compone de tejidos mineralizados como hueso y cemento en un estroma celular mesenquimatoso, con las características histológicas parecidas al Fibroma osificante intraóseo. Los especímenes revisados fueron intensamente positivos para los anticuerpos cemento específicos, siendo mucho más clara la inmunoreactividad para CEMP1, la cual se notó una intensidad muy marcada en todas las células que conforman esta lesión, tanto en las células que rodean al tejido mineralizado (cementículos y tejido óseo), como todas las que conforman esta lesión. El péptido de CAP por el contrario mostró una positividad mayor en las células que conforman la lesión, mientras que alrededor de las formaciones de tejido mineralizado bajo su intensidad. (Figura 10).

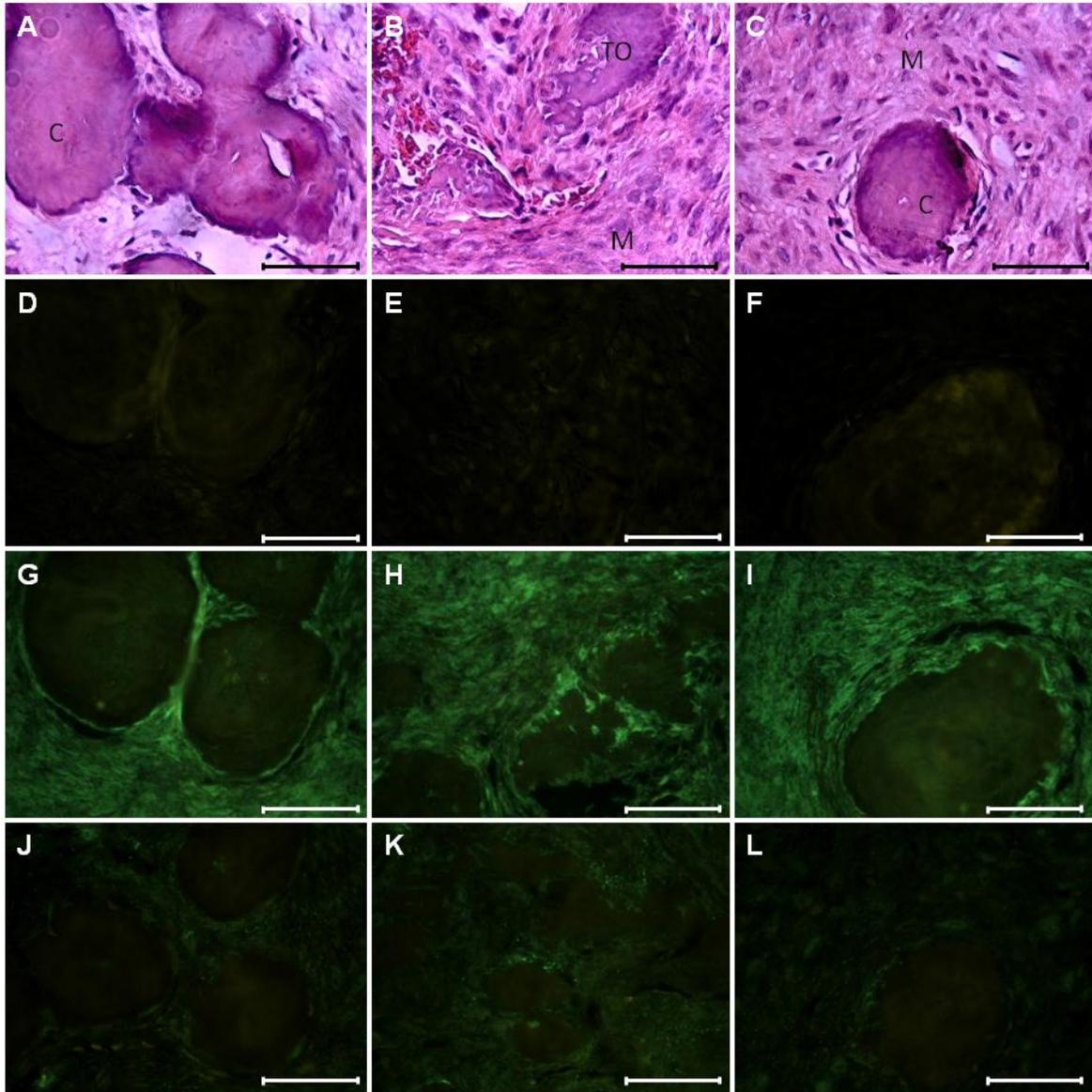


Figura 9. Inmunohistoquímica del fibroma osificante 40X. A. H&E de material mineralizado tipo cemento (C), rodeados de tejido conectivo. B. H&E de un área mesenquimatoso (M) celular con formación de tejido óseo u osículos (TO). C. H&E de tejido mineralizado tipo cemento, rodeado de células mesenquimatosas que podrían ser cementoblastos. En un estroma. (M). D, E y F. Controles negativos con BSA. G. Las células que se encuentran en el tejido conectivo rodeando los cementículos muestran reacción positiva intensa a CEMP1. H. células estromales mostrando positividad contra CEMP1, nótese una mayor intensidad alrededor de las células que se encuentran formando los osículos. I. Áreas celulares positivas al anticuerpo para CEMP1, con una intensidad mayor en las células

alrededor del cementículo. J, K y L. Inmunoreacción ligeramente positiva para CAP, en algunas de las células que se encuentran rodeando tejidos mineralizados principalmente.

