



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

DEPeI, FACULTAD DE ODONTOLOGÍA.

**EFFECTO BIOLÓGICO DE UN PÉPTIDO DE LA PROTEÍNA DEL CEMENTO 1
(CEMP1) EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DERIVADAS DEL
LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ADRIANA PÉREZ SORIA

TUTOR:

**DR. HIGINIO ARZATE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

México D.F.

Febrero

2015



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.

DEDICATORIA

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por prestarme vida y salud para llegar a este momento. Gracias por darme la fuerza para levantarme de mis propias ruinas y un espíritu indomable capaz de reinventarse y recomenzar incansablemente.

Mis sinceros agradecimientos a la Dra. Elba Rosa Leyva Huerta y el Dr. Higinio Arzate porque gracias a su preocupación y su orientación, yo retomé el anhelado sueño de concretar mi Doctorado, a pesar de las enormes dificultades que se me presentaron en el camino.

Agradezco al Dr Higinio Arzate por haberme procurado un espacio y su tiempo para mi desarrollo profesional, gracias a su persistencia y su rigor académico adquiriré tanto conocimientos como experiencias de vida. Él ha inculcado en mí, un sentido de seriedad, responsabilidad y autonomía que son fundamentales para un investigador completo.

Gracias a mis compañeros de laboratorio y mis amigos, que me han acompañado en cada paso y han asistido mis triunfos y fracasos siempre con un sabio consejo.

Eternos agradecimientos a todos los que forman parte de mi familia, por colmarme de bendiciones, amor incondicional y demostraciones de afecto. A ustedes les debo mi capacidad de mantener los valores y ética que tantos pierden en el camino. Gracias a ustedes me esfuerzo por ser una mejor persona y aprendo que la belleza de la vida va más allá del poder, la belleza o el dinero.

Los días más memorables de mi vida son aquellos en los que todos han creído en mí cuando yo misma me sabía perdida. Me declaro bendecida por tener la oportunidad de disfrutar su compañía, espero hacerlos sentir orgullosos y así retribuirles un poco de lo mucho que ustedes me han obsequiado.

INDICE

Agradecimientos	3
Resumen	5
Abstract	6
INTRODUCCIÓN	7
Tejidos periodontales	7
Terapia periodontal	7
Cemento radicular	9
Composición del Cemento radicular	11
CEMP1 activa la vía de las MAPK	20
CEMP1 expresada en células del ligamento periodontal	21
Péptidos bioactivos	22
Planteamiento y justificación del problema	25
Objetivo	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Síntesis del péptido 1 de CEMP1	26
Cultivo celular	26
Ensayo de proliferación celular	26
Ensayo de citotoxicidad celular	27
Ensayos de la actividad de la fosfatasa alcalina	27
Ensayo de alizarina roja	28
Ensayo de Western blot	28
Ensayo de qRT-PCR tiempo real	29
Ensayo de Western blot para MAPK	30
Análisis estadístico	30
RESULTADOS	31
CONCLUSIONES	50
DISCUSIÓN	51
PERSPECTIVAS	54
TABLAS	55
PUBLICACIÓN	56

RESUMEN

ANTECEDENTES.-El cemento es un tejido especializado que forma parte de los tejidos periodontales, responsables de darle soporte al diente. Resulta crítico idear estrategias para mantener dichos tejidos cuando son afectados por la enfermedad periodontal. Las células del ligamento periodontal humano (hPLC) se han considerado clave para promover la regeneración de los tejidos periodontales. La proteína del Cemento 1 (CEMP1) es responsable del compromiso celular hacia el linaje cementoblástico/osteoblástico, promoviendo la proliferación y diferenciación de las células hPLC mediante la activación de la cinasa ERK1/2. Los péptidos son ampliamente utilizados para inducir respuestas celulares. La identificación de un péptido que emule las funciones de CEMP1 y que pueda ser aplicado a un proceso inductivo de mineralización en un sistema de células, permitirá contemplar nuevas estrategias para promover la cementogénesis.

OBJETIVO.-Determinar el efecto biológico de un péptido de la proteína del Cemento 1 (CEMP1p1) en las células derivadas del ligamento periodontal humano (hPLC), *in vitro*.

MATERIALES.-Las células hPLC se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). Se determinaron los controles positivos, negativos y los experimentales donde se probaron diferentes concentraciones de CEMP1p1. Con el ensayo de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) se determinó la dosis efectiva. Los ensayos para diferenciación celular incluyeron: la tinción de alizarina roja, qRT-PCR tiempo real, Western blot y la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) a 3,7 y 14 días de cultivo (ensayos por triplicado). Por último, se realizó un curso temporal a tiempos cortos y largos para determinar los estados de fosforilación de las cinasas ERK 1/2 y p38.

RESULTADOS.-El péptido de CEMP1 promueve la proliferación de las hPLC e induce la diferenciación a nivel transcripcional y traduccional hacia un fenotipo mineralizante; también aumenta la actividad de ALP y la formación de nódulos de calcio a través de la fosforilación de MAPK cinasas.

CONCLUSIONES.-CEMP1p1 es biomimético de algunas funciones antes descritas para la proteína recombinante completa CEMP1.

Proyecto financiado por: DGAPA-PAPIIT:IT200414, CONACyT 224081.

ABSTRACT

BACKGROUND.-Cementum is an specialized connective mineralized tissue. Cementum seems to be critical to achieve the regeneration of the periodontal structures lost due periodontal disease. Human periodontal ligament cells (hPLC), contain heterogeneous cell subpopulations and mesenchymal stem cells that might be involved in the periodontium homeostasis and regeneration of the periodontal tissues. However, cementum proteins such as Cementum protein 1 (CEMP1) has been shown to play a key role on human periodontal ligament cells and their commitment to cementoblast/osteoblast lineages, through promoting the proliferation and differentiation of hPLC cells by ERK1/2 kinase activation. Nowadays peptides are widely used to induce cellular responses. The identification of a CEMP1 mimic peptide, applied on mineralization inductive processes will allow us to consider new strategies for promote cementogenesis.

OBJECTIVE.-To determine the effect of a CEMP1 peptide on the differentiation of hPLC cells *in vitro* through ERK1/2 and p38 MAP kinases activation.

MATERIALS.-The hPLC cells were cultured in DMEM medium. The positive and negative controls were determined and the experimental group was stimulated with different concentrations of CEMP1 peptide. MTT assay was performed and the effective dose was determined. Differentiation tests were performed; they included alizarin red staining, qRT-PCR real time and Western blotting for BSP, CAP, CEMP1, AMEL and AMBN, and activity of alkaline phosphatase, every assay was measured on 3, 7 and 14 days of culture (triplicate assays). Time course was also performed at short and long times and Western blotting to determine the phosphorylation of ERK 1/2 and p38 kinases.

RESULTS.-CEMP1 peptide promotes proliferation of hPLC and induces differentiation at transcriptional and translational level toward a mineralizing phenotype; also increases the ALP activity and calcium nodule formation through phosphorylation of MAPK kinases.

CONCLUSIONS.-CEMP1p1 shows to be biomimetic for the functions before described for the whole CEMP1 recombinant protein.

Supported by: DGAPA-PAPIIT:IT200414, CONACyT 224081.

INTRODUCCIÓN

TEJIDOS PERIODONTALES

Los tejidos periodontales se dividen en 2: tejidos duros que son hueso alveolar y cemento radicular y 2 tejidos blandos que incluyen encía y ligamento periodontal. El conjunto de tejidos dan soporte estructural y recubren la porción radicular de los órganos dentarios. Los 4 tejidos son diferentes en su composición celular, actividad metabólica y grado de mineralización (Mariotti 1993). El correcto funcionamiento del periodonto solo se logra a través de mantener la integridad estructural y una interacción coordinada (Melcher 1976) (Nanci & Bosshardt 2006).

La destrucción de los tejidos periodontales puede estar asociada a eventos, tales como infecciones, traumatismos, movimientos de ortodoncia, enfermedades sistémicas, factores genéticos, entre otros. En la enfermedad periodontal, la presencia de bacterias en la superficie de los dientes inducen una respuesta inflamatoria crónica, el huésped monta una respuesta inmune para eliminar el reto microbiano teniendo como resultado la destrucción de células del huésped que normalmente cubren la superficie de la raíz, la migración apical del epitelio de la mucosa oral y la pérdida de tejidos periodontales como el cemento, el ligamento periodontal y el hueso alveolar. En el huésped, los tejidos periodontales dañados secretan factores de crecimiento y citocinas que promueven inflamación y también intentos de reparación, la misma táctica es la que se aplica en el tratamiento periodontal (Goldstein, Brayer, & Schwartz 1996).

TERAPIA PERIODONTAL

Las terapia clínica actual utiliza técnicas de raspado y alisado radicular o acondicionamiento de tejidos, como una estrategia para aumentar la migración de células mesenquimales y el apego a la superficie radicular expuesta. El tratamiento con ácido cítrico, se ha encontrado útil para ensanchar la luz de los túbulos dentinarios, acelerando

la cementogénesis y la aposición del cemento (Mariotti 2003). También se han desarrollado estrategias para conducir la regeneración (regeneración tisular guiada) utilizando membranas reabsorbibles (Miller & Craddock 1996) (Murphy & Gunsolley 2003) (Al-Hamdan et al. 2003), o injertos óseos (Reynolds et al. 2003). Éste tratamiento resulta eficaz, pero no son predecibles y no restablecen por completo la arquitectura del periodonto original.

A medida que aumenta nuestra comprensión de la estructura, la función y la composición de los tejidos periodontales, también se desarrollan nuevas estrategias para la regeneración periodontal, actualmente, enfatizando el uso de moléculas derivadas de los propios tejidos periodontales. Un ejemplo de ello ha sido el uso de proteínas del esmalte para inducir la formación de cemento y de hueso, promoviendo así la regeneración de los tejidos periodontales. (Gestrelus, Andersson, Johansson, et al. 1997) (Gestrelus, Andersson, Lidstrom, et al. 1997) (Hammarstrom, Heijl, & Gestrelus 1997) (Hammarstrom 1997) (Heijl 1997) (Hirooka 1998). Hace varios años, se ha comercializado un producto que consiste en una preparación de proteínas de esmalte porcino, conocido en el mercado con el nombre de Emdogain, y utilizado de forma general por los Cirujanos Dentistas (Esposito et al. 2004) (Gestrelus, Lyngstadaas, y Hammarstrom 2000) (Giannobile y Somerman 2003) (Kalpidis y Ruben 2002) (Zeichner-David 2001) (Zeichner-David et al. 2006), los estudios sugieren que la acción clínica es el resultado de la contaminación con factores de crecimiento tales como factor de crecimiento transformante beta (Kawase et al. 2002) (Nagano et al. 2006) y las proteínas morfogenéticas del hueso (Iwata et al. 2002). Sin embargo, en los estudios en los que se han utilizado Amelogenina y Ameloblastina han mostrado que éstas proteínas tienen propiedades de señalización que inducen cambios fenotípicos en las células dependiendo de la célula diana (Boabaid et al. 2004) (Viswanathan 2003) (Zeichner-David 2001) (Zeichner-David et al. 2006).

En los últimos 20 años de investigación se han visto enormes avances en el conocimiento de los eventos celulares y moleculares implicados en el proceso de desarrollo del periodonto. Este conocimiento se ha traducido a nuevas estrategias terapéuticas para la regeneración periodontal utilizando enfoques moleculares (Froum 2002) (Grzesik y Narayanan 2002) (King 2001) (King 2001) (King & Cochran 2002) (Lamster 2001) (Nakashima y Reddi 2003) (McCauley y Nohutcu 2002) (Oringer 2002) (Tozum y Demiralp 2003) (Wikesjo et al. 2004) (Zeichner-David et al. 2006). En estas estrategias se incluyen el uso de factores de crecimiento, el factor de crecimiento derivado de plaquetas y los

factores de crecimiento derivados de la Insulina (Cho, Lin, y Genco 1995) (Giannobile, Finkelman, y Lynch 1994) (Howell et al. 1997) (Park et al. 1995) (Lynch et al. 1991) (Rutherford et al. 1993) (Wang et al. 1994), factor de crecimiento transformante beta (Matsuda et al. 1992), proteínas morfogenéticas del hueso, factor de crecimiento de fibroblastos (Selvig et al. 1994), dexametasona (Rutherford et al. 1993) (King, King, y Hughes 1998) (Kuboki et al. 1998) (Oda et al. 1997) (Ripamonti y Reddi 1994) (Ripamonti et al. 1996) (Ripamonti 2006) principalmente. Sin embargo, la aplicación de estos factores para la reparación periodontal es inespecífica y tienen una rápida pérdida del efecto debido a que los factores son de aplicación tópica (Lynch et al. 1991) (Beertsen 1997).

Para lograr la reparación completa y la regeneración parece necesario imitar el proceso de desarrollo normal del cemento, hueso y ligamento periodontal. De particular importancia es la regeneración del cemento, un sistema altamente sofisticado y complejo que tiene relación estrecha con los otros tejidos periodontales. Podemos decir que el papel funcional importante del cemento es la de servir como estructura para la fijación de las fibras de Sharpey del ligamento periodontal (Ripamonti 1994) (Ripamonti et al. 1996) (Ripamonti 2006). Como el cemento es una matriz rica en factores de crecimiento podría tener influencia en las actividades de diversos tipos celulares y se intenta evaluar su utilidad potencial para la regeneración de las estructuras periodontales de una manera terapéutica predecible.

CEMENTO RADICULAR

Introducción

Los estudios sobre el cemento dental se remontan a Malpighi en los años 1600. El cemento radicular es un tejido conectivo calcificado y especializado que cubre la superficie radicular de los órganos dentarios, tiene funciones como proveer el anclaje del diente a su alveolo, distribuir las fuerzas masticatorias, mantener el espacio del ligamento periodontal, así como mantener una constante relación oclusal. Es un tejido que estructuralmente se encuentra relacionado con las fibras del ligamento periodontal (fibras de Sharpey) y a través de éste, con el hueso alveolar para conformar los tejidos periodontales, responsables de darle soporte al diente (Page et al. 1978).

Se ha demostrado que la formación del cemento es un requisito indispensable para el desarrollo y regeneración de las estructuras periodontales. Al ser un tejido de interface

entre la dentina y el ligamento periodontal, resulta indispensable para la reparación de la superficie radicular. Por lo tanto, la integridad del cemento es indispensable y la pérdida de éste tejido se traduce en enfermedad periodontal (Page et al. 1978), lo cual conlleva a la pérdida dental y a un deterioro en la calidad de vida de las personas.

El cemento radicular, posee características que lo distinguen como un tejido único, ya que tiene un recambio metabólico bajo, no cuenta con aporte sanguíneo directo, inervación, drenaje linfático ni espacios medulares como el hueso alveolar. A pesar de los avances en biología celular y molecular continúa siendo un tejido pobremente estudiado y escasamente definido (Page et al. 1978).

Origen histológico del cemento

Algunos autores, basados en que las poblaciones de cementoblastos son fenotípicamente diferentes defienden la posibilidad de que el cemento acelular y celular tienen un origen de desarrollo diferente (Lang et al. 1995). Es ampliamente aceptado que células infiltradas del folículo dental reciben una señal inductora de la dentina en formación y se diferencian a cementoblastos.

Sin embargo, hay evidencia de que las células de la vaina epitelial de Hertwig pueden atravesar una transformación epitelio-mesénquima hacia cementoblastos durante el desarrollo como ocurre en la cresta neural, el esclerotoma, los cojines de mesénquima cardíaca y el borde de fusión de los procesos palatinos (Bosshardt 1997). Algunos estudios recientes sugieren que células de la vaina epitelial de Hertwig tienen una transformación epitelio-mesénquima hacia fibroblastos y cementoblastos, que depositan cemento acelular y celular respectivamente. Mientras que otros, señalan la posibilidad de la existencia de dos tipos de cementoblastos: los que derivan de células de la vaina epitelial de Hertwig que producen el cemento acelular de fibras extrínsecas, y cementoblastos derivados del folículo dental (cresta neural) producirían el cemento celular de fibras intrínsecas (Zeichner-David et al. 2003).

Clasificación del cemento

Se clasifica en celular y acelular dependiendo de la presencia o ausencia de cementocitos en su estructura. Otra clasificación incluye cemento de fibras intrínsecas o extrínsecas,

dependiendo de la presencia de fibras de colágeno formadas por cementoblastos o por fibroblastos.

Morfológicamente e histológicamente, se presentan diferencias a lo largo de la raíz dental, lo que lleva a clasificar el cemento en 3 tipos: cemento intermedio o acelular afibrilar (que se encuentra en la unión cemento-esmalte), cemento acelular (que se encuentra en la región coronal y media de la raíz) y el cemento celular (presente en las partes apicales e inter-radiculares) (Bosshardt & Schroeder 1993) (Cho 2000) (Harrison & Roda 1995) (Saygin 2000) (Schroeder 1992).

Cemento acelular afibrilar: recubre áreas pequeñas de esmalte, particularmente a lo largo de la unión cemento-esmalte, sus componentes principales son glucosaminoglicanos, y aun no se conoce su función específica.

Cemento acelular de fibras extrínsecas (o cemento primario) se encuentra principalmente en las porciones cervical y media de la raíz, recubre del 40% al 70% de la superficie radicular, su extensión apical incrementa, de los dientes posteriores a los anteriores. Realiza la función exclusiva de anclar la raíz al ligamento periodontal. Su matriz consiste en franjas densas de fibras cortas de Colágena que se implantan dentro de la matriz de la dentina y se orientan de forma perpendicular a la superficie radicular. El cemento acelular de fibras extrínsecas tiene el potencial de adaptarse a alteraciones funcionales como en los movimientos ortodónticos.

Cemento celular de fibras intrínsecas (o cemento secundario) contiene cementocitos embebidos en una matriz intrínseca de fibras de Colágena, las cuales están orientadas en su mayoría paralelamente a la superficie radicular y se dirigen de forma circular alrededor de la raíz. Este tipo de cemento se encuentra en la zona de furca, en la porción apical, en antiguas lagunas de reabsorción y en sitios de fractura radicular (Thomas 1995) (Zeichner-David et al. 2006). Tiene un papel importante como tejido adaptativo que mantiene al diente en su posición y también participa en el proceso de reparación aunque no tiene una función inmediata en el anclaje del diente (Beertsen 1997).

Se ha agregado recientemente a la clasificación el cemento celular de tipo mixto estratificado: que recibe este nombre cuando las fibras extrínsecas atraviesan y se entremezclan con las fibras intrínsecas del cemento.

COMPOSICIÓN DEL CEMENTO

Acerca de la composición de la matriz extracelular del cemento, se puede decir que es similar a la del hueso, consta de un 50% de materia inorgánica principalmente hidroxiapatita y 50% de materia orgánica la cual se compone de proteínas como Colágena tipo I (90%), y las tipo III y XII en cantidades considerablemente menores (Cho 2000) (Alvarez-Perez 2006). También forman parte de la materia orgánica los proteoglicanos asociados principalmente a los cementoblastos y a los cementocitos y se han localizado otras proteínas en el cemento acelular como Versican, Fibromodulina, Lumican, Sindecan-2 y se ha visto actividad de fosfatasa alcalina (ALP), un indicador valioso de desarrollo y diferenciación de cartílago, hueso y cemento (Groeneveld, Everts & Beertsen 1995), además de otras proteínas cemento-específicas.

Las proteínas no colágenas, también presentes en el hueso, incluyen a la Sialoproteína ósea (BSP), proteína de matriz dentinaria-1 (DMP-1), Sialoproteína dentinaria, Fibronectina, Osteocalcina (OCN), Osteonectina (ONT), Osteopontina (OPN), Tenascina (Bartold & Narayanan 2006) y factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento derivado del cemento (CGF), incluso se ha reportado la presencia de proteínas del esmalte como Amelogenina (AMEL), Ameloblastina (AMBN) y Enamelina (ENAM) (Saygin 2000) (Zeichner-David et al. 2006), principalmente en la región cervical del órgano dentario (Nanci & Bosshardt 2006). Todas las proteínas mencionadas constituyen la porción orgánica no colágena del cemento radicular y participan en funciones como adhesión celular, migración, proliferación y síntesis protéica (Zeichner-David et al. 2006).

