



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y
DE LA SALUD

“EFECTOS DE LA PROTEÍNA DEL CEMENTO 1 RECOMBINANTE
HUMANA (hrCEMP1), SOBRE LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE p38, JNK
y PI3K EN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR EN CEMENTOBLASTOS
HUMANOS”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

SILVIA MALDONADO FRÍAS

TUTOR: DR. HIGINIO ARZATE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

MÉXICO D. F.

FEBRERO 2013



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 DIOS.

GRACIAS sobre todo a **DIOS**, por la vida tan maravillosa que tengo, es perfecta, así como es, con trabajo arduo, pero con muchísimo amor y hermosas bendiciones. Porque el elegir también implica renunciar y yo elijo vivir bajo tus enseñanzas, compañía, protección, y filosofía de vida, la cual nos dejaste ver plasmadas en la vida y muerte de mi gran Maestro, amigo, compañero, guía y fortaleza en todos los momentos de la vida y al que llamo con gran amor y respeto: **JESÚS**.

A la UNAM

En esta institución está implícita la fuerte convicción de que su comunidad elabora una cultura de tendencias nuevas, de esencia espiritual y de libre pensamiento, conteniendo diversidad de ideas que se funden en una unidad: **“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**

GRACIAS por permitirme ser parte de tu alumnado, por formar parte de mi vida, porque te considero mi hogar, porque es un orgullo pertenecer a esta magnífica institución.

Agradezco los momentos inolvidables, el conocimiento que he adquirido, los profesores que han sido parte esencial de mi formación, los tutores de los que he aprendido lecciones de vida, el compromiso y dedicación de los sinodales, el acompañamiento de amigos y compañeros y, los lugares tan magníficos que tiene este campus y los cuales he podido disfrutar a lo largo del tiempo vivido en esta institución. **GRACIAS**.

Al Dr. Higinio Arzate.

Dentro de la Facultad de Odontología he conocido personas que son dignas de admiración, las cuales me han permitido conocer la entrega espiritual del docente, del hombre que sirve a una comunidad universitaria y social con el más profundo amor a su profesión. He tenido la gran fortuna de encontrar personas únicas, que tienen una entrega sin igual a esta institución y que son dignas de ser ejemplo de trabajo, constancia y dedicación, se erigen como grandes desde el lugar más callado y arduo, pero el que brilla intensamente por derecho propio, el trabajo. **GRACIAS Dr. HIGINO ARZATE** por ser una de esas personas que se merecen todo mi respeto y admiración, por ser el gran hombre e investigador que es, por su infinita paciencia, por permitirme entrar en su casa, porque considero que el laboratorio lo es, se dedica a esto con tal pasión que no me queda duda alguna de que es parte importante en su vida. Gracias por compartir su espacio, su tiempo, sus anécdotas y sus conocimientos, ha sido comfortable conocer al tutor que desde la libertad de pensamiento y elección, te enseñan con pasión y hechos lo que es la investigación. Gracias por la libertad, la confianza, las oportunidades y los consejos. **MUCHAS E INFINITAS GRACIAS**. Que la vida le siga dando dones y bendiciones para alcanzar todas sus metas.

Al jurado.

A todos y cada uno de los Doctores que integran el jurado, **MUCHAS GRACIAS** por toda su dedicación, comprensión y valioso tiempo en la revisión de este trabajo, gracias por sus comentarios y sugerencias. He aprendió de ustedes no solo académicamente sino también como personas.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados.

Muchas **GRACIAS** a todos por los momentos que pasamos juntos, gracias por su ayuda, apoyo, por su tiempo y por ser quien son. Muchas gracias Rita por tantos años de compañía, de desaciertos y de atinos, muchas gracias por tu amistad.

A la Dra. Elba Rosa Leyva.

MUCHAS GRACIAS por ser una linda persona y por todo el apoyo a lo largo de mi formación en el posgrado. Gracias por trabajar para y por la UNAM. Ha sido muy grato conocerla y espero y deseo de todo corazón que la vida la llene de luz.

Al Mtro. Javier de la Fuente Hernández.

GRACIAS por su apoyo en mi ingreso al Doctorado. Fue reconfortante escuchar sus comentarios y orientación en una decisión importante en mi formación. Muchas gracias.



Al Mtro. José Arturo Fernández Pedrero.

GRACIAS por permitirme ver que el trabajo constante es la llave que nos permite alcanzar nuestras metas. Gracias por la confianza y oportunidad de servir a la UNAM. Que Dios lo llene de bendiciones y de sabiduría.

"La educación es el arma más poderosa que puedes usar para cambiar el mundo"

ALBERT EINSTEIN



ÍNDICE

1. RESUMEN.....	5
2. ABREVIATURAS.....	8
3. INTRODUCCIÓN.....	9
4. ANTECEDENTES.....	12
4.1 PERIODONTO.....	12
4.1.1 Encía.....	12
4.1.2 Ligamento periodontal.....	13
4.1.3 Hueso Alveolar.....	14
4.1.4 Cemento.....	15
4.1.4.1 Composición.....	17
4.1.4.2 Funciones del cemento.....	18
4.1.4.3 Cementogénesis.....	18
4.1.4.4 Factores moleculares que regulan la cementogénesis.....	19
4.1.4.5 Proteínas asociadas a procesos de biomineralización en el cemento.....	20
Proteína del cemento 1 (CEMP1).....	23
4.2 ENFERMEDAD PERIODONTAL.....	
4.2.1 Regeneración periodontal.....	26
4.3 MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN.....	
4.3.1 MAPK.....	28
4.3.2 PI3K.....	32
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	35
6. JUSTIFICACIÓN.....	35
7. HIPÓTESIS.....	35
8. OBJETIVOS.....	36
9. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
10. RESULTADOS.....	39
11. DISCUSIÓN.....	58
12. CONCLUSIONES.....	61
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62



ÍNDICE FIGURAS

<i>Figura 1. Tejidos que conforman el periodonto.....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 2. Anatomía macroscópica de la encía.....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 3. Ligamento Periodontal.....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 4. Hueso alveolar.....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 5. Cemento.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 6. Secuencia de nucleótidos de longitud completa humano CP-23.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 7. Cascada de MAPK.</i>	<i>27</i>
<i>Figura 8. Cinasas activadas por estrés.</i>	<i>27</i>
<i>Figura 9. Vía de señalización de PI3K.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 10. Blancos de AKT.....</i>	<i>32</i>



1. RESUMEN

El objetivo principal de la terapéutica periodontal es la regeneración de la estructura y función del periodonto destruido o perdido durante la periodontitis. Para que ocurra la regeneración de sus componentes se requiere una secuencia espacial y concertada de los procesos que intervienen.

La neoformación del cemento es un paso crítico en la regeneración del periodonto, pues es el cemento radicular el que provee el sustrato en el cual se reinsertaran las fibras del ligamento periodontal.

En la regeneración del cemento radicular se requiere de cementoblastos, sin embargo el origen de estos y las moléculas que regulan su reclutamiento y diferenciación aún son desconocidas. Investigaciones realizadas en este tejido han demostrado la presencia de dos moléculas cemento específicas, la proteína de adhesión del cemento (CAP) y la proteína del cemento 1 (CEMP1).

Se ha reportado que CEMP1 solo se localiza en cemento y en células del ligamento periodontal de localización paravascular, estimula también la proliferación de células de ligamento periodontal y promueve procesos de mineralización, además de ser un regulador local de la diferenciación de fibroblastos gingivales humanos y de la mineralización de la matriz extracelular del cemento radicular. La regulación del comportamiento del cemento durante la cementogénesis es clave y los datos que se han reportado sobre CEMP1 han ayudado a comprender algunos de los procesos que se suceden durante dicho evento. Sin embargo los mecanismos de señalización que se dan en este tejido no se han esclarecido. En este trabajo investigamos los mecanismos de señalización intracelular involucrados en la respuesta celular inducida por la hrCEMP1 en cementoblastos putativos humanos. Cementoblastos putativos humanos fueron tratados con hrCEMP1 y/o medio mineralizante, el cual contenía β -glicerofosfato y ácido ascórbico. Se analizó la activación de la vía de las MAPK, específicamente de las cinasas p38 y JNK, así como la vía PI3K con la activación río abajo de AKT y GSK3. También se observó la activación de p38 mediada por hrCEMP1 y el efecto de su inhibición en la formación de nódulos mineralizados, utilizando el inhibidor SB203580.

Encontramos que el β -glicerofosfato y el ácido ascórbico promueven la fosforilación de p38, JNK y PI3K. Sin embargo, al adicionar hrCEMP1 al medio mineralizante, se promueve un incremento en la fosforilación de las cinasas p38 y JNK. Del mismo modo, se observa una disminución en la activación de la vía de PI3K bajo las mismas condiciones de tratamiento. En presencia del medio mineralizante y 10 μ g/ml de hrCEMP1 se observa un incremento en la activación de p38 así como la translocación de esta cinasa al núcleo, indicando la posible activación de factores de transcripción. También observamos un incremento en la fosforilación de la cinasa JNK y la fosforilación de C-JUN, molécula



importante para la activación del factor de transcripción AP-1. Por otra parte, demostramos que hrCEMP1 regula la expresión de marcadores osteoblásticos como sialoproteína ósea (BSP) y osteocalcina (OCN) y la actividad enzimática de fosfatasa alcalina (ALP) en etapas tempranas y tardías de tratamiento, así como la expresión de CEMP1 en estadios intermedios de tratamiento.

Existe una relación entre la cinasa p38, hrCEMP1 y el proceso de mineralización, ya que hrCEMP1 logra inducir la formación de nódulos mineralizados en células previamente tratadas con SB203580, e incluso se observa un incremento en la formación de estos nódulos en cultivos de cementoblastos in vitro.

Los resultados indican que hrCEMP1 promueve la activación de las MAPK, en particular de las cinasas p38 y JNK, induciendo la fosforilación de la proteína C-JUN componente del factor de transcripción AP-1 asociado a diferenciación. Del mismo modo, se promueve la activación de procesos de mineralización inducidos en cementoblastos putativos humanos. Se ha demostrado que β -glicerofosfato y el ácido ascórbico activan la vía de PI3K y la cinasa río abajo AKT, pero este evento disminuye cuando se adiciona al medio inductor hrCEMP1, indicando un posible rol de regulación entre la vía de PI3K y MAPK.

Por otra parte, hrCEMP1 es un regulador de la expresión de proteínas asociadas a procesos de mineralización modulando la expresión de marcadores osteoblásticos como BSP, ALP y OCN, indicando que esta proteína desempeña un papel importante en la diferenciación celular.



Abstract

Cementum Protein 1 (CEMP1) is a regulator of cementoblast differentiation, and cementum-matrix mineralization. The signal pathway p38, JNK mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and PI3K are intracellular signaling pathways that regulate cellular processes such as proliferation and differentiation. The signal transduction has been investigated in human osteoblasts and fibroblasts in periodontal tissues. However, signal transduction mechanisms in cementoblasts have been not characterized. The effect of hrCEMP1 and mineralizing media containing β -glycerophosphate and ascorbic acid were analyzed on the activation of p38-MAPK, JNK-MAPK, PI3K, AKT and GSK3 in cementoblastic cells. Also, the effect of the inhibitor SB203580 on mineralization processes was observed. We found that “mineralizing media” induced the phosphorylation of p38-MAPK, JNK-MAPK and PI3K but the treatment with hrCEMP1 only induces the MAPK and not PI3K signal pathway. The “mineralizing media” and 10 μ g/ml of hrCEMP1 increase the activation of p38-MAPK and its translocation to nucleus, probably the activation of transcription factors. hrCEMP1 and mineralizing media promote nodule formation and this event is not p38-MAPK-dependent. Additionally hrCEMP1 also increases the phosphorylation of JNK-MAPK and the expression of the transcription factor C-JUN, that is important for the activation of transcription factor AP-1. We also found that hrCEMP1 regulates the expression of osteoblastic markers, bone sialoprotein (BSP) and osteocalcin (OCN), alkaline phosphatase activity and the expression of CEMP1. Our results indicate that the MAPK pathway participates in the activation of transcription factors associated to cellular differentiation as well as processes of mineralization induced by hrCEMP1 in human putative cementoblasts. Interestingly, phosphorylation of MAPK and the pathway of PI3K were induced in cells treated with a combination of β -glycerophosphate and the ascorbic acid. On the other hand, cementoblastic cells treated with hrCEMP1 showed an enhanced of MAPK activity, whereas phosphorylation of the PI3K signal was decreased. The results of the present study indicate a possible role of hrCEMP1 in the regulation of PI3K and MAPK.



2. ABREVIATURAS

AKT = (PKB) Protein cinasa B.

ALP = Fosfatasa Alcalina.

AP1 = Proteína activadora 1.

BSP = Sialoproteína ósea.

CAP = Proteína de adhesión del cemento.

C-JUN = Proteína constituyente del factor AP1

CEMP1 = Proteína del cemento 1.

DMEM = Medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco.

GADPH = Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa.

HCDC = Cementoblastos derivados de cementoblastos humano.

hrCEMP1 = Proteína del cemento 1 recombinante humana.

JNK = quinasa amino-terminal reguladora del factor de transcripción C-JUN.

MAPK = Proteína quinasa activada por mitógeno.

OCN = Osteocalcina.

OPN = Osteopontina.

PBS = Buffer de fosfatos salino.

PBST = Buffer de fosfatos salino astringente.

PI3K = Fosfatidil inositol 3 cinasa.

PPi = Pirofosfato inorgánico.

p38 = Proteína p38.

pp38 = Fosfoproteína p38.

SB203580= Inhibidor específico de p38

SBF = Suero Bovino Fetal.

SDS = Dodecil sulfato de sodio.

TNPA = Fosfatasa alcalina tejido no específico.



3. INTRODUCCIÓN

El periodonto es la estructura de soporte del diente, está formado por encía, ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar. La función principal del periodonto es unir el diente al tejido óseo de los maxilares y conservar la integridad de la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad bucal ¹⁻³.

Existen hasta 600 especies diferentes de bacterias que colonizan la cavidad bucal y que afectan el equilibrio huésped-patógeno y conducen a la salud o enfermedad. Sin embargo, factores locales y sistémicos modulan de forma importante la susceptibilidad de un individuo a la enfermedad periodontal, y son los mismos factores los que hacen a la terapéutica de estas enfermedades no predecibles⁴.

La enfermedad periodontal es diagnosticada de forma cotidiana por la valoración de tres parámetros entre los que se incluyen la formación de la bolsa periodontal, la inflamación y la acumulación de placa dentobacteriana. En la práctica clínica es evidente que estas variables contribuyen a una disminución en la inserción de las fibras del ligamento periodontal y la destrucción del hueso alveolar, lo que conlleva a la pérdida del órgano dentario^{3,4}.

La regeneración del aparato de sostén es el objetivo principal en la terapia periodontal y consiste en la reconstitución del epitelio de unión y sulcular, cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar. La formación de los tejidos perdidos y la regeneración de la unión dentogingival requieren la acción concertada de distintos tipos celulares en el sitio de la lesión. Estos tipos celulares incluyen cementoblastos, fibroblastos, osteoblastos, células del epitelio sulcular y de unión, células endoteliales, etc ⁵.

A la fecha, el mecanismo molecular de la regeneración periodontal no es claro. Se ha reportado que el ligamento periodontal es esencial en la osteogénesis y cementogénesis y que células proliferativas como las mesenquimales indiferenciadas son inducidas a diferenciarse en osteoblastos o cementoblastos por estimulación, debido al daño periodontal ⁶. Sin embargo el cemento radicular es un tejido clave en la regeneración de los tejidos destruidos y perdidos debido a la periodontitis; este tejido tiene una función fundamental en la inserción de las fibras del ligamento periodontal que permiten su unión a la raíz del diente y ha demostrado tener proteínas que participan en procesos de proliferación celular. De acuerdo a lo anterior, el cemento es determinante para la reinserción de las fibras del ligamento periodontal ya que la unión a un sustrato es un requerimiento esencial para la proliferación, diferenciación y varias otras funciones en el anclaje celular ⁷.



El cemento radicular, es un tejido mineralizado especializado y secretado por cementoblastos en la superficie de la dentina radicular y en las coronas de algunos animales ⁸. Este tejido mineralizado tiene características similares al hueso alveolar en cuanto a su composición orgánica e inorgánica sin embargo, el cemento radicular posee características únicas, ya que no presenta aporte sanguíneo directo, inervación, ni drenaje linfático y a diferencia del hueso, no sufre procesos de remodelación de un modo fisiológico. Asimismo, tanto los cementoblastos como los osteoblastos comparten marcadores biológicos como ALP, OCN y BSP, proteínas de las que se ha observado su función en el proceso de mineralización, pero a la fecha no ha sido posible determinar por completo los eventos que regulan en el proceso de la cementogénesis ⁹⁻¹¹.

Estudios recientes sugieren que el cemento contiene moléculas específicas de este tejido, la proteína de adhesión del cemento (CAP) y la proteína del cemento 1 (CEMP1) ^{12,13}.

CEMP1 se aisló de células derivadas de un cementoblastoma humano, y se observó en cemento radicular y en subpoblaciones y zona paravascular del ligamento periodontal ¹³. La proteína purificada hrCEMP1 tiene una movilidad relativa de 50,000 da, una estructura secundaria compuesta principalmente por β plegadas (55%), asas (35%) y α -hélice (10%). Contiene N-glicosilaciones y fosforilaciones, presenta una alta afinidad por la hidroxiapatita y promueve la nucleación de cristales de fosfato octacálcico ¹⁴. Se ha reportado también que puede desempeñar un papel como regulador local de la diferenciación de los cementoblastos y de la mineralización de la matriz extracelular del cemento radicular. Por otra parte, CEMP1 en los fibroblastos gingivales humanos induce la mineralización y la expresión de las proteínas del hueso y de matriz del cemento, indicando que CEMP1 puede participar en la diferenciación y la mineralización de células no osteogénicas, además de tener una función potencial en la formación del cemento y del hueso ¹⁵. In vitro, CEMP1 estimula la proliferación y migración de células de ligamento periodontal, y promueve el proceso de mineralización ¹⁶. Datos recientes indican que CEMP1 no se detecta en osteoblastos, sugiriendo que CEMP1 podría ser un marcador de cementoblastos y sus progenitores ¹⁷.

Se han reportado avances importantes respecto a la función de CEMP1 en el proceso de mineralización y cementogénesis sin embargo, se requiere conocer a fondo los mecanismos de señalización intracelular activados por esta proteína para determinar claramente el papel que desempeña en la cementogénesis y su posible aplicación en la regeneración periodontal.

Durante décadas un tema de investigación que ha permitido explicar cómo se produce una respuesta celular, es el estudio de las vías de señalización. Una familia ampliamente estudiada es las proteínas



cinastas activadas por mitógeno (MAPK). Las diferentes clases de MAPK y la vía de PI3K juegan un papel importante en varios eventos celulares entre los que se encuentran la proliferación celular, diferenciación y apoptosis ¹⁸⁻²².

Tres estructuras relacionadas a la vía de las MAPK son fosforiladas río abajo por receptores de membrana y regulan la proliferación y diferenciación celular. La vía de c-jun-NH2 terminal cinastas (JNKs) y la proteína p38 (p38) son generalmente activadas por citocinas proinflamatorias o por estrés ambiental conduciéndose a la apoptosis por lo que han sido llamadas proteínas activas por estrés (SAPKs). La vía de la SAPK también contribuyen a múltiples procesos celulares tales como proliferación, diferenciación y sobrevivencia en respuesta a estímulos extracelulares ^{23, 24}. Los mecanismos de activación de las MAPKs se llevan a cabo generalmente por fosforilación en residuos de treonina y tirosina en la secuencia consenso T-X-Y que a su vez son fosforiladas por la MAPK cinastas de especificidad dual (MKK). Las MKK son fosforiladas y activadas por una familia de cinastas MKK con actividad de serina/treonina (MKKK). Las MKKK integran las señales mediadas por moléculas de señalización que se activan al inicio de las vías de comunicación intracelular²⁵.

Por otra parte, la vía de PI3K representa una vía que es activada por receptores con actividad catalítica tirosin cinasa (TK) a insulina, factores de crecimiento y a otras señales que activan receptores acoplados a proteínas G, así como por receptores de citocinas con efectos en la regulación transcripcional implicadas en la proliferación celular. Se ha reportado también que la vía de PI3K está involucrada en la diferenciación y proliferación osteoblástica ^{21, 26}.

Se ha investigado la función de proteínas que se localizan en el cemento en la activación de vías de señalización intracelular, encontrado que la proteína de adhesión del cemento (CAP) promueve la fosforilación de ERK 1/2 (p42 y p44) en fibroblastos gingivales humanos, así como la relación entre el inhibidor de esta cinasa y la diferenciación celular promovida por CAP ⁷. En investigaciones recientes también se demostró el papel de la MAPK ERK, como regulador de CEMP1 y CAP en células mesenquimales del ligamento periodontal¹⁶ sin embargo, la investigación de los mecanismos de transducción de señales intracelulares inducidos en células del cemento radicular carece de datos que permitan comprender completamente como es el comportamiento de este tejido, por lo que es importante determinar el posible rol que desempeña CEMP1 en la actividad de señalización intracelular, en células de tipo cementoblástico con la finalidad de esclarecer si CEMP1 promueve la activación de cinastas involucradas en eventos de proliferación y diferenciación.



4. ANTECEDENTES

4.1 PERIODONTO

El periodonto también llamado “aparato de inserción” o “tejido de sostén del diente, establece una unidad funcional, biológica y evolutiva que adquiere su forma y textura finales con la erupción de los dientes, además de experimentar modificaciones con la edad, y sufrir alteraciones morfológicas y funcionales debido al ambiente bucal^{1-3,27}.

El periodonto (peri = alrededor, odontos = diente) comprende los siguientes tejidos (Fig. 1):

Encía

Ligamento periodontal.

Cemento radicales.

Hueso alveolar.

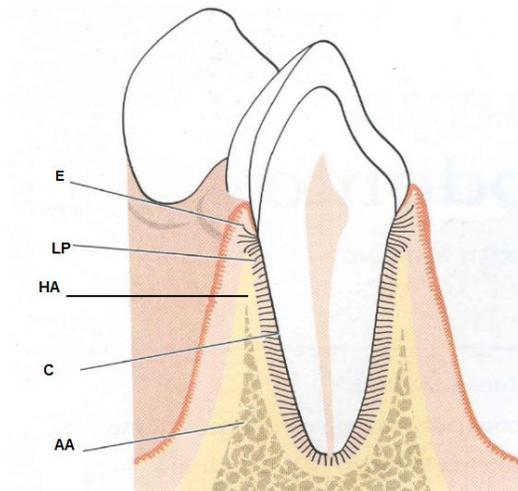


Fig. 1. Tejidos que conforman al periodonto. E: encía, LP: ligamento periodontal, C: cemento radicular y HA: hueso alveolar. El hueso alveolar se divide en HA: Hueso alveolar propiamente dicho y AA: apófisis alveolar. Tomado y modificado de *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica* Jan Lindhe. (2005).

4.1.1 Encía

La encía (*en lat. gingiva*) es una fibromucosa formada por tejido conectivo denso con una cubierta de epitelio escamoso queratinizado y es la parte de la mucosa masticatoria que recubre la apófisis alveolar y rodea la porción cervical de los dientes. Anatómicamente la encía está dividida en encía libre o marginal, encía adherida o insertada y encía interdientaria.