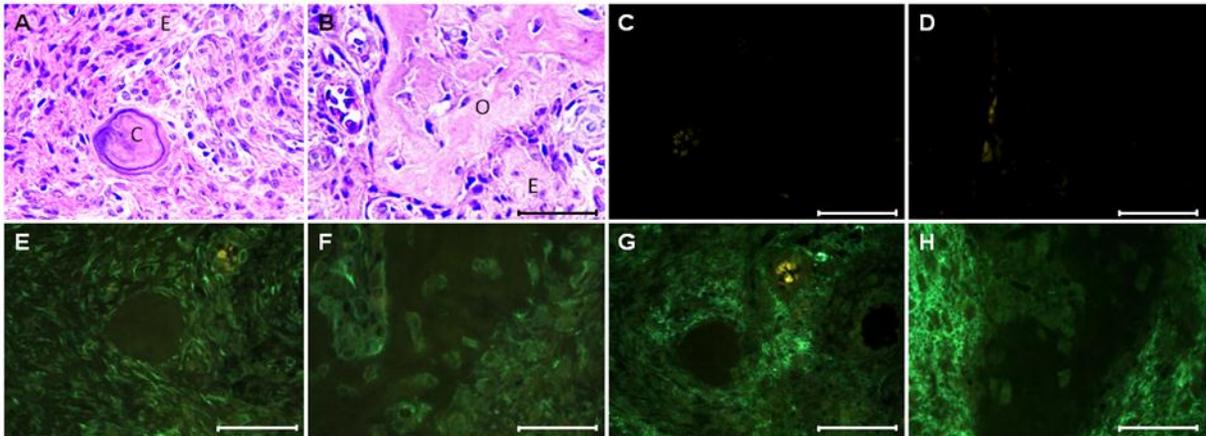


Figura 11. Inmunohistoquímica del fibroma osificante periférico a 40X. A. H&E de un área altamente celular de la lesión (E) con una formación de tejido parecido a cemento, redondeado, altamente basófilo y suavemente contorneado al centro (C). B. H&E en la que se observa un área de tejido parecido a hueso (O) en el cuál se observa muy claramente las células mineralizantes a su alrededor (E). C y D. Controles negativos con BSA. E y F. Inmunoreacción positiva en las células que rodean a un cementículo y el tejido óseo con el anticuerpo contra CEMP1. G y H. Inmunoreacción con el PEP-CAP en la que se observan áreas positivas en las células de alrededor de los tejidos mineralizados, pero áreas negativas adyacentes a los tejidos mineralizados.

Neoplasias malignas de cabeza y cuello

Osteosarcoma osteoblástico tipo convencional

Esta neoplasia de alto grado de malignidad, en la cual las células neoplásicas se encuentran envueltas en un material de tipo osteoide, y que sus cantidades de este material varían de acuerdo a cada neoplasia. Los especímenes que se revisaron fueron de características similares, originados en maxilar, de subtipo histológico osteoblástico por la cantidad de osteoide que se encontró en las laminillas revisadas. Los resultados que se obtuvieron fueron una positividad muy ligera en las células que están produciendo osteoide para el anticuerpo contra CEMP1. Por el contrario para el péptido de CAP, se observó una mayor

positividad para las células entre el material osteoide, como se observa en las fotomicrográficas. (Figura 11).