El análisis de las proteínas expresadas por los cementoblastos no había dado como resultado la identificación de proteínas específicas para este tejido (Saygin 2000), actualmente se reportan dos proteínas cemento específicas la proteína de adhesión del cemento (CAP) y la proteína del cemento 1 (CEMP1).

A continuación se describirán brevemente las características de las proteínas que integran la matriz orgánica del cemento.

PROTEÍNAS NO COLÁGENAS

Glucosaminoglucanos

Además de glucosaminoglucanos, un grupo heterogéneo de glicoproteínas donde las cadenas de carbohidratos de los glucosaminoglucanos existen como repeticiones de disacáridos en los cuales uno de los dos azúcares es siempre la N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina. Todos los glucosaminoglucanos con excepción del ácido hialurónico tienen azúcares sulfatados, y la presencia de grandes cantidades de grupos carboxilo y sulfato hacen de estos polímeros moléculas fuertemente ácidas. Los principales glicosaminoglucanos presentes en el cemento humano son el ácido hialurónico, sulfato de dermatan y sulfato de condroitina, y su distribución parece ser bastante diferente de la reportada para los tejidos blandos, tales como el tejido conectivo gingival y ligamento periodontal, en la que predomina el dermatán sulfato (Bartold et al. 1988) (Pearson & Gibson 1982). El porcentaje de ellos es alta en tejidos sometidos a fuerzas de compresión, como sucede en el cemento.

Proteoglicanos

El contenido de proteoglicanos en tejidos mineralizados es relativamente bajo. Los proteoglicanos se sabe que interactúan específicamente con proteínas colágenas en una variedad de tejidos y aunque el cemento acelular no contiene proteoglicanos, la formación inicial de cemento acelular requiere de una densa acumulación de proteoglicanos (Yamamoto et al. 2004). De manera interesante, estas proteínas se localizan predominantemente en el cemento no mineralizado (precemento y el área periférica al cementocito), lo que sugiere que desempeñan importantes funciones de regulación durante la mineralización del cemento (Cheng et al. 1996). Se postula que los proteoglicanos en el cemento son componentes integrales de matrices, median la unión entre el cemento viejo y recién formado, creando las denominadas: líneas incrementales del cemento (Scott 1980) (Vogel, Paulsson & Heinegard 1984). En casi todas las especies de mamíferos el número de líneas incrementales en el cemento dental (anillos del cuerpo) pueden ser correlacionadas con la edad, por lo que se ha utilizado en la arqueología y en la medicina forense para determinar edad biológica de fósiles y cadáveres.

Sindecanos

Syndecan-2 ha sido encontrado significativamente expresado por las células en estrecho contacto con la superficie radicular y dentro de la matriz de cemento reparador, lo que sugiere que debe estar asociada con las interacciones célula-matriz durante la mineralización de cemento (Worapamorn et al. 2002). Además, las proteínas: lumican,

decorina, biglicano y versican están asociadas con la formación de cemento celular, pero no de cemento acelular, lo que sugiere diferentes subpoblaciones de cementocitos o una respuesta diferencial de estas células (Ababneh, Hall & Embery 1999).

PROTEÍNAS MINERALIZANTES

Sialoproteína ósea

El cemento contiene muchas proteínas no colágenas, incluyendo algunas fosfoproteínas importantes como Osteopontina y Sialoproteína ósea. Estas dos proteínas son ácidas: Osteopontina tiene un poli-Asp, mientras que Sialoproteína contiene dos dominios de poli-Glu, las secuencias repetitivas tienden a unir calcio a las superficies minerales, por lo que estas proteínas son necesarias para la iniciación de la formación de cristales y juegan un papel importante en el llenado de los espacios creados durante el montaje de colágeno. Estas proteínas participan en la regulación de la nucleación y el crecimiento de cristales de hidroxiapatita.

Ambas cuentan con residuos de aminoácidos arginina-glicina-aspártico (secuencias RGD) (Sodek, Ganss & McKee 2000) que se les ha asociado con propiedades de fijación de células (Oldberg, Franzen & Heinegard 1988). Se une fuertemente a la hidroxiapatita y actúa con una gran especificidad, por tal razón se reconocen como potentes nucleadores para la formación de cristales de hidroxiapatita *in vitro* teniendo una asociación espacial precisa con agregados minerales en etapas tempranas (Hunter 1993).

Se ha sugerido que la Sialoproteína modula el proceso de cementogenesis y está implicada en el proceso de quimiotaxis, adhesión y diferenciación de precementoblastos (MacNeil & Somerman 1993) (Macneil et al. 1994) (MacNeil et al. 1995) (Somerman et al. 1991). Tanto la Sialoproteína como la Osteopontina desempeñan un papel durante la diferenciación de las células progenitoras hacia cementoblastos (Saygin 2000).

Fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina se ha estudiado por más de 80 años y se cree que juegan un papel importante en la mineralización ósea. Es una glicoproteína unida a la membrana que trabaja como enzima a pH alcalino, hidrolizando los grupos fosfato e inhibiendo la pirofosfatasa. Se expresa en la mayoría de los sitios del cuerpo durante el desarrollo embrionario, pero en la vida adulta es confinado a los linfocitos B, huesos, riñones e hígado. El hecho de que se expresa en los tejidos no mineralizados sugiere que tiene otras funciones además de los asociados con la mineralización. La fosfatasa alcalina es altamente expresado en células del ligamento periodontal (Gibson & Fullmer 1967) (Halackova, Oudran & Kukletova 1980) (Itoiz et al. 1969) (Marikova & Kindlova 1972) (Nojima et al. 1990) (Yamashita, Sato & Noguchi 1987), donde se cree que desempeñan un papel en el metabolismo del fosfato (Beertsen, Van den Bos & Everts 1990), de forma particular participa en la formación de cemento acelular (Beertsen & Everts 1990) (Groeneveld, Everts & Beertsen 1995).

En ratones deficientes de Fosfatasa se ha visto una formación defectuosa de cemento acelular, mientras que no se han observado defectos en el hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento celular, lo que sugiere que la fosfatasa alcalina es esencial para la formación de cemento acelular. Sin embargo, las observaciones en seres humanos con hipofosfatasa, resultado de mutaciones en el gen de la fosfatasa alcalina c, reveló que la formación del cemento es casi completamente abolida, tanto para el cemento acelular como para el celular, resultando en la pérdida prematura de dientes (Beertsen, VandenBos & Everts 1999).

Una de las principales funciones de la fosfatasa alcalina es hidrolizar el pirofosfato inorgánico, éste último resulta ser un potente inhibidor de la formación de hidroxapatita (Terkeltaub 2001) por lo tanto de los procesos de mineralización que la involucren. Específicamente, los cementoblastos son sensibles a los niveles de pirofosfato inorgánico/fosfato inorgánico dentro de la matriz extracelular (Nociti et al. 2002). Los cambios en estos niveles tienen un efecto significativo sobre la función de los osteoblastos, y por consiguiente tienen efecto directo sobre la mineralización de la matriz, lo que indica que la fosfatasa alcalina desempeña funciones biológicas claves para favorecer la mineralización del hueso y el cemento (Hough et al. 2007).

Proteínas del esmalte

Slavkin y Boyde, propusieron la hipótesis de que algunas proteínas del esmalte pueden iniciar la formación de cemento acelular. Para demostrar lo anterior, se utilizaron Amelogenina y Enamelina, proteínas de 72 y 26 kDa, respectivamente. Ambas proteínas son secretadas por células de la vaina radicular epitelial de Hertwig. Se ha demostrado que la Ameloblastina, proteína asociada al esmalte, se expresa en las células epiteliales que cubren la primera capa de dentina no mineralizada de la raíz, y se ha localizado una señal fuerte en las células del cemento celular conocidas como los restos epiteliales de Malassez así como en células localizadas coronalmente en la superficie de la raíz, área de localización del cemento acelular (Slavkin et al. 1989) (Fong 1996) (Fong 1996). Sin embargo, la presencia de las proteínas del esmalte, especialmente amelogeninas, durante el desarrollo de la raíz ha sido objeto de controversia. Algunos investigadores informaron sobre la expresión de amelogeninas por las células apicales de la vaina epitelial de Hertwig, que segrega pequeñas cantidades de amelogeninas durante la diferenciación temprana de desarrollo de la raíz (Janones, Massa & Arana-Chavez 2005), mientras que otros no detectaron la expresión de Amelogenina en estas células (Luo, Slavkin & Snead 1991), pero sí de Ameloblastina (Zeichner-David et al. 2003).

Los nuevos enfoques terapéuticos, utilizan compuestos derivados de la matriz del esmalte para lograr la regeneración periodontal, basado en la suposición de que las proteínas de la matriz del esmalte sintetizadas por las células de la vaina epitelial de Hertwig podrían desencadenar la diferenciación de las células del folículo hacia cementoblastos. Sin embargo, algunos sugieren que el tejido formado aunque si es similar al cemento celular también lo es al hueso (Bosshardt & Nanci 2004) (Bosshardt et al. 2005) y además, estas proteínas se han visto expresadas en todos los tejidos mineralizados.

PROTEÍNAS CEMENTO ESPECÍFICAS

La matriz extracelular de todos los tejidos mineralizados comparte gran similitud, sin embargo tienen diferentes propiedades funcionales que los hacen únicos. Estas propiedades podrían ser el resultado de las diferencias cuantitativas y/o cualitativas entre sus componentes. Durante años se creyó que los diferentes tejidos mineralizados contienen moléculas específicas que no están presentes en ningún otro tejido (es decir, Amelogenina en esmalte, Osteopontina en hueso, etc) y que podrían ser consideradas como marcadores para esos tejidos. Conforme las técnicas de detección se hicieron más sensibles, se encontró que muchas de estas moléculas también se expresaron en otros

tejidos, aunque en concentraciones considerablemente menores, y por lo tanto aún podrían ser considerados marcadores específicos de algún tejido. Dentro de ésta categoría entran las proteínas cemento-específicas CAP y CEMP1, que han sido aisladas de cemento y caracterizadas.

Proteína de adhesión del cemento (CAP)

CAP es una proteína cemento específica que se extrajo de cemento humano y bovino, tiene una movilidad relativa de 56 KDa. CAP ha mostrado promover varias actividades biológicas como la adhesión celular, quimiotaxis, diferenciación, así como la expresión de fosfatasa alcalina (McAllister et al. 1990) (Arzate et al. 1992) (Alvarez Perez 2003). Es una proteína parecida a la Colágena, que tiene una homología parcial con las colágenas tipo I y XII, sirve como marcador de progenitores cementoblásticos putativos del ligamento periodontal humano adulto, y tiene la capacidad de regular la capacidad de diferenciación de estos progenitores *in vitro* (Liu et al. 2013). CAP parece relacionarse inmunológicamente con CEMP1, ya que los anticuerpos monoclonales contra CAP tienen reacción cruzada con la proteína CEMP1 (70 kDa). Se ha reportado a CAP con un peso molecular de 65 kDa en el germen dental en desarrollo (Arzate et al. 2002) (Alvarez-Perez et al. 2005). CAP se une con alta afinidad a la Fibronectina e hidroxapatita pero no a colágenas, la actividad de adhesión celular es selectiva para los diferentes tipos celulares (fibroblastos, osteoblastos, células de músculo liso y células endoteliales, pero no a células epiteliales). Las células óseas migran y se adhieren mejor a superficies cubiertas con CAP que las células del ligamento periodontal y a su vez estas lo hacen mejor que los fibroblastos gingivales. Un patrón similar se observa al evaluar la capacidad de CAP de unirse a estas líneas celulares (Liu et al. 2013). Las células que tienen mayor capacidad de unirse a CAP, forman tejidos mineralizados. CAP podría participar en el reclutamiento de células formadoras de cemento putativas del periodonto y participar en la diferenciación cementoblástica (Komaki 2012).

Proteína del cemento 1 (CEMP1)

La proteína del cemento fue aislada de un cementoblastoma humano (Arzate 1996) (Arzate 1998) (Arzate et al. 2002). El gen se encuentra en el brazo corto del cromosoma 16 (16p13.3). El producto final se compone de 247 aminoácidos, el peso molecular estimado es de 26 kDa y sufre intensas modificaciones post-traduccionales que puede elevar su peso molecular hasta 50kDa.

El análisis teórico de las modificaciones post-traduccionales dio como resultado la detección de sitios teóricos de N-glicosilación y fosforilación.

El análisis *in silico* de CEMP1 muestra dos sitios candidatos sufrir modificaciones de tipo N-glicosilación, (asparagina-X-serina) en los aminoácidos 20 y 25, lo que coincide con el cambio de tamaño de la proteína de Mr 50.000 a una proteína de Mr 39.000. El papel que desempeña la unión de hidratos de carbono a CEMP1 es desconocido; sin embargo, se sabe que las glicosilaciones pueden afectar la función de una proteína y podrían estar relacionadas con el proceso de mineralización porque su superficie aniónica puede unirse a un gran número de iones Ca^{2+} y regular así el crecimiento de cristales de hidroxapatita (Chen & Boskey 1985). Los glicanos también están implicados en la regulación de la osificación endocondral, el remodelado óseo y la reparación de fracturas (Grzesik et al. 2002). También se han identificado en CEMP1 sitios susceptibles de fosforilación, y se cree que es una proteína fosforilada porque los anticuerpos contra fosfoserina y fosfotreonina entrecruzan con ella. La presencia de grupos fosfato favorece la unión de iones Ca^{2+} (Jono, Peinado & Giachelli 2000) (Torres-Quintana, Lecolle & Goldberg 1998), por tal motivo, las proteínas altamente fosforiladas, tales como Osteopontina y Sialoproteína ósea, están asociadas con el proceso de mineralización resultado de la fosforilación de sus residuos de treonina y serina (Zeichner-David et al. 1995).

Es una proteína alcalina (punto isoeléctrico = 9,73), sin péptido señal. En su composición los aminoácidos más abundantes son: prolina (11,3%), glicina (10,5%), alanina (10,1%), serina (8,9%), leucina (8,1%), treonina y arginina (7,7%) y contiene niveles bajos de triptófano, ácido aspártico e isoleucina (2,0%) además de fenilalanina (1,6%) (Cuisinier et al. 1991). La secuencia de aminoácidos indica que es probable que CEMP1 sea capaz de trasladarse al núcleo; sin embargo, no tiene motivos de unión al ADN.

Los aminoácidos 30-110 muestran 48% de similitud con Colágena humano tipo I, 46% similar al tipo XI y 40% de similitud con el tipo X. CEMP1 recombinante de longitud completa ha sido expresada en fibroblastos gingivales. Tiene un alto porcentaje de estructura de espirales al azar (Dean et al. 2002), que se ha demostrado ser multifuncional y tener diversas propiedades de mineralización; como ejemplo están las proteínas SIBLING (Proteínas N-glicosiladas con ligandos de unión de integrina), ejemplo; OPN, BSP y DMP-1. La función de las proteínas SIBLING es fomentar la conexión celular a través de adhesiones focales estables o transitorias a macromoléculas

extracelulares, que están mediadas por receptores de la superficie celular que posteriormente se traducen en señales intracelulares. Estas proteínas tienen como funciones fijar los osteoclastos en el hueso y, además de mantener la conexión celular fijan el Ca^{2+} con la colaboración de secuencias de aminoácidos poliácidos (Cuisinier et al. 1991) (Dunker & Obradovic 2001). Esto puede explicar porque la proteína regula el crecimiento de cristales de apatita (Alvarez Pérez 2003) y porque CEMP1 posee una alta afinidad por la hidroxiapatita, incluso sin modificaciones posteriores a la traducción.

CEMP1 puede desempeñar un papel en las primeras etapas de mineralización. Se ha cuantificado que con 1ug/ml de la proteína se puede promover la nucleación (Villarreal-Ramirez 2009), ésta concentración es eficaz para promover la formación de cristales de fosfato octacálcico en geles de agarosa. El fosfato octacálcico se presume como un precursor obligado de las apatitas, siendo una fase transitoria obligada durante el crecimiento de los cristales. En los cristales pequeños, mediante un proceso de hidrólisis se transforma en hidroxiapatita y sólo se puede detectar en los grandes cristales a causa de su lenta cinética de la transformación.

Estudios de inmunocitoquímica han mostrado que la expresión de CEMP1 se presenta en células derivadas del cementoblastoma (95%) y células del ligamento periodontal (6%). También en una población pequeña (3%) de células osteoblásticas *in vitro*, mientras que no se detectó en fibroblastos gingivales. Sin embargo; se han detectado en CEMP1 funciones como inductor de la diferenciación celular y de la proliferación (Arzate 1998). Su expresión tanto a nivel de mRNA como de proteína se limita a cementoblastos y subpoblaciones de células derivadas del ligamento periodontal localizadas en zonas paravasculares y células de los espacios endosteales. Estas pequeñas poblaciones positivas podrían representar precursores de cementoblastos, lo que sugiere que tanto cementoblastos como osteoblastos podrían tener un ancestro común y que CEMP1 podría ser un marcador para el linaje cementoblastico (Arzate et al. 2002).

CEMP1 está involucrada en la regulación de la morfología, el depósito y la composición de los cristales de hidroxiapatita, así como, en la regulación de la expresión de ALP, OPN y BSP en cementoblastos putativos *in vitro* (Alvarez Perez 2003) (Alvarez-Perez 2006).

Se han estudiado las funciones de CEMP1 mediante ensayos de transfección de células no mineralizantes (HGF-CEMP1). Las células HGF-CEMP1 mostraron una mayor proliferación, formación de nódulos de calcio, aumentaron la actividad específica de la

fosfatasa alcalina y la expresión de *novo* de OCN, OPN, BSP, CAP, entre otras. Estas moléculas están asociadas a la formación de hueso y cemento (Carmona-Rodriguez 2007). Los estudios apoyan firmemente la idea de que CEMP1 tiene la capacidad de cambiar el fenotipo de las células de no mineralizantes (HGF) hacia fenotipos osteo/cementoblasticos, regulando la proliferación y la expresión génica, lo que resulta en la diferenciación de estas células y la producción de una matriz extracelular mineralizada.

Se ha demostrado que los extractos proteicos de cemento maduro promueven tanto adhesión como migración celular y además estimulan la síntesis de proteínas en cultivo de fibroblastos gingivales y células del ligamento periodontal. Un análisis más detallado de dichos extractos reveló la presencia de Sialoproteína ósea (BSP), Osteopontina (OPN), vitronectina (VN) y Fibronectina (FN) (Saygin 2000) responsables de promover tales efectos. Es probable que juegue un papel importante regulando la diferenciación de cementoblastos y durante la mineralización de la matriz extracelular del cemento. Se ha sugerido que CEMP1 sería un marcador biológico ideal para cementoblastos y sus progenitores putativos provenientes del ligamento periodontal (Arzate et al. 2002).

CEMP1 ACTIVA LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LAS MAPK

En muchos procesos de transducción de señales existe un número creciente de proteínas y moléculas involucradas que convierten el estímulo en respuesta, provocando dentro de la célula una cadena secuencial de eventos (cascada de señalización o ruta del segundo mensajero) y la amplificación de la señal dando como resultado una respuesta celular. Específicamente la vía de las MAP cinasas (Mitogen-Activated Protein Kinases) es una ruta de transducción de señales que se sitúa corriente abajo de receptores tirosín quinasa, los cuales una vez activados inician una secuencia de eventos de fosforilación y desfosforilación de proteínas. En términos globales, la señal se transporta mediante GRB2 y de Sos a Ras (una proteína G monomérica). Esta Ras, ya activada, estimula a tres proteínas quinasa que actúan de forma secuencial y que culmina con la activación de la MAP cinasa (ERK), una serín treonín cinasa que es capaz de traslocarse al núcleo y regular la transcripción fosforilando factores de transcripción como c-jun y c-fos, modulando así la expresión de distintos genes asociados con diversos procesos fisiológicos como: proliferación, apoptosis, autofagia e incluso se ha visto involucrada ésta vía en la diferenciación osteoblástica controlando los niveles de expresión de fosfatasa alcalina y osteocalcina (Arzate 2010).