Los componentes principales del tejido conectivo son las fibras colágenas (alrededor del 60% del volumen de tejido conectivo), fibroblastos (alrededor del 5%) vasos, nervios y matriz extracelular

(alrededor del 35%). Los diferentes tipos de células presentes en el tejido conectivo son fibroblastos, mastocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos y plasmocitos²⁷. (Fig 2)

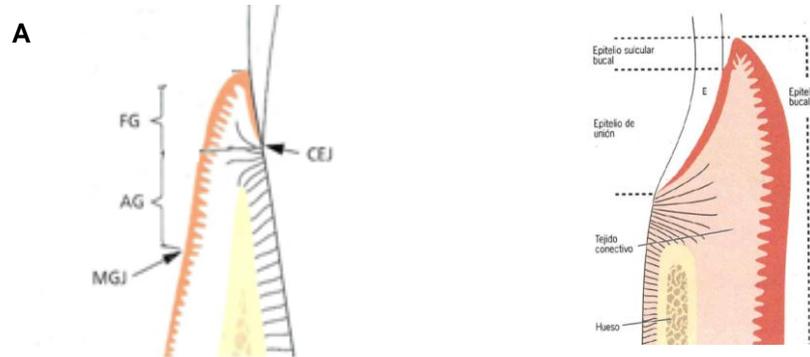


Fig. 2. A. Anatomía macroscópica de la encía: la encía libre (FG), la encía adherida (AG), límite cementoamantino (CEJ), límite mucogingival (MGJ). **B. Encía libre o marginal.** Esquema de un corte histológico que describe la composición de la encía y el área de contacto entre la encía y el esmalte y sus estructuras. Tomado y modificado de *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica* Jan Lindhe. (2005).

4.1.2 Ligamento periodontal

El ligamento periodontal se ubica entre el hueso alveolar propio y el cemento radicular y es el tejido conectivo blando, muy vascularizado y celular que rodea los dientes y une el cemento radicular con la lámina dura del hueso alveolar propio. Los elementos más importantes del ligamento periodontal son las fibras principales, que son colagenosas, están dispuestas en haces y siguen una trayectoria sinuosa en cortes longitudinales. Las porciones terminales que se insertan en el cemento y el hueso son llamadas fibras de Sharpey^{2, 3, 27}. (Fig. 3)

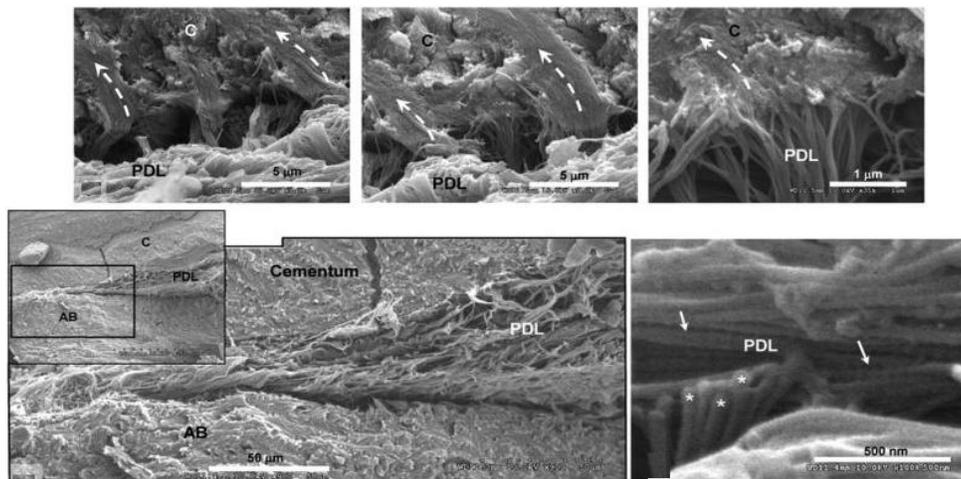


Fig. 3. Ligamento periodontal. La microscopía electrónica de barrido ilustra el ligamento periodontal (PDL) entre el cemento (C) y el hueso alveolar (AB). La fila superior de micrografías, ilustran PDL insertos en el cemento (flechas de trazos curvos). Las fibras de colágena dentro del PDL son paralelas a la superficie del cemento. La periodicidad de las fibras de colágena (flechas) es notoria. Tomado de Hurng JM, Kurylo MP, et al., *Discontinuities in the human bone-PDL-cementum complex*. *Biomaterials*. 2011 Oct; 32(29):7106-17



El ligamento particularmente protege los conductos sanguíneos y nervios de posibles daños por las fuerzas mecánicas de masticación, transmiten las fuerzas oclusales hacia el hueso, adhiere el diente al hueso, mantienen los tejidos gingivales en relación con los dientes, está bajo constante remodelación y las células del ligamento periodontal participan en la formación y resorción del cemento y hueso en situaciones de movimiento fisiológico de los dientes, también los fibroblastos forman fibras de colágeno, y las células mesenquimatosas residuales se convierten en osteoblastos y cementoblastos. El ligamento periodontal le confiere drenaje linfático y riego de nutrientes al cemento, hueso y la encía^{4,27}.

4.1.3 Hueso alveolar.

Es la parte de los maxilares que alberga y protege a los dientes. La capa de hueso en la cual se insertan las fibras de Sharpey se denomina "hueso fasciculado" (hueso alveolar propio) y constituye la superficie interna de la pared ósea del alveolo. (Fig. 4)

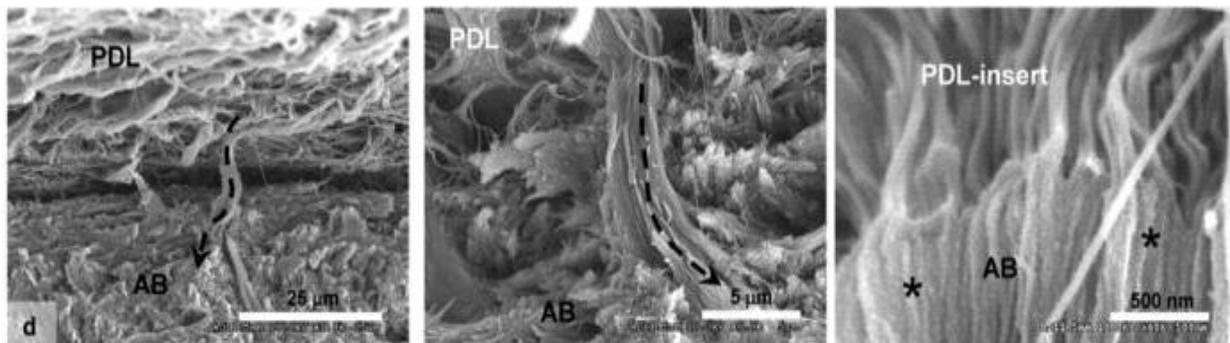


Fig. 4. Hueso alveolar. Microscopía electrónica de barrido que ilustra Ligamento periodontal (PDL) inserto en el hueso alveolar (AB) (flecha de trazo curvo). Se observa carencia de periodicidad en las fibras colágenas. Tomado de Hurng JM, Kurylo MP, et al., Discontinuities in the human bone-PDL-cementum complex. Biomaterials. 2011 Oct; 32(29):7106-17

La matriz orgánica está formada principalmente por colágena tipo I (90%), con pequeñas cantidades de proteínas no colágenas como osteocalcina, osteonectina, proteínas morfogénicas (BMP), fosfoproteínas y proteoglicanos. La osteopontina y sialoproteína ósea son proteínas de adherencia celular importantes para los osteoclastos y osteoblastos. Además contiene factores parácrinos como las citocinas, quimocinas y factores de crecimiento^{2,9}. La porción inorgánica está compuesta principalmente de calcio, fosfato, hidroxilo, carbonatos, citrato y vestigios de otros iones como sodio, magnesio y flúor. Las sales minerales se encuentran en forma de cristales de hidroxipatita².

La remodelación es la principal vía para los cambios óseos en la forma, resistencia a la fuerza, reparación de heridas y homeostasis del calcio y fósforo en el cuerpo. La mezcla de resorción y



formación ósea constituye uno de los principios fundamentales para la remodelación del hueso durante su vida. El hueso alveolar depende, para su existencia y desarrollo, de la presencia de los dientes. Cuando existe una ausencia congénita de éstos el desarrollo del hueso alveolar es escaso²⁸.

4.1.4 Cemento

El cemento radicular es un tejido conectivo calcificado especializado no vascularizado, que cubre las superficies radiculares de los órganos dentarios. Es un tejido estructuralmente importante semejante al hueso en sus características fisicoquímicas y estructurales pero con diferencias funcionales importantes; cubre la totalidad de la superficie de la raíz del diente y provee la superficie en la cual las fibras del ligamento periodontal (Sharpey) se insertan, por lo que forma la interfase entre la dentina y el ligamento periodontal y juega un papel primordial en la reparación de la superficie radicular. Estas funciones son perdidas cuando el cemento es afectado por enfermedades inflamatorias tales como gingivitis y periodontitis o hipofosfatasa. El cemento carece de inervación, aporte sanguíneo directo y drenaje linfático^{2,28}.

Se reconocen dos tipos distintos de cemento:

Cemento primario o acelular, que se forma conjuntamente con la raíz y la erupción dentaria. Este cemento no contiene células y se forma simultáneamente a la dentina radicular y en presencia de la vaina epitelial de Hertwig.^{1,2,27-30}

Una parte importante del cemento acelular está constituida por haces de fibras de Sharpey que se mineralizan y que suelen partir de cerca del límite cemento adamantino. En el cemento acelular, tienen un diámetro menor y están apretadas más densamente que las del hueso alveolar. Durante la formación continua de cemento acelular, en porciones de las fibras del ligamento periodontal (fibras principales) adyacentes a la raíz van quedando incluidos cristales minerales, es decir, se mineralizan. De tal modo, las fibras de Sharpey en el cemento deben ser consideradas como una continuación directa de las fibras colágenas (fibras principales) del ligamento periodontal y del tejido conectivo supraalveolar. Las fibras de Sharpey forman el llamado sistema fibroso extrínseco del cemento y son producidas por los fibroblastos del ligamento periodontal. El sistema fibroso intrínseco es producido por los cementoblastos y está integrado por fibras orientadas más o menos paralelamente al eje longitudinal de la raíz. Generalmente, el cemento acelular está más mineralizado que el cemento celular. El cemento acelular a menudo contiene líneas de alimento que reflejan los períodos alternantes de formación de cemento y de inactividad^{1,2}.



Cemento secundario o celular, que se forma después de la erupción dentaria y en respuesta a las exigencias funcionales. Sin embargo, sobre la superficie radicular se pueden alternar áreas de cemento acelular y celular. Este cemento a diferencia del cemento primario, contiene células, se deposita sobre el primario a lo largo del período funcional del diente. Ambos cementos son producidos por cementoblastos que cubren la superficie radicular. Algunas de estas células se incorporan al cementoide, que posteriormente se mineraliza para formar el cemento. Estas células que quedan incorporadas al cemento son denominadas cementocitos. El cemento celular se presenta sólo en la parte intralveolar de la raíz. Algunas veces, solamente se mineraliza la periferia de las fibras de Sharpey del cemento celular y queda sin mineralizar el corazón de la fibra por lo que en el cemento celular, las fibras de Sharpey muestran un núcleo central no mineralizado^{8,27}.

En contraste con el hueso, el cemento no tiene períodos alternantes de reabsorción y formación, pero aumenta su espesor durante toda la vida mediante el depósito de sucesivas capas nuevas. Durante este proceso de aposición gradual, la porción precisa de las fibras principales, que se ubica adyacente a la superficie radicular, se va mineralizando. La mineralización se produce por el depósito de cristales de hidroxiapatita, primero dentro de las fibras colágenas, después sobre la superficie fibrosa y, finalmente, en la matriz interfibrilar^{1,2,8,28}.

Existe una clasificación del cemento basada en su composición y su disposición².

Clasificación de Schoroede:

Cemento afibrilar acelular (AAC): no contiene células extrínsecas ni intrínsecas de colágeno. Es producto de los cementoblastos y se encuentra en la parte más coronal con un espesor de 1 a 15 μm .

Cemento acelular de fibras extrínsecas (AEFC): se compone casi por completo de paquetes que se componen de fibras de Sharpey y carece de células. Es producto de los fibroblastos y cementoblastos y se encuentra en el tercio cervical de las raíces extendiéndose hasta el tercio apical. Su grosor es de 30 a 230 μm .

Cemento estratificado celular mezclado (CMSC): está compuesto por fibras extrínsecas (Sharpey) y fibras intrínsecas, puede contener células. Es un producto de fibroblastos y cementoblastos y aparece principalmente en el tercio apical de las raíces, ápices y furca. Su espesor es de 100 a 1000 μm .

Cemento celular de fibras intrínsecas (CIFC): contiene células pero no fibras extrínsecas de colágena. Está formado por los cementoblastos y rellenan las lagunas producidas por la resorción^{2, 8,}

^{29,30}. (Fig. 5)

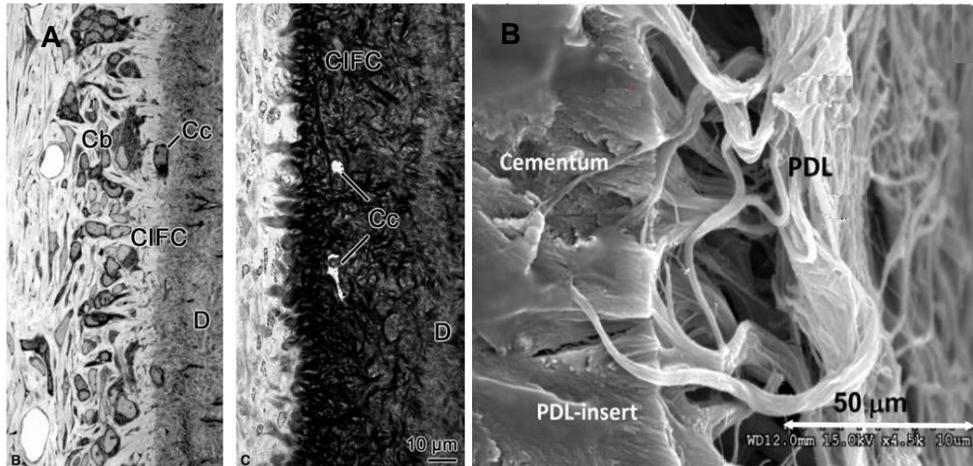


Fig. 5. Cemento. A. Microscopía electrónica de barrido. B y C. Se observan cementocitos (Cc) cementoblastos (Cb) y cemento celular de fibras intrínsecas en un premolar humano. Tomado de Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol* 2000. 2006;40:11-28
B. Microscopía electrónica de barrido. Se observa la integración de las fibras del ligamento periodontal al cemento. Tomado de Ho SP, Kurylo MP, et al. The biomechanical characteristics of the bone-periodontal ligament-cementum complex. *Biomaterials*. 2010 Sep;31(25):6635-46.

4.1.4.1 Composición

El cemento tiene muchos rasgos en común con el tejido óseo. Como otros tejidos mineralizados, consta de fibras colágenas incluidas en una matriz orgánica. El cemento está formado por células y por una matriz extracelular calcificada.

Las células principales del cemento son los cementocitos y los cementoblastos. Los cementoblastos se encargan de sintetizar tropocolágena que formara las fibras colágenas extrínsecas y los proteoglicanos o glucosaminoglucanos que formaran la matriz extracelular ²⁷.

Los cementocitos (células negras) residen en lagunas del cemento celular. Se comunican entre sí por una red de prolongaciones citoplasmáticas que corren por los canalículos del cemento. Asimismo, mediante prolongaciones citoplasmáticas, se comunican con los cementoblastos de la superficie. La presencia de los cementocitos permite el transporte de nutrientes a través del cemento y contribuye al mantenimiento de la vitalidad de este tejido mineralizado.

La matriz de cemento es un compuesto biológico constituido por agua (32%), minerales (46-50%), y material orgánico (22%) como proteínas colágenas y no colágenas, factores de crecimiento y citocinas. Los componentes minerales consisten principalmente en cristales de hidroxiapatita, carbonato de calcio, sodio, potasio hierro, fluoruro, etc ^{29,30}.



La matriz orgánica de cemento se compone principalmente de colágena. La colágena tipo I, desempeña una función estructural, así como un papel morfogénico además de proporcionar andamiaje para los cristales minerales. Es la principal especie, y representa el 90% de toda la colágena. La colágena de tipo III constituye el ~ 5%².

El cemento contiene además importantes proteínas no colágenas, sialoproteína ósea (BSP) y la osteopontina (OPN). Estas proteínas, que son expresadas en forma prominente en el cemento extrínseco acelular y cemento acelular afibrillar, permanecen unidas a la matriz de colágena, y poseen propiedades de unión celular a través de la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD). Ambas proteínas son expresadas durante el desarrollo temprano de la formación e la raíz dental. Estas dos proteínas se cree que juegan un papel importante en la diferenciación de las células progenitoras cementoblásticas a cementoblastos. Se piensa que BSP tiene una función de adhesión de las células a la superficie de la raíz y participa en la iniciación de la mineralización. La fibronectina y la tenasina también son componentes de la matriz extracelular. Otros componentes incluyen proteoglicanos decorina y biglicano, osteonectina, osteocalcina, osteopontina y laminina, así como factores de crecimiento que incluyen a BMP-2,-3, y-4 , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento tumoral beta (TGF-b) y el factor de crecimiento de insulina (IGF-I)².

Muchos de estos componentes están presentes en el hueso también sin embargo, en fechas recientes se han escrito dos proteínas cemento específicas, la proteína de adhesión del cemento (CAP) y la proteína del cemento 1 (CEMP1)^{31,32}.

4.1.4.2 Funciones del cemento

Una de las funciones más importantes del cemento es invertir y anclar fibras periodontales principales del ligamento, que atraviesan como a red entre la raíz y el hueso alveolar. Otras funciones del cemento incluyen la participación en mantenimiento de la relación oclusal (adaptación), reparación de los defectos de raíz después de la resorción o de la fractura, y protección de la pulpa. También controla el ancho del espacio periodontal, permitiendo la orientación de las fibras periodontales y conserva la inserción de dichas fibras durante el movimiento dentario y compensa el desgaste del diente por atrición²⁷.

4.1.4.3 Cementogénesis

En la formación de la raíz dental, las células de los epitelios externo e interno (del órgano dental) proliferan apicalmente, formando una doble capa de células denominada Vaina radicular epitelial de



Hertwig. Los odontoblastos que forman la dentina de la raíz se diferencian de las células ectomesenquimáticas de la papila dental por el influjo inductor de las células del epitelio interno. La dentina continúa formándose en sentido apical, produciendo el armazón de la raíz. Al iniciarse la formación de la dentina, las células interiores de la Vaina radicular epitelial de Hertwig sintetizan y segregan proteínas asociadas al esmalte. Al finalizar dicho evento, la formación del cemento comienza cuando la vaina epitelial de Hertwig se fenestra y a través de estas fenestraciones ingresan células ectomesenquimáticas del folículo dental, que contactan con la superficie radicular. Las células ectomesenquimáticas en contacto con las proteínas se diferencian en cementoblastos y empiezan a formar cementoide. Este cementoide representa la matriz orgánica del cemento y se compone de una sustancia fundamental y fibras colágenas, las que se entremezclan con fibras colágenas de la capa externa de la dentina. La formación del cemento celular que recubre el tercio apical de las raíces dentales, difiere de las del cemento acelular en que algunos de los cementoblastos quedan incluidos en el cemento y posiblemente secretado por cementoblastos de la cresta neural.^{2,27-29}.

La discusión acerca de la presencia o ausencia de las proteínas del esmalte sobre la superficie de la raíz también plantea la cuestión general sobre la importancia funcional de las proteínas como factores constitutivos durante cementogénesis. Se ha demostrado que amelogenina no parece ser el principal agente inductivo para estimular las células del folículo dental a convertirse en cementoblastos y segregar cemento. En la actualidad, los mecanismos de cementogénesis no son del todo claros, pero los últimos avances en nuestra comprensión de la biología del desarrollo dental han presentado una serie de posibilidades, incluyendo la inducción de cementoblastos por la matriz de dentina subyacente y la inducción de cementoblastos por moléculas de la matriz extracelular. Componentes de la matriz de dentina subyacente podrían ser una posible fuente de estímulos que contribuyen a la cementogénesis. Existe evidencia del papel inductivo de la hidroxiapatita en el cultivo celular así como de numerosos componentes de la matriz extracelular que podrían desempeñar un papel similar durante la diferenciación cementoblastos²⁸.

4.1.4.4 Factores moleculares que regulan la cementogénesis

En la actualidad, el mecanismo de formación de cemento sigue siendo poco claro, pero recientes avances en la comprensión de la biología del desarrollo del diente, han presentado una serie de posibilidades, incluyendo la inducción de cementoblastos por la matriz de dentina subyacente y la inducción de cementoblastos por moléculas de la matriz extracelular^{2,8}.

Las proteínas morfogénicas óseas, son moléculas de señalización que tienen una variedad de funciones durante la morfogénesis y la diferenciación celular y, en los dientes, se considera que son



parte de las moléculas de señalización epitelio-mesenquimales que regulan el desarrollo de la corona del diente. Estas proteínas se han utilizado en modelos experimentales para inducir la regeneración, sin embargo, carecen de evidencias clínicas².

Otras proteínas citadas como moléculas que regulan la cementogénesis son las proteínas de la matriz del esmalte, la proteína relacionada con la hormona paratiroidea y componentes de la membrana basal. En el caso de proteínas de la matriz del esmalte, la discusión se centra en el hecho de que no se han detectado consistentemente a lo largo de la raíz, en todas las especies y en todos los dientes. Sin embargo, esta contradicción no descarta su participación en la formación de raíces. Algunas proteínas pueden todavía ser transitoriamente secretadas en cantidades limitadas en las primeras etapas de formación de la raíz por células HERS para influir en la diferenciación de odontoblastos o cementoblastos; una expresión tan limitada puede ser difícil de detectar²

Runx-2 se han identificado como reguladores maestros para la diferenciación de los osteoblastos. Runx-2 se ha encontrado en las células del folículo dental, células del ligamento periodontal, cementoblastos, cementocitos, los odontoblastos y ameloblastos. Basándose en las similitudes propuestas con osteoblastos, se reporta que también pueden estar involucrados en la diferenciación de cementoblastos.

Otras moléculas que pueden tener una función reguladora en la diferenciación y actividad de los cementoblastos y que se encuentran dentro de los tejidos periodontales en desarrollo y maduro incluyen fosfatasa alcalina, varios factores de crecimiento (por ejemplo factor de crecimiento IGF y TGF- β), metaloproteinasas, y proteoglicanos. Estas últimas son importantes en la formación de tejidos mineralizados, aunque una función específica relacionada con la diferenciación / inhibición de los cementoblastos no se ha establecido.

En fechas recientes se han descrito actividades biológicas importantes de dos proteínas de cemento específicas CEMP1 y CAP. Las evidencias indican que estas proteínas juegan un papel importante en el proceso de mineralización del cemento, y aunque se siguen obteniendo datos respecto a su función aún falta establecer claramente los mecanismos en los que están involucradas.

Una mayor comprensión de las cascadas de señalización implicadas en la cementogénesis, activadas por estas proteínas, elucidará los mecanismos que contribuyen a la formación de este intrigante tejido.

4.1.4.5 Proteínas asociadas a procesos de biomineralización en el cemento

La biomineralización en humanos es un proceso fisiológico regulado por la interacción de minerales y moléculas orgánicas extracelulares.



El inicio de la mineralización de cartílago, hueso, dentina y cemento tiene lugar dentro de las vesículas de matriz distribuidas en la superficie de los condrocitos, osteocitos, odontoblastos y cementoblastos. Los iones de fosfato de calcio son activamente acumulados dentro de las vesículas. La concentración de fosfatos de calcio eventualmente precipita y forma cristales de hidroxiapatita. Estos cristales penetran la membrana de las vesículas y dan lugar a la calcificación de nódulos en líquido extracelular. Los cristales mineralizados subsecuentemente proliferan en y entre las fibras de colágena. La tasa de proliferación de los cristales depende de las condiciones extracelulares, incluyendo las concentraciones de fosfato de calcio y la concentración de pH, así como la presencia de proteoglicanos y proteínas no colágenas de la matriz extracelular. Los tejidos mineralizados son altamente representados en el diente y en sus estructuras de soporte. La dentina, el cemento y el hueso alveolar del periodonto son tejidos conectivos en los cuales la formación de minerales ocurre dentro y entre las fibras colágenas sintetizadas. Las proteínas no colágenas de la matriz se cree juegan un papel fundamental en la organización de la matriz colágena, y en la regulación, formación y crecimiento de los cristales de hidroxiapatita².