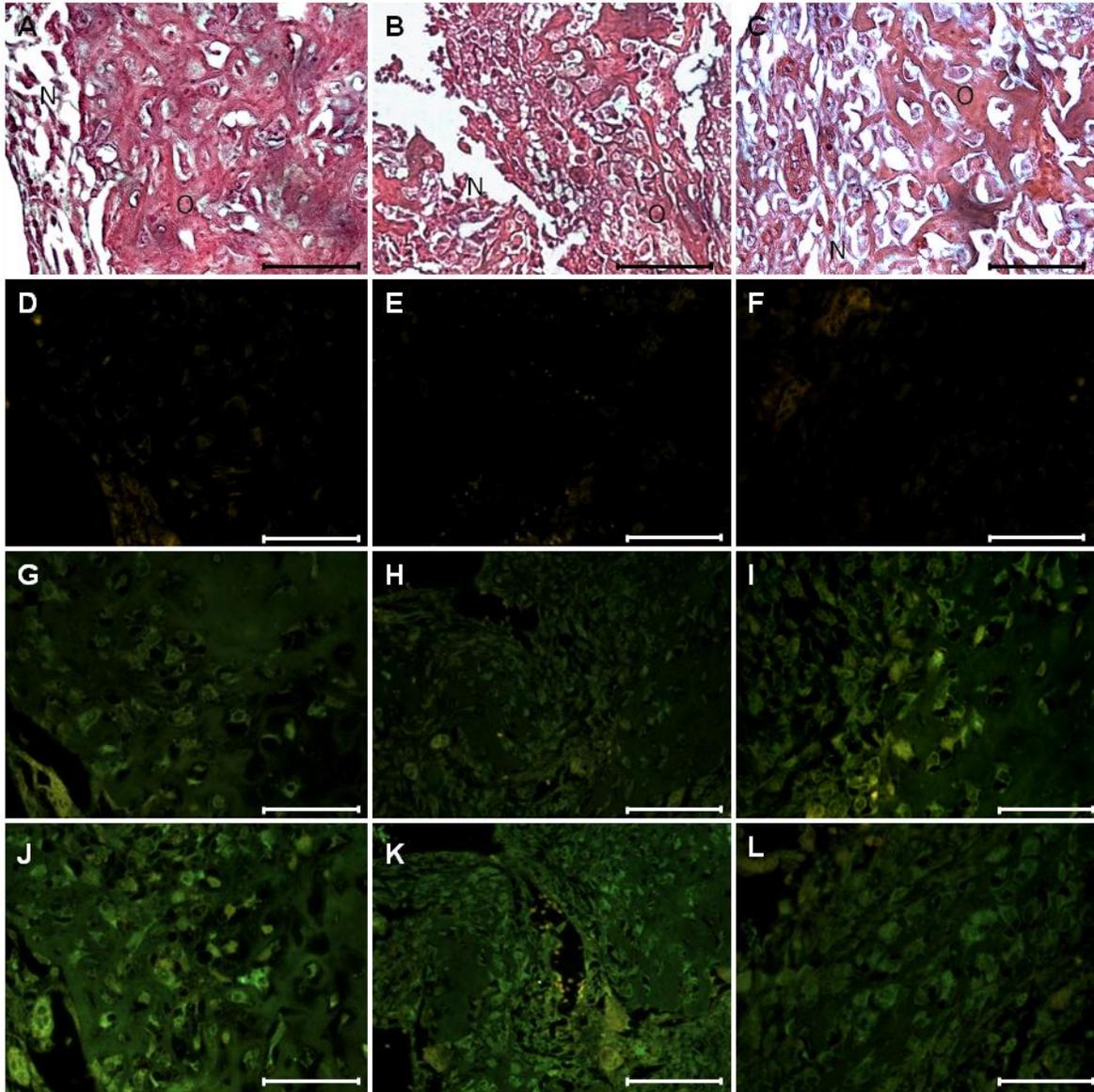


Figura 11. Inmunohistoquímica del osteosarcoma osteoblástico de maxilar a 40X. A, B y C. H&E en la cual se observan células neoplásicas (N) formando cantidades variables de material de tipo osteoide (O). D, E y F. Controles negativos con BSA. G, H e I. Inmunoreacción con CEMP1 en la que se observa una ligera positividad de las células neoplásicas formadoras de osteoide. J, K y L. Células neoplásicas positivas para el PEP-CAP que están formando en cantidades variables tejido mineralizado u osteoide.

Condrosarcoma

Neoplasia maligna conformada por cartílago hialino con diferentes grados de mineralización. Los especímenes revisados fueron de cabeza y cuello área no especificada, de grado 1 moderadamente celular. CEMP1 y PEP-CAP se expresaron intensamente, tanto en las áreas celulares de cartílago hialino neoplásico, así como en las áreas donde se observaba cartílago hipertrófico.

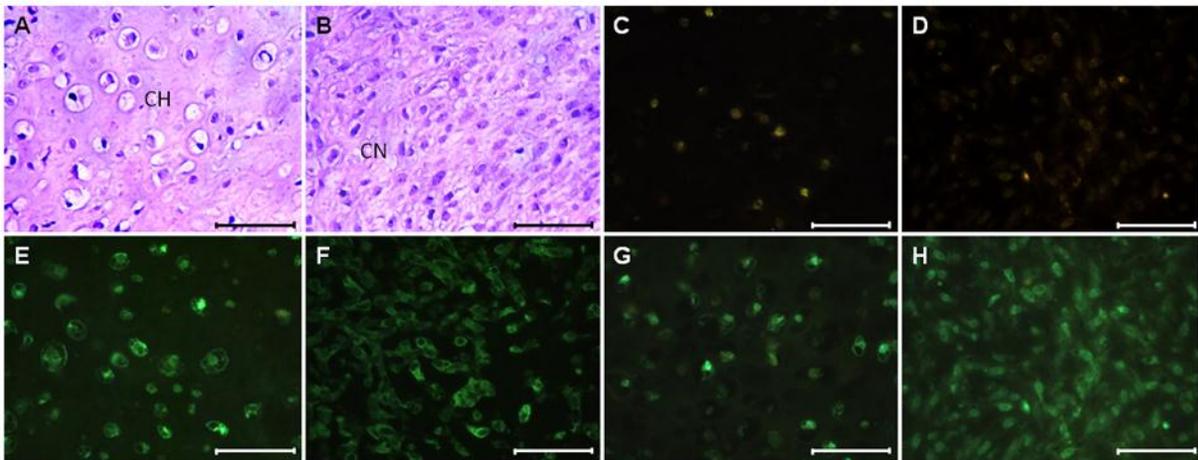


Figura 12. Inmunohistoquímica del condrosarcoma grado 1 a 40X. A. H&E de un área de cartílago hialino neoplásico (CH). B. H&E donde se observa un área de células neoplásicas con poco componente mineralizado (CN). C y D. Controles negativos con BSA. E. Inmunoreacción positiva en células de condrocitos hipertróficos en cartílago hialino neoplásico con el anticuerpo anti-CEMP1. F. Áreas positivas altamente celulares con anti-CEMP1. G. Inmunoreacción con PEP-CAP en la que se observa un 50% de células positivas en esta área de cartílago hipertrófico neoplásico. H. Intensa positividad para PEP-CAP en las áreas altamente celulares.

7. DISCUSIÓN

CEMP1 es una proteína que se aisló de células de un cementoblastoma humano, las cuales expresan un fenotipo cementoblástico y los hallazgos físicos, químicos y morfológicos del tejido mineral depositado por estas células son diferentes al tejido depositado por células osteoblásticas humanas *in vitro*.⁴¹⁻⁴² Esta línea celular produce una proteína con una Mr 50,000 daltones que ha sido purificada del medio condicionante y que se denominó como Proteína del Cemento 1.²⁹ Se ha demostrado que CEMP1 es altamente expresada a nivel de proteína y ARNm en cementoblastos, células progenitoras localizadas en zonas paravasculares del ligamento periodontal y células de los espacios endosteales del hueso alveolar.¹⁸ Carmona-Rodríguez y col. demostraron que células de fenotipo no mineralizante como son los fibroblastos gingivales, transfectados con el gen de CEMP1 expresaran esta proteína y además cambiaran su fenotipo, siendo células mesenquimatosas no mineralizantes, a células de fenotipo mineralizante, secretando proteínas asociadas a procesos de mineralización como fosfatasa alcalina, sialoproteína ósea, proteína de adhesión del cemento, osteocalcina y osteopontina.²³