Estudios previos también han mostrado que el calcio extracelular aumenta la expresión de CEMP1 y CAP en las células madre del ligamento periodontal a través de la vía de señalización de proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK). Esto ha sido confirmado por el bloqueo de la señal de la MAPK utilizando ARN de interferencia, el efecto es la disminución en la expresión de CEMP1 y CAP (Gestrelius, Andersson, Johansson, et al. 1997). Además, el uso de un bloqueador de canales de calcio, que impide la expresión de ambas proteínas, lo que demuestra el papel de los iones de calcio en la cementogénesis (Paula-Silva 2010) y de las proteínas cemento específicas.

CEMP1 EXPRESADA EN CÉLULAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL

El ligamento periodontal es un tejido conectivo no mineralizado único. Existe evidencia de la presencia de células madre dentro de sus múltiples subpoblaciones celulares por lo que se considera a éste tejido como una fuente de células progenitoras debido a que, las células del ligamento periodontal conservan el potencial para diferenciarse hacia células formadoras de tejido mineralizado como cementoblastos y osteoblastos, entre otras. Diferentes autores han demostrado que es posible la inducción y deposición de un tejido similar al cemento por las hPLC, sin embargo aún se desconocen los factores que inducen la proliferación y diferenciación celular para obtener el fenotipo requerido.

Se tiene evidencia de que la sobreexpresión de CEMP1 en células del ligamento periodontal humano (hPLC) incrementa la diferenciación cementoblástica mientras atenúa los fenotipos periodontales y osteoblásticos regulando la expresión de marcadores que definen a dichos fenotipos. CEMP1 no sólo es un marcador para cementoblastos, también regula el compromiso de hPLC hacia dicho fenotipo mineralizante y una vez que se compromete el destino celular se induce la actividad de proteínas involucradas con la mineralización de la matriz extracelular (Alvarez Perez 2003).

Haciendo referencia a la enfermedad periodontal caracterizada por la pérdida de tejidos de soporte como el hueso alveolar y el cemento radicular, se cree que puede existir una correlación significativa entre los niveles de la proteína CEMP1 y los parámetros periodontales. Dicha proteína está relacionada con los tejidos de soporte del diente, en teoría, puede favorecer la pérdida de tejidos de soporte o evitar la regeneración de los mismos lo cual se traduce en un alto riesgo de desarrollar enfermedad periodontal u otras

enfermedades donde se encuentre inmerso un proceso de desmineralización/remineralización en ausencia de CEMP1.

Los datos presentados anteriormente indican claramente que CEMP1 es una proteína única que tiene varias propiedades como: inductor de la mineralización, proliferación, diferenciación y maduración celular e incluso, CEMP1 podría servir como regulador de la población de células madre mesenquimales presentes en el ligamento periodontal con capacidad para inducir su diferenciación. Estas propiedades abren las posibilidades de utilizar CEMP1 para terapias de regeneración periodontal (Arzate 1996).

PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Existe un interés muy particular por estudiar los factores externos involucrados en la modificación de las respuestas celulares, específicamente en relación a la proliferación y la diferenciación celular considerando además a la reprogramación celular, funciones que puedan ayudar al entendimiento del comportamiento celular, ya que, la diferenciación celular conlleva a la generación y desarrollo de células fenotípicamente distintas, pese a cargar el mismo genotipo generando así la especificidad celular, es decir, la determinación de estructuras y funciones en distintos fenotipos celulares.

Los péptidos podrían funcionar como éstos factores externos que definen fenotipos celulares. Los péptidos, al igual que las proteínas, están presentes en la naturaleza, son responsables de un gran número de funciones que van desde hormonales hasta enzimáticas, sin embargo, muchas aún se desconocen.

Los péptidos (del griego πεπτός, peptós, que significa digerido) son moléculas formadas por la unión de dos o más aminoácidos mediante enlaces peptídicos. Se diferencian de las proteínas porque su cadena de aminoácidos es de longitud más pequeña (tienen menos de diez mil o doce mil Daltons de masa); es decir, tienen menos aminoácidos, aunque los límites entre ambos no están claramente definidos, en general la longitud promedio de los péptidos hasta ahora conocidos es desde 15 hasta 22 aminoácidos, mientras las proteínas pueden estar formadas por la unión de varios péptidos y a veces grupos prostéticos (Oldberg, Franzen, & Heinegard 1988).

Los péptidos funcionales o bioactivos se definen como secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis química o enzimática. Han sido empleados en distintas áreas como ingeniería mineral, inmunología y biomineralización, entre otras y también han sido ampliamente utilizados para inducir o bloquear pasos clave durante el desarrollo de ciertas actividades celulares, ofreciendo una nueva gama de alternativas para el control de enfermedades (Arpel 2014).

Estudios recientes han reportado el uso de péptidos en: áreas como la ingeniería mineral para la construcción de capas minerales de HAP con características muy semejantes al cemento, durante el control y crecimiento de la formación de cristales de HAP, también se han estudiado los efectos en etapas tempranas de la amelogénesis donde los péptidos pueden influir en las interacciones proteína-mineral (Gungormus et al. 2012).

Los péptidos se han utilizado como componente de biomateriales, induciendo un proceso de biomineralización, o como moléculas de estimulación para incrementar las funciones de los osteoblastos, inclusive ya han sido empleados para el diagnóstico y terapia del Alzheimer y actualmente se encuentran aplicándolos también en el diagnóstico oncológico. Con el uso de péptidos β amiloides se ha logrado promover la diferenciación de células madre neuronales en ratones.

Otros investigadores trabajan en inducir la formación de nuevos cardiomiocitos tras un infarto de miocardio. Otras áreas estudian los péptidos capaces de modificar la respuesta inflamatoria local o activar mecanismos de reacción inmunitaria (Slavkin et al. 1989). Lo más reciente en la terapia de péptidos ha sido favorecer procesos celulares específicos que inducen procesos de mineralización, incluso se han modificado los procesos de señalización a través del cual la célula interpreta la información del medio ambiente, para modificar la respuesta celular que normalmente una célula tiene ante un estímulo. Debido al aumento en las evidencias que existen sobre la aplicación de los péptidos en el área de mineralización (Ardjomandi 2012) (Boabaid et al. 2004) (Boabaid et al. 2004) (Chen & Webster 2009) (Chen & Webster 2009) (Gungormus et al. 2012) (Liu et al. 2013) (Mante et al. 2004) (Stout et al. 2014) (Zhu et al. 2013), surge la necesidad de estudiarlos y analizar su capacidad como agentes terapéuticos para la regeneración de estructuras afectadas en enfermedades que aquejan los tejidos mineralizados.

La identificación de un péptido capaz de imitar las funciones de la proteína CEMP1 permitirá generar conocimiento sobre los mecanismos moleculares que regulen la diferenciación celular y al mismo tiempo aportará información para el conocimiento este proceso, contribuyendo así, al entendimiento y el futuro desarrollo de nuevas estrategias para reconstruir los tejidos mineralizados.

El conocimiento y la comprensión de la biología del cemento es clave para comprender el funcionamiento del periodonto, entender las enfermedades que lo destruyen y desarrollar terapias eficaces para la reparación y regeneración de tejidos afectados por enfermedades periodontales. Los avances en la comprensión de las proteínas cemento específicas y su posible papel en la selección de las células madre periodontales, induciendo su diferenciación y regulando el proceso de mineralización o la formación de cemento destaca el papel de éstas proteínas con algunas otras involucradas en estos procesos. Estas proteínas y sus péptidos pueden estar relacionados con actividades biológicas de mineralización y representan un agente terapéutico para la regeneración de no sólo las estructuras periodontales sino también de otros tejidos mineralizados.

El impacto que podría tener en el campo de la periodoncia y los tejidos óseos parece muy prometedor. Sin embargo el estudio de los péptidos en relación con el proceso de regeneración de las estructuras periodontales esta apenas comenzando.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La investigación actual respalda el uso de péptidos para modificar funciones celulares y si los resultados pueden ser aplicables a la clínica, se ofrecen rutas alternativas para el tratamiento de enfermedades (péptidos terapéuticos).

Existe evidencia de que la proteína CEMP1 promueve la proliferación y diferenciación de las células hPLC hacia un fenotipo cementoblástico mediante la activación de la cinasa ERK1/2, involucrada en procesos de proliferación celular en células de fenotipo no mineralizante.

Estudios previos de CEMP1p1 en un sistema libre de células, lograron demostrar que éste péptido participa en procesos de nucleación y crecimiento ordenado de cristales de fosfato octacálcico, lo que parece indicar dicho péptido está promoviendo la formación de fases previas a la formación de hidroxiapatita.

La identificación de un péptido que emule las funciones de CEMP1 y que pueda ser aplicado a un proceso inductivo de mineralización en un sistema de células, permitirá contemplar nuevas estrategias para promover la cementogénesis, con todas las ventajas que ofrece el uso de péptidos sobre el manejo de proteínas totales.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel biológico del péptido MGTSSSTDSQQAGHRRRCSTSN (CEMP1p1) de la proteína CEMP1, en la diferenciación de células derivadas del ligamento periodontal humano *in vitro*.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de CEMP1p1 en la expresión a nivel transcripcional y traduccional de proteínas que participan en la mineralización de la matriz extracelular (BSP, CAP, AMEL, AMBN y CEMP1).
2. Determinar el efecto de CEMP1p1 en la fosforilación de las cinasas p38 y ERK1/2.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente estudio comprende la realización de una fase experimental en un sistema celular *in vitro* en el cual se evaluarán los efectos celulares a los que da lugar la presencia de un péptido funcional de CEMP1.

SÍNTESIS DEL PÉPTIDO 1 DE CEMP1

La siguiente secuencia de aminoácidos: MGTSSSTDSQQAGHRCSTSN, fue sintetizada en Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Corresponde a los primeros 20 aminoácidos de la secuencia de la proteína CEMP1 (Protein Database NP_001041677.1). El fragmento obtenido se denominó péptido 1 de CEMP1 (CEMP1p1). Se utilizó PBS pH 7.2 para las diluciones del péptido que se requirieron en los ensayos realizados.

CULTIVO CELULAR

Las células hPLC fueron aisladas con la técnica de explante celular descrito previamente (Arzate et al., 1998, 2000). Las células fueron cultivadas hasta la subconfluencia en frascos de 75cm² (Nunc, Life Technologies, MX), en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle médium) (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA) suplementado con 1% (v/v) Anti-Anti, MEM NEAA, 100 mM de Piruvato de Sodio y 10% (v/v) Suero Fetal Bovino inactivado (SFB) (Gibco™, Invitrogen, MX) en una atmósfera de 37°C, 5% de CO₂ y 100% de humedad. Las células entre el segundo y quinto pasaje fueron utilizadas para los siguientes procedimientos experimentales.

ENSAYO DE PROLIFERACION CELULAR

Las células hPLC fueron tripsinizadas (0.05% Trypsin-EDTA 1X, Gibco™, Invitrogen, MX), homogeneizadas y contadas (The Countess® automated cell counter, Gibco™, Invitrogen, MX). La densidad celular fue ajustada a 1.5x10³ y posteriormente se sembraron en cajas de cultivo de 96 pozos (Nunc, Life Technologies, MX) a una densidad de 2.5X10³ células por pozo en medio DMEM 1X (Gibco).

Con el fin de asegurar la adhesión al sustrato, las células se mantuvieron en DMEM-SFB 10% durante 24 horas (Día 0) previo a la estimulación. Después de 24 horas las células adheridas se lavaron con PBS pH 7.2 y se agregó el medio DMEM suplementado para el grupo control positivo con 10% SFB, para el grupo control negativo con 2% FBS y los grupos experimentales con SFB al 2% y CEMP1p1 en concentraciones entre 0.01-10.0 µg/ml.

Las células se incubaron durante 1-5 días, realizando cambio de medio cada tercer día. Los efectos en la proliferación se evaluaron de 0-5 días. Los ensayos se realizaron por triplicado.

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD CELULAR

Para los ensayos de citotoxicidad se preparó una solución de 5mg/ml de MTT (Sigma, Saint Louis, MO, USA) en PBS pH 7.2 filtrada a 0.2 µm. Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos. Después de su adhesión durante 24 horas, el medio de cultivo fue removido y cambiado para cada control o grupo experimental preestablecido.

A los tiempos determinados (0-5días) se agregó al pozo de cultivo una décima parte de MTT por volumen de medio de cada pozo, se incubaron las células durante 4 horas a 37°C, 5% de CO₂ y 100% de humedad, al final del periodo de incubación se removió el medio y se solubilizó el colorante convertido en formazán con 100µl de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, Saint Louis, MO, USA) por pozo de cultivo y se incubó durante 15 minutos a 37°C, posteriormente se midió la absorbancia a 570nm en un lector de placas FilterMax™ F5 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA). Los ensayos se realizaron por triplicado.

ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

Ensayo de actividad específica de la fosfatasa alcalina

Las células hPLC fueron cultivadas en medio DMEM 1X a una densidad de 2×10^5 en placas de cultivo de 24 pozos (Costar Cambridge MA, USA) y durante 24 horas se permitió su adhesión a la superficie del pozo de cultivo, en seguida el medio de cultivo fue sustituido por las distintas condiciones descritas para los controles y los experimentales.

Las células se recuperaron a los tiempos de 3, 7 y 14 días en 50ul de buffer de lisis con inhibidores de proteasas (50mM Tris-HCl (pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM PMSF, 10mM NaF, 1% Triton-X 100 y 1× protease inhibitor cocktail) (Complete; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). En seguida se tomaron 10ug de la proteína y se incubaron a 37°C durante 1 hora con p-nitrofenilfosfato (pNPP) sustrato para la enzima fosfatasa alcalina.

Se realizaron lecturas cada 15 minutos para rastrear la evolución de la actividad. La actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) se determinó por medio de la técnica de Lowry (Lowry et al 1954). La concentración de proteína se determinó de acuerdo al método de Bradford (1976) usando albúmina (BSA) como estándar. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Ensayo de mineralización con alizarina roja

Las células hPLC tratadas según se indicó, fueron sembradas en medio DMEM a una densidad de 2×10^4 en placas de cultivo de 24 pozos (Costar Cambridge MA, USA) permitiendo su adhesión durante 24 horas previo al tratamiento con DMEM y medio mineralizante (10 mM β -glicerofosfato y 50 μ g/ml ácido ascórbico), bajo dichas condiciones se mantuvieron los triplicados durante 3, 7 y 14 días con cambios de medio cada tercer día.

Al término, se les retiró a las células el medio de cultivo y fueron fijadas con etanol al 70% durante 10 minutos, en seguida se retiró el etanol y se permitió la evaporación del residual. Se preparó la tinción de alizarina roja (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) al 2% pH 4.2 y se agregó a las células fijadas durante 5 minutos, posteriormente las células fueron lavadas con agua bidestilada y la tinción residual fue removida con PBS pH 7.2. La presencia de nódulos de calcio insolubles fue documentada con ayuda del microscopía de invertido en campo claro (60X).

Ensayo de Western blot para proteínas implicadas en el fenotipo cementoblástico

Se sembraron 2×10^4 hPLC en cajas de cultivo de 24 pozos por triplicado, se cultivaron durante 3, 7 y 14 días bajo las condiciones descritas para grupos controles y experimentales. A los tiempos señalados, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS pH 7.2 y en seguida se resuspendieron y lisaron en amortiguador de lisis

(50mM Tris-HCl (pH 7.4), 150mM NaCl, 1mM PMSF, 10mM NaF, 1% Triton-X 100 y 1× protease inhibitor cocktail) (Complete; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA).

El producto lisado fue sonificado 1 x 15 segundos a 25% de amplitud y clarificado (14,000 rpm, 4°C). La concentración de proteína fue determinada de acuerdo el método de Bradford utilizando BSA como estándar.

Se utilizaron 20 µg de proteína de cada muestra para ser sometidas a separación por electroforesis en gel de SDS-PAGE 12% y en seguida las proteínas separadas fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF (Polyvinyl difluoride) (Millipore Corp., Bedford, MA). Las membranas se incubaron con anticuerpos policlonales (1:1000) de conejo contra BSP, AMEL, AMBN, CAP, CEMP1 y GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Inc; Santa Cruz, CA) durante toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 15 minutos y se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (1:3000) durante 2 horas. Al finalizar los lavados, la enzima acoplada al anticuerpo se reveló con DAB (3´3 diaminobencidina) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y agua oxigenada.

La imagen de las membranas fue escaneada y analizada con ayuda de un software (Image J) que ayudó a determinar los valores de densitometría. Los niveles de proteína fueron normalizados respecto a la proteína de referencia (GAPDH). Los ensayos se realizaron por triplicado.

Ensayo de qRT-PCR tiempo real

Las células hPLC fueron sembradas a una densidad de 5×10^4 en placas de 6 pozos hasta la subconfluencia. Fueron tratadas según se ha explicado para los grupos controles y experimentales. A los tiempos de 3, 7 y 14 días el RNA total fue aislado mediante el método de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se usaron 10 nanogramos de RNA para realizar el ensayo de PCR cuantitativo (One-Step qRT-PCR) (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). De acuerdo al protocolo del fabricante para el kit SuperScript® III Platinum® SYBR® Green Kit se realizó la transcripción en forma inversa del RNA en un analizador de tiempo real (Rotor-Gene 6000; Corbett Life Science PO, NSW, NZ).

Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron oligonucleótidos sintéticos sentido y antisentido (Tabla 1), diseñados para amplificar el transcrito de las proteínas BSP, AMEL, AMBN, CAP, CEMP1 y GAPDH (control interno). Las condiciones de termociclado utilizadas fueron las siguientes: 30 ciclos de 1 minuto, desnaturalización a 94°C, alineamiento a 55°C y extensión a 72°C.

Los ensayos se realizaron por triplicado. La eficiencia de amplificación fue comparable y reproducible. Los resultados fueron cuantificados mediante fluorescencia y reportados como expresión relativa de mRNA. Los análisis se realizaron mediante el método delta delta C_i (DDct).

ENSAYO DE WESTERN BLOT PARA MAPK

Se sembraron 2×10^4 hPLC en cajas de cultivo de 24 pozos, se cultivaron durante tiempos cortos (0-60 minutos) y largos (1-12 horas) bajo las mismas condiciones descritas para grupos controles y experimentales. Las células fueron resuspendidas en el amortiguador para la extracción de proteínas que contenía 0.04mM Na_3VO_4 y 10mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ con el objetivo de conservar las proteínas fosforiladas. Posteriormente, se realizó la extracción de proteínas con TRIzol. La concentración de proteínas fue determinada de acuerdo al método de Bradford utilizando BSA para la curva estándar de concentración de proteínas. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Se realizó la electroforesis y electrotransferencia a membranas de PVDF y posteriormente se incubaron las membranas con anticuerpos monoclonales (1:1000) para p38, P-p38, ERK1/2 y P-ERK1/2 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) en buffer de bloqueo (5% BSA) durante toda la noche a 4°C. Se lavaron tres veces durante 5 minutos con TBST y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (1:2500) durante 2 horas. La proteína de referencia fue GAPDH. Se analizó la densitometría de las imágenes digitalizadas (Image J).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó la Prueba de t de Student fue utilizada para evaluar la significancia estadística de las diferencias entre los grupos control y experimental ($p \leq 0.05$). Los datos presentados se expresan como la media \pm error estándar de la media ($M \pm \text{EEM}$) de al menos tres

experimentos independientes. Los análisis estadísticos y las gráficas fueron realizados con la versión 3.5 del software SigmaStat (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

A continuación se presentará la secuencia de ensayos en los que se evaluaron los efectos celulares inducidos por el péptido funcional de CEMP1 (CEMP1p1) en hPLC.