Sialoproteína Ósea (BSP).

Es una de las primeras proteínas óseas caracterizada como glucoproteína, rica en ácido siálico inicialmente descrita por Geoffrey Herring en 1960. Constituye del 8 a 12% del total de las proteínas no colágenas en hueso y cemento. Fue aislada por primera vez de hueso cortical de bovino como una glicoproteína de 23 kDa³³.

BSP de mamíferos está compuesta por ~327 aminoácidos y el peso basado en esta secuencia es de 33-34 kDa. BSP tiene un peso molecular de 65 a 70 kDa, del cual aproximadamente el 50% es proteína (12-15% ácido siálico) y el 50% carbohidrato. BSP contiene predominantemente residuos de glutamato y glicina; el alto contenido de glutamato se refleja en la presencia núcleos de ácido poliglutámico localizados en el extremo amino terminal el cual se cree está involucrado en la unión a hidroxiapatita. BSP también contiene una secuencia RGD (Arg-Gly-Asp) secuencia cercana al extremo carboxilo terminal, la cual induce la concentración libre de Ca^{++} en osteoclastos. Esta proteína es altamente fosforilada en su mayoría en residuos de serina y contiene 5 sitios de fosforilación sin embargo algunos estudios han indicado la posibilidad de incorporar hasta un máximo de 9 fosfatos. La secuencia de BSP contiene también tres sitios para N-glicosilaciones³⁴.

Es una proteína altamente expresada en la formación de hueso nuevo y se considera como un nucleador potencial de cristales de hidroxiapatita y un marcador específico de osteoblastos^{33,34}.



Osteocalcina

Es la mayor proteína asociada a Ca^{++} no colágena de la matriz orgánica de hueso, dentina y cemento. Su concentración en suero refleja la actividad osteoblástica. Esta proteína contiene entre 46 y 50 aminoácidos (Masa molecular = 5210 Da-5889 Da) dependiendo de las especies. La procedente de hueso humano tiene 49 aminoácidos en una única cadena polipeptídica y una masa molecular de 5800 Da. Contiene tres residuos gama-carboxiglutámicos (Gla). Las dos principales características estructurales de osteocalcina que parecen controlar su función incluyen: la 'hélice Gla', una compacta conformación de estructura alfa hélice dependiente de Ca^{++} , en la cual los tres residuos de Gla se alinean para facilitar la adsorción de hidroxiapatita, y la estructura ' β plegada' carboxilo terminal, que exhibe actividad quimiotáctica hacia leucocitos mononucleares, monocitos y precursores putativos de osteoclastos. Aunque la función biológica de la osteocalcina es desconocida, parece ser un marcador osteoblástico tardío altamente específico producido durante la formación de hueso, y se está convirtiendo rápidamente en un parámetro de diagnóstico clínicamente importante de la patología ósea³⁵.

Se observan incrementos de osteocalcina en aquellas patologías donde hay un incremento de la formación del hueso o, lo que es lo mismo, un aumento en la actividad osteoblástica. En estos casos, las concentraciones de osteocalcina correlacionan bien con otros marcadores como la fosfatasa alcalina. Alrededor del 20% de la osteocalcina sintetizada no se incorpora al hueso, pasando a la circulación sanguínea y pudiendo ser medida en suero^{36.37}.

Fosfatasa Alcalina.

La fosfatasa alcalina [ALP] (Fosfohidrolasa de ésteres monofosfóricos: EC 3.1.3.1 es una fosfomonoesterasa que hidroliza inespecíficamente enlaces éster fosfórico a pH alcalino (8-10). Es clasificada en cuatro tipos – tejido no específica (TNAP), intestinal, placenta y célula germinal- de las cuales, la no específica es ubicuamente expresada en varios tejidos incluyendo hígado, hueso y riñón. La fosfatasa alcalina tejido no específica (TNAP) es expresada en membranas celulares de condrocitos hipertróficos, condrocitos, osteoblastos, odontoblastos y cementoblastos³⁸.

El gen de esta proteína se localiza en el cromosoma 1p36.1-34 y está constituido por 12 exones y motivos reguladores. La fosfatasa alcalina tejido no específico presenta una homología del 57 % a la presente en placenta, esta última es un homodímero con dos puentes disulfuro y 2 sitios de anclaje al zinc, un sitio de unión a magnesio y uno a calcio en la interface entre monómeros. El sitio activo consiste en dos sitios de unión al zinc, un sitio de unión a magnesio y una serina en posición 102 que



una fosfatasa. Se cree que los sustratos fisiológicos de las TNAP son PPi (pirofosfato inorgánico), piridoxal 5 fosfato, y posiblemente fosfoetanolamina³⁸.

Se ha reportado que la TNAP también defosforila OPN (osteopontina) y que la mutación en el gen ALPL y la disminución en la función de la TNAP provoca hipofosfatemia, desorden que conduce a la osteomalacia y que está asociado a hipoplasia de cemento radicular acelular lo que provoca una deficiente unión de la raíz dental y el hueso alveolar³⁹.

Se ha reportado también la importancia de la fosfatasa alcalina para formación de cemento, en particular con respecto al potencial celular formativo distintivo entre cemento acelular de fibras extrínsecas y cemento celular de fibras intrínseca. En los ratones knockout para el gen TNAP o ratas tratadas con bisfosfonatos, la formación del cemento acelular está significativamente afectada, mientras que el cemento celular parece desarrollarse normalmente. Esto sugiere diferencias en los tipos celulares y / o factores de control del desarrollo de estas dos variedades de cemento².

Proteína de adhesión del cemento (CAP).

La proteína de adhesión del cemento es una proteína colágena presente en la matriz del cemento, distinta de las colágenas tipo I, XII y XIV. Tiene una masa molecular de 55-56 kDa cuando se aísla del cemento de humano o bovino. Es una proteína específica del cemento que promueve la adhesión celular de fibroblastos⁷ y de otras células periodontales y su actividad está mediada por receptores de superficie celular a integrinas $\alpha 5\beta 1$ e induce la fosforilación para la actividad de proteínas tirosin-fosforiladas, cinasas de adhesión focal (pp125_{fak}) y MAPK. Dos anticuerpos monoclonales fueron elaborados para CAP con los cuales se determinó que la expresión de CAP está restringida al cemento y algunas células derivadas del ligamento periodontal⁴⁰⁻⁴².

Se ha demostrado CAP que promueve el incremento de ERK2, así como de la ciclina D y E, contribuyendo a la progresión del ciclo celular. In vitro es capaz de reclutar hacia la superficie radicular progenitores cementoblásticos y/o llevar a cabo la diferenciación de estos, así como inducir la adhesión de células de músculo liso y células endoteliales⁴³.

Proteína del cemento 1 (CEMP1)

Es una proteína que tiene una secuencia de nucleótidos de 1374 pares de bases localizándose en el cromosoma 16. Se reportó el análisis del producto génico demostrando que es una proteína con 247 aminoácidos y tiene un peso molecular de 26 kDa¹³ (Fig. 6).



CP-23 cDNA

TTACTTTTGT TATGTATTTT ACCACAATTT TTAAAAAGCA AACCAAACC AACCAAGAGT GCTTCCCCCA	70
CACCTCAAAA TCATCCTGCA GCAGCTCCCT GGCCAGCTC TCTCTCACCC TGACCTGGG CCCCTCTCCC	140
ACCACCCAGG GCTAGCCCTG TGGACCAACC ATCTCTGCCA GCCCTCCCC GACCCTCCAG CCAGGGAGGT	210
GGGGCGCTGG CCGGTGAATG GGGCAGGCCA GGCCCAAAGG CTGGCCACAG GCTCACCAG TCTGGACTGG	280
GCGTCCCGTC TGAGGTGGGG ATGACCAACA TGCCAGTCTT GGGTTTTAGC TGAGG	335
ATG GGC ACA TCA AGC ACT GAC AGC CAG CAA GCT GGG CAC AGG CGA	380
Met Gly Thr Ser Ser Thr Asp Ser Gln Gln Ala Gly His Arg Arg	15
TGC TCA ACC TCT AAC ACA TCG GCT GAG AAC CTC ACC TGC CTC TCC	425
Cys Ser Thr Ser Asn Thr Ser Ala Glu Asn Leu Thr Cys Leu Ser	30
CTG CCT GGG AGC CCT GGC AAG ACA GCT CCT CTC CCA GGC CCA GCA	470
Leu Pro Gly Ser Pro Gly Lys Thr Ala Pro Leu Pro Gly Pro Ala	45
CAG GCA GGC GCT GGA CAG CCA CTT CCT AAG GGG TGC GCG GCC GTC	515
Gln Ala Gly Ala Gly Gln Pro Leu Pro Lys Gly Cys Ala Ala Val	60
AAG GCA GAG GTG GGT ATC CCT GCA CCT CAC ACC TCT CAG GAG GTC	560
Lys Ala Glu Val Gly Ile Pro Ala Pro His Thr Ser Gln Glu Val	75
AGG ATC CAC ATC CGT CGC CTG CTT TCC TGG GCT GCC CCT GGG GCT	605
Arg Ile His Ile Arg Arg Leu Leu Ser Trp Ala Ala Pro Gly Ala	90
TGT GGG CTG AGA TCA ACC CCT TGT GCC CTG CCC CAG GCC CTC CCT	650
Cys Gly Leu Arg Ser Thr Pro Cys Ala Leu Pro Gln Ala Leu Pro	105
CAG GCG AGG CCC TGC CCA GGC AGG TGG TTC TTC CCT GGC TGT TCC	695
Gln Ala Arg Pro Cys Pro Gly Arg Trp Phe Phe Pro Gly Cys Ser	120
CTT CCA ACA GGT GGG GCC CAG ACC ATC CTA TCT CTT TGG ACC TGG	740
Leu Pro Thr Gly Gly Ala Gln Thr Ile Leu Ser Leu Trp Thr Trp	135
AGA CAT TTC CTT AAC TGG GCT TTG CAG CAG AGG GAA GAG AAC AGT	785
Arg His Phe Leu Asn Trp Ala Leu Gln Gln Arg Glu Glu Asn Ser	150
GGC AGA GCC AGG CGC GTA CCT CCT GTG CCC AGG ACA GCA CCT GTA	830
Gly Arg Ala Arg Arg Val Pro Pro Val Pro Arg Thr Ala Pro Val	165
AGC AAG GGG GAA GGG AGC CAC CCA CCC CAG AAC TCA AAT GGA GAG	875
Ser Lys Gly Glu Gly Ser His Pro Pro Gln Asn Ser Asn Gly Glu	180
AAA GTC AAG ACA ATC ACC CCT GAC GTG GGG CTG CAC CAA TCC CTG	920
Lys Val Lys Thr Ile Thr Pro Asp Val Gly Leu His Gln Ser Leu	195
ACG TCT GAC CCC ACT GTG GCT GTC CTC AGA GCC AAG AGG GCT CCA	965
Thr Ser Asp Pro Thr Val Ala Val Leu Arg Ala Lys Arg Ala Pro	210
GAA GCC CAC CCG CCT CGA AGC TGT TCA GGG AGC CTC ACG GCC CGT	1010
Glu Ala His Pro Pro Arg Ser Cys Ser Gly Ser Leu Thr Ala Arg	225
GTT TGC CAC ATG GGT GTG TGC CAG GGC CAA GGG GAC ACA GAA GAT	1055
Val Cys His Met Gly Val Cys Gln Gly Gln Gly Asp Thr Glu Asp	240
GGC AGG ATG ACA CTA ATG GGG TGA GCA GGGCACACTG GTGCCTCCCA	1102
Gly Arg Met Thr Leu Met Gly *	247
TACTGCCCTC CAGCACCAGG CAGGGTCACC ACAGCCGGCA AGCACTGGGC CTGGGGATGT GTGAAGAGAT	1172
AGGGTTATTG AGAAGAGAAA ACAGAACGCT GGTATCCGT GGCATCAGG GCTAGGCAGT CCAGGGAGCA	1242
GAAAACAGGG GTCCCGGCC CAGTCTCCCT CCTGGAGGTC AGAGCGGAGC CCCTGGCACT GTGCCCTGCC	1312
CCAGAACCAG GCTGTGGGCT CCACGTGCA CACCCAACT CAGGAGCAGA AAGCAAACCC CT	1374

Fig. 6. Secuencia de nucleótidos de longitud completa de humano CP-23 y de aminoácidos. Tomado de Álvarez-Pérez M.A, et al. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein(CP-23). Bone 2006; 38: 409–419

En el ADNc humano contiene un marco de lectura abierto de 744-pb flanqueado por 335 y 295-pb de las secuencias no traducidas en el extremo 5' y 3', respectivamente. Se ha descrito también que tiene un 100% de homología con un clon de ADN Homo Sapien presente en el cromosoma 16 (gb AC093525.3) y 99% de homología con un clon de ADNc humano, denominado DKFZp313E2215 (gb



AL833099). El producto de la traducción de esta proteína codifica para una proteína teórica de tipo alcalina (pI 9.73) que carece de péptido señal y con un peso teórico calculado de 25.9 kDa. Esta proteína está enriquecida en prolina (11.3%), glicina (10.5%), alanina (10.15), serina (8.9%), leucina (8.1%), treonina y arginina (7.7%), además de contener niveles bajos de triptófano, ácido aspártico, isoleucina (2.0%) y fenilalanina (1.6%). No se encontraron residuos de tirosina. Se ha reportado que el producto del gen de esta proteína contiene sitios para la N-glicosilación NX (S / T) en las posiciones 20 y 25; 9 sitios de fosforilación, los cuales proporcionan la posibilidad de modificaciones postraduccionales para aumentar el carácter ácido de la proteína; 2 sitios de N-glicosidaciones y sitios de miristilaciones, los cuales pudieran ser los responsables de su actividad biológica. La secuencia de aminoácidos de CEMP1 muestra que tiene 40% de homología con la colágena tipo X entre los aminoácidos 30 a 110 sin embargo, el anticuerpo para esta proteína no presenta reacción cruzada con la colágena tipo I; el northern blot para CEMP1 dió positivo en cementoblastoma y células derivadas del ligamento periodontal, no así en hígado, pulmón, páncreas, cerebro, placenta, músculo esquelético corazón, riñón y colon. Se ha indicado también que esta proteína presenta una movilidad relativa de 56,000 Da, esta movilidad está relacionada con el grado de fosforilaciones, glicosidaciones o miristilaciones, pudiendo tener esta relación un impacto con su actividad biológica¹³. Se encontró que hrCEMP1 tiene una movilidad relativa de 50,000 Da, una estructura secundaria compuesta principalmente por β -plegada (55%), asas (35%) y α -hélice (10%). Contiene N-glicosilaciones y fosforilaciones, presenta una alta afinidad por la hidroxiapatita y promueve la nucleación de cristales de fosfato ocatcálcico¹⁴. En los fibroblastos gingivales humanos, CEMP1 induce la mineralización y la expresión de las proteínas del hueso y de matriz del cemento en células de fenotipo no mineralizante, indicando que CEMP1 puede participar en la diferenciación y la mineralización de células no osteogénicas, además de tener una función potencial en la formación del cemento y del hueso¹⁵. In vitro, CEMP1 estimula la proliferación y migración de células de ligamento periodontal, y promueve el proceso de mineralización, así como ha demostrado su relación con la cinasa ERK1 proteína perteneciente a la familia de las MAPK¹⁶. Datos recientes indican que CEMP1 no se detecta en osteoblastos, sugiriendo que CEMP1 podría ser un marcador de cementoblastos y sus progenitores¹⁷. Se ha reportado que CEMP1 también promueve la adhesión y diferenciación celular y la composición y morfología de los cristales de hidroxiapatita en células cementoblásticas⁴⁴,⁴⁵. hrCEMP1 también promueve la proliferación de células del ligamento periodontal e induce la formación de tejido similar a hueso y/o cemento, y cartílago además de incrementar la actividad de la fosfatasa alcalina y de marcadores osteogénicos⁴⁶. Recientemente se indicó que IL-1B disminuye la expresión de CEMP1 utilizando a esta proteína como un marcador de cemento⁴⁷.



Todo lo anterior sugiere que CEMP1 tiene un papel fundamental como regulador local del proceso de mineralización y diferenciación celular en la cementogénesis.

4.2 ENFERMEDAD PERIODONTAL

Las enfermedades periodontales son enfermedades definidas por los signos y síntomas de inflamación gingival y destrucción del tejido periodontal. Se diagnostican mediante la evaluación clínica de los signos de inflamación en las encías sin destrucción del tejido periodontal (gingivitis) o por la presencia de inflamación y destrucción de tejido (periodontitis). La periodontitis se caracteriza por pérdida de inserción del tejido conectivo que empieza en la unión amelo cementaria y que se extiende apicalmente a lo largo de la superficie radicular.

Además de microorganismos específicos, diversos factores son determinantes para la evolución de una periodontitis a partir de una gingivitis previa. Entre estos factores se encuentran las respuestas inmunitarias desencadenadas por patógenos y cuyos rasgos fundamentales son bien conocidos. Estas reacciones defensivas pueden ser desproporcionadas (excesivas o deficientes) y a pesar de que el sistema inmune se activa, no logra eliminar los factores que causan esta enfermedad, ocasionando una respuesta continua y excesiva del huésped llevando a la destrucción tisular debido al reclutamiento de leucocitos y la subsecuente liberación de mediadores y citocinas que juegan un papel crucial en la patogénesis de la enfermedad periodontal^{3, 4, 5}.

Actualmente se mencionan, además de reacción inmunitaria determinada genéticamente, otros factores (de riesgo) individuales responsables de la aparición la intensidad de gravedad, y la velocidad de evolución de una periodontitis, como el tabaquismo^{38,39}.

Una vez que la enfermedad ha progresado más allá del epitelio de unión y se extiende al tejido conectivo del periodonto, la regeneración se complica por el hecho de que tres tejidos están involucrados cemento, el ligamento periodontal y el hueso alveolar.

4.2.1 Regeneración periodontal.

El tratamiento de la enfermedad periodontal se basa en la eliminación de la inflamación gingival y los factores que la provocan. El tratamiento regenerador comprende procedimientos diseñados especialmente para restaurar las estructuras del periodonto perdidas durante la enfermedad.

Se define **regeneración** como la reproducción o reconstrucción de una parte perdida o dañada de manera tal que, la arquitectura y la función de los tejidos perdidos o dañados quedan restituidas por



completo. Esto significa que la inserción del diente ha sido regenerada con la formación de nuevo cemento con inserción de fibras colágenas sobre la superficie radicular denudada, incluyendo el recrecimiento del hueso alveolar. Se ha reportado que se produce regeneración periodontal después de numerosos procedimientos quirúrgicos que incluyen la biomodificación de la superficie radicular, combinada con procedimientos de colgajo desplazado, inserción de injertos óseos, implantes de sustitutos óseos o el empleo de barreras membranosas orgánicas o sintéticas (regeneración tisular guiada). Sin embargo muchos casos considerados clínicamente exitosos, que incluyen casos con neoformación significativa de hueso alveolar, pueden demostrar histológicamente un recubrimiento epitelial a lo largo de la superficie radicular tratada, en lugar del depósito de nuevo cemento lo que implica una reparación y no una regeneración.

Todavía hay varias cuestiones fundamentales que deben resolverse en la terapia periodontal, una de importancia esencial es comprender el proceso de cementogénesis, sobre todo, para elaborar enfoques terapéuticos para la prevención y tratamiento de enfermedades periodontales. Datos importantes que podrían constituir valiosa información incluyen determinar:

- los precursores de cementoblastos;
- si los cementoblastos son una población de células distintas que expresa productos únicos de genes;
- si el cemento acelular y celular son distintos tejidos;
- ¿Qué regula la formación y el mantenimiento de ligamento periodontal vs cemento, evitando así fusión de la raíz en el hueso alveolar (anquilosis)².

La regeneración del cemento requiere de cementoblastos y de factores moleculares que regulen su reclutamiento y diferenciación, sin embargo el cómo se sucede esto aun no es claro. Estudio in vivo en modelos animales han demostrado la expresión de patrones de moléculas específicas de matriz y estudios in vitro han dado evidencia del papel de los componentes del cemento en el ligamento periodontal, dando pistas de cómo estos componentes pueden regular la regeneración del cemento. Estas evidencias indican que los componentes del cemento pueden regular la actividad celular por varios mecanismos, por ejemplo; el cemento contiene moléculas que promueven la migración quimiotáctica, adhesión, proliferación y diferenciación de algunos tipos celulares periodontales, más que otras^{10,12,13,15}.

Los mecanismos por los cuales se logra la selección de progenitores cementoblásticos aun no son claros, y es muy probable que involucre eventos de señalización que aun no se han definido.



4.3 MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN.

El proceso de señalización, promueve una secuencia de reacciones bioquímicas dentro de la célula que se lleva a cabo a través de enzimas que favorecen la formación de segundos mensajeros como el AMPc, el GMPc o el Ca^{2+} . En muchos procesos de transducción de señales existe un número creciente de proteínas y moléculas desde el inicio del estímulo, el cual se inicia con la unión de un ligando a un receptor de membrana, hasta la activación del mismo, el cual convierte el estímulo en respuesta, provocando dentro de la célula una cadena secuencial de eventos (cascada de señalización o ruta del segundo mensajero) amplificación de la señal, y dando como resultado una respuesta celular.

La gran variedad de señales físico-químicas a las que las células pueden responder, haría pensar en una amplia diversidad de mecanismos de transducción de señal. Sin embargo, la evolución ha seleccionado y perfeccionado sólo una serie limitada de cadenas de eventos que son capaces de generar la respuesta apropiada a cada estímulo en diferentes tipos celulares. Esta convergencia en unas pocas cadenas de transducción comunes a plantas y animales ocurre en primer lugar en los receptores celulares.

4.3.1 MAPK

La vía de las MAP quinasas refiere una cascada de proteínas que se han conservado a lo largo de la cadena evolutiva y juegan un papel central en la transducción de señales en todas las células eucarióticas. El elemento central de la ruta es una familia de proteínas treonina-serina quinasas llamada MAP quinasa (mitogen-activated protein kinases) que son activadas en respuesta a varios factores de crecimiento y otras señales moleculares. Basándose en la diferencia de los motivos dentro de sus asas de activación, la familia de la MAPK está dividida en tres grupos: proteínas cinasas reguladas por señales extracelulares (Erk/MAPK), las cuales tienen un motivo Thr-Glu-Tyr; p38, la cual tiene un motivo Thr-Ala-Tyr, y la cinasa Jun N-terminal (JNK), la cual tienen un motivo Thr-Pro-Tyr. Las MAPKs tienen un conocido desempeño en los mamíferos regulando el crecimiento celular y la diferenciación, motivo por el cual se les denominó proteínas quinasas activadas mitogenamente^{20, 23}. (Fig. 7).