La caracterización bioquímica de CEMP1 reveló que esta proteína comparte algunas de las características de las proteínas no colágenas asociadas a la formación de cristales de fosfato de calcio; que es una proteína altamente glicosilada, fosforilada y tiene una alta afinidad por la hidroxiapatita, sin ser una proteína ácida. Romo Arévalo y col. Confirmaron que CEMP1 es una proteína que juega un papel importante en la nucleación de cristales de fosfato octacálcico (precursor de la hidroxiapatita), y enfatizó su relevancia en la regulación del crecimiento de cristales y su arreglo en la biomineralización.²⁹ El presente estudio muestra inmunotinción positiva a CEMP1 en 10 (80%) de 12 neoplasias revisadas, aunque en 3 de ellas la positividad a CEMP1 fue ligera y difusa, siendo 7 las neoplasias que expresaron una intensa positividad al anticuerpo anti-CEMP1. Fue encontrada esta proteína en células mesenquimatosas principalmente asociadas al tejido descrito como cementoide, sugiriéndonos que está

sintetizándose por células con fenotipo mineralizante, específicamente de linaje cementoblástico como se ha reportado por autores como Carmona-Rodríguez²³ y Komaki Motohiro⁴³. En los tumores odontogénicos de origen epitelial; CEMP1 no se expresó en células epiteliales neoplásicas que componen al ameloblastoma, por lo que se puede sugerir que CEMP1 está implicada únicamente en neoplasias en las cuales se compongan por tejidos mineralizados, corroborando lo descrito por autores como Gao y colaboradores⁴⁴, que estudiaron la expresión de la proteína morfogenética ósea (BMP) en tumores odontogénicos. Ellos concluyeron que al ser negativa la expresión de estas proteínas en estas neoplasias, era porque no presentaban algún tipo de formación de tejidos duros. El tumor odontogénico adenomatoide, otro de los tumores de origen epitelial según lo descrito por la OMS², mostró negatividad para CEMP1, tanto en el epitelio que conforma las pseudorosetas, como en las formaciones pseudoductales. Por lo que se puede sugerir que al igual que el ameloblastoma, no está mostrando una tendencia a formar tejidos mineralizados, específicamente cemento, aunque se ha descrito que el TOA es una neoplasia que puede llegar a formar calcificaciones y tejidos mineralizados (Sciubba y Reichart)^{1,2}. Los especímenes revisados no presentaban esta característica histológica, por lo que se podría sugerir que las células que estaban conformando esta neoplasia no estaban en procesos de mineralización, a pesar de que sí se encontró gran cantidad de gotas eosinófilas hialinas que fueron negativas para CEMP1, en la que algunos autores como Takata y col⁴, encontraron positivas las células que rodean estas formaciones para enamelinina (MMP-20), describiendo que podría ser que estas gotas hialinas estuvieran relacionadas a la formación de sustancias tipo esmalte.

Dentro de las neoplasias de origen mixto, el fibroma ameloblástico, una neoplasia poco común que ocupa el 0.5 a 4.5% de los tumores odontogénicos, fue negativo a CEMP1 en las células mesenquimatosas y positivo ligeramente en algunas células del componente epitelial, sugiriéndonos que CEMP1 podría estar implicada en procesos de diferenciación celular; como se ha descrito en investigaciones como la de Xiong y colaboradores⁴⁶ quién demuestra la capacidad de diferenciación de células de los restos epiteliales de Malassez, que pueden

generar hueso y estructuras tipo cemento, por lo que nos podría sugerir que al encontrar CEMP1 expresado en este linaje celular, hay un proceso de transición epitelio-mesénquima. Además de que estas neoplasias muestran moléculas que participan en procesos de tumorigénesis y diferenciación celular por genes que se encuentren encendidos en células neoplásicas, que no se encuentran en las células normalmente³. En cuanto al fibro-odontoma ameloblástico, CEMP1 fue positivo intensamente en las células mesenquimatosas que se encontraban asociadas a la formación de tejidos duros, por lo que se puede sugerir que esta proteína se encuentra relacionada a procesos de mineralización, además de estar implicada en los procesos de tumorigénesis y progresión como lo ha descrito Kumamoto³. De la misma forma se encontró CEMP1 en el odontoma, aunque con una intensidad menor en las células que se encontraban alrededor de las formaciones de tejidos duros que componen esta lesión, concordando con lo descrito por Carmona y colaboradores²³, en el cual se describe la participación de CEMP1 en procesos tempranos de mineralización, bajando su actividad en estadios finales de este proceso. Además de que CEMP1 es una proteína nucleadora de cristales de fosfato octacálcico, precursor de la hidroxiapatita, la cual forma parte de los tejidos mineralizados tanto odontogénicos como de otros tejidos duros²⁹. El odontoma compuesto, que se encuentra formado por odontoides completamente formados, con tejidos duros maduros, resultó negativo para CEMP1, únicamente se observó una inmunolocalización positiva a esta proteína en las células que conforman el folículo dental. Siendo CEMP1 una proteína limitada a células cementoblásticas o subpoblaciones del ligamento periodontal²², nos sugiere que uno de los orígenes de los cementoblastos, como se ha descrito en últimas revisiones⁴⁷, sea por células mesenquimatosas que provienen del folículo dental. En el tumor quístico odontogénico calcificante se observó una ligera positividad a CEMP1 en las células fantasmas e islas epiteliales que conforman la neoplasia, siendo negativo para las células mesenquimatosas; sugiriéndonos lo que se describió anteriormente sobre los diferentes procesos de diferenciación que puede tener el epitelio odontogénico, como describió Xiong y Col⁴⁶. El cementoblastoma la única neoplasia de origen

odontogénico ectomesenquimatoso que fue incluida en este estudio, resultó positiva para CEMP1 en las células mesenquimatosas que conforman la neoplasia, en los cementoblastos y cementocitos de la lesión, remarcando el origen cementoblástico de esta proteína, como se ha descrito acerca de CEMP1 por Arzate y col¹⁸.