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Las células del ligamento periodontal humano (hPLC) cultivadas en medio DMEM suplementado con SFB al 10%, proliferan bajo el estímulo del SFB a una tasa normal de crecimiento por lo cual, lo consideramos como un control positivo de crecimiento, siendo un parámetro de proliferación máxima inducida. Por otro lado, las células cultivadas con SFB al 2% muestran una tasa de proliferación más lenta, tienen los requerimientos necesarios para crecer y no morir, bajo tales condiciones aseguramos que las células mantengan una proliferación mínima; se le ha denominado control negativo de proliferación, siendo un parámetro de proliferación con nula inducción. Bajo ésta premisa, los grupos experimentales fueron cultivados bajo las condiciones del control negativo (SFB 2%) y la variable fue la adición de CEMP1p1.

Los resultados del ensayo de MTT muestran diferencia en la proliferación celular entre los controles positivo y negativo (Figura 1). En los análisis, las diferencias son estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) a los días de cultivo 2 y 3 entre los controles, donde se presentó una mayor proliferación en las células con SFB 10% y menor en las cultivadas con SFB 2%.

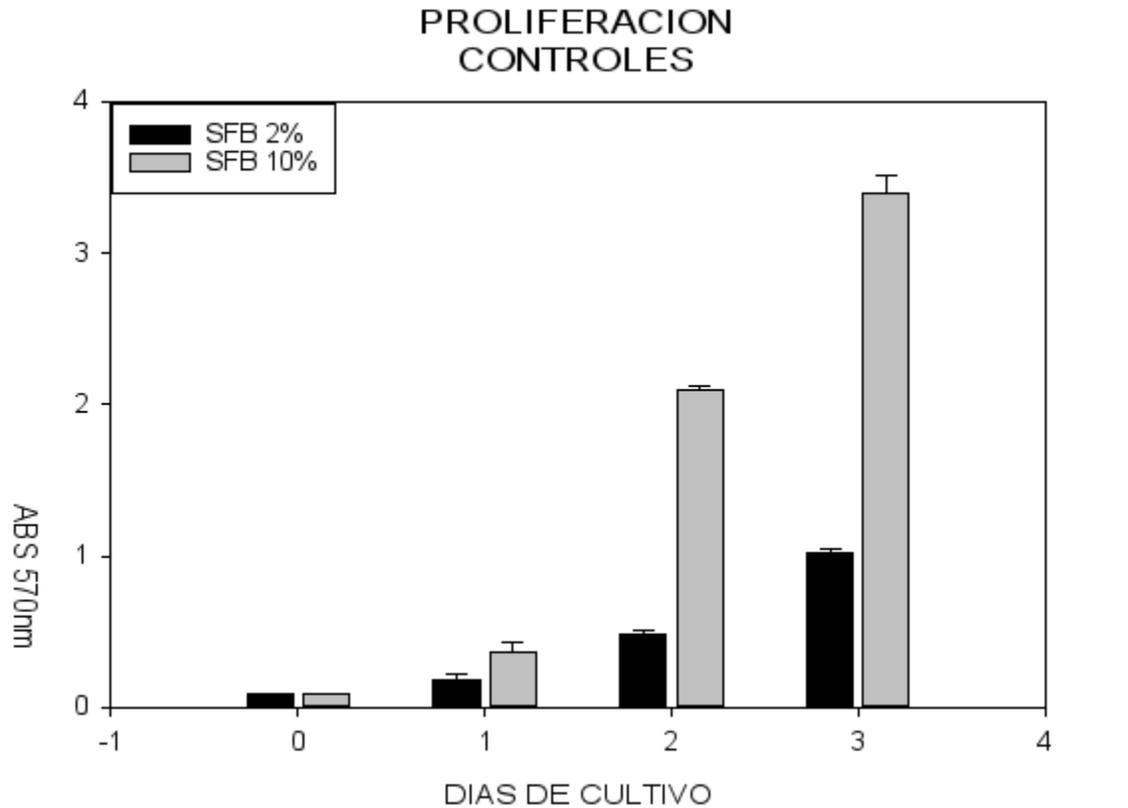


Figura 1

Figura 1. Ensayo de proliferación con MTT. Las barras representan la media \pm el error estándar de la media ($M \pm EEM$) de las células hPLC cultivadas bajo las condiciones para los controles positivo (hPLC cultivadas en SFB 10%) y negativo (hPLC cultivadas en SFB 2%) utilizados. Se grafica la cantidad de células que se multiplican bajo ambas condiciones control.

En la Figura 2 se muestran los resultados de la proliferación celular, se comparó la proliferación entre los controles y los grupos experimentales (SFB 2% + CEMP1p1). Los resultados muestran un aumento en la proliferación de las células estimuladas con la presencia de CEMP1p1. El incremento fue proporcional a la concentración del estímulo (CEMP1p1). Se observó que 1000ng/ml y 3000ng/ml de CEMP1p1 fueron las concentraciones que estimulan mayormente la proliferación. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre controles y experimentales.

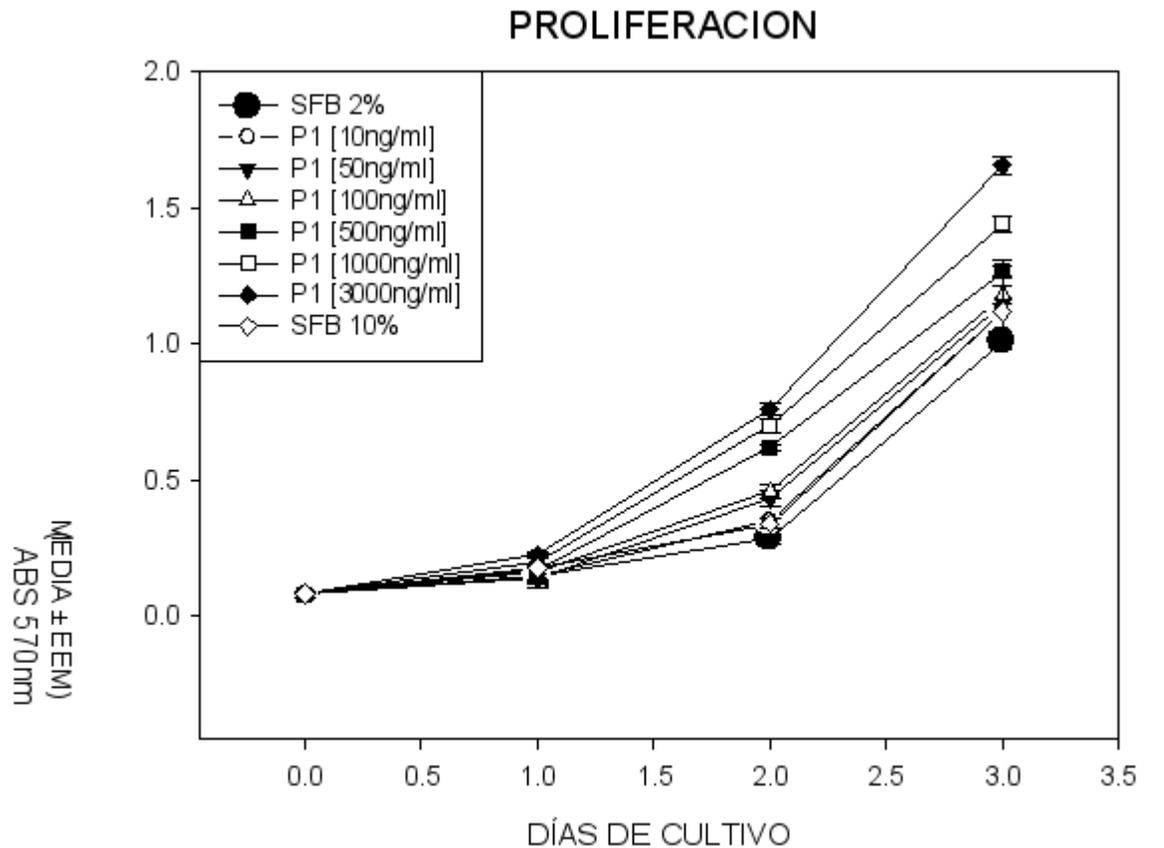


Figura 2. Ensayo de proliferación con MTT. Se grafica la cantidad de células que se multiplican bajo condiciones control y experimental. Las líneas representan $M \pm EEM$. Las concentraciones más eficientes para inducir la proliferación fueron 1000ng/ml y 3000ng/ml que muestran diferencias estadísticamente significativas contra los grupos control.

La concentración de 3000ng/ml fue el estímulo más alto que se probó y dio resultados positivos; sin embargo, la proliferación aumentaba conforme a la concentración por lo que se decidió observar si se mantenía constante este patrón de respuesta respecto a la concentración del estímulo y al tiempo; por tal razón se realizó otro ensayo hasta 5 días de cultivo aumentando el estímulo hasta 10000ng/ml de CEMP1p1.

Los resultados del ensayo muestran que las concentraciones de 1000ng/ml y 3000ng/ml continúan siendo las más efectivas para inducir la proliferación celular (Figura 2). Ciertamente, la proliferación aumenta de manera constante respecto al estímulo, sin embargo; este patrón se detiene en la concentración de 5000ng/ml, en la que comienza una disminución en la proliferación, siendo proporcional el decremento al aumento en la concentración de CEMP1p1; incluso la concentración de 10000ng/ml se comportaba similar a los controles y estadísticamente no presentaron diferencias significativas entre los grupos.

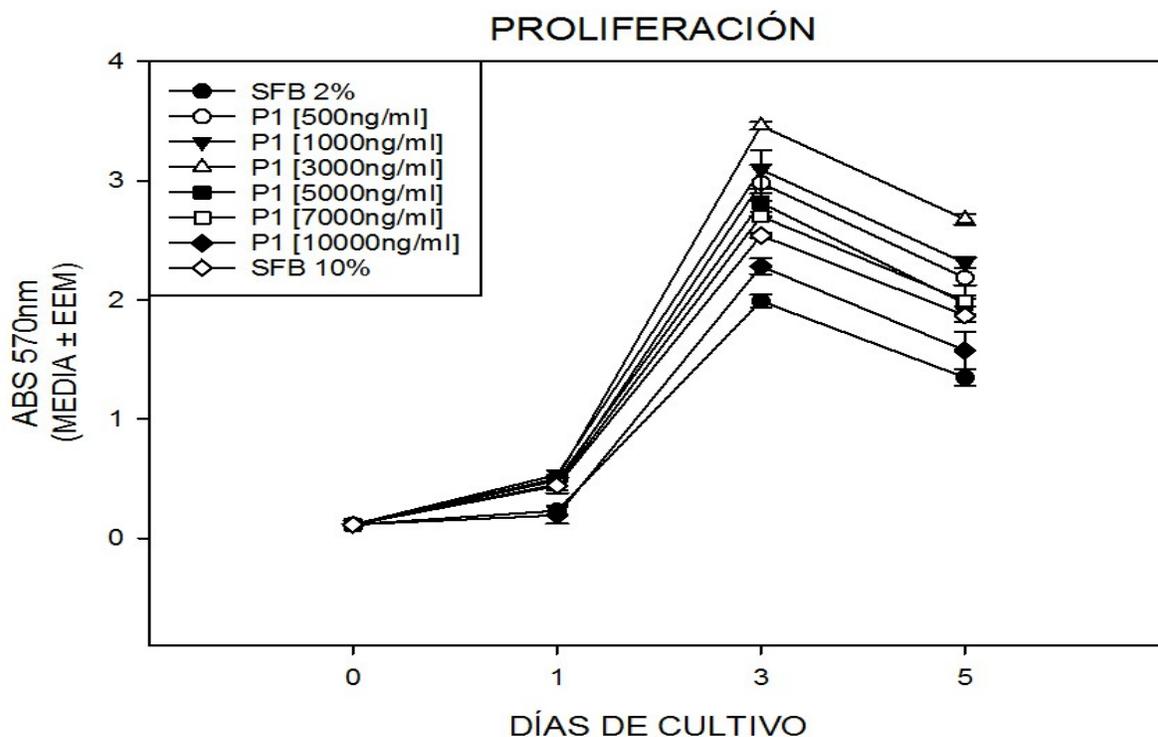


Figura 3. Ensayo de proliferación con MTT. Las líneas representan $M \pm EEM$. Las concentraciones más eficientes para inducir la proliferación fueron 1000ng/ml y 3000ng/ml que muestran diferencias estadísticamente significativas contra los grupos control. Las concentraciones superiores disminuyen la proliferación.

Los resultados anteriores sugieren que la dosis efectiva para inducir la proliferación es 3000ng/ml. Además la proliferación se mantiene constante desde 0 hasta 3 días de cultivo y en días posteriores desciende.

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Los resultados de la proliferación fueron comparados con los de viabilidad celular en muestras tratadas bajo las mismas condiciones antes descritas. Los resultados demostraron que las concentraciones de 1000ng/ml y 3000ng/ml de CEMP1p1 mantienen las células viables.

La concentración de 3000ng/ml tiene mejor efecto que 1000ng/ml a los 3 días de cultivo, a pesar de que ambas resultan estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) comparadas con los controles (Figura 4).

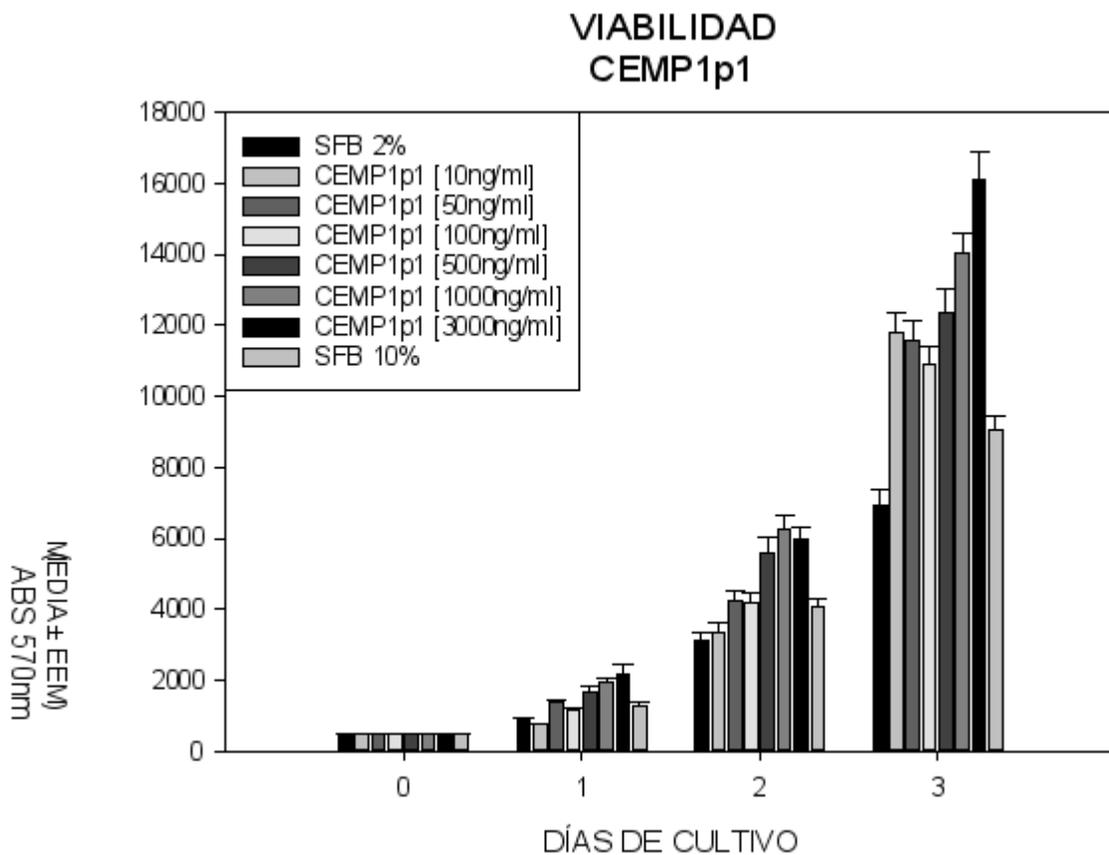


Figura 4. Ensayo de proliferación con MTT. Se muestra la cantidad de células viables en los grupos controles y experimentales. Las barras representan $M \pm EEM$. Las concentraciones más eficientes para mantener la viabilidad fueron 1000ng/ml y 3000ng/ml que muestran diferencias al compararlas con los grupos control.

La viabilidad disminuye cuando la concentración de CEMP1p1 rebasa los 5000ng/ml (Figura 5) pudiendo resultar citotóxica.

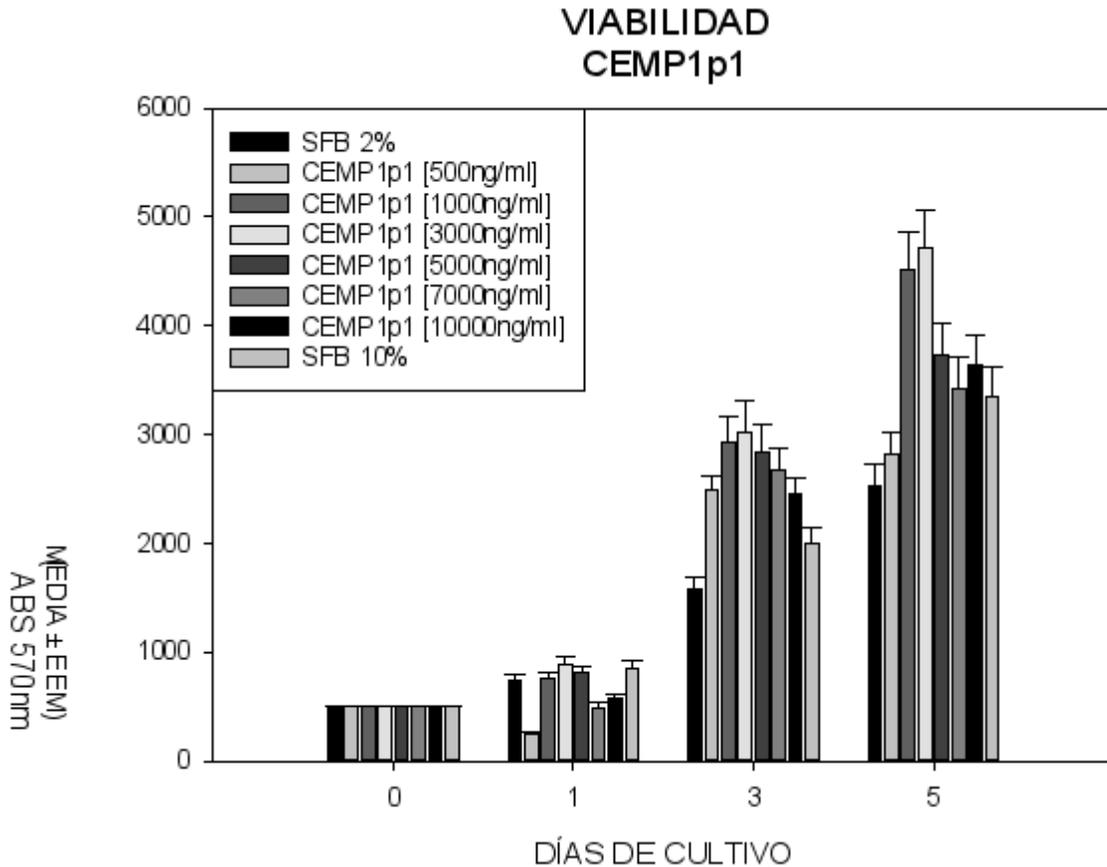


Figura 5. Ensayo de proliferación con MTT. Se grafica la cantidad de células que se mantienen viables bajo condiciones control y experimental. Las barras representan $M \pm EEM$. Las concentraciones más eficientes para mantener la viabilidad fueron 1000ng/ml y 3000ng/ml que muestran diferencias contra los grupos control. Las concentraciones superiores disminuyen la viabilidad.