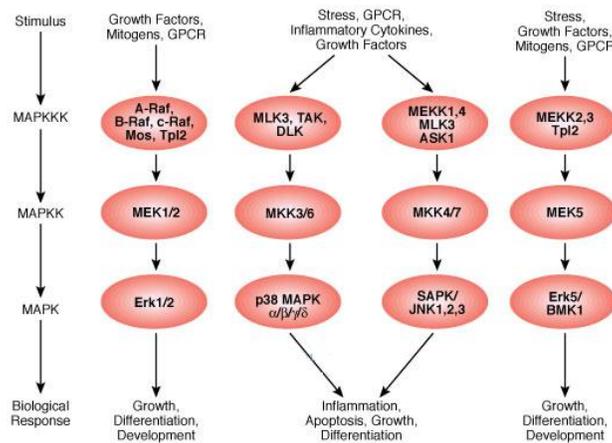


Fig. 7. Cascada de MAPK. Las proteínas cinasas activadas por mitógeno son una familia de serin/treonin proteínas cinasas que son ampliamente conservadas entre eucariontes y están involucradas en muchos procesos celulares. Tomado de [www. Sabioscience.com](http://www.Sabioscience.com)

ERK (Extracellular signal-regulated kinase) (quinasa regulada por señal extracelular) es activada en respuesta a varios factores de crecimiento y otras señales moleculares. En el proceso de mineralización, se ha reportado que ERK participa en la extensión de fibroblastos gingivales humanos inducida por CAP⁶. También, se ha reportado que la inhibición de ERK disminuye el proceso de mineralización inducido por hidróxido de calcio¹⁶.

En las levaduras, ERK controla la reproducción, forma celular y esporulación. JNK y p38, a diferencia de ERK, son activadas en respuesta a citoquinas inflamatorias y estímulos celulares como la radiación ultravioleta²¹ (Fig 8).

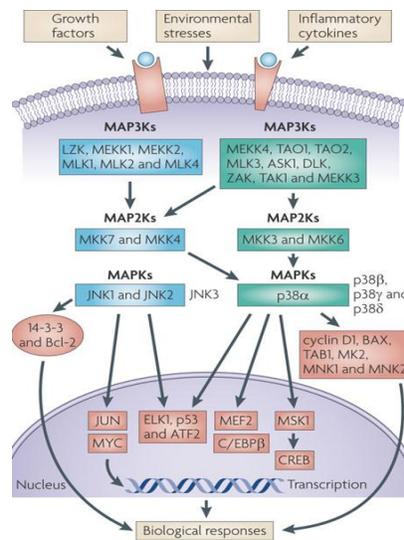


Fig. 8. Cinasas activadas por estrés. El esquema muestra proteínas activadoras de JNKs y p38 MAPKs, como MAP2K y miembros de MAP3K, así como las dianas finales que incluyen factores de transcripción y otros efectores involucrados en



proliferación celular, diferenciación, sobrevivencia, etc. Tomado de Erwin F. Wagner & Ángel R. Nebreda. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. Nature 2009. Reviews Cancer. 9; 537-549

p38

Es el tercer miembro de la familia MAPK, también se le conoce como SAPK2/RK o quinasa reactiva o quinasa activada por estrés. Fue originalmente identificada por la estimulación de macrófagos de ratón con LPS¹⁸. Es una proteína de peso molecular de 38 kDa que se encuentra presente en el citoplasma celular de células involucradas en la respuesta inflamatoria como monocitos y macrófagos. También ha sido caracterizada en fibroblastos, en células del sistema nervioso como, en células epiteliales, en plaquetas y en células del músculo vascular²³.

Se han descrito cuatro isoformas de p38: $\alpha, \beta, \gamma, \delta$, sin embargo la forma α es la que más se ha estudiado en diversas líneas celulares y la más caracterizada. Algunos autores mencionan que las cuatro isoformas son idénticas en un 57-73% de sus secuencias de aminoácidos pero difieren en sus factores de expresión, y en su sensibilidad a inhibidores conocidos contra estas enzimas, así SB203580 es específico para p38 α .

p38 fosforilada activa varios factores de transcripción que incluyen ATF-2, ELK1, CHOP, MEF2C, AP-1, IF4E (Factor de iniciación eucariótica) y Sap1a. Estos factores están involucrados en numerosas funciones celulares como la activación, proliferación y transformación celular. También se ha involucrado la participación de p38 en la inducción del factor de transcripción NF κ B, se cree que p38 no actúa directamente sobre el factor de transcripción o sobre las proteínas quinasas IK β , sino que actúa en un segundo nivel de activación que involucra un complejo basal en el cual participan p65/p50 que interactúa con el coactivador CBP que se encuentra en el complejo basal. Aún no se comprenden bien los mecanismos por los cuales esta quinasa activa estos factores de transcripción, se sabe que tiene un papel importante porque al ser inhibida puede disminuir la inducción de estos genes, algunos estudios refieren que p38 actúa en la fosforilación de otras quinasas que se encuentran debajo de ella y que a su vez activan estos factores de transcripción, por otro lado también se ha referido que las MAPK son capaces de translocarse al núcleo. Entre las quinasas que se han caracterizado y que son inducidas por p38 por estar debajo de esta vía se mencionan MNK1/2, MAPKAPK2 (MK2), MSK1 y PRAK, las cuales regulan la expresión de genes por la fosforilación de otros factores de transcripción como CREB y ATF-1^{21-25,49,50}.



JNK

JNK/SAPK fue identificada como una ciclohexamida activada por MAP-2 cinasa. Tres diferentes genes codifican a JNK/SAPKs: JNK1/SAPK β , JNK2/SAPK α y JNK3/SAPK γ . Las proteínas tiene una homología del 85% y existen más de 10 formas con pesos moleculares de 46 a 55 kDa. JNK1 y JNK2 son ubíquos, mientras que JNK3 es relativamente restringido al cerebro. Estudios in vitro y la falta del gen demuestran las diferencias funcionales entre las isoformas de JNK. JNK1 es la principal quinasa C-JUN después de la estimulación, y JNK2 se une de forma preferente a C-JUN en células no estimuladas y contribuye a la degradación de C-JUN por un mecanismo ubiquitina-dependiente. JNK2 también regula la estabilidad de JunB, c-Myc y ATF2^{18,20,23}.

JNK/SAPK es activada en respuesta a citocinas inflamatorias, estrés ambiental como la radiación ionizante, el estrés oxidativo, daños en el DNA, factores de crecimiento, etc. JNK fosforila factores de transcripción como C-JUN, ATF-2, p53, Elk-1, y el factor nuclear de células T activadas, que regulan la expresión de un conjunto de genes involucrados en la proliferación celular, diferenciación o apoptosis. JNK está involucrada en la producción de citocinas, respuesta inflamatoria, estrés inducido, y el desarrollo programado de la apoptosis así como la reorganización de actina y la transformación celular y metabolismo. En respuesta a la estimulación por insulina, JNK asociado con el sustrato 1 del receptor a insulina (IRS-1) y fosforilado en la serina 307, desacopla a IRS-1 de la señalización promovida por la insulina. Esto parece tener una función dual como un inhibidor heterólogo de la insulina durante la inflamación aguda y crónica y como un regulador de retroalimentación de inhibición durante la estimulación de insulina¹⁸. Se ha reportado que JNK está implicado en la migración celular²⁰.

AP1

AP1 es una proteína dimérica, formada por homodímeros entre miembros de la familia Jun, o heterodímeros entre miembros de las familias Jun y Fos; la interacción entre ambas proteínas está dada a través de un "zipper" de leucinas. AP1 es un importante factor de transcripción, identificado por primera vez en la regulación del gen de la metalotioneína humana IIA, y posteriormente en genes inducidos por ésteres de forbol. Más tarde se observó que la actividad de AP1 era inducida por una amplia gama de estímulos, entre los que se encuentran radiaciones con luz UV, factores de crecimiento, activadores de células T, etc. Hasta hace poco tiempo AP1, se había considerado como un factor de transcripción ubicuo que se activa en respuesta a ciertos factores extracelulares como los que inducen proliferación, diferenciación y apoptosis, lo que da lugar a la activación transcripcional de ciertos genes, llamados genes de expresión temprana. Ahora se sabe que es un factor involucrado



en la regulación fina de la expresión tejido-específica de sus genes blanco, mediante la combinación específica y exacta de los miembros proteicos que conforman este factor de transcripción⁵⁰.

PI3K

Las fosfoinositol 3-quinasas o fosfoinositida-3-quinasas (PI 3-quinasas o PI3K o P110 δ), son una familia de enzimas capaces de fosforilar el grupo hidroxilo de la posición 3' del anillo inositol de las moléculas llamadas en conjunto fosfatidilinositol -enzima que en humanos está codificada por el gen PIK3CD²¹.

Las PI3-quinasas producen varios fosfoinositidos: PtdIns3P, PtdIns(3,4)P2, PtdIns(3,5)P2 y PtdIns(3,4,5)P3, todos fosforilados en la posición 3'. Estas moléculas son parte de un mecanismo por el cual un grupo selecto de proteínas de señalización celular que contienen los dominios PX, de pleckstrina (dominio PH) y FYVE³⁵.

Se han asociado las PI 3-quinasas una diversidad extraordinaria de funciones celulares, incluyendo el crecimiento celular, proliferación, movilidad, supervivencia celular y tráfico intracelular. Muchas de estas funciones se relacionan a la habilidad de las PI 3-quinasa Clase I de activar a la PKB (PKB, también llamada AKT)^{22,36}.

Las PI3K son también un componente importante en la cascada de señalización de la insulina, interactuando como sustrato del receptor de insulina con el fin de regular la entrada de glucosa a la célula por medio de una serie de eventos de fosforilación, por lo que ha surgido interés en el papel que la enzima pueda tener en la diabetes²².

Se ha reportado el IGF-I promueve la proliferación e inhibe la diferenciación osteoblástica y la mineralización de las células vasculares tanto a través de vías ERK y PI3K²⁶.

La ruta PI3K/Akt activada se inicia a través del reclutamiento de PI3K a la membrana plasmática a través de la unión de su dominio SH2 a proteínas tirosina fosforiladas. En concreto, los residuos de tirosina fosforilados de los receptores tirosina quinasa interactúan con la subunidad reguladora de PI3K, p85^{21, 26, 35}.

PI3K es un heterodímero que consiste en una subunidad reguladora, p85, y una subunidad catalítica, p110, encargada de transferir el grupo fosfato y del ATP al fosfatidil inositol, 4,5-bifosfato (PIP2), generando el fosfatidil inositol, 3,4,5-trifosfato. Las actividades quinasa son reguladas por las fosfatasas que actúan eliminando los fosfatos de las proteínas diana. Existen evidencias de que PTEN defosforila PIP3, actuando como regulador de la ruta de señalización de PI3K. PTEN tiene un

dominio proteína-tirosina fosfatasa y un dominio de homología a la tensina, lo que sugiere que PTEN suprime el crecimiento celular tumoral ejerciendo un efecto antagonista al de las proteínas tirosina quinasa, regulando la invasión de las células tumorales y la metástasis a través de las interacciones con las adhesiones focales³⁵ (Fig. 9).

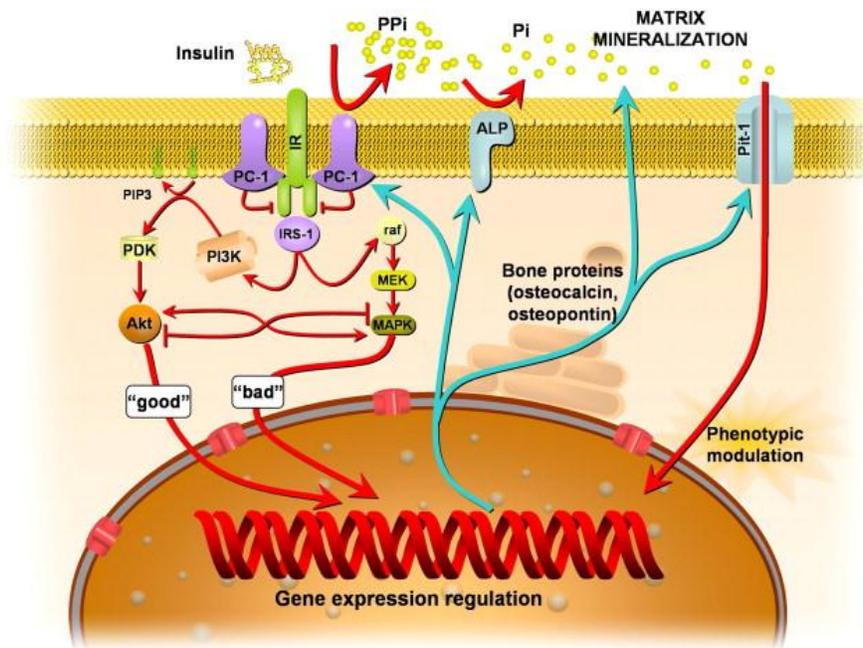


Fig. 9. Vía de señalización de PI3K. Vías que pueden converger en la regulación de eventos relacionados a la calcificación. Tomado de Fadini GP, Pauletto P, et al. The good and the bad in the link between insulin resistance and vascular calcification. *Atherosclerosis*. 2007 Aug;193(2):241-4.

PIP3 sirve como ligando para reclutar la serina/treonina kinasa Akt (c-Akt, también llamada proteína-quinasa B, PKB) a la membrana plasmática a través de la interacción directa con el dominio con homología plecstrina (PH) de Akt. Una vez en la cara interna de la membrana, Akt es fosforilado por una serina/treonina quinasa, la quinasa 1, dependiente de fosfatidil inositol-3 (PKD1), resultando en la activación de Akt^{22, 36}.

La activación de Akt controla la supervivencia celular a través de la fosforilación de las dianas que dependen de ella, con el resultado neto del incremento en la supervivencia celular, proliferación, crecimiento y metabolismo. Las dianas para la activación de Akt pueden ser clasificadas en tres grupos distintos: proteínas apoptóticas, factores de transcripción y proteína-quinasa. Akt fosforila



directamente dos proteínas apoptóticas, BAD y caspasa 9, inhibiendo su actividad apoptótica y promoviendo por tanto la supervivencia celular^{22,36}.

Además, la activación de HIF-1 inducida por EGF y mediada por Akt conduce a una mayor expresión del factor de crecimiento endotelial (VEGF) que protege a las células de la apoptosis. Akt también fosforila directamente CREB activando su actividad transcripcional y sobreexpresando genes antiapoptóticos como Mcl-1. Por el contrario, Akt inactiva factores de transcripción FOXO (familia Forkhead) y p53, bien directamente fosforilando proteínas FOXO o por fosforilación y activación de MDM2, regulador negativo de p53. En ambos casos, la expresión de genes proapoptóticos disminuyen causando un aumento de la supervivencia celular.

Gsk-3 también es una diana de fosforilación de Akt, lo que determina su inactividad, bloqueando su actividad transcripcional y la regulación de su metabolismo. La inhibición de Gsk-3 protege a las células de la apoptosis pero el mecanismo exacto no se conoce^{22,36}.(Fig. 10)

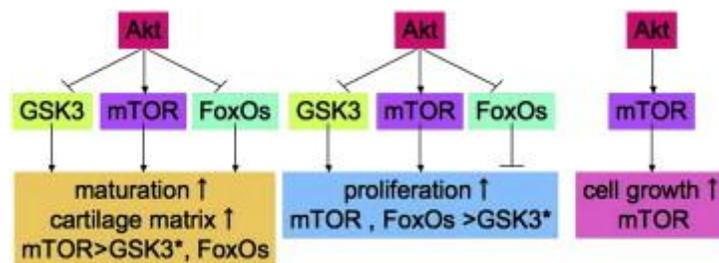


Fig. 10. Blancos de AKT. Activación de dianas río abajo de AKT. Tomado de Rokutanda S, Fujita T, et al. Akt regulates skeletal development through GSK3, mTOR, and FoxOs. *Dev Biol.* 2009 Apr 1;328(1):78-93.



5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades periodontales son desordenes complejos que están asociados a múltiples factores de riesgo y afectan al 80% de la población mundial. Los desordenes de esta enfermedad están accionados por la acumulación de placa dentobacteriana.

La homeostasis e integridad de los tejidos de soporte del diente son importantes para el adecuado funcionamiento de la cavidad oral y la pérdida del balance de los factores que convergen en el periodonto dan como resultado la enfermedad periodontal, en la cual incluso, se puede perder el órgano dentario.

La terapéutica en esta enfermedad tiene como objetivo principal la regeneración de los tejidos perdidos a causa de la periodontitis sin embargo, a la fecha, ninguno de los tratamientos son predecibles, y a pesar que en los últimos años se ha incrementado la investigación en los tejidos periodontales, los mecanismos moleculares que se llevan a cabo en estos tejidos, aun permanecen poco claros.

6. JUSTIFICACIÓN

Un tejido que resulta de gran interés en la regeneración periodontal, es el cemento radicular. Debido a las características suigéneris que presenta y por ser el tejido que provee el sustrato para el anclaje celular de las fibras del ligamento periodontal, es un tejido indispensable en la regeneración de los tejidos perdidos en la periodontitis.

Conocer los componentes de este tejido, así como la acción de moléculas presentes en él y la regulación e interacción de estas a nivel intracelular, nos provee de herramientas poderosas que nos permiten un mejor entendimiento y aplicación de la terapéutica periodontal.

Por lo anterior, conocer el papel de la proteína recombinante del cemento 1 (hrCEMP1), sobre la activación de mecanismos de transducción intracelulares como p38, JNK, PI3K, AKT y GSK3 así como la expresión de los ARN's mensajeros que codifican para la proteína de adhesión del cemento (CAP), fosfatasa alcalina (ALP), sialoproteína ósea (BSP), osteocalcina (OCN) y la proteína del cemento 1 (CEMP1), y sus productos génicos en cementoblastos, nos permite esclarecer algunas de las interrogantes hasta la fecha formuladas.

7. HIPÓTESIS

La hrCEMP1 activa las cascadas de señalización asociadas a la proliferación y a la diferenciación celular como p38, JNK y la vía de PI3K, y regula la expresión de los genes que codifican para la proteína de adhesión del cemento (CAP), fosfatasa alcalina (ALP), sialoproteína ósea (BSP) osteocalcina (OCN) y la proteína del cemento 1 (CEMP1).



8. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la activación de la vía de p38, JNK y PI3K en cementoblastos humanos por efecto de la proteína hrCEMP1, así como el efecto de esta proteína en la expresión de los ARN's mensajeros de la proteína de adhesión del cemento (CAP), fosfatasa alcalina (ALP), sialoproteína ósea (BSP), osteocalcina (OCN) y CEMP1 y sus productos génicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la fosforilación de p38, JNK, PI3K, AKT y GSK3 al tratamiento con hrCEMP1.
- Determinar el efecto de hrCEMP1 en la expresión de los ARN's mensajeros de la proteína de adhesión del cemento (CAP), fosfatasa alcalina (ALP), sialoproteína ósea (BSP) y osteocalcina (OCN) y CEMP1 y la expresión de sus productos génicos.
- Determinar si hrCEMP1 promueve la formación de nódulos de mineralización y si p38, regula este proceso.

9. MATERIALES Y MÉTODOS.

9.1 Reactivos.

Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad CA); suero fetal bovino (SBF) (Invitrogen, Carlsbad CA); Anticuerpos primarios policlonales; anti-p38, anti-p-p38, anti-JNK, anti-p-JNK, anti-p-c-jun, anti-PI3K, anti-p-PI3K (Cell signaling Technology), anti-GSK-3, anti-p-GSK3, anti-AKT, anti-p-AKT, anti-BSP, anti-OCN, y anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Inc., SantaCruz, CA, USA); anti-ALP, anti-CEMP1 y anti-CAP IgG policlonales; Anticuerpo secundario, HPR-conjugado anti-conejo IgG (Invitrogen) y anti-ratón IgG acoplado a fluoresceína (Santa Cruz Biotechnology, Inc., SantaCruz, CA, USA); Diaminobencidina (Gibco); TRIZOL® Reagent (Sigma Chemical Co.); Super Script® III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para la inhibición de p38 se utilizó el inhibidor SB 203580 (Sigma Chemical Co). El laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados cuenta con la proteína del cemento¹ recombinante humana (hrCEMP1) con la que se realizaron los tratamientos.

9.2 Cultivo celular.

El laboratorio cuenta con la línea celular establecida a partir de un cementoblastoma humano. Las células se sembraron en cajas falcon de 75-cm² y se incubaron en Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SBF) inactivado por calor y se adicionó antibiótico (100 µg/ml estreptomicina and 100 U/ml penicilina). El cultivo celular fue incubado



a 37°C en una atmósfera de 5% de CO² en aire húmedo, hasta la subconfluencia. Las células se usaron del pasaje 3 al 7.

9.3 Ensayo de Western-Blot.

Los cementoblastos se cultivaron en cajas de 6 pozos (1x10⁵ células/pozo). Las células se crecieron hasta la subconfluencia y se trataron con medio mineralizante (consistente en DMEM suplementado con 10 mM β-glicerofosfato, 50 μg/ml de ácido ascórbico, and 1% de suero bovino fetal), y/o hrCEMP1. Después del estímulo el medio se aspiró y las células se desprendieron con gendarme en buffer de fosfatos salino (PBS) + 1 mM ortovanadato de sodio, o no, la muestra se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 minutos y la pastilla se colocó con 50 μl de buffer de lisis (0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5 M PMSF, 0.4 mM ortovanadato de sodio, o no, 10 mM de fluoruro de sodio, 10 mM de pirofosfato de sodio, o no, y Complete-EDTA free(Sigma Chemical Co). La muestra se sonicó (1s x 30) en un baño con hielo. Para el ensayo de Western blot se utilizaron 10 μg de proteína que se mezcló 1:1 con buffer de muestra 2x (20% glicerol, 4% SDS, 0.05% azul de bromofenol y 1.25 M Tris-HCl pH 6.8 (Sigma Chemical Co.), la muestra se cargó en un gel al 12% SDS-PAGE y se corrió a 30V por 1 h. Las proteínas celulares se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore) por 1 hr. Posteriormente, la membrana se bloqueó con 150 mM NaCl, 100mM Tris-HCl pH 7.8 (TBST) y 5% de leche toda la noche a 4°C. Se lavó en tres ocasiones y se incubó con el anticuerpo primario (2:5000). Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C y posteriormente se lavaron durante 3 ocasiones con TBST y se incubaron durante 2 hrs. con el anticuerpo secundario (1:3000). Las bandas inmunorreactivas se revelaron con diaminobencidina.

9.4 Inmunocitoquímica:

Las células se crecieron en cubreobjetos en cajas de 24 pozos bajo las condiciones antes mencionadas. Terminado el tratamiento se fijaron por 30 minutos con 2% de paraformaldehído en PBS a 4°C y se lavaron durante 3 ocasiones con PBS. Posteriormente, se permeabilizaron durante 5 minutos con Tritón 0.1% en PBS, y se lavaron durante 3 ocasiones con PBS. Las células se incubaron con suero-albúmina bovina al 1% por 1 hora. Para la visualización de p-p38, y p-c-jun, las células se trataron durante 1 hora con anticuerpo anti-conejo pp38 (Tyr 182); diluidos (1:100) en PBS, posteriormente se lavaron en cinco ocasiones con PBS. Las células se incubaron durante 45 minutos con anti-ratón IgG acoplado a fluoresceína (1:100) en PBS. Las muestras se montaron en resina y se observaron por microscopía confocal (Eclipse 80i, Nikon Instruments Inc., USA). Los experimentos se repitieron en tres ocasiones por separado.