En cuanto a las lesiones óseas relacionadas, el fibroma osificante que es de localización central (intraósea), fue positivo intensamente en las células mesenquimatosas que conforman toda la lesión, siendo mucho más marcado en las células alrededor de los cementículos, mostrando que estas están formando el tejido mineralizado parecido a cemento, expresando CEMP1; por lo que se puede sugerir que estas islas redondeadas, basófilas pobremente celulares están conformadas por cemento. Ya que esta proteína se ha descrito como un marcador específico de este tejido y es secretada por células de fenotipo cementoblástico^{18, 22, 25,43}. De la misma forma, el fibroma osificante periférico (extra óseo), muestra positividad a CEMP1 en las células que se encuentran alrededor de estas formaciones mineralizadas, igualmente descritas como de tipo cemento, por lo que de igual manera sugerimos que este tejido mineralizado está siendo formado por cementoblastos y por lo tanto está conformado por este tejido. El encontrar positividad, refuerza lo antes descrito acerca de un contenido mixto, con componente óseo y cemento, además caracteriza de manera molecular el cemento, aportando otro punto más a lo que se ha descrito hasta el momento, como las características histológicas, luz polarizada; que se ha utilizado para distinguir el cemento, como describe Sachin y colaboradores, por la falta de un anticuerpo específico de cemento⁴⁸. Además de que contradice lo descrito por autores de antaño como Storkel⁴⁹, Romber⁵⁰ y Wenig⁵¹; quienes describen un único origen osteogénico en este tipo de lesiones. Las neoplasias malignas de cabeza y cuello que se incluyeron en el estudio: el osteosarcoma y el condrosarcoma de maxilares; se decidieron incluir porque comparten un origen embriológico en común, las células que originan los procesos maxilares dando origen a los maxilares, siendo de origen ectomesenquimal; al igual que las células que desarrollan los órganos dentarios y el ligamento periodontal, además de que

todas provienen del primer arco branquial. La variación en el desarrollo embriológico, únicamente es por las diferentes vías que sigue cada uno de los componentes celulares, debido a la expresión de diferentes genes que se encuentran en los sitios indicados⁵². Encontramos una ligera positividad al anticuerpo para CEMP1, en las células que componen el Osteosarcoma, principalmente las asociadas a áreas que rodean osteoide, reflejándonos que esta proteína está implicada en procesos de mineralización, como la nucleación de cristales de fosfato octacálcico precursor de la hidroxiapatita, y por lo tanto está asociada a procesos de mineralización patológica en esta neoplasia²⁹. En el condrosarcoma de cabeza y cuello, se observó una alta positividad en las células neoplásicas, tanto en las áreas altamente celulares con poca cantidad de matriz mineralizada, como en las áreas con gran cantidad de matriz, en la que se observan condrocitos hipertróficos altamente positivos a CEMP1. La presencia de este hallazgo tiene una asociación directa a lo ya reportado por Arzate y colaboradores⁵³, que en estudios previos vieron la asociación que existía entre extractos de esta proteína y su participación en la condrogénesis. La proteína del cemento 1; tiene una región (del residuo 30 al 110) que presenta 40% de identidad que la colágena tipo 10, que participa en los procesos de mineralización del cartílago hipertrófico, además de tener un papel nucleador en el proceso de mineralización²⁹. Recientemente investigaciones como la de Hoz R y col⁵⁴, han sugerido que CEMP1 es un factor clave para la diferenciación de fenotipos cementoblástico, osteoblástico y/o condroblástico, sugiriendo que mantiene una íntima participación en el proceso de osificación endocondral en células ectomesenquimales que dan origen a órganos dentarios y huesos maxilares.

CAP es una proteína que se considera un splicing alternativo del gen PTPLA, se ha inmunolocalizado en cemento radicular, en espacios endosteales del hueso alveolar y en zonas paravasculares del ligamento periodontal, así como en cementoblastos putativos *in vitro* e *in vivo*^{35, 36, 38}. CAP se ha descrito como la isoforma 2 del gen de PTPLA (Protein Tyrosine Phosphatase like) (AF114494). Con la diferencia de que en su secuencia se encuentran 15 aminoácidos distintivos de CAP, no encontrándose en otros splicing alternativos de PTPLA. Por

lo que se sugirió que este péptido debía de ser aislado para producir un anticuerpo para estos diferentes 15 aminoácidos y ver las funciones específicas que podía tener esta secuencia que la hace única y específica de cemento³⁷. En últimos estudios se observó que CAP actúa como mitógeno de células troncales derivadas de ligamento periodontal humano e induce la formación de nódulos de calcio, demostrando que está asociado a la formación y composición de cristales de hidroxiapatita, *in vitro*³⁸. En el estudio se observaron 11 de 12 neoplasias con positividad en diferentes intensidades (90% de las neoplasias estudiadas) para el péptido de CAP. De igual forma que CEMP1, únicamente 7 de estas neoplasias mostraron una positividad intensa tanto en células de origen epitelial como en células mesenquimatosas, principalmente asociadas a neoplasias que presentan tejidos mineralizados, como el cementoide, siendo este el objetivo de nuestro estudio.

En los tumores de origen epitelial según la OMS, el ameloblastoma fue negativo para el péptido de CAP. Esta neoplasia no presenta tejidos mineralizados ni calcificaciones descritas, por lo que se puede sugerir que al ser CAP una proteína implicada en procesos de mineralización no se encuentra presente en estas células tumorales⁴⁴. El tumor odontogénico adenomatoide, otra neoplasia de origen epitelial, resultó positiva intensamente en las células tumorales, principalmente en las gotas hialinas que se encuentran en la neoplasia; por lo que se puede sugerir que al describirse como una neoplasia con capacidad de formación de componentes mineralizados (Sciubba JJ¹ y Reichart PA²), estas células epiteliales pueden estar diferenciándose hacia un fenotipo mineralizante o como ha descrito Takata y colaboradores⁴, pueden estar formando un tejido parecido al esmalte y por lo tanto presentando las características de una célula mineralizante.