Mediante los ensayo de MTT se determinó que 3000ng/ml de CEMP1p1 es la dosis efectiva para estimular la proliferación y mantener la viabilidad en las células hPLC, por lo que se designó como la dosis efectiva de tratamiento para los siguientes procedimientos experimentales.

COMPARACIÓN DE EFECTOS DE CEMP1 vs CEMP1p1

Estudios previos señalan que la proteína CEMP1 tiene efectos de proliferación celular sobre células hPLC. Considerando lo anterior se decidió realizar un ensayo comparativo entre los efectos de la proteína contra los efectos del péptido sobre la misma línea celular. Para tal efecto, se seleccionaron las concentraciones de 1000ng/ml y 3000ng/ml.

Los resultados muestran que el efecto de CEMP1p1 3000ng/ml estimula la proliferación de manera superior al estímulo que representa la proteína CEMP1 en las dos concentraciones probadas (Figura 6).

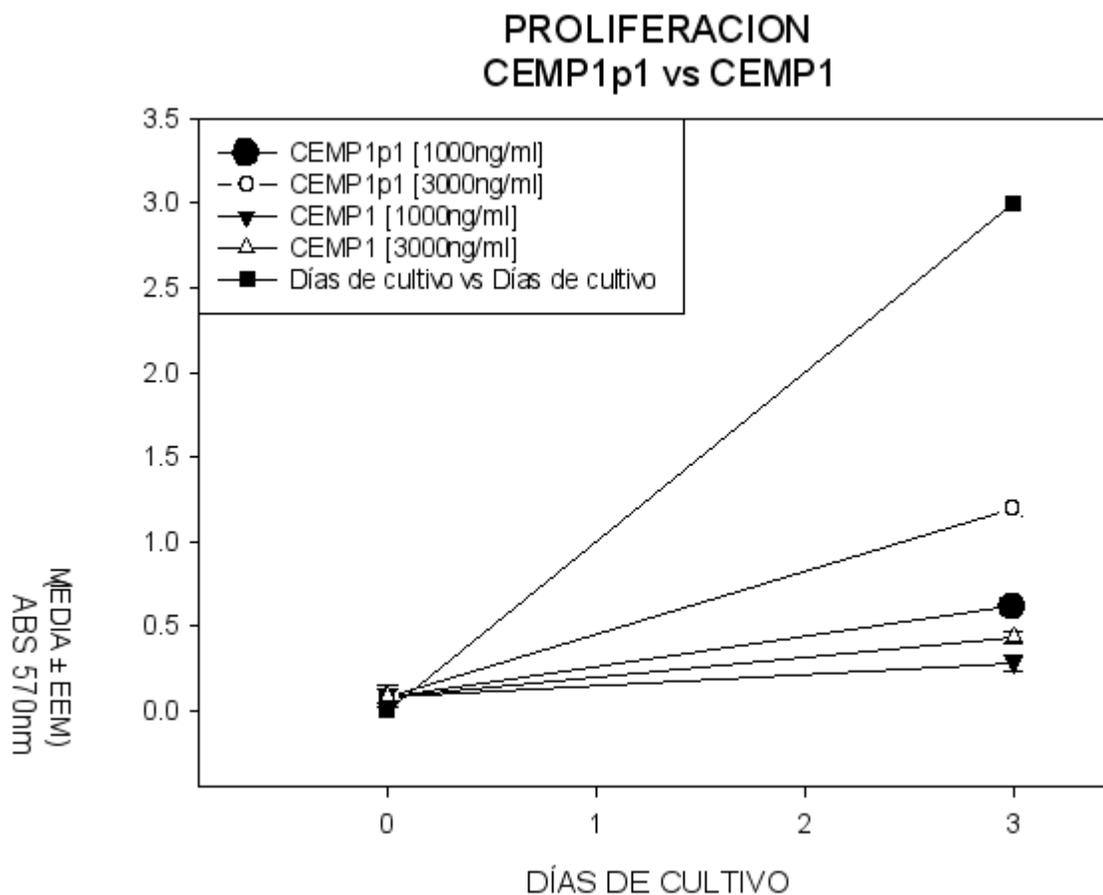


Figura 6. Ensayo de proliferación con MTT. Las líneas representan $M \pm EEM$. La concentración más eficiente para inducir la proliferación fue 3000ng/ml CEMP1p1 que mantiene diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) contra los grupos de CEMP1.

Al comparar la proliferación con la viabilidad celular bajo el mismo diseño experimental, se determinó que la incubación con concentración de 3000ng/ml de CEMP1p1 conserva la viabilidad celular.

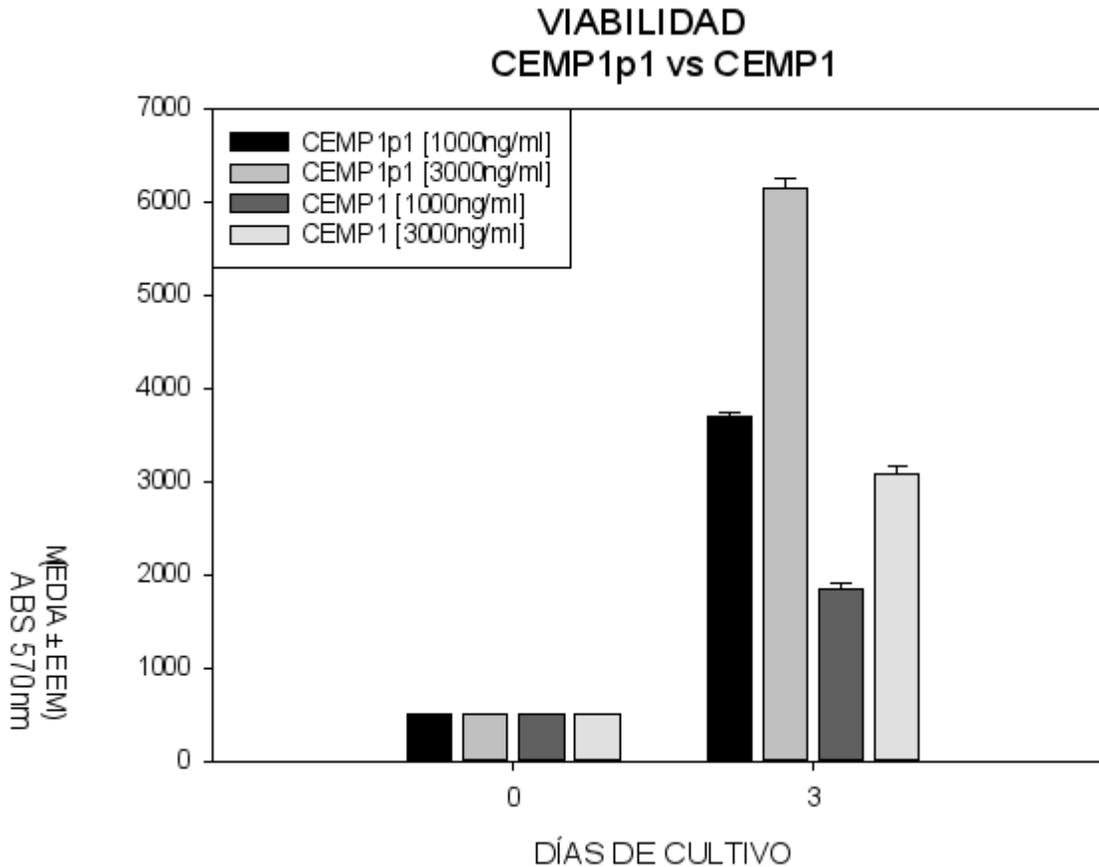


Figura 7. Ensayo de proliferación con MTT. Se muestra la cantidad de células que se mantienen viables bajo condiciones control (CEMP1) y experimental (CEMP1p1). Las barras representan $M \pm EEM$. La concentración de 3000ng/ml CEMP1p1 mantiene diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) contra los grupos control de CEMP1.

Las concentraciones de la proteína CEMP1 inicialmente utilizadas no eran tan eficientes para estimular la proliferación celular como lo observado previamente con el péptido, por lo que se decidió realizar otros ensayos con diferentes concentraciones de la proteína CEMP1 para establecer la concentración óptima para estimular la mayor proliferación.

En el ensayo se probaron concentraciones desde 1ng/ml hasta 10000ng/ml tanto de CEMP1 como CEMP1p1 y los tiempos de cultivo fueron desde 0 hasta 5 días (Figura 8).

Los resultados arrojaron que las dos mejores concentraciones de CEMP1p1 continuaban siendo 1000ng/ml y 3000ng/ml en el día 3; por otro lado, las dos mejores concentraciones de CEMP fueron 500ng/ml en el día 3 y 10000ng/ml en el día 2.

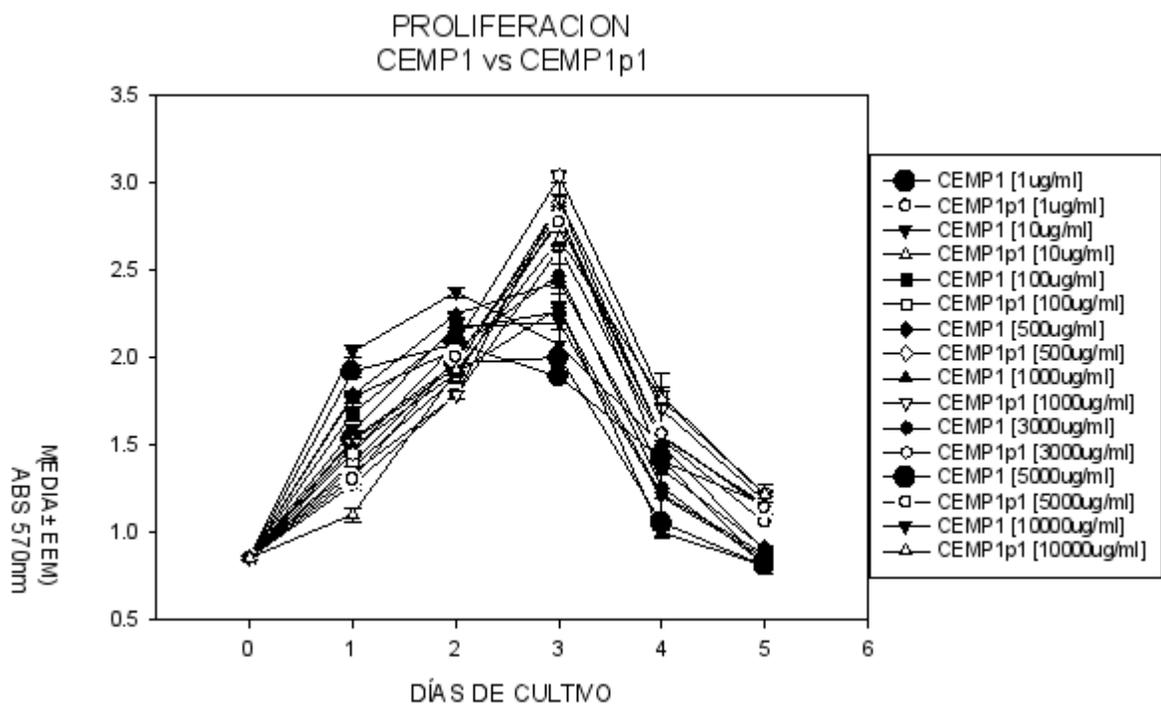


Figura 8. Ensayo de proliferación con MTT. Se grafica la cantidad de células que se multiplican bajo condiciones control (CEMP1) y experimental (CEMP1p1). Las líneas representan $M \pm EEM$. La concentración más eficiente para inducir la proliferación fue 3000ng/ml CEMP1p1.

La evaluación de la proliferación en relación a la viabilidad celular mostró que 3000ng/ml de CEMP1p1 mantiene una viabilidad celular mayor en el día 3, sin embargo; en el día 2 de cultivo la proteína CEMP1 mantiene una viabilidad similar a la encontrada con el péptido (Figura 9).

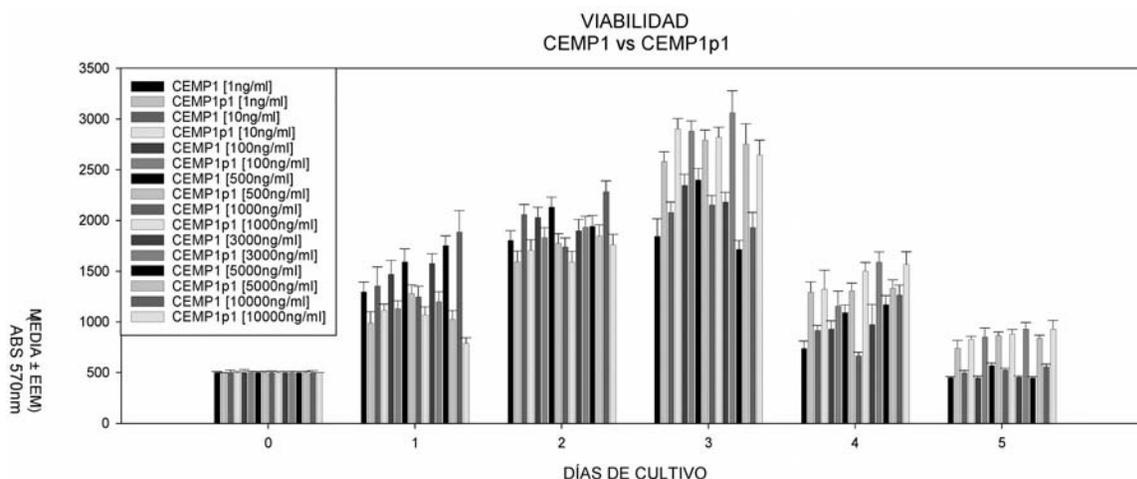


Figura 9. Ensayo de proliferación con MTT. Se grafica la cantidad de células que se mantienen viables bajo condiciones control (CEMP1) y experimental (CEMP1p1). Las barras representan $M \pm EEM$.

Se realizaron análisis comparativos, entre los controles incubados con SFB 2%, con SFB 10% y las concentraciones de 500ng/ml y 10000ng/ml de CEMP1 contra 3000ng/ml de CEMP1p1 encontrando que, en el día 2 se presentó el mejor estímulo de CEMP1 pero sin diferencias significativas contra CEMP1p1, mientras que en el día 3 de cultivo si existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$), esto puede ser que CEMP1p1 induce una mayor proliferación de hPLC en cultivo que CEMP1 (Figura 10).

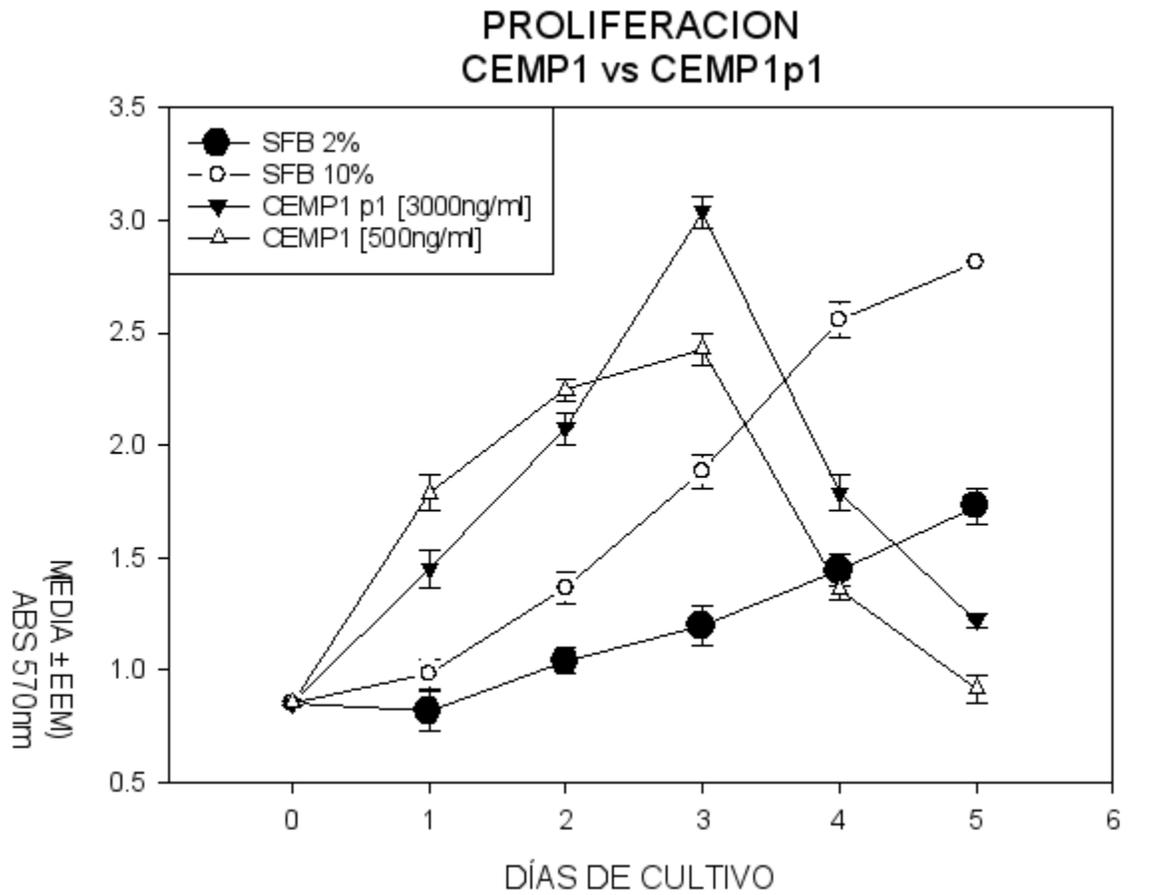


Figura 10. Ensayo de proliferación con MTT. Las líneas representan $M \pm EEM$. La concentración más eficiente para inducir la proliferación fue 3000ng/ml CEMP1p1.

Referente a la viabilidad celular, los análisis mostraron que en el día 3 de cultivo existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre CEMP1 y CEMP1p1, éste último además de inducir una tasa mayor de proliferación conserva la viabilidad más alta comparada contra CEMP1 (Figura 11).