9.5 Ensayo qRT •PCR.

Las cajas se sembraron en cajas de 6 pozos hasta la subconfluencia. Se realizaron los tratamientos previamente descritos y se cambió el medio condicionante cada tercer día. El RNA total se aisló de células derivadas de un cementoblastoma humano, usando TRIzol[®] Reagent. El RNA (1 ng) fue transcrito en forma inversa (RT) usando el equipo Corvett 6000 (In vitrogen). La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se realizó utilizando los oligonucleótidos 5´TCC AGA CAT TTG CCT TGC TT3´ (sentido codificante) y 5´TTA CAG CAA TAG AAA AAC AGC ATG A3´(sentido anticodificante) de la proteína de adhesión del cemento (CAP); 5´ AGC ACT CCC ACT TCA TCT GGA A3´(sentido codificante) y 5´GAG ACC CAA TAG GTA GTC CAC ATT G3´ (sentido anticodificante) de fosfatasa alcalina (ALP); 5´ AAC GAA GAA AGC GAA GCA GAA3´ (sentido codificante) y 5´ TCT GCC TCT GTG CTG TTG GT 3´ (sentido anticodificante) de sialoproteína ósea (BSP); 5´ GGG CTC CCA GCC ATT GAT3´ (sentido codificante) y 5´ CAA AGC CTT TGT GTC CAA GCA 3´ (sentido anticodificante) de osteocalcina (OCN); 5´TGA GAA CCT CAC CTG CCT CT3´ (sentido codificante) y 5´ACC CCT TAG GAA GTG GCT GT3´ (sentido anticodificante) de CEMP1; 5´ CAA CGG ATT TGG TCG TAT TGG 3´ (sentido codificante) y 5´ GCA ACA ATA TCC ACT TTA CCA GAG TTA A 3´ (sentido anticodificante) de gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min y extensión a 72°C por 1.5 min. Se realizaron tres experimentos por separado de cada tratamiento.

9.6 Actividad de fosfatasa alcalina.

Las células se lisaron en 50 µl de buffer de lisis (0.05 mM Tris-HCl, pH 7.8, 0.15 M NaCl, 1% Tritón X 100, 0.5 M PMSF y Complete EDTA-free, inhibidores de proteasas) y se sonicaron por 20 s. 10 µg de proteína total, se incubaron a 37°C por 30 minutos con p-nitrofenilfosfato (pNPP; sustrato de la fosfatasa alcalina).

La actividad enzimática de la fosfatasa alcalina fue expresada en nanomoles de p-nitrofenol por minuto por miligramos de proteína. La concentración de la proteína se determinó usando suero albúmina bovina como control. Los ensayos se realizaron por triplicado.

9.7 Expresión de Osteocalcina determinada por ELISA

Las muestras control y experimentales se incubaron toda la noche. Se retiró el contenido y se realizaron tres lavados, posteriormente se bloqueo durante 30 minutos. Al término se lavaron los



pozos por triplicado. Terminada la incubación de realizaron lavados y se incubó con primario durante 2 horas a 37°C, realizando lavados al terminó e incubando el anticuerpo secundario por 30 minutos. Se detuvo la reacción con 2 N H₂SO₄. Las placas se leyeron a 490 nm utilizando un el lector Microplate Reader (Awareness Technology, Inc. USA). Los ensayos se realizaron por triplicado.

9.8 Ensayo de mineralización.

Los cementoblastos se crecieron en cajas de 6 pozos (1X10⁵ células pozo) .Se crecieron en DMEM suplementado al 10% con suero bovino fetal y se espero hasta la subconfluencia. Se llevaron a cabo tratamientos durante 3, 7 y 14 días con medio mineralizante o no, y/o 10 µg de hrCEMP1, adicionando o no el inhibidor SB203580. Terminado el tiempo de tratamiento, las células se fijaron con formaldehido al 4% en PBS por 10 minutos y se realizó la tinción con una solución de alizarina roja al 2% (Sigma) durante 2 hrs a temperatura ambiente para visualizar la deposición de calcio en la matriz extracelular. Posteriormente, se realizaron lavados con buffer de fosfato salino y finalmente con agua desionizada. Se tomaron las imágenes con microscopio de contraste de fases. Los experimentos se realizaron por triplicado.

9.9 Análisis de datos y estadística.

Los datos presentados corresponden a la media ± error estándar del número de observaciones que se indicó previamente. Las comparaciones estadísticas se realizaron por la prueba Anova seguido por el análisis de Dunett o Tukey-Kramer. Las diferencias entre las medias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

10. RESULTADOS.

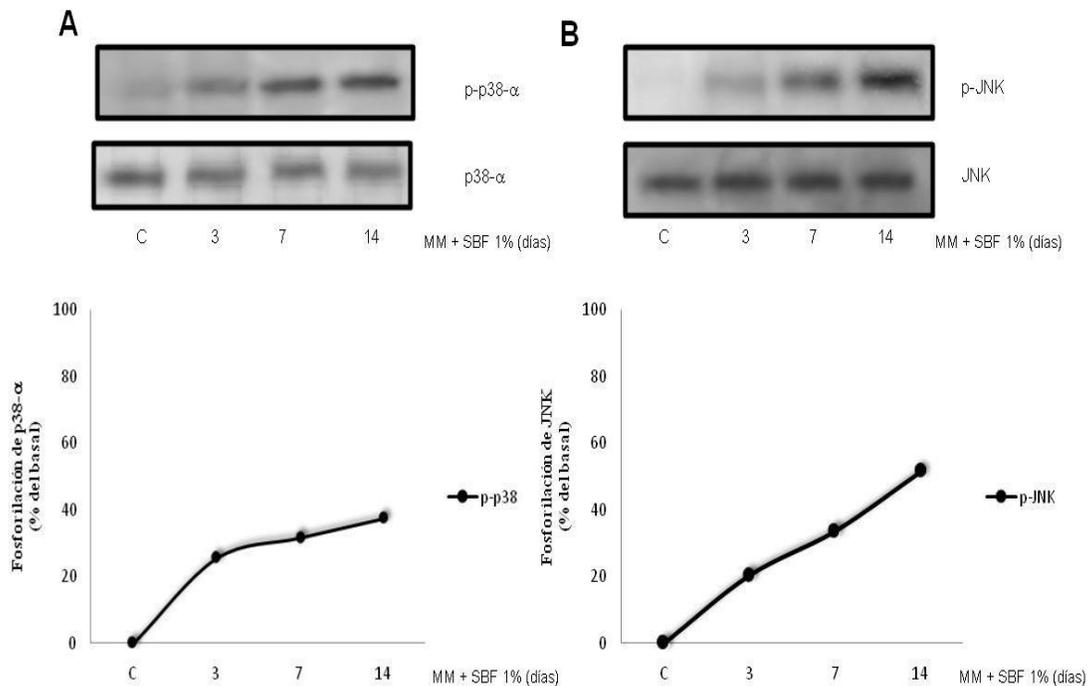
EL β-GLICEROFOSFATO Y ÁCIDO ASCÓRBICO PROMUEVEN LA FOSFORILACIÓN DE p38, JNK y PI3K.

Se ha reportado que el β-glicerofosfato y ácido ascórbico (suplementos osteogénicos) son los más ampliamente usados para inducir procesos de mineralización en diversas especies celulares⁵¹⁻⁵³. Con el objeto de determinar si el medio mineralizante promovía la fosforilación de las cinasas p38, JNK y PI3K en cementoblastos putativos humanos, las células fueron incubadas con DMEM al 1% SBF y suplementado con β-glicerofosfato (10mM)+ ácido ascórbico (50 µg/ml) durante 3 ,7 y 14 días.



Se observó un incremento en el patrón de fosforilación de p38 en un 25% a los 3 días de tratamiento y hasta un 37% hasta los 14 días, (Fig.1A). Los cambios en el patrón de fosforilación de la cinasa JNK indican que hay un incremento en la fosforilación de ésta a partir del tercer día de tratamiento y hasta el día 14 observándose un incremento del 51% respecto al basal en el último día de tratamiento (Fig. 1B).

Con respecto a la cinasa PI3K, se observó un incremento a partir del día 3 de tratamiento y hasta del 42% en el día 14 de tratamiento (Fig. 1C). El incremento en el patrón de fosforilación está estimado en relación al basal en el cual las células estuvieron en DMEM suplementado con 1% SBF. Estos resultados demuestran que el medio mineralizante induce tanto la activación de las MAPK p38 y JNK así como la cinasa PI3K.



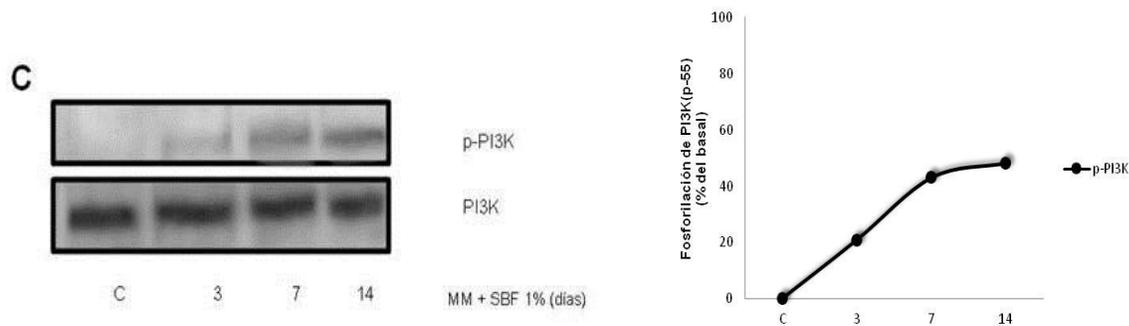


Fig. 1. EFECTO DEL β -GLICEROFOSFATO + ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE p38, JNK y PI3K. A), B) y C) Las células fueron incubadas con DMEM al 1% SBF en el control y se suplementó con β -glicerofosfato (10mM)+ ácido ascórbico (50 μ g/ml) en los tratamientos a 3, 7 y 14 días. El medio se cambio cada tercer día. Las gráficas representan la media de tres experimentos que se realizaron de forma individual. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

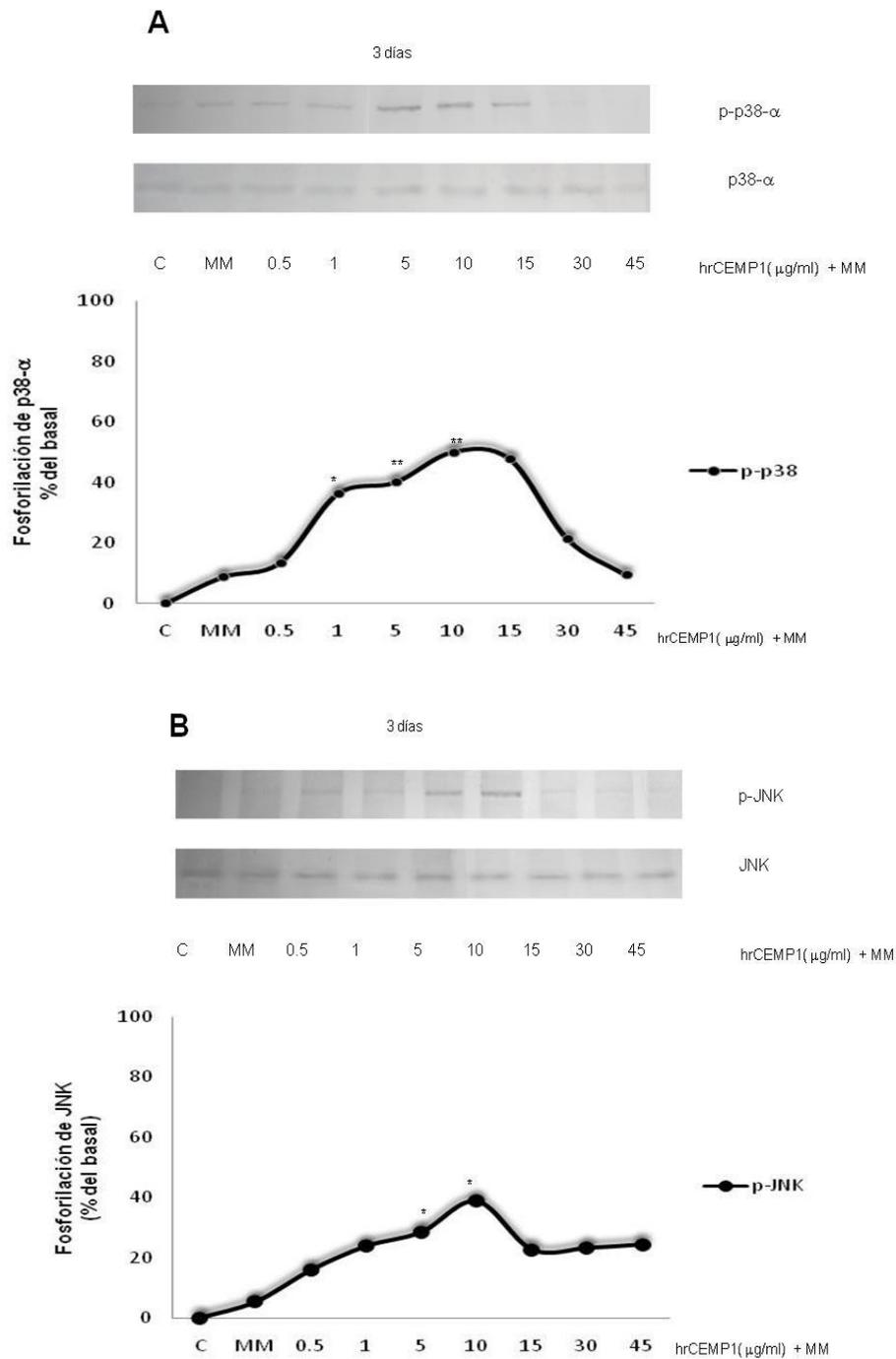
EFECTO DE hrCEMP1 SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE LAS MAPK p38 Y JNK Y LA VÍA DE PI3K.

Estudios previos han revelado la activación de las MAPK asociadas a procesos de diferenciación osteoblástica y mineralización^{7,16,24,54}. Con el fin de evaluar el efecto de la proteína del cemento 1 recombinante humana (hrCEMP1) en la fosforilación de las cinasas p38, JNK, PI3K, AKT y GSK3, las células fueron incubadas con DMEM suplementado con β -glicerofosfato y ácido ascórbico con diferentes concentraciones de hrCEMP1, utilizando un control con SBF al 1% y un segundo control, el cual está suplementado con β -glicerofosfato y ácido ascórbico con SBF 1%. Los resultados mostraron un incremento en la fosforilación de p38 con el medio mineralizante el cual se observó hasta con una concentración de 10 μ g/ml de hrCEMP1, la concentración disminuye a partir de una concentración de 15 μ g/ml (Fig. 2A). Un patrón de fosforilación similar se observó en la cinasa JNK, encontrando que la máxima fosforilación se obtiene también a una concentración de 10 μ g/ml (Fig. 2B). Para la cinasa PI3K, la fosforilación mayor se da a una concentración de 5 μ g/ml (Fig. 2C) esta disminuye a partir de 10 μ g/ml, mientras que para la cinasa AKT se observa un incremento en la fosforilación con el medio mineralizante, pero al adicional la hrCEMP1 partiendo de 0.5 μ g/ml la fosforilación desciende (Fig. 2D). En el caso de la GSK3 no hay cambios significativos en la fosforilación con respecto al basal (Fig. 2E).

Para evaluar los efectos de hrCEP1 a tiempos cortos y en ausencia del medio inductor, en la activación de MAPK-p38 y MAPK-JNK, HCDC se incubaron en DMEM adicionando hrCEMP1 (10 μ g/ml) Por 15 min, 30 min, 1, 2, 3, 6 y 12 hr. Nuestros resultados muestran un incremento en la

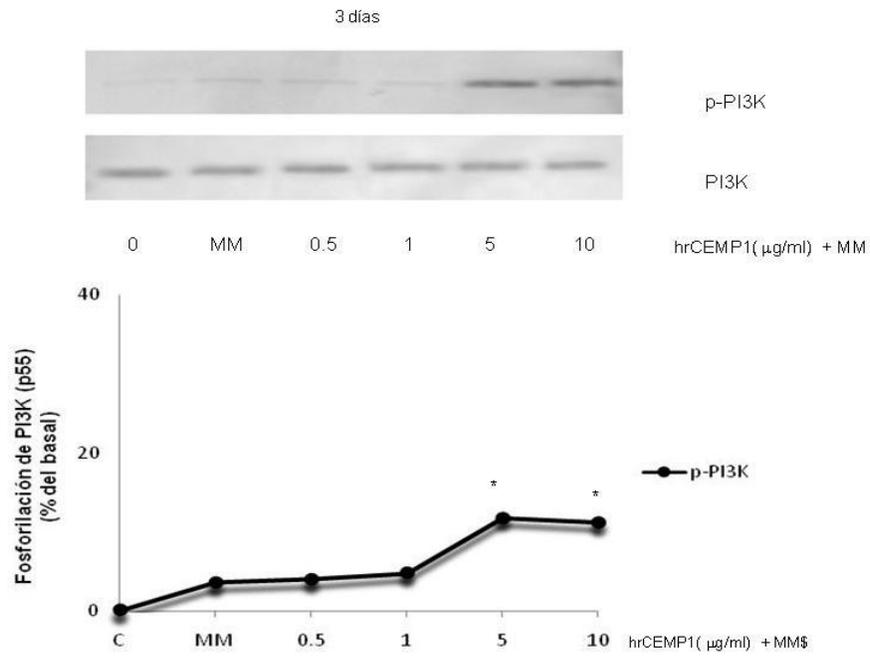


fosforilación de p38 en 17% and JNK en 9% después de 15 minutos y esto fue continuo hasta las 12 horas del tratamiento. (Fig. 2F, 2G).

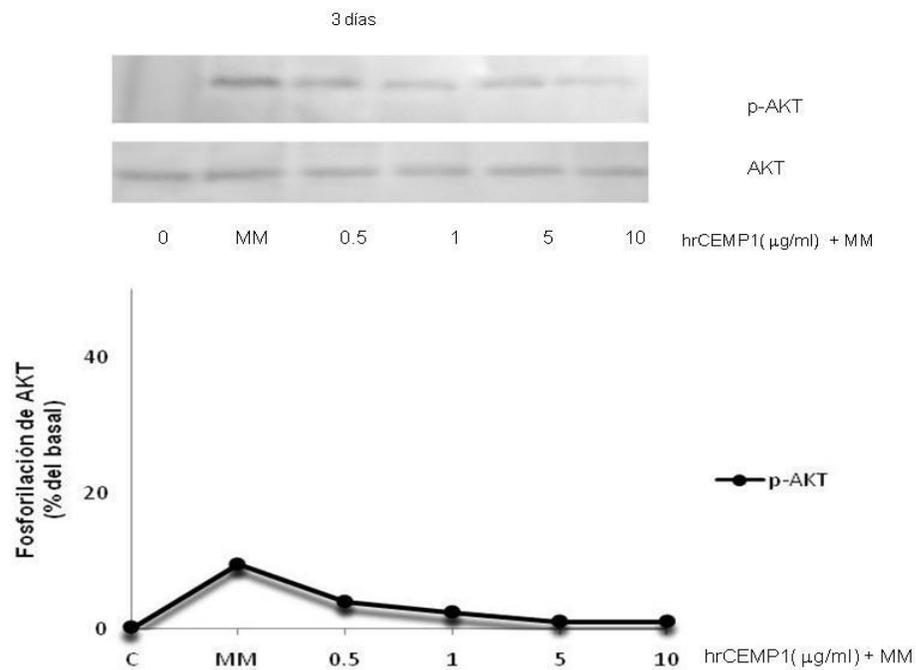




C

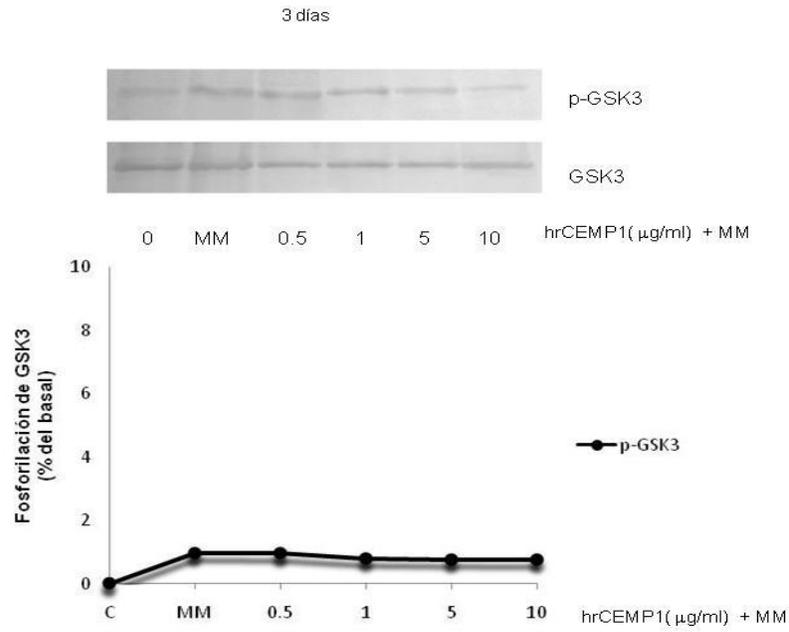


D

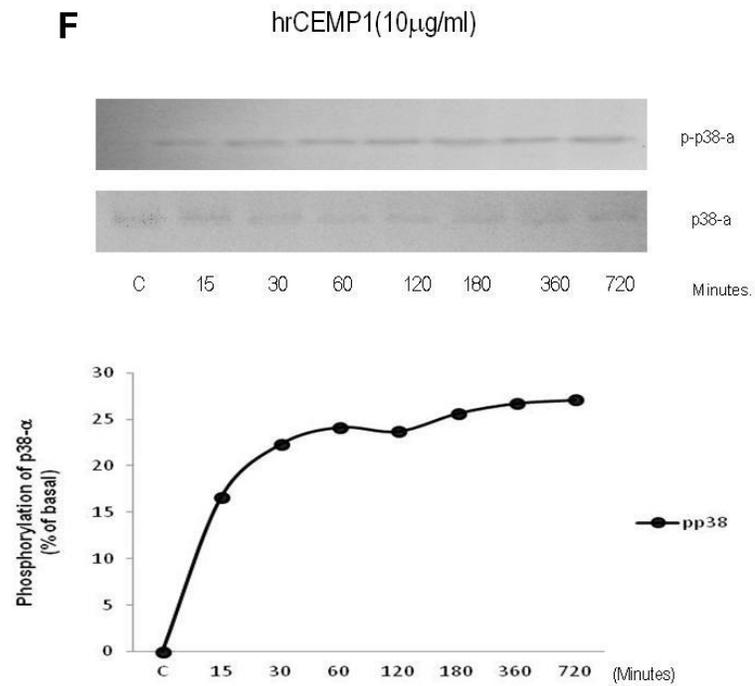




E



F



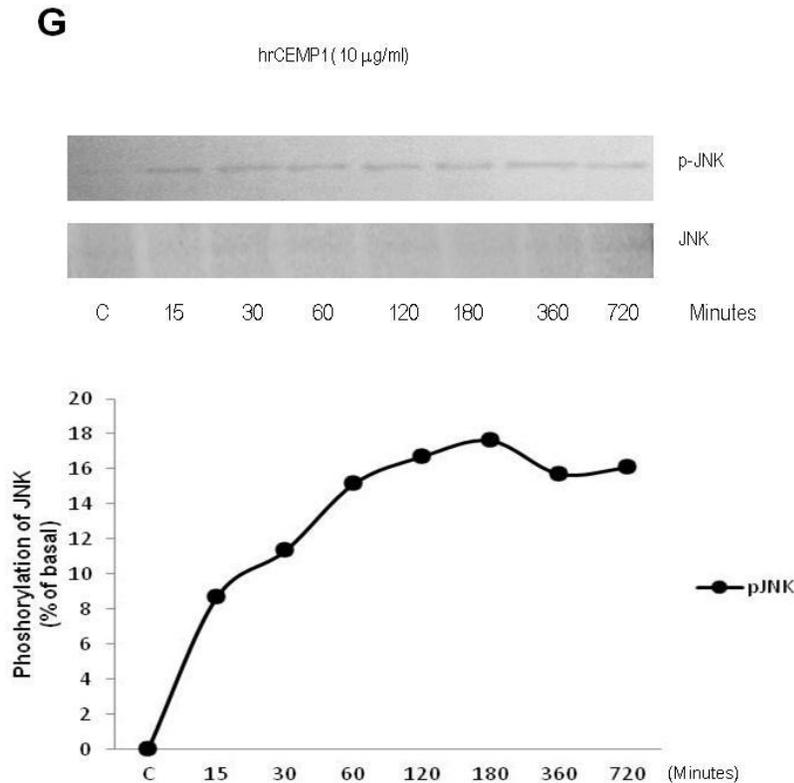


Fig. 2. EFECTO DE hrCEMP1 SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE p38, JNK, PI3K, AKT y GSK3. A), B), C.), D) E) Las células fueron incubadas con DMEM al 1% SBF en el control (C) y se probó un segundo control con el medio mineralizante el cual contiene β -glicerofosfato (10mM)+ ácido ascórbico (50 µg/ml). Se colocaron concentraciones de 0.5, 1, 5,10, 15, 30 y 45 µg/ml de hrCEMP1 y el medio mineralizante durante 3 días para las cinasas p38 y JNK. Para las cinasas PI3K, AKT y GSK3 se utilizaron concentraciones hasta 10 µg/ml. El medio se cambio cada tercer día. F) Las células fueron incubadas con hrCEMP1 (10 µg/ml) por 15 min, 30 min, 1, 2, 3, 6 y 12 hr. Las gráficas representan la media de tres experimentos que se realizaron de forma individual. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Estos datos sugieren que la hrCEMP1 activa la vía de las MAPK, y disminuye la fosforilación de la vía de cinasa AKT activada por el medio inductor al adicionar hrCEMP1, cinasa que se localiza río abajo de esta vía de señalización e incluso GSK3 no muestra cambios en el patrón de fosforilación respecto al control.