Dentro de los tumores odontogénicos que se originan del epitelio y ectomesénquima odontogénico, el fibroma ameloblástico fue positivo en el componente epitelial de algunas áreas, mientras que el fibro-odontoma ameloblástico se observó con positividad en las células ectomesenquimatosas

asociadas a tejidos mineralizados como la dentina. Aunque los resultados no son concluyentes por la intensidad de la expresión del péptido de CAP que es baja, nos podría sugerir que estas neoplasias tanto en epitelio de FA, como de FOA puede haber varios procesos asociados a CAP. En el fibroma ameloblástico no se observan tejidos mineralizados, por lo que puede estar asociada a quimiotaxis o proliferación celular (Metzger y col). Mientras que el fibro-odontoma ameloblástico si puede estar asociado a nucleación de cristales de hidroxiapatita como se ha descrito en referencias anteriores.^{30-36,37}

Los odontomas compuestos y complejos que se revisaron en este estudio, fueron positivos en las células mesenquimatosas del folículo dental y en algunas células aisladas asociadas a tejidos mineralizados, por lo que concluimos que el péptido de CAP está asociado a procesos de mineralización y diferenciación de células neoplásicas ectomesenquimatosas que lo conforman (Montoya y col)³⁷. El tumor quístico odontogénico calcificante, clasificado como un tumor mixto por tener un equilibrio en su contenido celular epitelio- ectomesénquima, fue intensamente positivo en sus 2 componentes celulares; además de mostrar positividad en la matriz extracelular alrededor de las células mesenquimatosas, sugiriéndonos que esta matriz está en un estado temprano de mineralización, ya que CAP se ha asociado como una proteína que induce un aumento significativo en la actividad de la fosfatasa alcalina, quién actúa principalmente en los inicios de la mineralización (Montoya y col)³⁷. Otro hallazgo interesante fue que las islas de células epiteliales junto con las células fantasma, expresaron fuertemente el péptido de CAP, apoyando lo descrito por Xiong y col.⁴⁶, acerca de la diferenciación que puede tener el epitelio odontogénico, principalmente las células fantasma, las cuales usualmente están en un proceso de mineralización y por lo tanto es posible que expresen este tipo de moléculas⁵⁵. Dentro de los tumores de origen ectomesenquimatoso, la neoplasia que se revisó en el presente trabajo, fue el cementoblastoma, que fue positivo en las células cementoblásticas, cementocitos del centro de la lesión y tuvo áreas negativas en zonas celulares mesenquimatosas al péptido de CAP. Por lo que se puede sugerir, como ya ha

sido descrito por autores como Arzate y colaboradores³⁰, que esta proteína es expresada por células con un fenotipo cementoblástico.

Dentro de las neoplasias de origen odontogénico, se encuentran las lesiones óseas relacionadas, en la que se revisó el fibroma osificante central y su contraparte (que no se ha considerado como una neoplasia de origen odontogénico) el fibroma osificante periférico, el cual presenta características histológicas similares como la presencia de tejido parecido a cemento. El péptido de CAP, fue positivo en las células que rodean estas formaciones de tipo cementoide en el fibroma osificante. La positividad fue mucho menor en comparación con CEMP1, por lo que esto nos podría sugerir que el péptido de CAP actúa en las fases iniciales del proceso de mineralización de estas formaciones tipo cemento y por lo tanto su expresión disminuye en comparación con CEMP1, como se describió anteriormente por autores como Montoya y col³⁷. A diferencia, el fibroma osificante periférico, fue intensamente positivo en todas las células que componen esta lesión reactiva, tanto alrededor del cementoide como en las áreas altamente celulares. La etiología de esta lesión todavía no está completamente esclarecida, pero se ha descrito que esta se origina de células del ligamento periodontal (Luvizoto EK y col), por lo que la presencia del péptido de CAP en estas células refuerza lo descrito acerca de su inmunolocalización^{35, 37}.

Las neoplasias malignas de maxilares revisadas en nuestro estudio, el osteosarcoma osteogénico fue positivo al péptido de CAP en todas las células malignas asociadas a material de tipo osteoide (característico de esta lesión), que como lo ha descrito la OMS es matriz ósea que se encuentra en proceso de mineralización, eosinófila, homogénea y curvilínea entre las células que la producen⁵⁷. En el condrosarcoma también hubo expresión de este péptido en todas las células neoplásicas, por lo que podríamos sugerir que este péptido se encuentra implicado en los procesos de mineralización tanto del osteoide del osteosarcoma, como en la matriz cartilaginosa del condrosarcoma, que tienen gran contenido de moléculas asociadas a mineralización en su matriz extracelular. CAP es una proteína que induce un aumento en la actividad de la fosfatasa

alcalina, por lo que el encontrarla formando parte de las células neoplásicas de estos tumores mineralizantes, nos indica que estas neoplasias se encuentran en estados mineralizantes patológicos^{3, 37}.

8. CONCLUSIONES

En el presente estudio la expresión de CEMP1 nos sugiere que esta proteína se encuentra implicada en procesos no únicamente de mineralización, sino de diferenciación celular en tumores odontogénicos de origen mixto.

Los resultados de este estudio refuerzan los hallazgos de que CEMP1 es una molécula involucrada en procesos de condrogénesis por su presencia en tumores malignos como el condrosarcoma.

La expresión de CAP en células tumorales de origen epitelial y mesenquimal, no relacionadas ha tejido mineralizado; nos sugiere que puede estar implicada en procesos de adhesión y proliferación celular en los tumores odontogénicos.