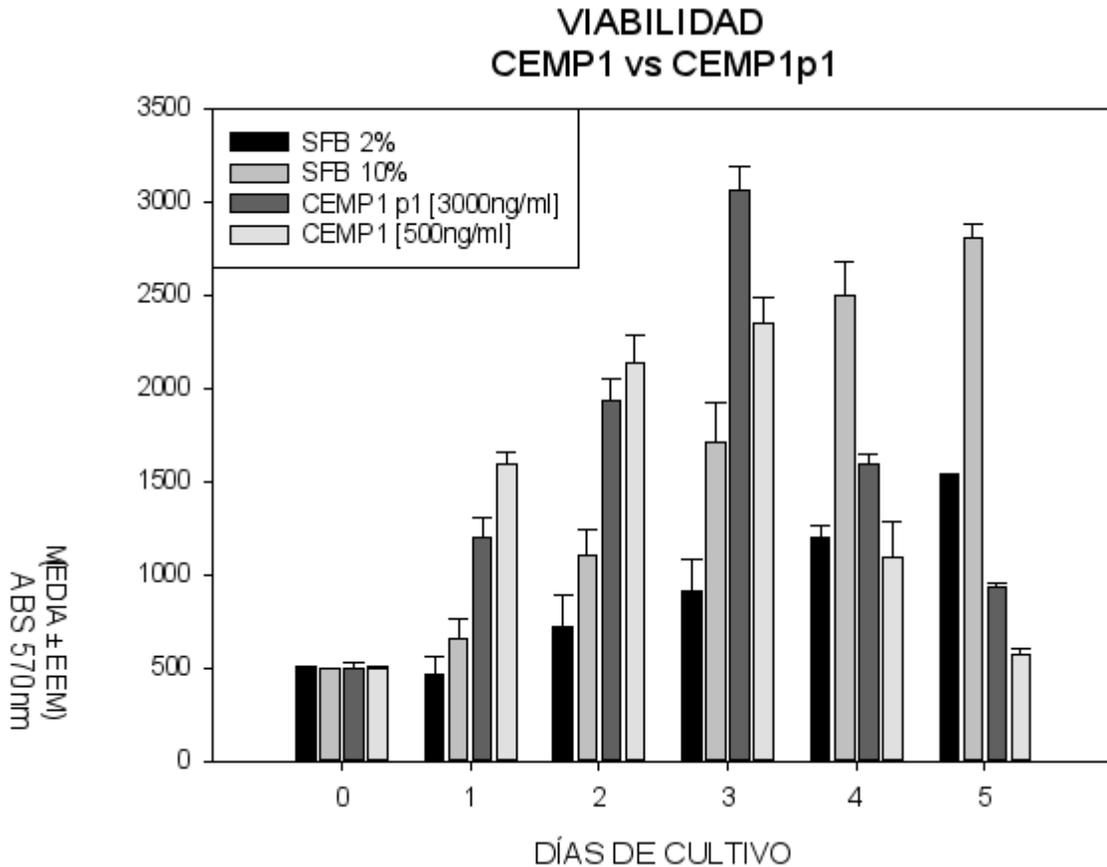


Figura 11. Ensayo de proliferación con MTT. Se muestra la cantidad de células viables en el grupo control y experimental. Las barras representan $M \pm EEM$.

Los ensayos de MTT anteriormente descritos, llevan a la conclusión de que 3000ng/ml de CEMP1p1 es una concentración eficiente para promover la proliferación celular así como, para mantener la viabilidad durante el cultivo de células hPLC *in vitro*. La respuesta celular ante tal estímulo no es superada por ninguna de las concentraciones probadas de la proteína completa CEMP1, lo que sugiere que el CEMP1p1 puede ser una molécula con potencial superior y probablemente con mejores efectos que CEMP1.

ENSAYOS DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

Ensayo de actividad específica de la fosfatasa alcalina

La actividad enzimática de la fosfatasa alcalina se expresa en nanomoles de pNPP por minuto por miligramos de proteína. Las lecturas que se realizaron a intervalos de 15 minutos, para las células hPLC cultivadas durante 3, 7 y 14 días, detectaron la actividad de ALP desde etapas tempranas de cultivo.

Los resultados muestran que la actividad de fosfatasa alcalina, considerada un marcador de células mineralizantes se encuentra mayormente expresada en los experimentales que en los controles, logrando diferencias entre ambos de casi 80% a los 14 días de cultivo, lo que resulta estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) (Figura 12).

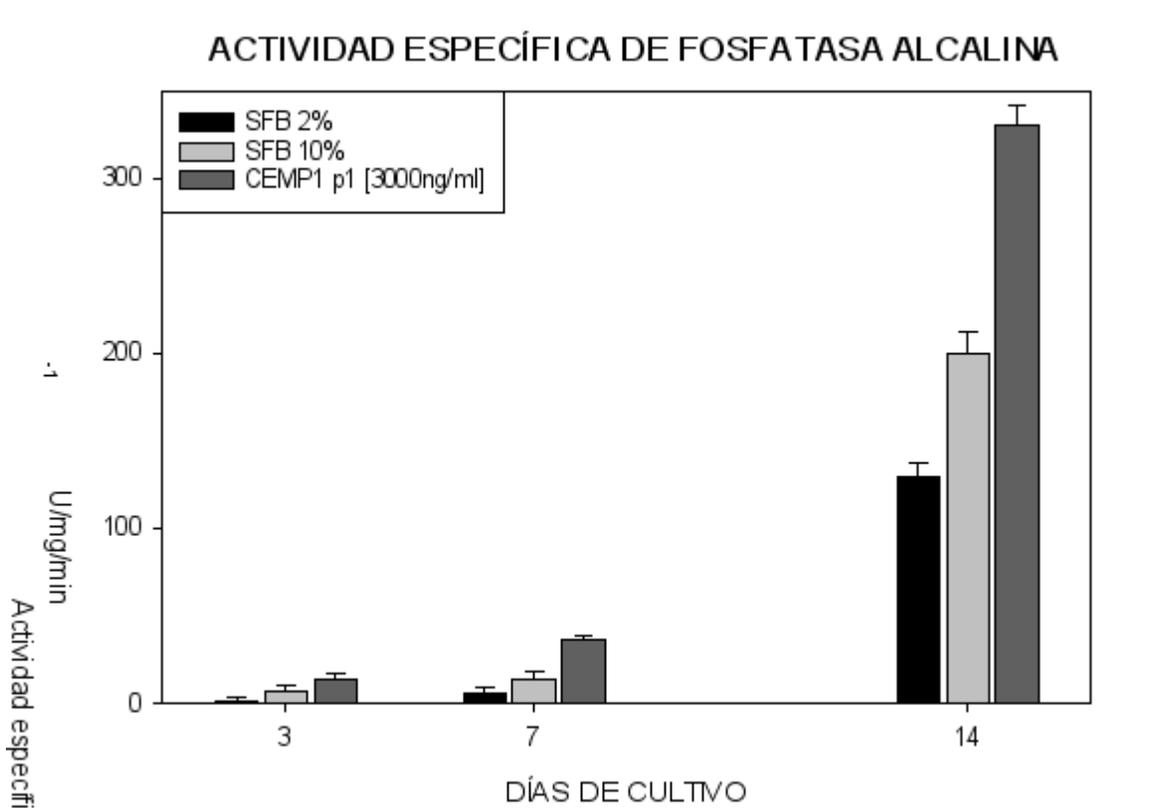


Figura 12. Ensayo de actividad de ALP. Las barras representan $M \pm EEM$. Se grafican los cambios celulares en el grupo control y experimental. La diferencia entre SFB 10% y CEMP1p1 ($p \leq 0.05$) se acerca al 80% en el día 14.

Los resultados sugieren que las células hPLC se encuentran en proceso inductivo de mineralización y la presencia del estímulo de CEMP1p1 aumenta significativamente las diferencias entre los controles y el grupo experimental.

Ensayo de mineralización con alizarina roja

La tinción de alizarina 2%, identifica la presencia de sales de calcio, es un colorante del tipo antraquinona, el cual forma quelatos con el ion calcio, uniéndose dos moléculas de alizarina roja a los anillos fenólicos y quinoides del colorante.

Los resultados de este ensayo colorimétrico, muestran que las células hPLC tratadas con CEMP1p1 tienen un aumento en la concentración de iones de calcio, detectado por el aumento en la coloración rojo-marrón de las células cultivadas en los experimentales comparados con los controles, mostrando diferencias cualitativas. Las evidencias más contundentes se observaron a los 14 días de cultivo como se observa en la Figura 13.

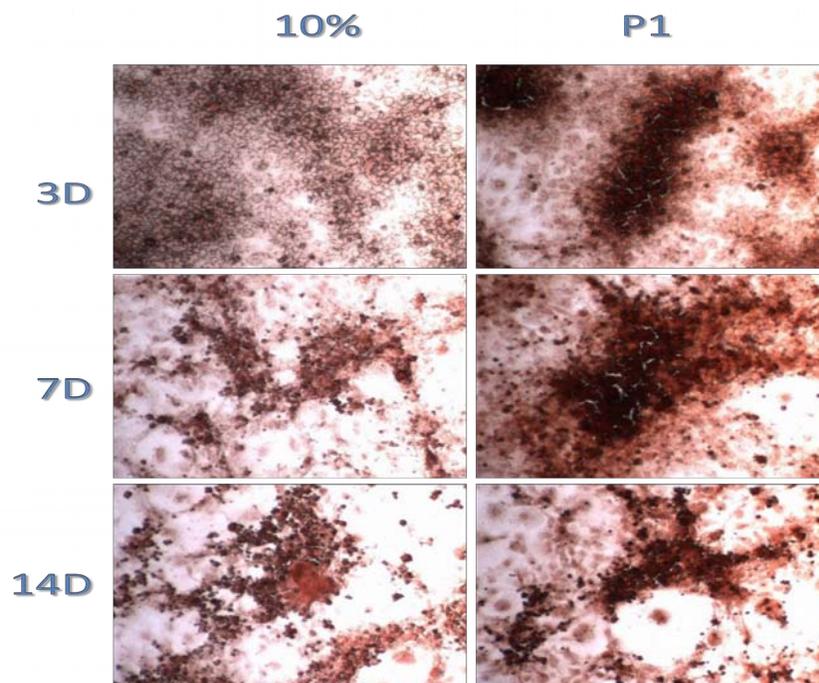


Figura 13. Imágenes de la tinción de alizarina roja (60X). Se observa en el cultivo celular fijado y teñido, la evidencia de la formación de nódulos de calcio, la coloración más intensa habla de mayor concentración de iones. Se presentan cambios celulares entre los grupos control y experimental.

La formación de nódulos de calcio demuestra que las células hPLC en presencia de CEMP1p1 mantienen un proceso de mineralización activo, lo que favorece la formación de nódulos más compactos y de coloración más intensa.

Ensayo de Western blot para proteínas implicadas en el fenotipo cementoblástico

Los ensayos de Western blot inmunodetectaron la presencia de proteínas implicadas en procesos de mineralización, los resultados se presentan en la Figura 14.

Las células hPLC estimuladas con 3000ng/ml de CEMP1p1 aumentan la expresión de proteínas como CEMP1 en todos los tiempos de cultivo, mientras que la expresión de BSP, CAP, AMEL y AMBN solo aumenta en los días 3 y 7 de cultivo y disminuye al día 14. La diferencia entre los controles y CEMP1p1 es significativa para la proteína CEMP1 en los días 3, 7 y 14 y para el resto de las proteínas la significancia se mantiene únicamente durante 3 y 7 días de cultivo. La comparación de los grupos experimentales con los controles mantiene diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$ y $p \leq 0.05$).

Se comprobó que CEMP1p1 induce la expresión de proteínas relacionadas con el fenotipo osteoblastico/cementoblástico en células hPCL *in vitro*.

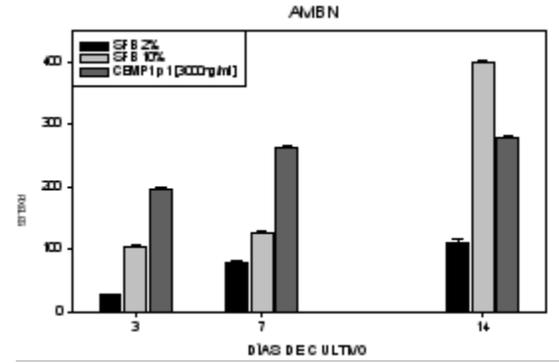
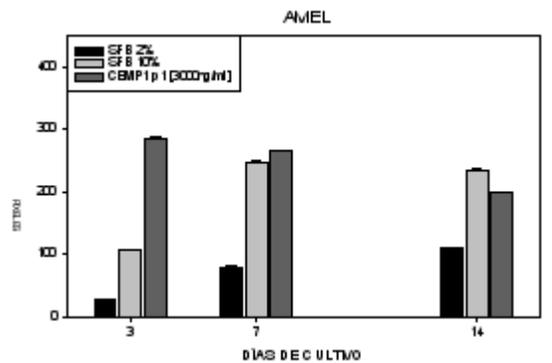
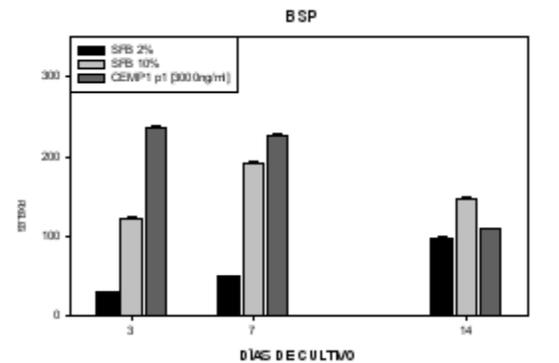
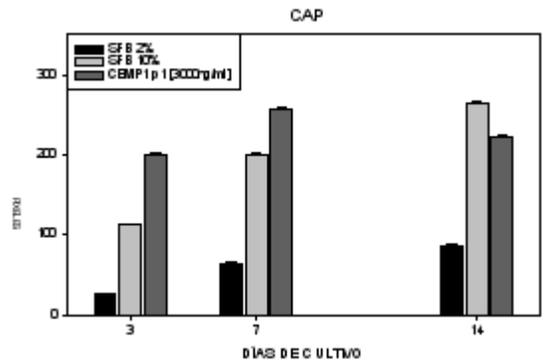
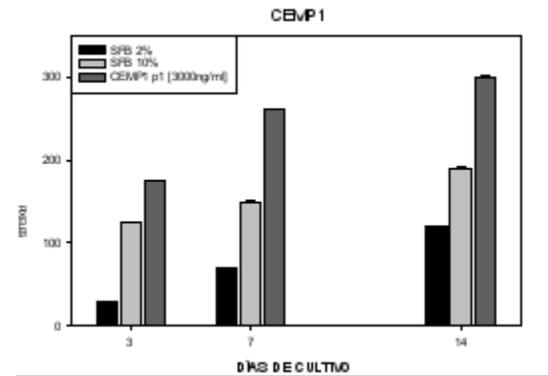
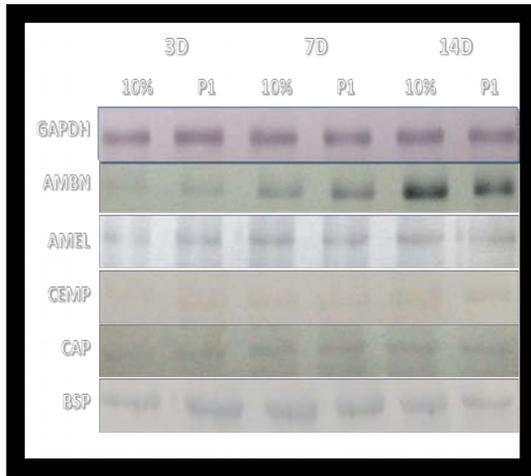


Figura 14. Ensayo de Western blot. En la primera imagen (superior-izquierda) se observan las distintas condiciones evaluadas a 3, 7 y 14 días de cultivo. Las gráficas de barras (CEMP1, BSP, CAP, AMEL y AMBN) representan $M \pm EEM$ de los ensayos por triplicado. Se observaron cambios celulares estadísticamente significativos en el grupo experimental comparado contra el control ($p \leq 0.05$).

Ensayo de qRT-PCR

Los resultados del qRT-PCR muestran la expresión relativa del mRNA de las proteínas seleccionadas con valores de fluorescencia. Los resultados expresan la cantidad de mRNA normalizado contra la expresión endógena de GAPDH y comparados contra los valores del grupo control (SFB 2%).

El análisis de los resultados indica que el grupo experimental tiene una mayor expresión de los genes que codifican para proteínas que se encuentran implicadas en procesos de mineralización activos (Figura 15). Los grupos experimentales fueron comparados con los controles; en el caso de las proteínas BSP, CAP, AMEL y AMBN la diferencia fue estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) para tiempos tempranos de mineralización como 3 y 7 días de cultivo en presencia de CEMP1p1, salvo algunas excepciones como CAP que solo mantiene la diferencia en el día 3 y AMBN que solo se observa en el día 7, el resto exhibe una diferencia durante ambos 3 y 7 días de cultivo donde los controles no mantienen una expresión de la misma magnitud.

En el día 14 de cultivo las diferencias con el control positivo ($p \leq 0.05$) debido a que los grupos experimentales ya no registran un aumento en la expresión de los productos génicos. A partir de éste día de cultivo no se muestran diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

Se determinó que el CEMP1p1 induce cambios a nivel transcripcional y aumenta la transcripción de proteínas responsables de la mineralización de la matriz extracelular, lo anterior, hace referencia a que el CEMP1p1 participa de forma activa regulando la mineralización de las células hPLC.

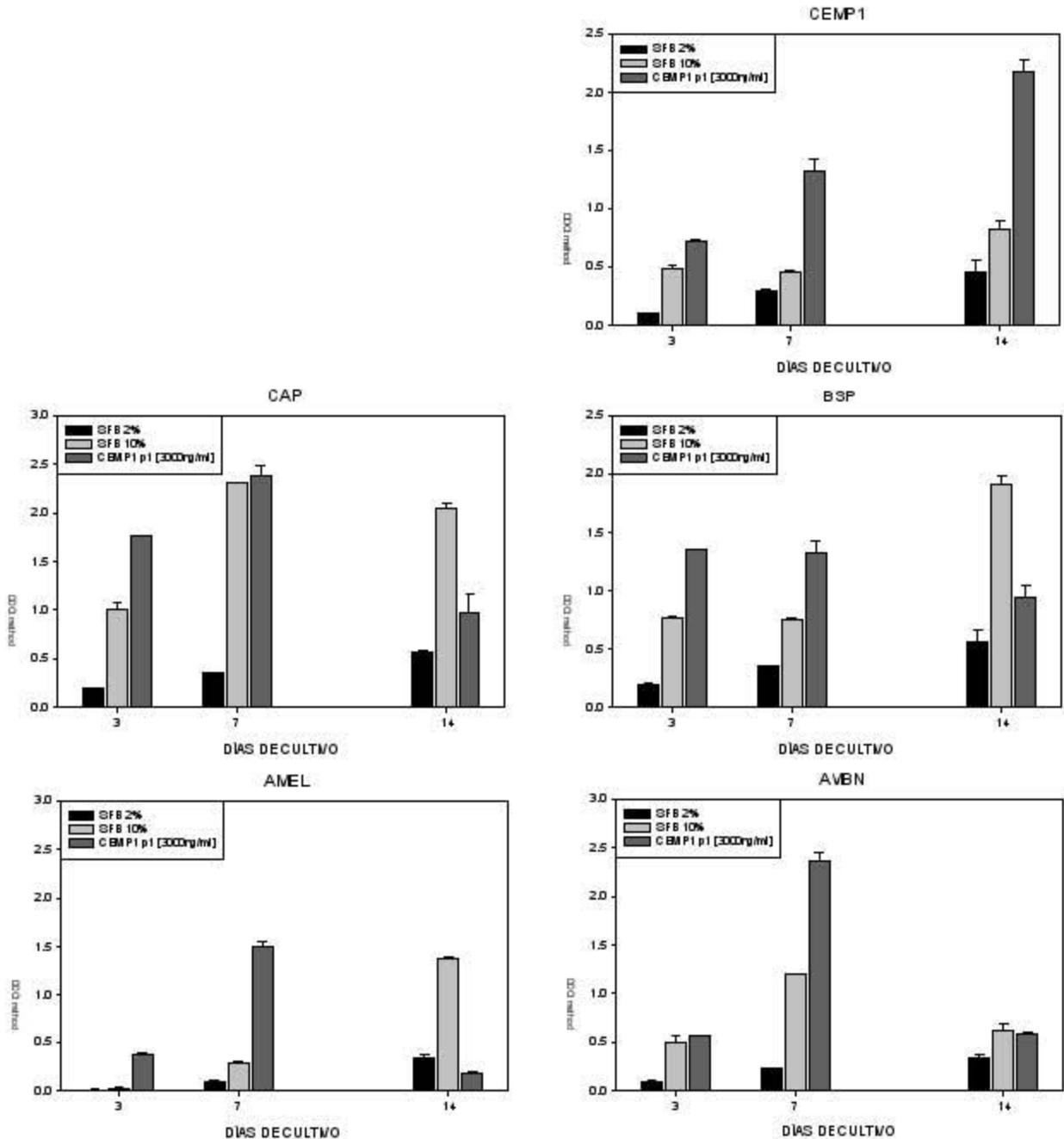


Figura 15. Ensayo de qRT-PCR para la expresión génica relativa. Las gráficas muestran las comparaciones entre los grupos control y experimentales a 3, 7 y 14 días. De los ensayos por triplicado resultan las barras que representan $M \pm EEM$ calculado por el método de DDCT. Se presentan diferencias entre control y experimental que resultan significativos para los productos génicos de todas las proteínas (CEMP1, BSP, CAP, AMEL y AMBN), sin embargo, las diferencias no se mantienen durante todos los días de cultivo.