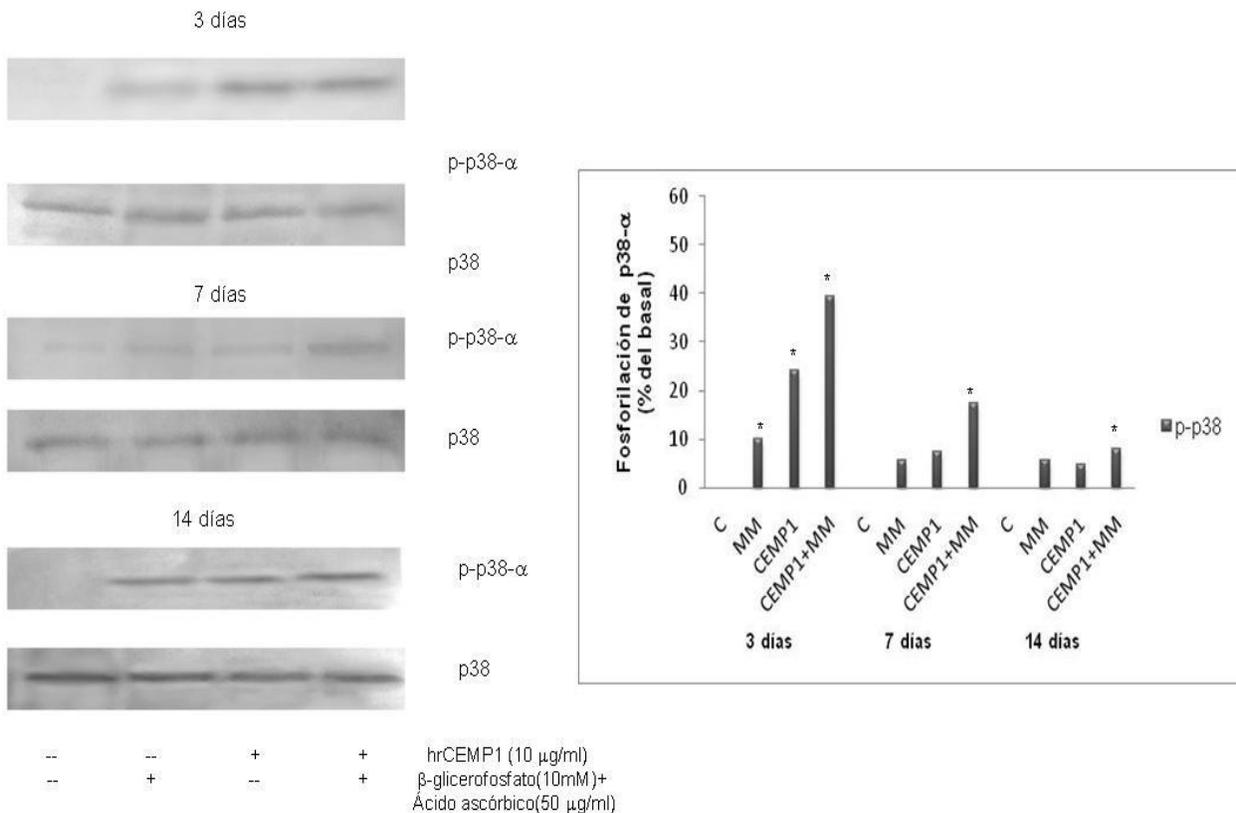
EFECTO DE hrCEMP1 EN LA FOSFORILACIÓN Y TRANSLOCACIÓN DE p38 AL NÚCLEO y FOSFORILACIÓN DE JNK Y FOSFORILACIÓN DE C-JUN.

La familia de las MAPK ha sido descrita como una vía de señalización asociada con procesos de diferenciación celular. La cinasa p38 se relaciona con la actividad de proteínas asociadas a eventos de mineralización^{55,56}. Para determinar el efecto de hrCEMP1 y del medio mineralizante con respecto a p38 y JNK, se realizaron ensayos durante 3, 7 y 14 días con la proteína sola y en presencia del

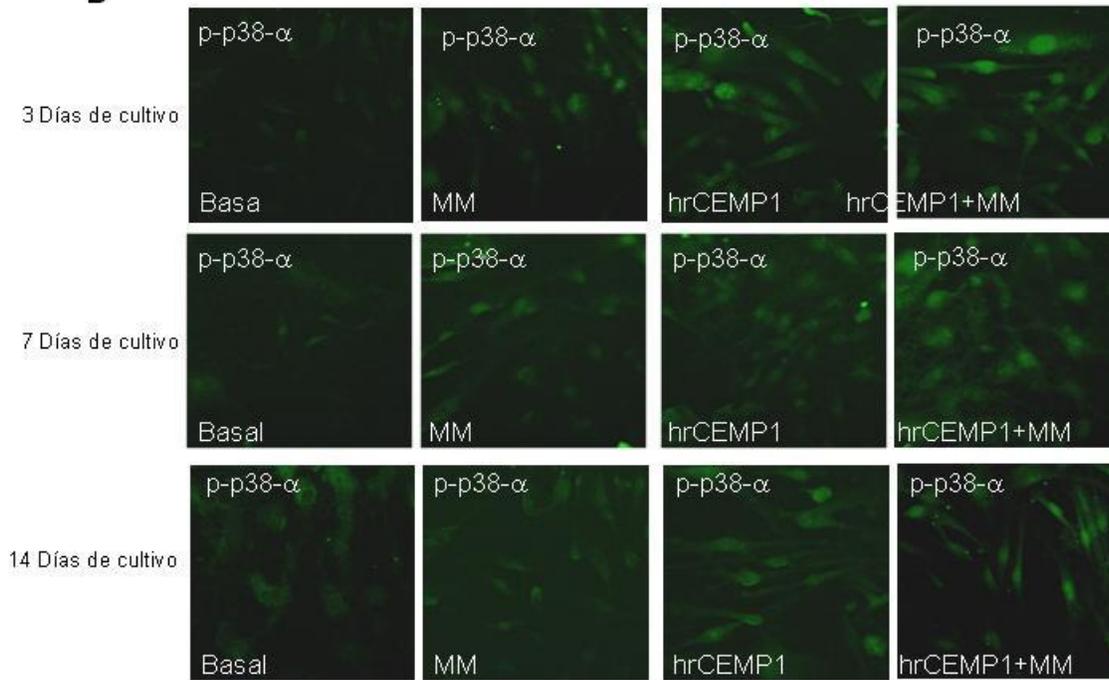


medio mineralizante. Los resultados muestran que tanto la proteína hrCEMP1 como el medio inductor incrementarán la fosforilación de p38 sin embargo, al adicionarlos juntos, esta aumenta hasta en un 40% respecto al basal. Se observó también que la fosforilación más alta de esta cinasa se da a los 3 días de tratamiento (Fig. 3A), de la misma forma se observó la translocación de esta cinasa al núcleo bajo las mismas condiciones (Fig. 3B). Encontramos también que la hrCEMP1 y el medio inductor solos promueven la fosforilación de JNK, esta activación incrementa cuando se adicionan juntos, pero a diferencia de p38, la activación de esta cinasa es similar a lo largo del tratamiento (Fig. 3C). Se ha reportado que la activación de la cinasa JNK conduce a la activación del oncogén C-JUN^{57, 58}. Los resultados indican un activación marcada del oncogén C-JUN al tratamiento con hrCEMP1 y el medio inductor juntos (Fig. 3D). Estos resultados sugieren que la hrCEMP1 y el medio mineralizante pueden promover la activación de factores de transcripción asociados a diferenciación celular en cementoblastos putativos humanos.

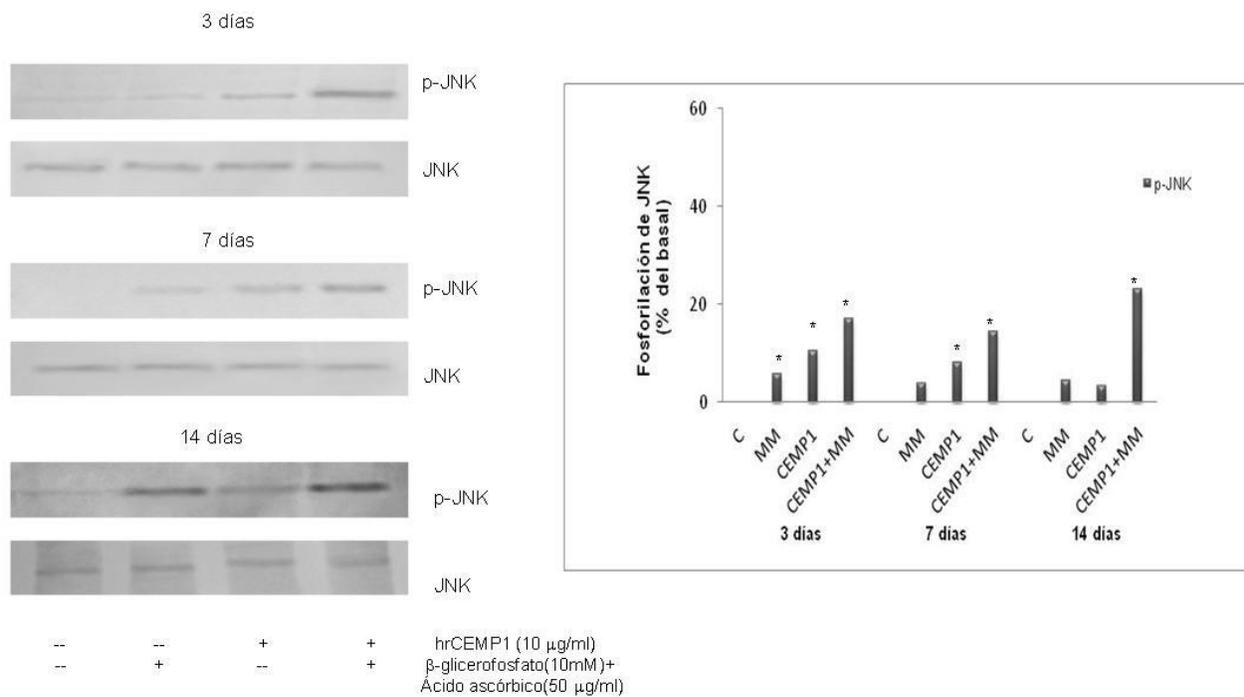
A



B



C



D

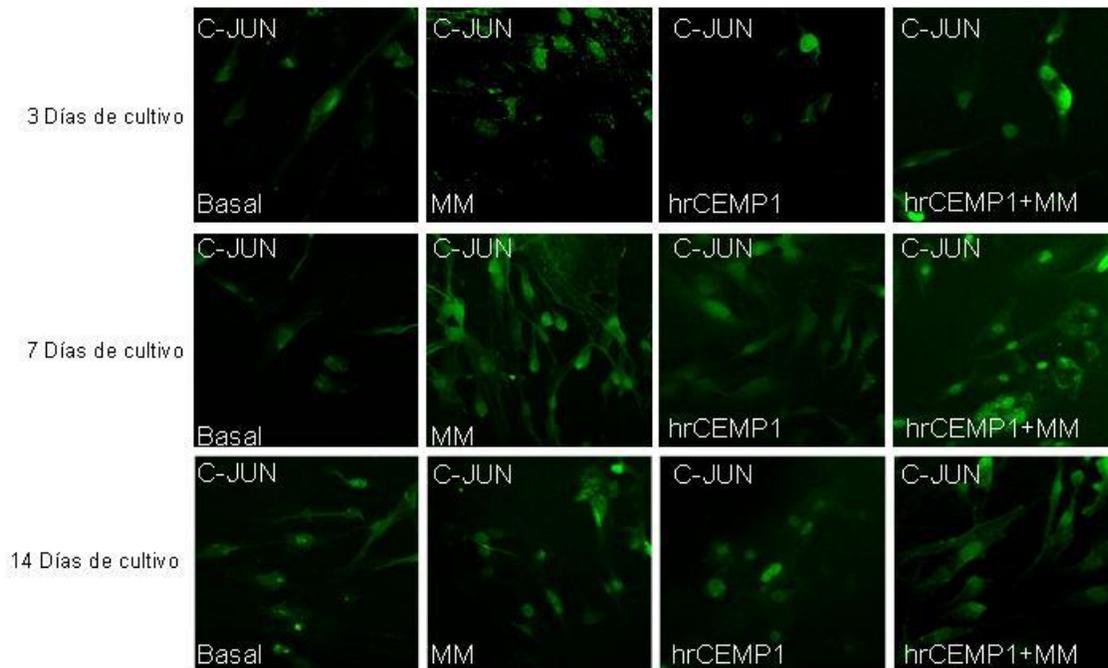


Fig. 3. EFECTO DE hrCEMP1 SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE p38, JNK, LA TRASLOCACIÓN DE p38 AL NÚCLEO Y LA ACTIVACIÓN DE C-JUN. A), B), C) y D), Las células fueron incubadas en presencia de hrCEMP1 (10 μ g/ml) y/o medio mineralizante durante 3, 7 y 14 días. El medio se cambió cada tercer día. Las gráficas representan la media de tres experimentos que se realizaron de forma individual. * $p < 0.001$

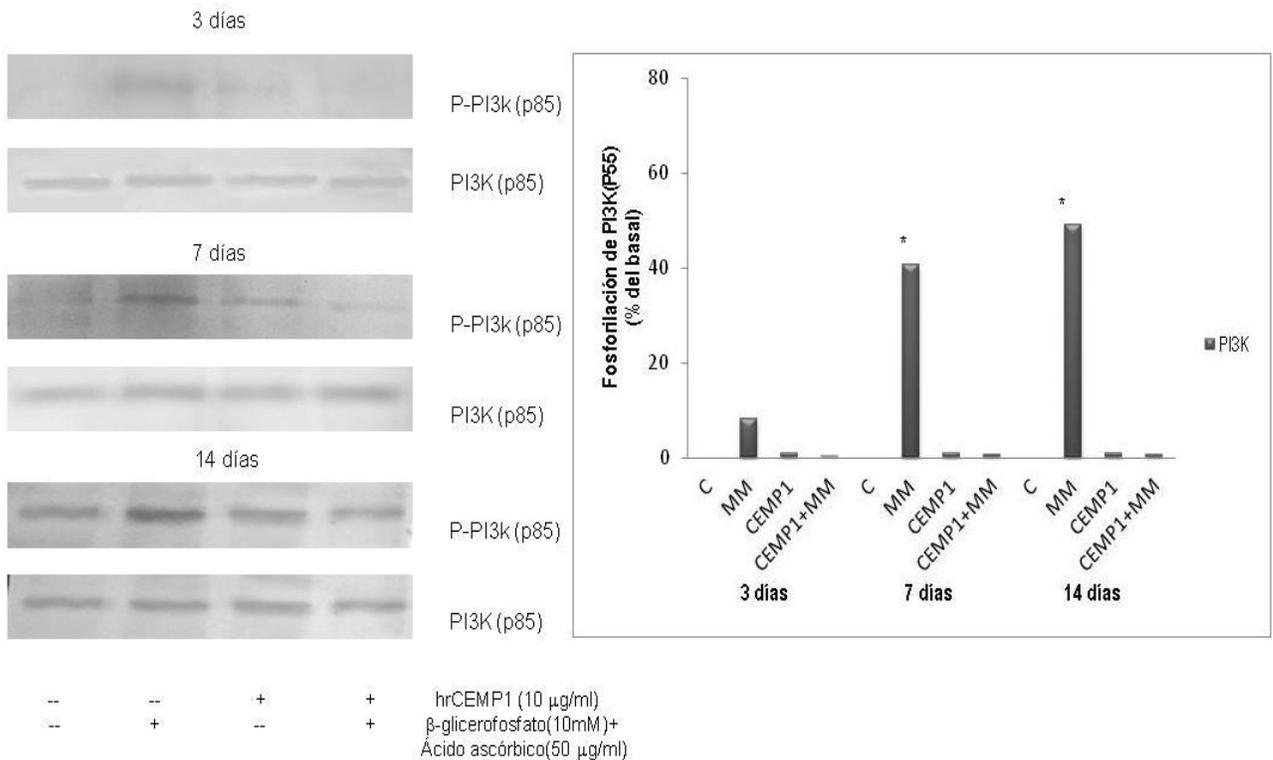
EFECTO DE hrCEMP1 EN LA FOSFORILACIÓN DE PI3K, AKT Y GSK3.

Investigaciones actuales demuestran la activación de las vías de PI3K, seguida río abajo con la activación de AKT y GSK3 en procesos de diferenciación y proliferación osteoblástica y condroblástica^{59, 61}. Con el fin de evaluar el efecto de hrCEMP1 en la activación de la vía de PI3K, los cementoblastos fueron tratados durante 3, 7 y 14 días en presencia o ausencia del medio mineralizante y/o hrCEMP1. Los resultados indican que la cinasa PI3K se fosforila en tratamientos con el medio mineralizante dependientes del tiempo, pero al adicionar conjuntamente la hrCEMP1 este evento no se observa (Fig. 4A). La cinasa AKT presenta activación con el medio mineralizante a lo largo del tratamiento con máxima fosforilación a los 14 días del 27%, por otra parte hrCEMP1 sola, promueve la fosforilación de esta cinasa, a los 3 y 7 días de tratamiento en un 10% y 3% respectivamente, sin embargo la fosforilación de ésta disminuye cuando se adicionan medio mineralizante y hrCEMP1 (Fig. 4B). Con respecto a la cinasa río abajo GSK3 no se observaron



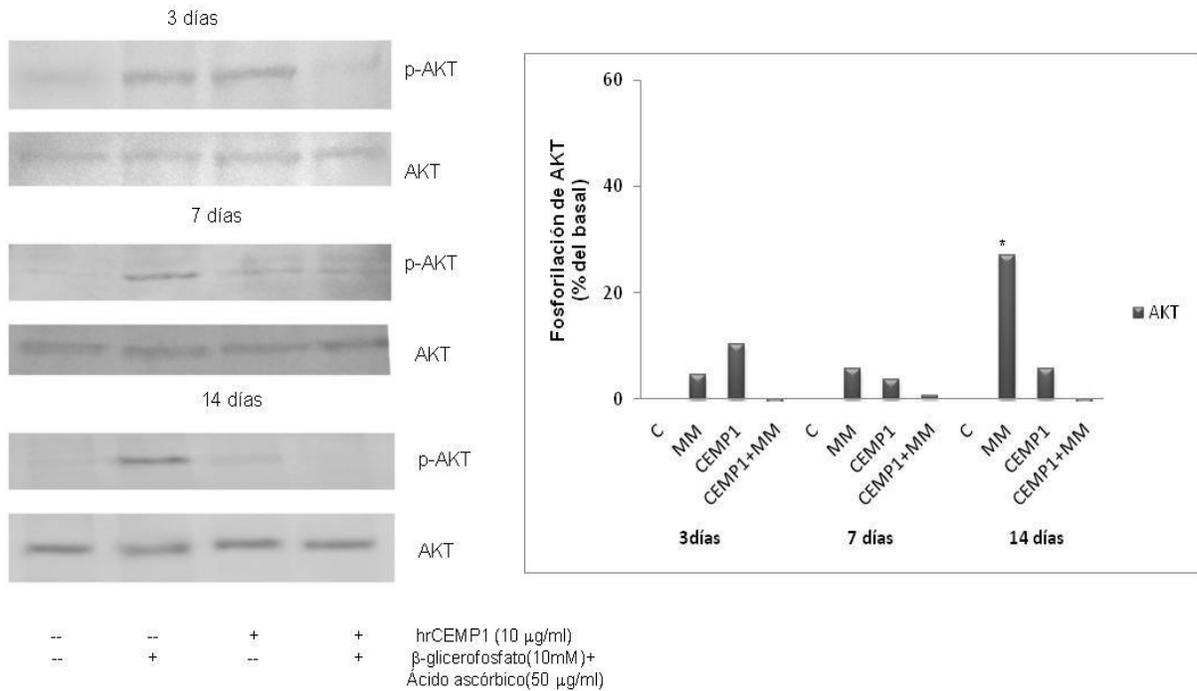
cambios significativos (Fig. 4C). Los datos anteriores indican que el β -glicerofosfato y el ácido ascórbico activan a la vía de transducción PI3K, seguida con la activación de AKT pero no de GSK3, y que, al suplementar este medio mineralizante con 10 μ g/ml de la proteína hrCEMP1, se inhibe este evento, lo que indica que hrCEMP1 es un modulador de la activación de vías de transducción de MAPK y PI3K en cementoblastos putativos humanos.