Los resultados obtenidos nos sugieren que las proteínas específicas de cemento CEMP1 y CAP se encuentran implicadas en procesos de mineralización patológica en los tumores odontogénicos y las lesiones óseas relacionadas.

CEMP1 y CAP se encontraron adyacentes a zonas de formación de tejido parecido a cemento; principalmente en lesiones como los fibromas osificantes, donde se han descrito estas mineralizaciones por lo que podemos sugerir que este tejido es cemento, debido a su caracterización histológica y molecular.

Al encontrar expresión en células adyacentes a la formación del cemento; CEMP1 y CAP pueden ser utilizados como marcadores específicos de células con fenotipo cementoblástico y para corroborar la presencia de cemento en este tipo de neoplasias odontogénicas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sciubba JJ, Fantasía JE, Kahn LB. Tumors and cysts of the jaw. Washington, DC, USA: Armed Forces Institute of Pathology, 2001; 71-160.
2. Reichart PA, Philipsen HP. Odontogenic tumors and allied lesions. London, UK: Quintessence Publishing, 2004; 41-332.
3. Kumamoto H. Molecular pathology of odontogenic tumors. J Oral Pathol Med, 2006; 35: 65-74.
4. Takata T, Zhao M, Uchida T, Wang T, Aoki T, Bartlett JD, Nikai H. Immunohistochemical detection and distribution of enamelysin (MMP-20) in Human Odontogenic Tumors. J. Dent Res 2000; 79: 1608-1613.
5. Slootweg PJ. Maxillofacial fibro-osseous lesions: Classification and differential diagnosis. Semin Diagn Pathol, 1996; 13: 104-112.
6. Furtado GP, Sallum EA, Sallum AW, Zaffalon CM, de Toledo S, Nociti JFM. Dental cementum reviewed: development, structure, composition, regeneration and potential functions. Braz J Oral Sci, 2005; 12: 651-658
7. Grzesik WJ, Cheng H, Oh JS, Kuzhetsov SA, Mankani MH, Uzawa K, Robey PG, Yamauchi M. Cementum-Forming cells are phenotypically distinct from bone-forming cells. J Bone Miner Res, 2000; 15: 52-59
8. Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. Periodontol 2000, 1997; 13: 41-75.
9. Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. Periodontol 2000, 2000; 24: 73-98.
10. Bosshardt DD, Schroeder HE. Establishment of acellular extrinsic fiber cementum on human teeth. A light –and electron- microscopy study. Cell tissue Res, 1991; 263: 323-336.
11. Bosshardt DD, Schroeder HE. Initiation of acellular extrinsic fiber cementum on human teeth. A light –and electron – microscopy study. Cell tissue Res, 1991; 263:311-324.
12. Thomas HF, Kollar EJ. Differentiation of odontoblasts in grafted recombinants of murine epithelial root sheath and dental mesenchyme. Arch Oral Biol, 1989; 34: 27-35.

13. MacNeil RL, Thomas HF. Development of the murine periodontum. Role of basement membrane in formation of a mineralized tissue on the developing root dentin surface. *J Periodontol*, 1993; 64: 95-102.
14. Pitaru S, McCulloch CA, Narayanan SA. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodontal Res* 1994; 29: 81-94.
15. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissue in health and disease. *Periodontology* 2000, 2006; 40: 11-28.
16. Cochran DL, Wozney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol* 2000. 1999; 19: 40-58.
17. Ikezawa K, Hart CE, Williams DC, Narayanan AS. Characterization of cementum derived growth factor as an insulin-like growth factor-I like molecule. *Connect tissue Res*, 1997; 36: 309-319.
18. Arzate H, Jiménez-García LF, Álvarez-Pérez MA, Landa A, Barkana I, Pitaru S. Immunolocalization of human cementoblastoma-conditions medium derived protein. *J Dent Res*, 2002; 81: 541-546.
19. WU D-Y, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan SA. Characterization of a collagenous cementum-derived attachment. *J Bone Mineral Res*, 1999; 11: 686-692.
20. Saito M, Iwase M, Maslan N, Nozaki N, Yamamuchi M, Handa K, Takashi O, Sato S, Kasawe T, Terenaka T, Narayanan S, Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone* 2001; 29:242-248.
21. Arzate H, Olson SW, Page RC, Narayanan S. Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in culture. *J Bone Mineral Res*, 1992; 18: 15-30.
22. Álvarez-Pérez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Carmona-Rodríguez B, Arzate H. Molecular cloning, expresión and immunolocation of a novel human cementum-derived protein (CP23). *Bone R*, 2006; 38: 409-419.
23. Carmona-Rodríguez B, Álvarez-Pérez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes Gasga J, Molina Guarneros J, García-Hernández A, Suárez-Franco J, Chavarría I, Villareal E, Arzate H. Human cementum protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblast. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 358: 763-769.

24. Villareal-Ramírez E, Moreno A, Mas-Oliva J, Chávez-Pacheco J, 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; 384: 49-54
25. Kémoun P, Laurencin-Dalricieux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Cote-Auriol F, Briand-Mesange F, Gadelorge M, Arzate H, Narayanan AS, Brundel G, Salles JP. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel Matriz derivates (EMD) in vitro. *Cell Tiss Res*, 2006; 329: 283-294.
26. Arzate H, Chimal-Monroy J, Hernández-Lagunas L, Díaz de León L. Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *J Periodontol Res*, 1996; 31: 144-148.
27. 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.
28. Kitagawa M, Kudo Y, Ogawa I, Abiko Y, Miyauchi M, Takata T. Effect of F-Spondin on cementoblastic differentiation of human periodontal ligament cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 309: 1050-1056.
29. Enrique Romo-Arévalo Eduardo Villareal-Ramírez E, Juan L. Chávez-Pacheco, Cristina Piña-Barba, M. Aguilar-Franco and Higinio Arzate. In vitro effects of cementum protein 1 (CEMP1) on calcium phosphate crystal formation and its role during the mineralization process. *MRS Proceedings*, 1244, 5 doi:10.1557/PROC-1244-1245.
30. 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; 6: 11: 2990-2995.
31. Barkana I, Narayanan AS, Grosskop A, Savion N, Pitaru S. Cementum attachment protein enriches putative cementoblastics populations on root surfaces in vitro. *J Dent Res*. 2000; 79: 7: 1482-1488.
32. Komaki M, kang M, Narayanan AS. Role of MAP Kinases p42erk-2/p44erk-1 in cementum-derived attachment-protein-mediated cell attachment. *J. Dent Res* 2000; 79: 10: 1789-1793.
33. 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; 12:10: 1691-1699.