ENSAYO DE WESTERN BLOT PARA MAPK

La especificidad de la unión antígeno–anticuerpo permite la detección de una única proteína dentro de una combinación compleja de proteínas o la detección de proteínas que se encuentren en estado fosforilado o no. Los resultados del análisis de las proteínas muestran datos cualitativos y semicuantitativos sobre la expresión de proteínas activas en las vías de señalización celular.

Los resultados de la densitometría muestran que la vía de ERK1/2 se encuentra activa en la proliferación de las células de hPLC desde las 0 horas hasta las 24 horas, a partir de ese momento comienza la activación de la vía de p38 y desciende la fosforilación de ERK1/2. El mismo patrón fue observado en las células estimuladas con el CEMP1p1.

Los resultados sugieren que CEMP1p1 no modifica las vías de señalización que normalmente utilizan las células hPLC y tampoco modifica los tiempos en los que se lleva a cabo el switching de vía de señalización activa; por tal motivo, CEMP1p1 participa aumentando los procesos de proliferación e inicios de diferenciación pero no modifica las etapas que la célula requiere para llevar a cabo tales efectos.

Por lo tanto, en este trabajo comprobamos que el CEMP1p1 promueve funciones necesarias para iniciar un proceso de mineralización sin modificar las vías activas de señalización ni los cambios a nivel intracelular y nuclear que normalmente llevaría a cabo dicho tipo celular.

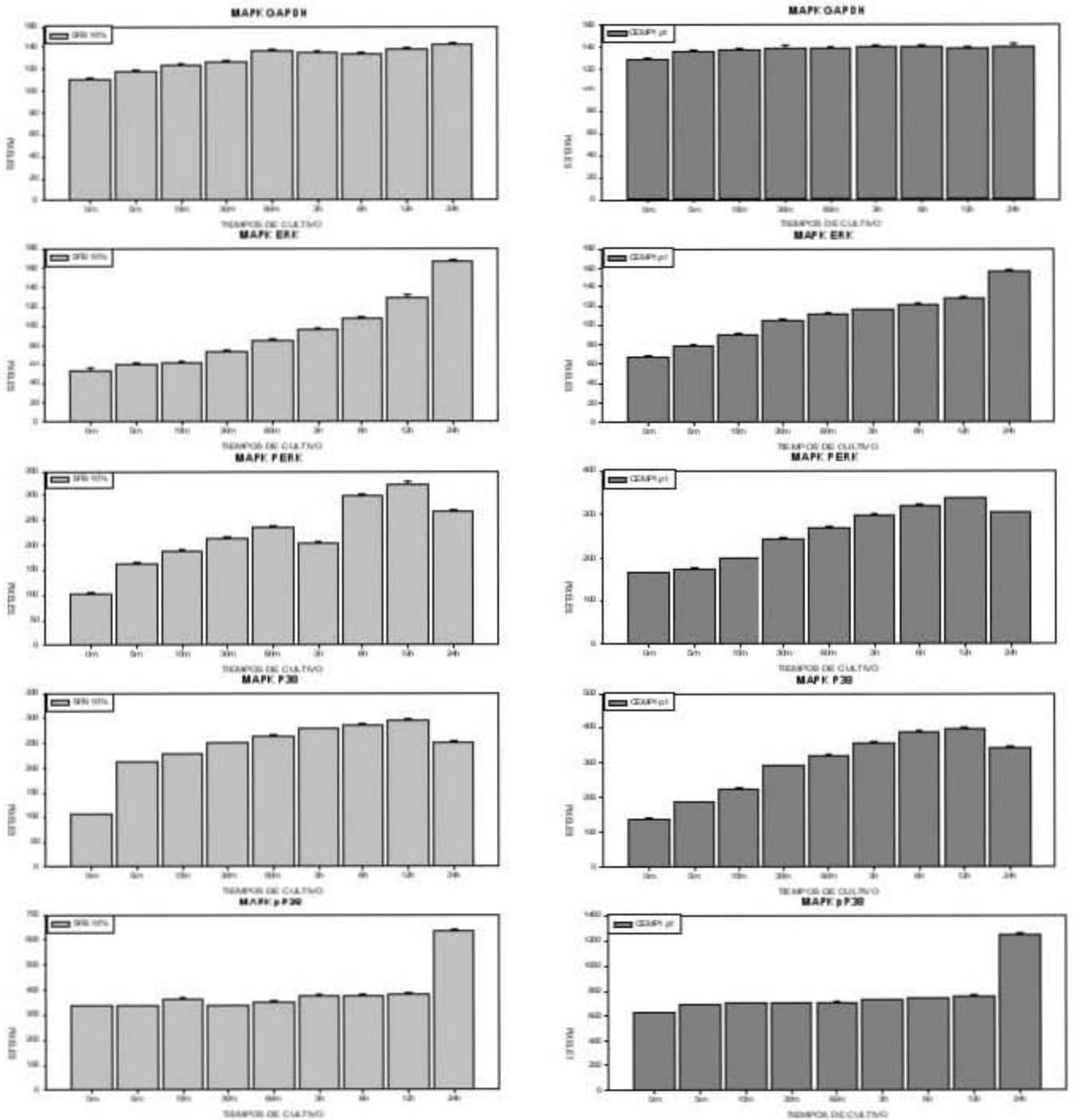


Figura 16. Ensayo de Western blot para la expresión de proteínas. Las gráficas muestran la comparación entre los grupos controles y experimentales a 3, 7 y 14 días de cultivo ($M \pm EEM$). Ensayos por triplicado. Las comparaciones entre control y experimental muestran diferencias estadísticamente significativas a las 24 horas ($p < 0.05$).

CONCLUSIONES

CEMP1p1 promueve la proliferación de hPLC *in vitro* e induce su diferenciación, a nivel transcripcional y traduccional, hacia un fenotipo mineralizante.

CEMP1p1 aumenta la actividad de ALP y la formación de nódulos de calcio, resultados asociados a la diferenciación celular hacia un fenotipo mineralizante.

Durante las primeras etapas de proliferación de hPLC, CEMP1p1 mantiene activa la cinasa de ERK1/2 hasta las 24h donde inicia la activación de la cinasa de p38, lo que sugiere un switching en las vías de señalización.

Los resultados apoyan la teoría de que CEMP1p1 puede ser una molécula con actividad biológica trascendente, participando en la promoción y regulación de la biomineralización así como en el compromiso cementoblástico de hPLC *in vitro*.

Respecto a eventos de nucleación en sistemas libres de células, proliferación vía activación de ERK1/2 en hPLC, diferenciación celular, regulación de la expresión protéica y mineralización de la ME, se puede garantizar que CEMP1p1 es biomimético de la proteína CEMP1.

DISCUSION

El descubrimiento de moléculas que pueden ser utilizadas para el tratamiento de enfermedades es un tema abordado frecuentemente en el desarrollo de productos tanto biofarmacéuticos como del área de regeneración de tejidos, gran número de estudios sobre péptidos bioactivos tienen esa meta (Berkowitz et al. 2012). Sin embargo, para que un péptido llegue a ser aplicado en el tratamiento de enfermedades requiere necesariamente, la previa caracterización estructural y funcional antes de trasladar la teoría a la práctica clínica. Este enfoque nos obliga a estudiar desde la estructura primaria de un péptido, que proporciona información decisiva sobre la función que puede llevar a cabo.

Los estudios han demostrado que los péptidos probados pueden desencadenar un gran número de efectos en cultivo celular, desde promover eventos de proliferación celular, apoptosis hasta activar vías de señalización previamente inactivas, entre otros (Chatron-Colliet et al. 2014) (Arpel 2014) (Li 2014) (Bai 2014). El estudio de estos efectos es indispensable para determinar su caracterización funcional.

Para evaluar los eventos de proliferación a los que da lugar la presencia de un péptido, es necesario realizar los ensayos en un sistema celular y designar controles de crecimiento. Generalmente para tal fin se hace referencia al porcentaje de SFB agregado. Un porcentaje de SFB menor a 5% puede ser utilizado como control negativo y SFB al 10% como control positivo. Conociendo el hecho de que el SFB es un suplemento con efectos mitogénicos sobre los cultivos celulares, en nuestro ensayo de proliferación se utilizó SFB 10% como control positivo y SFB 2% como control negativo y se observó que la proliferación disminuyó con SFB 2%, con esto se redujo la capacidad mitogénica de las células y se asegura que cualquier efecto en la proliferación fuera resultado de la presencia de CEMP1p1, que fue el estímulo estudiado.

En los estudios sobre caracterización de péptidos se han logrado identificar motivos de unión a cristales (Zhu et al. 2013). Algunos péptidos probados como inductores de procesos de mineralización, han estudiado con frecuencia a los péptidos de AMEL, de BSP o de DMP (Chen & Webster 2009; Liu et al. 2013), para la inducción de una diferenciación osteoblástica en células madre mesenquimales (Olivares-Navarrete et al.

2014; Stout et al. 2014); también, se han diseñado péptidos combinados, que incluyen un extremo terminal de AMEL y otro de AMBN para inducir diferenciación osteoblástica o con la ayuda de péptidos de Amelogenina se ha logrado inclusive construir capas de material similar al cemento (Gungormus et al. 2012). Al parecer los péptidos no tienen necesariamente el efecto de la proteína de donde derivan sino la secuencia de aminoácidos parece ser la responsable de los efectos que los péptidos inducen y sobre el medio en el que se encuentran inmersos. Por lo que los péptidos, además de ser capaces de promover procesos de mineralización, también inducen diferenciación celular. En el presente estudio, se evaluó el efecto de un nuevo péptido inductor de un proceso de mineralización distinto a los antes reportados en la literatura. Los resultados de los ensayos, sugieren que el péptido que proviene de CEMP1 tiene capacidad de inducir la diferenciación de células de fenotipo no mineralizante.

Existe un enorme potencial para imitar superficies de las proteínas utilizando moléculas pequeñas, sin embargo la mayoría de investigación en cambio se ha centrado en el objetivo más fácil de modificar péptidos biológicamente activos, e insertar cambios para evitar las limitaciones y mejorar sus propiedades. Por ésta razón ha habido un gran interés en la manipulación de las secuencias sintéticas, adicionando nuevas regiones dentro de los péptidos funcionales que aseguren una interacción con alguna molécula de interés; sin embargo, tal manipulación aunque podría aportar muchos beneficios también puede desencadenar efectos no esperados o poco predecibles. En el caso del presente proyecto, el péptido mantiene la estructura original de la secuencia de la proteína, lo que nos evita efectos secundarios inesperados.

La interacción de los péptidos con secuencias de proteínas, ADN, ARN y otras, está determinada por la estructura primaria de los péptidos, debido a que la capacidad de interacción guarda relación directa con la secuencia de aminoácidos que conforman a los péptidos. En el ámbito de las pequeñas moléculas, existe la premisa de que el mimetismo estructural puede conferir mimetismo funcional y conducir a la pequeña molécula a activar los objetivos de interés biológico, de aquí que se busquen secuencias cortas que pueden corresponder a epítopes específicos de una proteína total plegada. Este seccionamiento de la secuencia de la proteína completa, por su tamaño no tiende a formar estructuras termodinámicamente estables como una proteína total y en el agua, debido a la competencia de enlaces de hidrógeno, el péptido puede establecer interacciones y mantener mayor estabilidad entre mayor sea el número de aminoácidos polares. Los

aminoácidos presentes en la secuencia, sufren plegamientos e interactúan con el entorno que define tanto la localización como la acción de los péptidos. El análisis de la secuencia del péptido CEMP1p1 expone que el 70% de sus aminoácidos son polares lo cual, nos asegura una interacción con medios acuosos y además de brindarnos la comodidad de administrarlo en solución, nos sugiere una posible localización intracelular o extracelular.

Diferentes estudios han establecido que la mineralización puede verse facilitada con la presencia de residuos RGD así como, la estructura al azar en el ordenamiento de una proteína, la presencia de aminoácidos como ácido aspártico y ácido glutámico o la presencia de secuencias consenso que permita a las serina/treonina cinasas, fosforilar un sustrato (Ardjomandi 2012) (Moore 2011) (Beuvelot 2009) (Mante et al. 2004). Al analizar todas estas características que participan o promueven eventos de mineralización, en nuestra secuencia de CEMP1p1, el análisis determinó que un 40% de la secuencia de CEMP1p1 consiste en residuos de Serina y Treonina, aunado al 25% de secuencia de RGD, lo que define que ésta molécula es apropiada para promover eventos de mineralización en un 65%. Coincidentemente, en nuestros resultados CEMP1p1 estuvo involucrado en la diferenciación de células del ligamento periodontal humano hacia un fenotipo mineralizante.

Por otro lado, se ha visto que la composición de aminoácidos de carácter hidrofóbico, puede proporcionarle al péptido la capacidad para interactuar con moléculas del mismo carácter. Nuestro análisis demuestra que el 10% de la composición de CEMP1p1 es hidrofóbica y el 90% es hidrofílica, tal composición nos lleva a pensar en una molécula capaz de mantenerse en un entorno acuoso aunque podría llegar a asociarse con moléculas hidrofóbicas probablemente de forma temporal. Se ha identificado el mismo tipo de comportamiento en péptidos conocidos como troyanos o penetratinas. Es el caso de la penetratina del Virus del VIH, conocida como HIV-1 *Tat* (Rizzuti et al. 2014), éstos péptidos son capaces de introducirse a una célula mediante el establecimiento de interacciones momentáneas con la membrana celular para poder atravesarla sin necesidad de un transportador o receptor; las principales características de tales péptidos es que su estructura conserva una naturaleza hidrofílica y además contienen algunos aminoácidos hidrofóbicos distribuidos en toda su longitud. Diversos péptidos tienen futuro en la aplicación terapéutica donde se pretende (Tutar 2014) (Huang 2014) (Fu 2014) utilizarlo como acarreadores de moléculas que tienen un destino intracelular y enormes dificultades para ser transportadas al interior de una célula.

PERSPECTIVAS

El descubrimiento de moléculas con potencial para la regeneración de tejidos, vislumbra enormes beneficios en el área médico-dental.

Los péptidos bioactivos aunque tienen una amplia gama de propiedades biológicas, su uso como fármacos o moléculas terapéuticas ha sido obstaculizado enormemente debido a las dificultades que presentan para permear la membrana celular, la limitada biodisponibilidad oral, la acelerada eliminación por el metabolismo, entre otras. Recientemente se han propuesto modificaciones que podrían solucionar las deficiencias de los péptidos pero, se requiere un enfoque profundo en los efectos nocivos que conllevan dichas modificaciones.

Las perspectivas para CEMP1p1, son diversas, la principal consiste en continuar con la caracterización funcional de ésta molécula antes de proyectar su uso a la aplicación clínica. Un buen parámetro de comparación es la proteína completa CEMP1. Sería recomendable realizar los mismos estudios que ya se han hecho para CEMP1 y continuar corroborando si CEMP1p1 resulta ser mimético de la proteína de la cual deriva.

Recientemente se reportaron los resultados de un experimento realizado en defectos óseos de tamaño crítico, creados en la calvaria de ratas Wistar (Serrano 2013) y posteriormente tratados con CEMP1. Después de 16 semanas del tratamiento, la proteína fue capaz de inducir la regeneración del defecto en un 97%. Las características del nuevo tejido mineralizado, incluyendo la densidad ósea, fueron muy similares al hueso normal sano. En este estudio, se demostró que CEMP1 estimula la formación y regeneración de hueso, resultando en una alternativa terapéutica para el tratamiento de defectos óseos. Con la evidencia previa se puede diseñar un experimento similar pero utilizando como tratamiento CEMP1p1, si los resultados fueran iguales o mejores, entonces se podría asegurar que sigue siendo una mejor alternativa el uso de péptidos sobre el uso de proteínas.

Resulta también indispensable definir la dosis terapéutica, llevando implícito el hecho de que la dosis debe tener el mejor efecto posible con el mínimo, o de ser posible, nulos efectos secundarios.

El uso de péptidos inductores de la mineralización con orientación hacia la regeneración es un área ampliamente estudiada, y la mejora de las limitaciones de los péptidos sigue siendo una tarea complicada en la que se requiere el enfoque científico multidisciplinario.

TABLAS

Tabla 1. Los ensayos de qRT-PCR tiempo real, utilizaron los siguientes primers sintéticos (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

PRIMER #	NOMBRE	SECUENCIA
1	GAPDH-F	CAACGGATTTGGTCGTATTGG
2	GAPDH-R	GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTAA
3	CEMP1-F	TGAGAACCTCACCTGCCTCT
4	CEMP1-R	ACCCCTTAGGAAGTGGCTGT
5	CAP-F	TCCAGACATTTGCCTTGCTT
6	CAP-R	TTACAGCAATAGAAAAACAGCATGA
7	BSP-F	AACGAAGAAAGCGAAGCAGAA
8	BSP-R	TCTGCCTCTGTGCTGTTGGT
9	AMEL-F	GGACCAAGCCTCCCTGTGAGC
10	AMEL-R	TGCTCCCACAAGGCAGGCAAAC
11	AMBN-F	TGTGCATCCCCCACCTCTCCC
12	AMBN-R	GTGCTGTGGCCTGGTTGGTGG

RESEARCH ARTICLE

Cementum protein 1 (CEMP1) activates p38 and JNK during the mineralisation process by cementoblast-like cells in vitro

Silvia Maldonado¹, Enrique Romo¹, Janeth Serrano¹, Adriana Pérez¹, Christian Guerra², Margarita Zeichner-David², Gabriela Mercado¹ and Higinio Arzate^{1*}

¹ Laboratorio de Biología Periodontal, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

² Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, México, D.F., México

³ Dntrow School of Dentistry of the University of Southern California, Los Angeles, California, USA

Abstract

We recently presented evidence showing that cementum protein 1 (CEMP1) promotes periodontal ligament (PDL) cell migration, proliferation, expression of bone, and cementum-matrix proteins and mineralisation. In other words, it induces PDL precursor cells commitment toward a cementoblast-like cells phenotype. The intracellular signalling pathways involved in cementoblast differentiation and mineralisation have not been well characterised. JNK and p38 protein kinases (MAPKs) are intracellular signalling pathways and key mediators of cellular processes such as proliferation and differentiation. Since signalling pathways involving MAPKs have been associated with osteoblastic phenotype, in this study we investigated the effect of hrCEMP1 and mineralising media containing β -glycerophosphate and ascorbic acid on the activation of p38-MAPK and JNK-MAPK in cementoblast-like cells. Our results show that mineralising media and hrCEMP1 induced phosphorylation of p38 and JNK kinases. Mineralising media containing hrCEMP1 increased the activation of p38-MAPK and its translocation to the cell nucleus; increased phosphorylation of JNK-MAPK and induced the phosphorylation of the protein C-JUN. We also demonstrate that hrCEMP1 regulates the expression of BSP, OCN, and ALP specific activity. We found that hrCEMP1 and mineralising media promote nodule formation. These findings give an insight into the signalling pathways activated by hrCEMP1 and suggest likely components of the mechanisms that regulate the formation and regeneration of cementum and surrounding connective tissues.