A





B



C

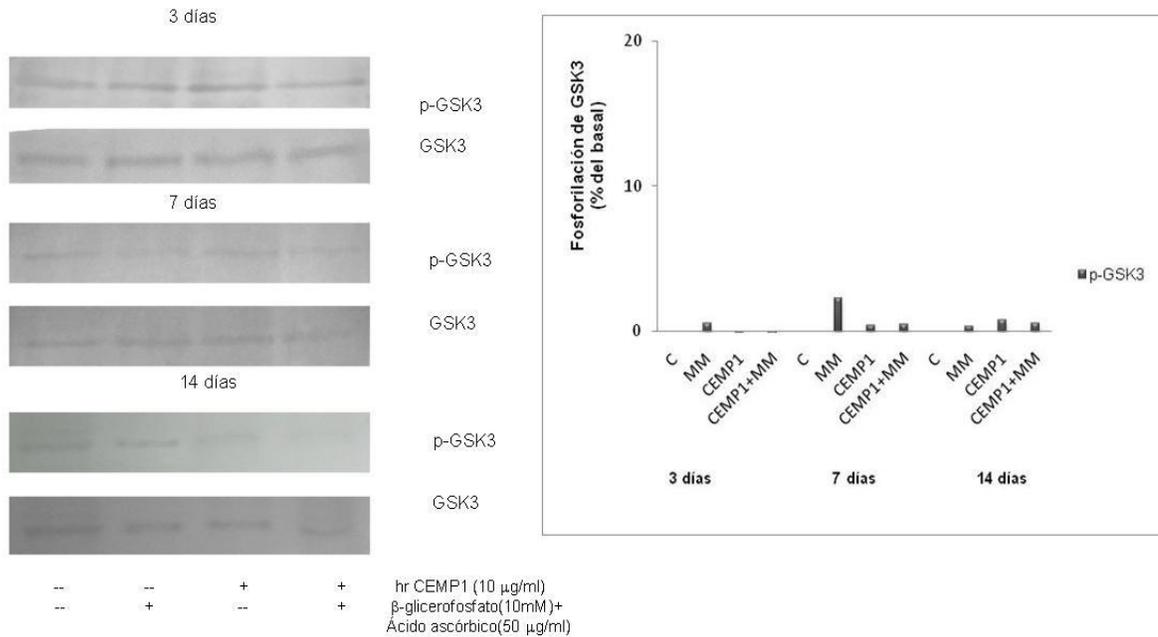


Fig. 4. EFECTO DE hrCEMP1 SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE PI3K, AKT Y GSK3. A), B), y C). Las células fueron incubadas en presencia de hrCEMP1 (10 µg/ml) y/o medio mineralizante durante 3, 7 y 14 días. El medio se cambió cada tercer día. Las gráficas representan la media de tres experimentos que se realizaron de forma individual. * $p < 0.05$

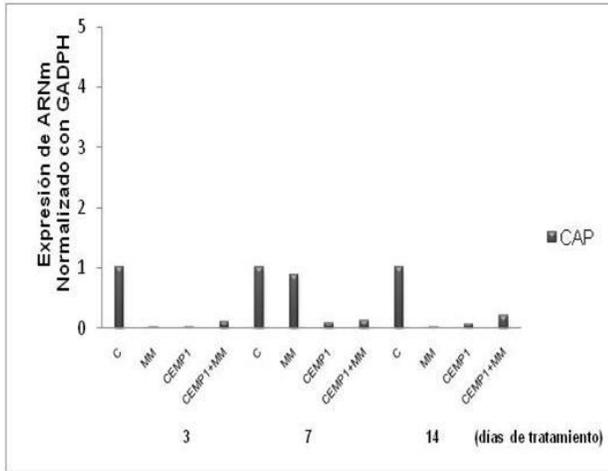


EFFECTO DE hrCEMP1 EN LA EXPRESIÓN DE LOS ARN'S MENSAJEROS DE LA PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO (CAP), FOSFATASA ALCALINA (ALP), SIALOPROTEÍNA ÓSEA (BSP), OSTEOCALCINA (OCN) Y LA PROTEÍNA DEL CEMENTO 1 (CEMP1) Y SUS PRODUCTOS GÉNICOS.

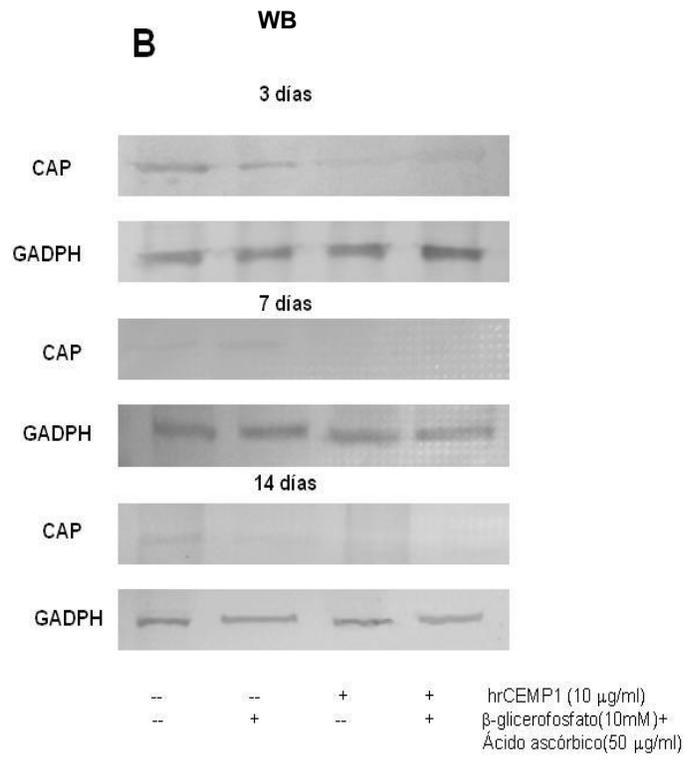
Reportes previos indican que CEMP1 modula la expresión de OPN y BSP en tratamientos curso temporales^{62,63}. Para determinar la expresión de los ARN's mensajero de proteínas asociadas a procesos de mineralización, los cementoblastos fueron tratados durante 3, 7 y 14 días con 10 $\mu\text{g/ml}$ de la proteína hrCEMP1 y/o medio mineralizante. Los resultados demuestran que el medio inductor y/o la proteína hrCEMP1, disminuyen la expresión de los mensajeros de la proteína de adhesión del cemento (CAP) y fosfatasa alcalina (ALP) respecto al control, a lo largo del tratamiento (Fig. 5A y 5C). El mensajero de la proteína del cemento 1 (CEMP1) presenta una disminución en su expresión a los 3 y 14 días de tratamiento, bajo todas las condiciones de tratamiento, pero en el día 7 se observa un incremento en su expresión al tratamiento con ambos sugiriendo una autorregulación a los 7 días de tratamiento (Fig. 5E). Por otra parte la expresión de sialoproteína ósea está disminuida en etapas tempranas de tratamiento, pero se observa que a los 14 días el medio mineralizante incrementa su expresión, evento que se ve inhibido al adicionar hrCEMP1 (Fig. 5G). El marcador osteoblástico osteocalcina (OCN), presenta un incremento en su expresión a los 3 y 7 días de tratamiento con el medio mineralizante, sin embargo este evento se ve totalmente inhibido con la presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de la proteína hrCEMP1 (Fig. 5I). Los resultados demuestran que hrCEMP1 es un regulador de la expresión de proteínas que se han reportado como marcadores osteoblásticos^{64,65}. Del mismo modo encontramos que los productos génicos de los mensajeros de las proteínas asociadas a mineralización presentan un expresión que corresponde a la de los mensajeros (Fig. 5B, 5D, 5F y 5H).



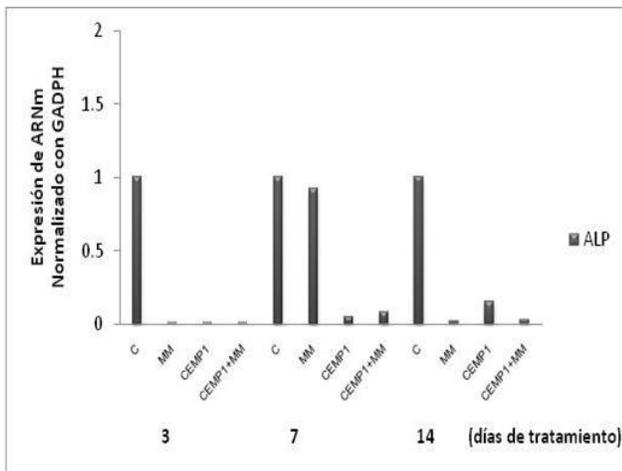
A



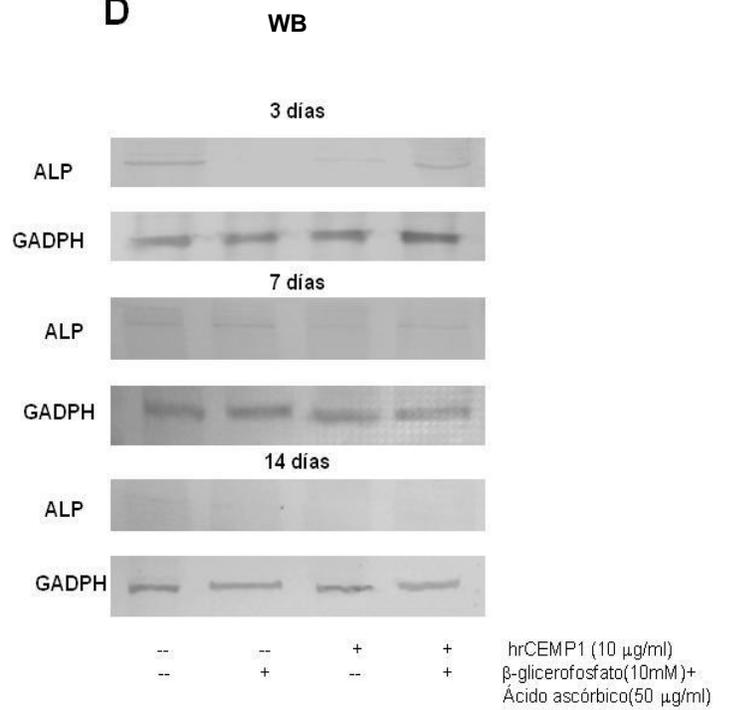
B



C

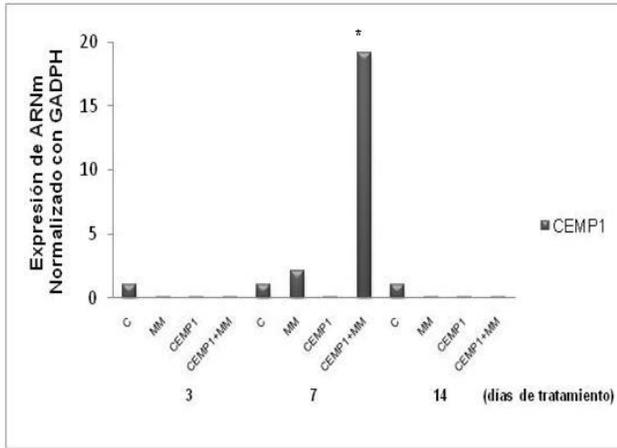


D

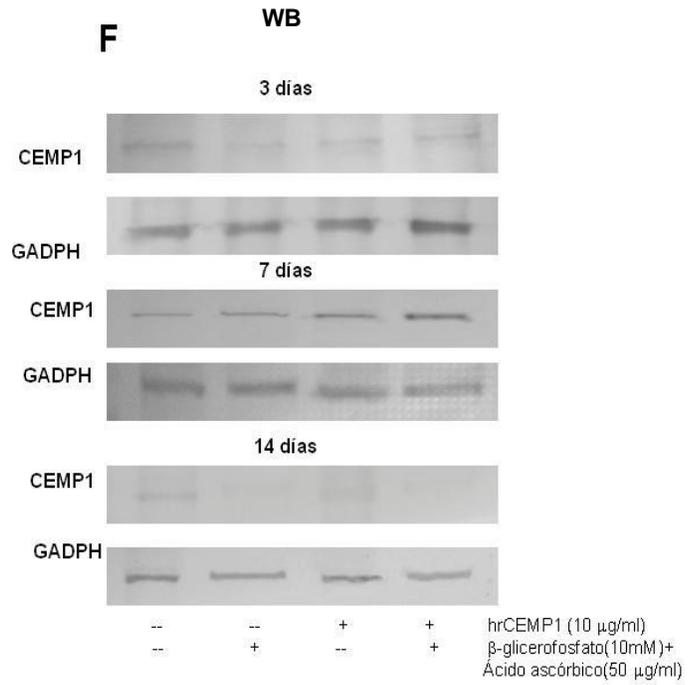




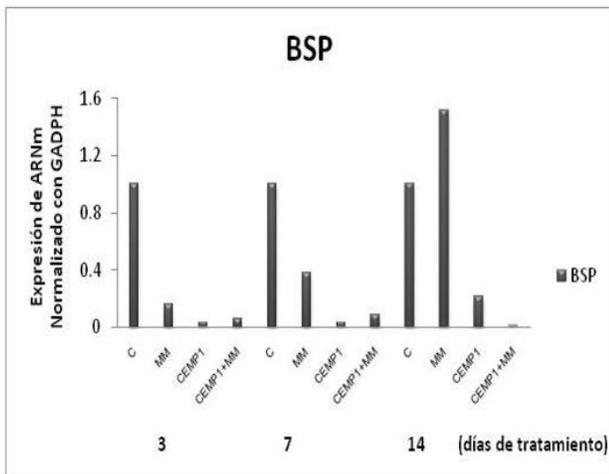
E



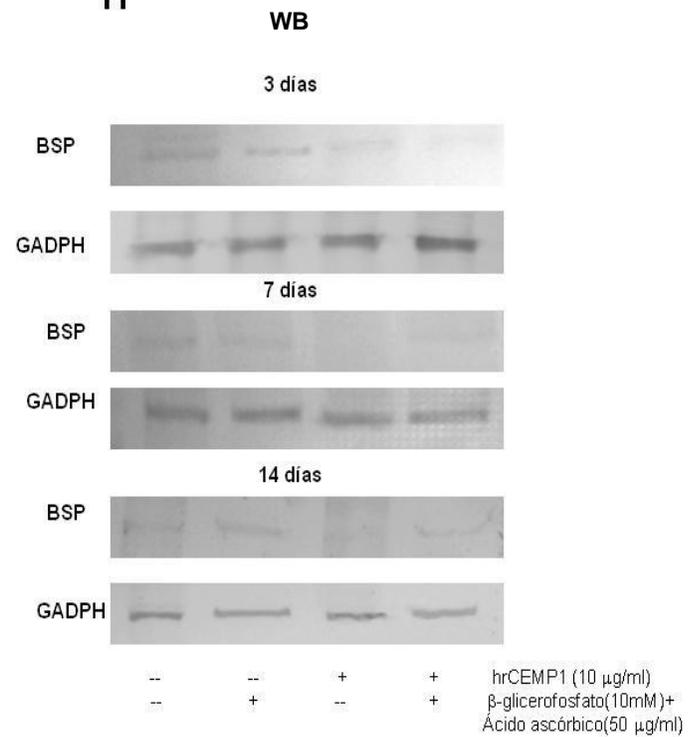
F



G



H



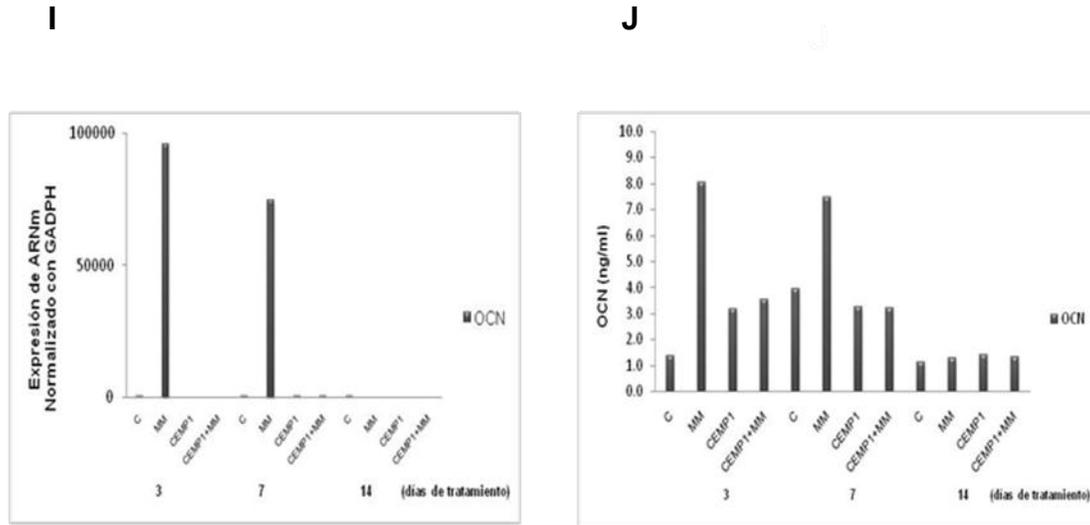


Fig. 5. EFECTO DE hrCEMP1 SOBRE LA EXPRESIÓN DE ARN'S, Y SUS PRODUCTOS GÉNICOS DE LA PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO (CAP), FOSFATASA ALCALINA (ALP), SIALOPROTEÍNA ÓSEA (BSP), OSTEOCALCINA (OCN) Y LA PROTEÍNA DEL CEMENTO 1(CEMP1). A), C), E), G) e I). Las células fueron incubadas en presencia de hrCEMP1 (10 μ g/ml) y/o medio mineralizante durante 3, 7 y 14 días. Se extrajo el ARNm para ensayos de qRT-PCR. El medio se cambio cada tercer día. Las gráficas representan la media de tres experimentos que se realizaron de forma individual. * $p < 0.05$. B), D), F), H) y J) Las células fueron incubadas en presencia de hrCEMP1 (10 μ g/ml) y/o medio mineralizante durante 3, 7 y 14 días y se obtuvieron la proteína totales para ensayos de western blot (B,D,F,H.) y ensayo de Elisa (J). Las células control solo se incubaron con DMEM al 1% SBF.

EFECTO DE hrCEMP1 EN LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE FOSFATASA ALCALINA (ALP).

Se ha demostrado que la fosfatasa alcalina se expresa en células derivadas de cementoblastoma⁶⁵ y la actividad enzimática de esta proteína se asocia a procesos de mineralización^{66, 67}. Para observar la actividad enzimática de fosfatasa alcalina se realizaron experimentos curso temporales a 3, 7 y 14 días en presencia de medio mineralizante y/o la proteína hrCEMP1 en cementoblastos putativos humanos. Nuestros resultados indican que la proteína hrCEMP1 y el medio mineralizante en etapas tempranas promueven la actividad específica de fosfatasa alcalina, sin embargo en etapas tardías se observa un evento contrario, disminuyen significativamente la actividad de esta proteína, indicando que existe una regulación mediada por la hrCEMP1.

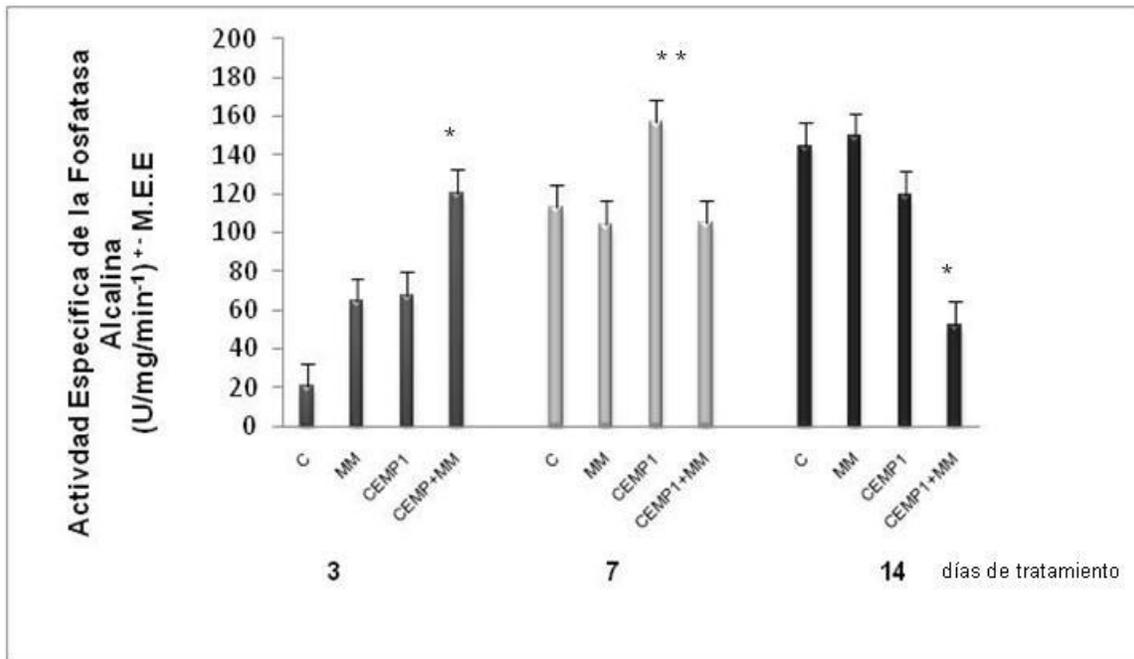


Fig. 6. EFECTO DE hrCEMP1 SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE FOSFATASA ALCALINA. Las células fueron incubadas en presencia de hrCEMP1 (10 μ g/ml) y/o medio mineralizante durante 3, 7 y 14 días. El medio se cambió cada tercer día. Las gráficas representan la media de tres experimentos que se realizaron de forma individual. * $p < 0.001$; ** $p < 0.05$

EFECTO DE hrCEMP1 SOBRE LA FORMACIÓN DE NÓDULOS MINERALIZADOS EN CEMENTOBLASTOS PUTATIVOS HUMANOS.

La regulación en los procesos de mineralización en osteoblastos mediada por p38 ha indicado una función importante de esta vía en dichos eventos^{68, 69}. Para determinar la participación de hrCEMP1 y p38 en la formación de nódulos mineralizados en cementoblastos, se realizaron ensayos durante 3, 7 y 14 días en presencia de la proteína hrCEMP1 y/o el medio mineralizante con y sin el inhibidor SB203580. Los resultados muestran que en presencia del inhibidor de p38 hay un incremento en la formación de nódulos mineralizados dependiente del tiempo. Esto sugiere que hrCEMP1 promueve la formación de nódulos mineralizados no dependiente de p38, ya que al colocar el inhibidor, la formación de estos se ve incrementada, por lo que se evidencia la relación de esta vía en procesos de mineralización en cementoblastos humanos.

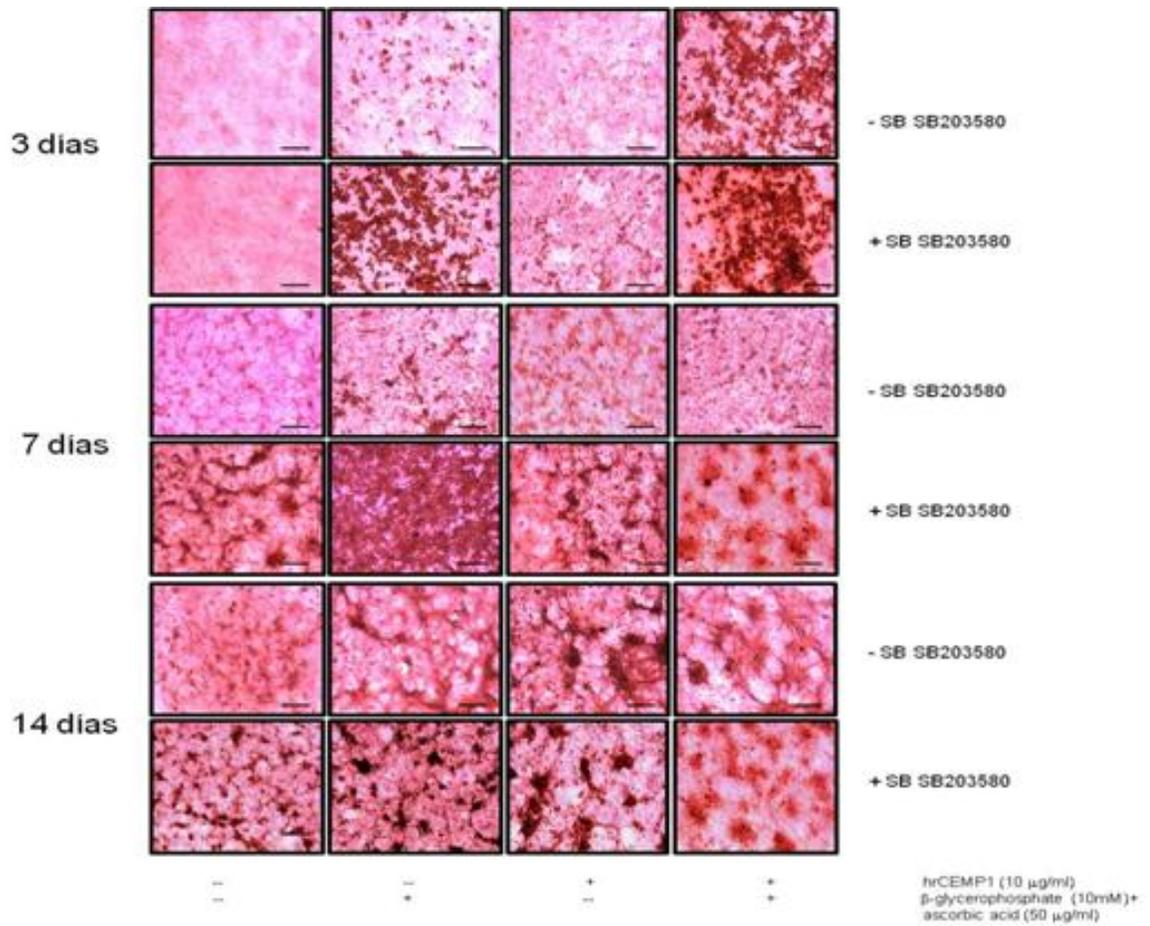


Fig. 7. EFECTO DE SB203580 SOBRE LA FORMACIÓN DE NÓDULOS MINERALIZADOS EN CEMENTOBLASTOS. A) Las células fueron incubadas en presencia de hrCEMP1 (10 µg/ml) y/ o con medio mineralizante durante 3, 7 y 14 días. El medio se cambio cada tercer día. Los experimentos se realizaron por triplicado.