34. Metzger Z, Weinstock B, Dotan M, Narayanan AS, Pitaru S. Differential chemotactic effect of cementum attachment protein on periodontal cells. J Periodontal Res. 1998; 33:2: 126-129.

35. Pitaru S, Narayanan SA, Olson S, Savion N, Hekmati H, Alt I, Metzger Z. Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces. J Periodontal Res. 1995; 30: 3608.

36. Saito M, Narayanan AS. Signaling reactions induced in human fibroblasts during adhesion to cementum-derived attachment protein. J Bone Miner Res, 1999; 14: 65-72.

37. Montoya Ayala Gonzalo. "La proteína recombinante de adhesión del cemento radicular (hrCAP) induce la diferenciación de células troncales derivadas del ligamento periodontal humano y regula el proceso de mineralización *in vitro*". Tesis de maestría en el programa de posgrado de odontología en la Universidad Nacional Autónoma de México.

38. Valdés de Hoyos A, Hoz-Rodríguez L, Arzate H, Narayanan AS. Isolation of protein-tyrosine phosphatase-like member-a variant from cementum. J Dent Res, 2012; 91: 203-209.

39. Shen LC, Chen YK, Hsue SS, Shaw SY. Expression of osteonectin/secreted protein acidic and rich in cysteine and matrix metalloproteinases in ameloblastoma. J Oral Pathol Med, 2010; 39: 242-249.

40. Modolo F, Tillman Biz M, Trieveiller Martins M, Orsini Machado de Sousa S, Soares de Araújo N. Expression of extracellular matrix proteins in adenomatoid odontogenic tumor. J Oral Pathol Med. 2010;39: 230-235.

41. Arzate H, Alvarez-Pérez MA, Alvarez-Fregoso O, Reyes-Gasga J, Ximénez-Fyvie LA. Electron microscopy, micro-analysis and X-ray diffraction. Characterization of the mineral-like tissue deposited by human cementum tumor-derived cells. J Dent Res, 2000;79: 28-34.

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

43. Komaki M, Iwasaki Kengo, Arzate H, Narayanan A, Izumi Y, Morita I. Cementum Protein 1 (CEMP1) Induces a cementoblastic phenotype and reduces

osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *J Cell Physiol Res* 2012; 227: 649-657.

44. Gao YH, Yang LJ, Yamaguchi A. Immunohistochemical demonstration of bone morphogenetic protein in odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med* 1997; 26: 273-277.

45. Kumamoto H, Ooya K. Expression of bone morphogenetic proteins and their associated molecules in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. *J Oral Diseases*; 12: 163-170.

46. Xiong J, Mrozik K, Gronthos S, Bartold M. Epithelial cell rest of Malassez contain unique stem cell population capable of undergoing epithelial-mesenchymal transition. *J Stem Cells Dev* 2012; 26: 1-14.

47. Diekwisch T. Developmental Biology of cementum. *Int J Dev Biol.* 2001; 45: 695-706.

48. Sachin CS, Gargi SS, Pushkar W, Anuprita P, Jashika M. Juvenile psammomatoid ossifying fibroma: A review. *Oral Oncol* 2011;06: 1110-1116.

49. Storkel S, Wagner W, Makek MS, Psammous desmo-osteoblastoma: Ultrastructural and immunohistochemical evidence for an osteogenic histogenesis. *Virchows Ar* 1987;411:561-568.

50. Romberg R, Werness PG, Lollar P, Riggs BL, Mann KG. Isolation and characterization of native adult osteonectin. *J Biol Chem* 1985; 260: 2728-2736.

51. Wenig BM, Vinh TN, Smirniotopoulos JG, Fowler CB, Houston GD, Heffner DK. Aggressive psammomatoid ossifying fibroma of the synovial region: a clinicopathologic study of a distinct group of fibro-osseous lesions. *Cancer* 1995; 76: 1155-1165.

52. Yu Y, Li M, Sun J, Yang M, Long J, Tian W, Tang W, Li T, Liu L. Differential expression of signaling pathways in odontogenic differentiation of ectomesenchymal cells isolated from the first branchial arch. *Mol Cell Biochem* 2011; 351: 85-92.

53. 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.

54. Hoz L, Romo E, Zeichner-David M, Nuñez J, Gaytán L, Mercado G, Arzate H. Cementum protein 1 (CEMP1) induces differentiation by human periodontal

ligament cells under three-dimensional culture conditions. *Cell Biol Int* 2012; 36: 129-136.

55. Macedo-Crivelini M, Callestini-Felipini R, Issamu-Miyahara G, Cantanhede-Orsini Machado de Sousa S. Expression of odontogenic ameloblast-associated protein, amelotin, ameloblastin, and amelogenin in odontogenic tumors: Immunohistochemical analysis and pathogenetic considerations. *J Oral pathol med* 2012; 41:272-280.

56. Luvizuto EK, Da Silva JB, Luvizuto GC, Pereira FP, Faco EF, Sedlacek P, Poi WR. Peripheral ossifying fibroma. *J Craniofac Surg* 2012; 23: 7-10