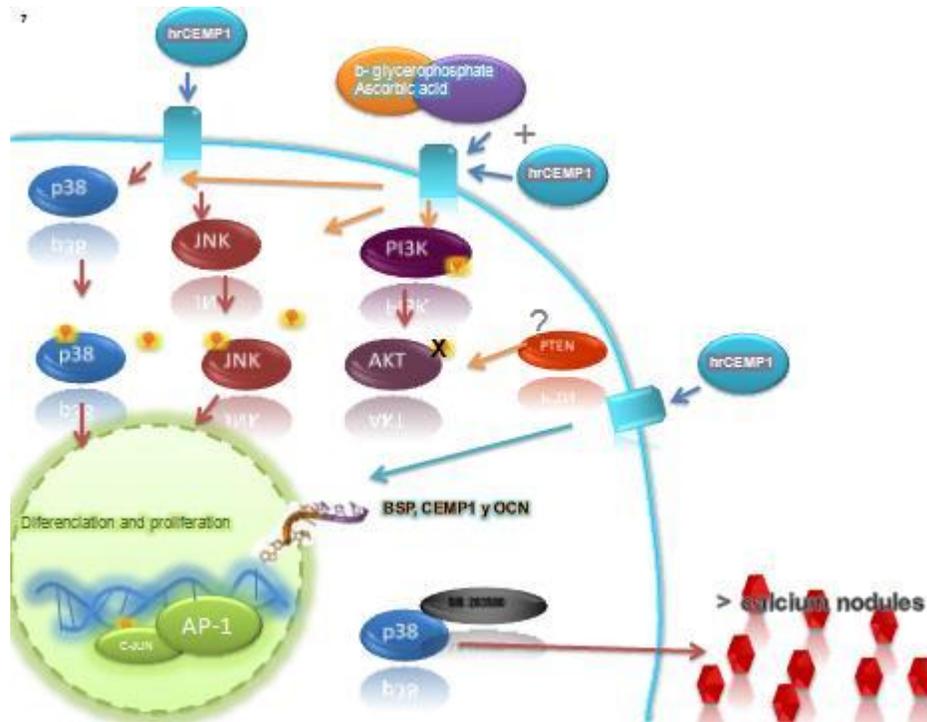


Fig. 8. EFECTO DE hrCEMP1 EN LA ACTIVACIÓN DE LAS MAPK P38, JNK Y LA VÍA DE PI3K. El β-glicerofosfato y el ácido ascórbico, promueven la fosforilación p38, JNK y PI3K. La proteína del cemento 1 recombinante humana se incrementa la fosforilación de las vías de las MAPK y disminuye la activación de cinasas río debajo de la vía de PI3K, indicando una posible regulación de vías y la posible activación de factor de transcripción AP-1. Por otra parte la inhibición de p38 no disminuye la formación de nódulos mineralizados al tratamiento con hrCEMP1.



11. DISCUSIÓN.

Los mecanismos moleculares que regulan la diferenciación celular y la deposición del cemento permanecen poco claros. Se realizó este estudio *in vitro* con la finalidad de mantener las condiciones que promuevan los mecanismos que conduzcan a la diferenciación celular, inducida por hrCEMP1 y tener evidencias del papel que desempeña esta proteína en la activación p38, JNK y las vía de PI3K, las cuales están asociadas a procesos de diferenciación, migración y proliferación celular entre otros. El observar su acción en proteínas asociadas a procesos de mineralización y la relación que existe entre las vías de señalización y los procesos de mineralización en cementoblastos humanos es de gran relevancia.

Se ha reportado que el ácido ascórbico y el β -glicerofosfato, son los suplementos más ampliamente utilizados para inducir la diferenciación osteogénica de diferentes especies, incluyendo células mesenquimales y del ligamento periodontal²⁷. Los mecanismos por los cuales llevan a cabo estas funciones no son totalmente evidenciados, sin embargo, células madre mesenquimales son capaces de diferenciarse en osteoblastos, este mecanismo es mediado por ERK1/2 y PKC⁷⁰. Por otra parte la inactivación de JNK, bloquea la última etapa de los eventos moleculares de la diferenciación de osteoblastos, incluyendo la expresión génica de osteocalcina (OCN) y sialoproteína ósea (BSP). En contraste, los eventos de diferenciación temprana, incluyendo la expresión de la fosfatasa alcalina (ALP) y de osteopontina (OPN) no fueron inhibidas por la inactivación de JNK⁷¹. Estas evidencias sugieren la participación de la vía de la MAPK en procesos de mineralización.

En este estudio observamos que el β -glicerofosfato y ácido ascórbico, promueve la fosforilación de la familia de las MAPK específicamente de la cinasa p38 y JNK y la vía se PI3K, de manera dependiente del tiempo, demostrado que estos osteoinductores promueven la activación de vías asociadas a procesos de proliferación, diferenciación, y sobrevivencia celular. Un dato relevante, es saber que las células que están suplementadas con osteoinductores y que no son de fenotipo mineralizante, no necesariamente mineralizan, esto dependerá del tipo celular y de otros factores que regulen este proceso. Se ha reportado que células endoteliales pueden tener un proceso de mineralización bajo ciertas condiciones patológicas, eventos que fueron inhibidos por factores de crecimiento vía de PI3K y la MAPK Erk⁷². De ahí la importancia de conocer cómo es que CEMP1 puede promover este evento de diferenciación y cuál es la vía implicada, ya que se ha demostrado que células que carecen del fenotipo mineralizante, al transfectarse con el vector que contiene la secuencia para la expresión de esta proteína, modifica su fenotipo y mineralizan¹⁵.



Un evento interesante en el estudio de los mecanismos de transducción intracelular es saber como una célula discrimina la naturaleza del mensaje principal, cuál es la manera por la que los transductores internos que se activan y que parecieran son los mismos en diversos tipos celulares, tienen respuestas completamente distintas entre los diferentes ligandos. En este trabajo demostramos que los osteoinductores activan en cementoblastos, a dos vías de señalización, sin embargo la coestimulación con hrCEMP1, promueve el incremento de solo un mecanismo de transducción para la respuesta celular, en específico de las proteínas p38 y JNK. La acción que provee la proteína hrCEPM1 está marcada por activación de la vía de las MAPK, en etapas tempranas, su efecto sobre p38 es notorio, y de manera continua activa a la cinasa sobre JNK y discrimina totalmente la vía de PI3K la cual se activa por osteoinductores. La razón por la que la activación que desencadena un ligando específico y regula la respuesta de otro, aun permanece poco claro. Un dato que podría dar un panorama más amplio del proceso es que la convergencia de los componentes de la vía de MAPK está determinada por proteínas de andamiaje que permiten la eficiente fosforilación y activación de la vía. La estrecha proximidad de los componentes hace posible integrar las señales entrantes en microambientes localizados. La activación de cinasas intracelulares rio abajo está bajo un estricto control y la acción de las proteínas de andamiaje pareciera tener la respuesta de la regulación en la activación de los mecanismos de transducción⁷³.

Se ha reportado que p38 regula la actividad de la fosfatasa alcalina y la mineralización de nódulos, probablemente mediante la interacción transcripcional de beta-catenina sugiriendo que MAPKs ERK y p38 son probablemente las vías esenciales activadas por proteínas Wnt para el desarrollo de las células mesenquimales en osteoprogenitores⁵⁴. Otros reportes indican que puedes estar activa p38 en etapas tempranas de diferenciación de las células osteoblásticas, esta activación es cAMP-dependiente de PKA y media la expresión de ALP que desempeña un papel crítico para la calcificación de la matriz ósea^{68,69}.

Nosotros demostramos que hrCEMP1 y el medio inductor promueven la activación de p38, demostrando también que la actividad de ALP se incrementa en etapas tempranas de tratamiento y decrece en etapas tardías, y del mismo modo observamos la formación de nódulos mineralizados. La formación de nódulos mineralizados no es dependiente de p38, se observó un incremento en la formación de nódulos al tratamiento con el inhibidor de esta cinasa. Sugiriendo que existe una regulación negativa de esta cinasa en la formación de nódulos mineralizados en cementoblastos.



Se ha reportado que la proteína CAP promueve la expresión de c-fos (proteína que dimeriza con C-JUN para activar al complejo AP1)⁷⁴. En este trabajo se observó también que el medio inductor y hrCEMP1 promueven la translocación de pp38 al núcleo así como la fosforilación de C-JUN componente del factor de transcripción AP-1. Estos datos sugieren que factores de transcripción pueden ser activados por hrCEMP1.

Por otra parte, se ha reportado que CEMP1 induce cambios en el fenotipo de células no mineralizantes, al transfectar el gen de la proteína, induciendo la expresión de OCN, BSP, OPN y ALP¹⁵. Los resultados demuestran un incremento en la expresión de CEMP1 a los 7 días de tratamiento con hrCEMP1 y el medio mineralizante, respecto al control. También observamos que bajo las mismas condiciones la expresión de OCN disminuye al tratamiento con hrCEMP1, y la de BSP incrementa con el medio inductor en etapas tardías, evento que es inhibido por hrCEMP1. Estos datos sugieren que hrCEMP1 regula la expresión de proteínas asociadas a procesos de mineralización en etapas tempranas, intermedias y tardías de tratamiento.



12. CONCLUSION.

Nuestros resultados indican que hrCEMP1 juega un papel importante durante el proceso de diferenciación y mineralización de cementoblastos humanos, mediado por la vía de las MAPK. Conocer los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la regeneración del cemento radicular, así como los mecanismos activos ante los diferentes ligandos presentes en el medio ambiente y la naturaleza de los mismos, los cuales están involucrados en la diferenciación, proliferación y sobrevivencia celular es imperativo. Se propone que las estrategias deberán ser objetivas en el desarrollo efectivo y predecible de la terapéutica periodontal de tal forma que el reto en la regeneración de los tejidos periodontales es la liberación controlada de moléculas promotoras del crecimiento y diferenciación celular sobre la superficie dental, por lo que esta proteína es una alternativa poderosa en el tratamiento de esta enfermedad, así como en aquellas enfermedades asociadas a procesos de mineralización.

Sin embargo es importante evidenciar todos los mecanismos involucrados, relacionados y activados por esta proteína, así como su receptor y su mecanismo de señalización completo en tejidos mineralizados.

El conocer ampliamente los mecanismos moleculares nos provee poderosas herramientas que nos permitan utilizar a esta proteína para lograr la regeneración periodontal.



1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Cho MI, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol* 2000. 2000; 24: 9-27.
2. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol* 2000. 2006; 40: 11-28.
3. Lindhe J, Karring T, Lang N.P. *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. 4ª ed. Ed Panamericana. 2005. Buenos Aires Argentina
4. Loe H, Anerud A, Boysen, Smith M. The natural history of periodontal disease in man. *J. Periodontol Res*. 1978; 49: 553-559.
5. McCulloch C.A. Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontology* 2000. 1993; 1: 16-25.
6. Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, Matsuzaki H, Hashimoto S, Muramatsu T, Shima K, Matsuzaka K, Inoue T. Regulatory Mechanism of Periodontal regeneration. *Microsc Res Tech*. 2003; 60(5): 491-502.
7. Komaki M, Kang M, and Narayanan A.S. Role of Map Kinases p42erk-2 /p44erk-1 in Cementum-derived Attachment-protein-mediated Cell Attachment. *J. Dent Res*. 2000; 79(10):1798-1793.
8. Diekwisch TG. The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol*. 2001; 45(5-6):695-706.
9. Baab DA, Page RC, Morton T. Studies of a family manifesting premature exfoliation of deciduous teeth. *J Periodontol* 1985; 56: 403-9.
10. Pitaru S, McCulloch CAG, Narayanan AS. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodontol Res* 1994; 29: 81-94.
11. Paynter KJ, Pudy G. A study of the structure, chemical nature and development of cementum in the rat. *Anat Rec* 1958;131: 233-51.
12. Arzate H, Jiménez-García L.F, Álvarez-Pérez M.A, Landa A, Bar-Kana I, and Pitaru S. Immunolocalization of a Human Cementoblastoma-conditioned Medium-derived Protein. *J Dent Res*. 2002; 81(8): 541-546.
13. Álvarez-Pérez M.A, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodríguez Carmona B, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein(CP-23). *Bone* 2006; 38: 409–419.
14. 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; 384: 49–54.



15. 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; 358(3): 763-9.
16. Garcia Paula-Silva FW, Ghosh A, Arzate H, Kapila S, Bezerra da Silva L.A, Kapila Y.L. Calcium hydroxide promotes cementogenesis and induces cementoblastic Differentiation of mesenchymal periodontal ligament cell in a CEMP1 and ERK- dependent manner. *Calcif Tissue Int.* 2010; 87: 144-157.
17. Komaki M, Iwasaki K, Sata M, Arzate H, Narayanan A. S, Izumi Y, Morita I. Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *J Cell Physiol.* 2012; 227(2): 649-57.
18. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* 2007; 26: 3100-12.
19. Aouadi M, Binetruy B, Caron L, Le Marchand-Brustel Y, Bost F. Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie.* 2006; 88(9): 1091-8.
20. Huang C, Jacobson K, Schaller MD. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci.* 2004;117 (Pt 20):4619-28.
21. Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J.* 2000; 346 Pt 3: 561-76.
22. Kandel ES, Hay N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res.* 1999; 253(1): 210-29.
23. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68(2): 320-44.
24. Guicheux J, Lemonnier J, Ghayor C, Suzuki A, Palmer G, Caverzasio J. Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Jun-NH2-Terminal Kinase by BMP-2 and Their implication in the Stimulation of Osteoblastic Cell Differentiation. *J Bone Miner Res.* 2003; 18(11): 2060-8
25. Kim E.K, Choi E.J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2010; 1802: 396–405
26. Radcliff K, Tang TB, Lim J, Zhang Z, Abedin M, Demer LL, Tintut Y. Insulin-like growth factor-I regulates proliferation and osteoblastic differentiation of calcifying vascular cells via extracellular signal-regulated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circ Res.* 2005; 4(96): 398-400.



-
27. M. G. Newman, H.H. Takey, P.R. Klokkevold, F.A. Carranza. *Periodontología clínica* 10 ed. Mc Graw Hill 2006
 28. 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; 228(4): 651-63.
 29. Bosshardt DD. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *J Dent Res*. 2005; 84(5): 390-406.
 30. Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontol* 2000. 2000; 24: 73-98.
 31. Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(6):474-84.
 32. 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.
 33. Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999; 10(1): 79-98.
 34. Ogata Y. Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism. *J Periodontal Res*. 2008; 43(2): 127-35.
 35. Johansen IS, Williamson MK, Rice IS, Price PA. Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 501-512.
 36. Butler WT, D'souza RN, Bronckers AL, Happonen RP, Somerman MJ. Recent investigations on dentin specific proteins. *Proc Finn Dent Soc* 1992; 88 (Suppl 1): 369-376.
 37. Thiede MA, Smock SL, Petersen DN, Grasser WA, Thompson DD, Nishimoto 5K. Presence of messenger ribonucleic acid encoding osteocalcin, a marker of bone turnover, in bone marrowmegakaryocytes and peripheral blood platelets. *Endocrinology* 1994; 135: 929-937.
 38. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch* 2010;77 (1)
 39. Foster B.L, Nagatomo K.J, Tso H.W, et al. Tooth root dentin mineralization defects in a mouse model of hypophosphatasia. *J Bone Miner Res*. 2013; 28(2): 271-82.
 - 40 Arzate H, Olson SW, Page RC, Gown AM and Narayanan AS. Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J*. 6: 2990-2995, 1992.
 41. Saito M, Iwase M, Maslan S, Nozaki N, Yamauchi M, Handa K, Takahashi O, Sato S, Kawase T, Teranaka T and Narayanan AS. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone*. 2001; 29(3): 242-8



42. BarKana I, Narayanan A.S., Grosskop A, Savion N. and Pitaru S. Cementum Attachment Protein Enriches Putative Cementoblastic Populations on Root Surfaces in vitro. *J Dent Res* 2000; 79(7): 1482-8
43. Takayoshi Y. and Narayanan A.S. Role of D1 and E Cyclins in Cell Cycle Progression of Human Fibroblasts Adhering to Cementum Attachment Protein. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2001; 16(6): 1062-7
44. H. Arzate, J. Chimal-Monroy, L. Hernández-Lagunas, L. Díaz de León, Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells, *J. Periodont. Res.* 1996; 31: 144–148.
45. M.A. Alvarez Pérez, S. Pitaru, O. AlvarezFregoso, J. Reyes Gasga, H. Arzate, Anticementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line, *J. Struct. Biol.* 2003; 143: 1–13.
46. Hoz L, Romo E, Zeichner-David M, Sanz M, Nuñez J, Gaitán L, Mercado G, Arzate H. Cementum protein 1 (CEMP1) induces differentiation by human periodontal ligament cells under three-dimensional culture conditions. *Cell Biol Int.* 2012 ; 36(2): 129-36.
47. Diercke K, König A, Kohl A, Lux C.J, Erber R. Human primary cementoblasts respond to combined IL-1 β stimulation and compression with an impaired BSP and CEMP-1 expression *European Journal of Cell Biology.* 2012; 91: 402– 412.
48. Seger R. and Kren EG. Mapksignaling cascade. *Faseb J.* 1996; 9: 276-735.
49. Strnisková M, Baraneík M. and Ravingerová T. Mitogen-Activated Protein Kinases and Their Role in Regulation of Cellular Processes *Gen. Physiol. Biophys.* 2002; 21: 231-255
50. Velazquez A, Gariglio P. Possible role of transcription factor AP1 in the tissue-specific regulation of human papillomavirus. *Rev Invest Clin.* 2002; 54(3): 231-42.
51. Khanna-jain R, Agata H, Vuorinen A, K.B Sa'ndor G. Suuronen R, MiettinenS. Addition of BMP-2 or BMP-6 to dexamethasone, ascorbic acid, and b-glycerophosphate may not enhance osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells. *Growth Factors.* 2010; 28(6): 437-46.
52. Temu T.M, Wu K.Y, Gruppuso P.A, Phornphutkul C. The mechanism of ascorbic acid-induced differentiation of ATDC5 chondrogenic cells. *AJP-Endocrinol Metab.* 2010; 299: E325–E334.
53. Ecarot-Charrier B, Glorieux F.H, Van Der Rest M, Pereira G. Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J Cell biol.*1983; 96: 639-643.
54. Caversacio J, Mannen D. Essential role of Wnt3a mediated activation of mitogen activated protein kinase p38 for the stimulation of alkaline phosphatase activity and matrix mineralization in C3H10T1/2 mesenchymal cells. *Endocrinology.* 2007; 148(11): 5323–5330.



55. Tibbles L. A, Woodgett J. R. The stress-activated protein kinase pathways. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 1999; 55: 1230–1254.
56. Kakita A, Suzuki A, Ono Y, Miura Y, Itoh M, Oiso Y. Possible involvement of p38 MAP kinase in prostaglandin E1-induced ALP activity in osteoblast-like cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2004; 70(5): 469-74.
57. Pulverer B.J, Kyriakis J.M, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett J.R. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases, *Nature.* 1991; 353: 670–673.
58. Bogoyevitch M.A. The isoform-specific functions of the c-Jun N terminal Kinases (JNKs): differences revealed by gene targeting. *Bio Essays* 2006; 28: 923–934.
59. Radcliff K, Tang T.B, Lim J, Zhang Z, Abedin M, Demer L.L, Tintut Y. Insulin-Like Growth Factor-I Regulates Proliferation and Osteoblastic Differentiation of Calcifying Vascular Cells via Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase And Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathways. *Circ. Res.* 2005; 96: 398-400.
60. Mukherjee A, Rotwein P. Akt promotes BMP2-mediated osteoblast differentiation and bone development. *J Cell Science* 2009; 122: 716-726.
61. Kapadia R.M, Guntur A.R, Reinhold M.I, Naski M.C. Glycogen synthase kinase 3 controls endochondral bone development: Contribution of fibroblast growth factor 18. *Developmental Biology.* 2005; 285: 496–507.
62. Hauschka PV. Osteocalcin: the vitamin K-dependent Ca²⁺-binding protein of bone matrix. *Haemostasis.* 1986;16(3-4): 258-72.
63. Lian JB, Gundberg CM. Osteocalcin. Biochemical considerations and clinical applications. *Clin Orthop Relat Res.* 1988; 226: 267-91.
64. Arzate H, Olson S.W, Page R.C, Narayanan A.S. Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in culture. *Bone and Mineral.* 1992; 18: 15-30.
65. Arzate H, Alvarez Perez M.A, Narayanan A.S. Cyclosporin A promotes mineralization by human cementoblastoma-derived cells in culture. *J Periodont Res* 2005; 40: 218–224.
66. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch* 2010; 77: 4-12.
67. Sowa H, Kaji H, Yamaguchi T, Sugimoto T, Chihara K. Activations of ERK1/2 and JNK by Transforming Growth Factor Negatively Regulate Smad3-induced Alkaline Phosphatase Activity and Mineralization in Mouse Osteoblastic Cells. *J Biol Chem.* 2002; 277(39): 36024–36031.



-
- 68.** A. Rey, D. Manen, R. Rizzoli, S.L. Ferrari, J. Caverzasio. Evidences for a role of p38 MAP kinase in the stimulation of alkaline phosphatase and matrix mineralization induced by parathyroid hormone in osteoblastic cells. *Bone*. 2007; 41: 59–67.
- 69.** Suzuki A, Guicheux J, Palmer G, Miura Y, Bonjour J.P, Caverzasio J. Evidence for a Role of p38 MAP Kinase in Expression of Alkaline Phosphatase During Osteoblastic Cell Differentiation. *Bone*. 2002; 30 (1): 191–98.
- 70.** Miraoui H, Oudina K, Petite H, Tanimoto Y, Moriyama K, Marie P.J. Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Promotes Osteogenic Differentiation in Mesenchymal Cells via ERK1/2 and Protein Kinase C Signaling. *J Biol Chem*. 2009; 284(8): 4897-4904.
- 71.** Matsuguchi T, Chiba N, Bandow K, Kakimoto K, Masuda A, Ohnishi T. JNK Activity Is Essential for Atf4 Expression and Late-Stage Osteoblast Differentiation. *J Bone Miner Res* 2009; 24: 398–410.
- 72.** Duan X.P, Xie P.L, Ma Y.L, Tang S.Y. Omentin inhibits osteoblastic differentiation of calcifying vascular smooth muscle cells through the PI3K/Akt pathway. *Amino Acids*. 2011; 41(5): 1223-31.
- 73.** Morrison D.K, Davis R.J. Regulation of map kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2003; 19: 91–118.
- 74.** 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.