Keywords: cell signalling pathways; cementoblasts; CEMP; MAPK; mineralisation

Introduction

Cementum is a unique avascular mineralised tissue that covers the roots of the teeth and provides the interface through which the root is anchored to alveolar bone via collagen Sharpey's fibers of the periodontal ligament. The cementum organic matrix consists of several proteins and glycoproteins like collagens types I and III, fibronectin, osteopontin (OPN), bone sialoprotein (BSP), osteocalcin (OCN), alkaline phosphatase (ALP), these proteins play an important role during the cementogenesis process particularly during the mineralisation events, chondroitin sulphate, dermatan sulphate, hyaluronic acid, and several growth factors like BMPs, FGFs, etc. (Narayanan et al., 1995; Cho and

Garant, 2000; Shimono et al., 2003; Nanci and Bosshardt, 2006). More recently, a new protein present in cementum, named Cementum Protein 1 (CEMP1; GenBank NM_001048212, gene ID 752014) has been characterised and it has been shown that this protein is specific for cementum and it is expressed by cementoblasts and cementoblast-progenitor cells present in the periodontal ligament (Alvarez et al., 2006). Functional studies have shown that human recombinant cementum protein 1 (hrCEMP1) induces differentiation of non-mineralising cells to a mineralised-like phenotype (Carmona et al., 2007; Kémosan et al., 2007) and controls periodontal ligament cells commitment to become cementoblast. Additionally, CEMP1 is preferentially expressed in ALP-positive

*Corresponding author; e-mail: hartzate@unam.mx

Abbreviations: CEMP1, cementum protein 1; hrCEMP1, human recombinant cementum protein 1; HCDC, human cementoblastoma-derived cells; BSP, bone sialoprotein; OCN, osteocalcin; ALP, alkaline phosphatase; MAPK, mitogen activated protein kinases; JNK, C-JUN N-terminal kinase

©

Cell Biol Int Rep 31 (2014) 8–16 © 2013 The Authors. Cell Biology International Reports published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of the International Federation for Cell Biology.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

REFERENCIAS

- Ababneh, K. T., R. C. Hall, and G. Embery. 1999. The proteoglycans of human cementum: immunohistochemical localization in healthy, periodontally involved and ageing teeth. *J Periodontol Res* 34 (2):87-96.
- Al-Hamdan, K., R. Eber, D. Sarment, C. Kowalski, and H. L. Wang. 2003. Guided tissue regeneration-based root coverage: meta-analysis. *J Periodontol* 74 (10):1520-33.
- Alvarez-Perez, M. A., O. Alvarez-Fregoso, J. Ortiz-Lopez, and H. Arzate. 2005. X-ray microanalysis of human cementum. In *Microsc Microanal*. United States.
- Arzate, H. 2010. Effects of human full-length amelogenin on the proliferation of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *J Periodontol Res* 342 (2):205-12.
- Arzate, H., L. F. Jimenez-Garcia, M. A. Alvarez-Perez, A. Landa, I. Bar-Kana, and S. Pitaru. 2002. Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein. *J Dent Res* 81 (8):541-6.
- Arzate, H., S. W. Olson, R. C. Page, and A. S. Narayanan. 1992. Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in culture. *Bone Miner* 18 (1):15-30.
- Bartold, P. M., Y. Miki, B. McAllister, A. S. Narayanan, and R. C. Page. 1988. Glycosaminoglycans of human cementum. *J Periodontol Res* 23 (1):13-7.
- Bartold, P. M., and A. S. Narayanan. 2006. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. In *Periodontol 2000*. Denmark.
- Beertsen, W., and V. Everts. 1990. Formation of acellular root cementum in relation to dental and non-dental hard tissues in the rat. *J Dent Res* 69 (10):1669-73.
- Beertsen, W., T. Van den Bos, and V. Everts. 1990. The possible role of alkaline phosphatase in acellular cementum formation. *J Biol Buccale* 18 (3):203-5.
- Beertsen, W., T. VandenBos, and V. Everts. 1999. Root development in mice lacking functional tissue non-specific alkaline phosphatase gene: inhibition of acellular cementum formation. *J Dent Res* 78 (6):1221-9.
- Berkowitz, S. A., J. R. Engen, J. R. Mazzeo, and G. B. Jones. 2012. Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars. *Nat Rev Drug Discov* 11 (7):527-40.
- Boabaid, F., C. W. Gibson, M. A. Kuehl, J. E. Berry, M. L. Snead, F. H. Nociti, Jr., E. Katchburian, and M. J. Somerman. 2004. Leucine-rich amelogenin peptide: a candidate signaling molecule during cementogenesis. *J Periodontol* 75 (8):1126-36.
- Bosshardt, D. D., and A. Nanci. 2004. Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth. In *J Clin Periodontol*. Denmark.
- Bosshardt, D. D., and H. E. Schroeder. 1993. Attempts to label matrix synthesis of human root cementum in vitro. *Cell Tissue Res* 274 (2):343-52.
- Bosshardt, D. D., A. Sculean, P. Windisch, B. E. Pjetursson, and N. P. Lang. 2005. Effects of enamel matrix proteins on tissue formation along the roots of human teeth. In *J Periodontol Res*. Denmark: Blackwell Munksgaard 2005.
- Chatron-Colliet, A., N. Lalun, C. Terryn, S. Kurdykowski, M. Lorenzato, A. Rusciani, D. Ploton, L. Duca, H. Bobichon, A. Arpel, P. Sawma, C. Spenle, J. Fritz, L. Meyer, N. Garnier, I. Velazquez-Quesada, T. Hussenet, S. Aci-Seche, N. Baumlin, M. Genest, D. Brasse, P. Hubert, G. Cremel, G. Orend, P. Laquerriere, D. Bagnard, J. Li, S. H. Luo, Y. Tang, J. J. Li, B. Bai, X. Cai, Y. Jiang, E. Karteris, and J. Chen. 2014. The elastin peptide (VGVAPG) induces the 3D reorganisation of PML-NBs and SC35 speckles architecture, and accelerates proliferation of fibroblasts and melanoma cells
- Arpel A et al. 2014. Transmembrane Domain Targeting Peptide Antagonizing ErbB2/Neu Inhibits Breast Tumor Growth and Metastasis
- Li, J et al. 2014. C-reactive protein induces pulmonary artery smooth cell proliferation via modulation of ERK1/2, Akt and NF-kappaB pathways

- Bai, B et al. 2014. Heterodimerization of apelin receptor and neurotensin receptor 1 induces phosphorylation of ERK1/2 and cell proliferation via Galphaq-mediated mechanism. In *Histochem Cell Biol*. United States Germany England: 2014.Elsevier Inc. Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.
- Chen, C. C., and A. L. Boskey. 1985. Mechanisms of proteoglycan inhibition of hydroxyapatite growth. *Calcif Tissue Int* 37 (4):395-400.
- Chen, Y., and T. J. Webster. 2009. Increased osteoblast functions in the presence of BMP-7 short peptides for nanostructured biomaterial applications. *J Biomed Mater Res A* 91 (1):296-304.
- Cheng, H., B. Caterson, P. J. Neame, G. E. Lester, and M. Yamauchi. 1996. Differential distribution of lumican and fibromodulin in tooth cementum. *Connect Tissue Res* 34 (2):87-96.
- Cho, M. I., W. L. Lin, and R. J. Genco. 1995. Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodontol* 66 (6):522-30.
- Cuisinier, F. J., R. W. Glaisher, J. C. Voegel, J. L. Hutchison, E. F. Bres, and R. M. Frank. 1991. Compositional variations in apatites with respect to preferential ionic extraction. *Ultramicroscopy* 36 (4):297-305.
- Dean, D. D., C. H. Lohmann, V. L. Sylvia, D. L. Cochran, Y. Liu, B. D. Boyan, and Z. Schwartz. 2002. Effect of porcine fetal enamel matrix derivative on chondrocyte proliferation, differentiation, and local factor production is dependent on cell maturation state. In *Cells Tissues Organs*. Switzerland: 2002 S. Karger AG, Basel.
- Dunker, A. K., and Z. Obradovic. 2001. The protein trinity--linking function and disorder. In *Nat Biotechnol*. United States.
- Esposito, M., P. Coulthard, P. Thomsen, and H. V. Worthington. 2004. Enamel matrix derivative for periodontal tissue regeneration in treatment of intrabony defects: a Cochrane systematic review. In *J Dent Educ*. United States.
- Fong, C. D. 1996. Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *Oral Dis* 31 (2):144-8.
- Gestrelus, S., C. Andersson, A. C. Johansson, E. Persson, A. Brodin, L. Rydhag, and L. Hammarstrom. 1997. Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. *J Clin Periodontol* 24 (9 Pt 2):678-84.
- Gestrelus, S., C. Andersson, D. Lidstrom, L. Hammarstrom, and M. Somerman. 1997. In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol* 24 (9 Pt 2):685-92.
- Gestrelus, S., S. P. Lyngstadaas, and L. Hammarstrom. 2000. Emdogain--periodontal regeneration based on biomimicry. *Clin Oral Investig* 4 (2):120-5.
- Giannobile, W. V., R. D. Finkelman, and S. E. Lynch. 1994. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J Periodontol* 65 (12):1158-68.
- Giannobile, W. V., and M. J. Somerman. 2003. Growth and amelogenin-like factors in periodontal wound healing. A systematic review. *Ann Periodontol* 8 (1):193-204.
- Gibson, W. A., and H. M. Fullmer. 1967. Histochemistry of the periodontal ligament. II. The phosphatases. *Periodontics* 5 (5):226-32.
- Goldstein, M., L. Brayer, and Z. Schwartz. 1996. A critical evaluation of methods for root coverage. *Crit Rev Oral Biol Med* 7 (1):87-98.
- Groeneveld, M. C., V. Everts, and W. Beertsen. 1995. Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingiva of the rat molar: its relation to cementum formation. *J Dent Res* 74 (7):1374-81.
- Grzesik, W. J., C. R. Frazier, J. R. Shapiro, P. D. Sponseller, P. G. Robey, and N. S. Fedarko. 2002. Age-related changes in human bone proteoglycan structure. Impact of osteogenesis imperfecta. In *J Biol Chem*. United States.
- Grzesik, W. J., and A. S. Narayanan. 2002. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med* 13 (6):474-84.
- Gungormus, M., E. E. Oren, J. A. Horst, H. Fong, M. Hnilova, M. J. Somerman, M. L. Snead, R. Samudrala, C. Tamerler, and M. Sarikaya. 2012. Cementomimetics-constructing a cementum-like biomineralized microlayer via amelogenin-derived peptides. *Int J Oral Sci* 4 (2):69-77.

- Halackova, Z., L. Oudran, and M. Kukletova. 1980. Localization of some enzymes in the periodontium of the rat molar. In *Acta Histochem.* Germany, East.
- Hammarstrom, L. 1997. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol* 24 (9 Pt 2):658-68.
- Hammarstrom, L., L. Heijl, and S. Gestrelus. 1997. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol* 24 (9 Pt 2):669-77.
- Harrison, J. W., and R. S. Roda. 1995. Intermediate cementum. Development, structure, composition, and potential functions. In *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* United States.
- Heijl, L. 1997. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *J Clin Periodontol* 24 (9 Pt 2):693-6.
- Hirooka, H. 1998. The biologic concept for the use of enamel matrix protein: true periodontal regeneration. *Quintessence Int* 29 (10):621-30.
- Hough, T. A., M. Polewski, K. Johnson, M. Cheeseman, P. M. Nolan, L. Vizor, S. Rastan, A. Boyde, K. Pritzker, A. J. Hunter, E. M. Fisher, R. Terkeltaub, and S. D. Brown. 2007. Novel mouse model of autosomal semidominant adult hypophosphatasia has a splice site mutation in the tissue nonspecific alkaline phosphatase gene *Akp2*. *J Bone Miner Res* 22 (9):1397-407.
- Howell, T. H., J. P. Fiorellini, D. W. Paquette, S. Offenbacher, W. V. Giannobile, and S. E. Lynch. 1997. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 68 (12):1186-93.
- Itoiz, M. E., J. Mayo, R. L. Cabrini, and F. A. Carranza, Jr. 1969. Histochemical study of healing wounds: alkaline and acid phosphatase. *J Oral Surg* 27 (8):641-4.
- Iwata, T., Y. Morotome, T. Tanabe, M. Fukae, I. Ishikawa, and S. Oida. 2002. Noggin blocks osteoinductive activity of porcine enamel extracts. *J Dent Res* 81 (6):387-91.
- Janones, D. S., L. F. Massa, and V. E. Arana-Chavez. 2005. Immunocytochemical examination of the presence of amelogenin during the root development of rat molars. In *Arch Oral Biol.* England.
- Jono, S., C. Peinado, and C. M. Giachelli. 2000. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. In *J Biol Chem.* United States.
- Kalpidis, C. D., and M. P. Ruben. 2002. Treatment of intrabony periodontal defects with enamel matrix derivative: a literature review. *J Periodontol* 73 (11):1360-76.
- Kawase, T., K. Okuda, H. Yoshie, and D. M. Burns. 2002. Anti-TGF-beta antibody blocks enamel matrix derivative-induced upregulation of p21WAF1/cip1 and prevents its inhibition of human oral epithelial cell proliferation. *J Periodontol Res* 37 (4):255-62.
- King, G. N. 2001. New regenerative technologies: rationale and potential for periodontal regeneration: 1. New advances in established regenerative strategies. *Dent Update* 28 (1):7-12.
- . 2001. New regenerative technologies: rationale and potential for periodontal regeneration: 2. Growth factors. *Dent Update* 28 (2):60-5.
- King, G. N., and D. L. Cochran. 2002. Factors that modulate the effects of bone morphogenetic protein-induced periodontal regeneration: a critical review. *J Periodontol* 73 (8):925-36.
- King, G. N., N. King, and F. J. Hughes. 1998. The effect of root surface demineralization on bone morphogenetic protein-2-induced healing of rat periodontal fenestration defects. *J Periodontol* 69 (5):561-70.
- Kuboki, Y., M. Sasaki, A. Saito, H. Takita, and H. Kato. 1998. Regeneration of periodontal ligament and cementum by BMP-applied tissue engineering. *Eur J Oral Sci* 106 Suppl 1:197-203.
- Lang, H., N. Schuler, S. Arnhold, R. Nolden, and T. Mertens. 1995. Formation of differentiated tissues in vivo by periodontal cell populations cultured in vitro. *J Dent Res* 74 (5):1219-25.
- Liu, W., Y. Cao, J. Shen, Q. Xu, Z. Zhu, and Q. Li. 2013. [Design and evaluation of a kind of biomimetic peptides of dentin matrix protein-1]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 31 (4):341-4.
- Luo, W., H. C. Slavkin, and M. L. Snead. 1991. Cells from Hertwig's epithelial root sheath do not transcribe amelogenin. *J Periodontol Res* 26 (1):42-7.

- Lynch, S. E., G. R. de Castilla, R. C. Williams, C. P. Kiritsy, T. H. Howell, M. S. Reddy, and H. N. Antoniades. 1991. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol* 62 (7):458-67.
- MacNeil, R. L., J. Berry, J. D'Errico, C. Strayhorn, B. Piotrowski, and M. J. Somerman. 1995. Role of two mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein, during cementogenesis. *Connect Tissue Res* 33 (1-3):1-7.
- Macneil, R. L., N. Sheng, C. Strayhorn, L. W. Fisher, and M. J. Somerman. 1994. Bone sialoprotein is localized to the root surface during cementogenesis. *J Bone Miner Res* 9 (10):1597-606.
- MacNeil, R. L., and M. J. Somerman. 1993. Molecular factors regulating development and regeneration of cementum. *J Periodontol Res* 28 (6 Pt 2):550-9.
- Mante, F. K., K. Little, M. O. Mante, C. Rawle, and G. R. Baran. 2004. Oxidation of titanium, RGD peptide attachment, and matrix mineralization rat bone marrow stromal cells. *J Oral Implantol* 30 (6):343-9.
- Marikova, Z., and M. Kindlova. 1972. Alkaline phosphatase in the periodontium of rat molars. *J Dent Res* 51 (5):1502.
- Mariotti, A. 1993. The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues. *Periodontol 2000* 3:39-63.
- Mariotti, A. 2003. Efficacy of chemical root surface modifiers in the treatment of periodontal disease. A systematic review. *Ann Periodontol* 8 (1):205-26.
- Matsuda, N., W. L. Lin, N. M. Kumar, M. I. Cho, and R. J. Genco. 1992. Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol* 63 (6):515-25.
- McAllister, B., A. S. Narayanan, Y. Miki, and R. C. Page. 1990. Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum. *J Periodontol Res* 25 (2):99-105.
- McCaughey, L. K., and R. M. Nohutcu. 2002. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *J Periodontol* 73 (11):1377-91.
- Miller, P. D., and R. D. Craddock. 1996. Surgical advances in the coverage of exposed roots. *Curr Opin Periodontol* 3:103-8.
- Murphy, K. G., and J. C. Gunsolley. 2003. Guided tissue regeneration for the treatment of periodontal intrabony and furcation defects. A systematic review. *Ann Periodontol* 8 (1):266-302.
- Nagano, T., S. Oida, S. Suzuki, T. Iwata, Y. Yamakoshi, Y. Ogata, K. Gomi, T. Arai, and M. Fukae. 2006. Porcine enamel protein fractions contain transforming growth factor-beta1. *J Periodontol* 77 (10):1688-94.
- Nakashima, M., and A. H. Reddi. 2003. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. In *Nat Biotechnol*. United States.
- Nanci, A., and D. D. Bosshardt. 2006. Structure of periodontal tissues in health and disease. In *Periodontol 2000*. Denmark.
- Nociti, F. H., Jr., J. E. Berry, B. L. Foster, K. A. Gurley, D. M. Kingsley, T. Takata, M. Miyauchi, and M. J. Somerman. 2002. Cementum: a phosphate-sensitive tissue. *J Dent Res* 81 (12):817-21.
- Nojima, N., M. Kobayashi, M. Shionome, N. Takahashi, T. Suda, and K. Hasegawa. 1990. Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *J Periodontol Res* 25 (3):179-85.
- Oda, S., A. Kinoshita, T. Higuchi, T. Shizuya, and I. Ishikawa. 1997. Ectopic bone formation by biphasic calcium phosphate (BCP) combined with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Med Dent Sci* 44 (3):53-62.
- Oldberg, A., A. Franzen, and D. Heinegard. 1988. The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein. *J Biol Chem* 263 (36):19430-2.
- Olivares-Navarrete, R., K. Vesper, S. L. Hyzy, A. Almaguer-Flores, B. D. Boyan, and Z. Schwartz. 2014. Role of the N-terminal peptide of amelogenin on osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. In *Eur Cell Mater*. Scotland.
- Oringer, R. J. 2002. Biological mediators for periodontal and bone regeneration. *Compend Contin Educ Dent* 23 (6):501-4, 506-10, 512 passim; quiz 518.

- Page, R. C., L. D. Engel, A. S. Narayanan, and J. A. Clagett. 1978. Chronic inflammatory gingival and periodontal disease. *JAMA* 240 (6):545-50.
- Park, J. B., M. Matsuura, K. Y. Han, O. Norderyd, W. L. Lin, R. J. Genco, and M. I. Cho. 1995. Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. *J Periodontol* 66 (6):462-77.
- Pearson, C. H., and G. J. Gibson. 1982. Proteoglycans of bovine periodontal ligament and skin. Occurrence of different hybrid-sulphated galactosaminoglycans in distinct proteoglycans. *Biochem J* 201 (1):27-37.
- Reynolds, M. A., M. E. Aichelmann-Reidy, G. L. Branch-Mays, and J. C. Gunsolley. 2003. The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Ann Periodontol* 8 (1):227-65.
- Ripamonti, U. 2006. Soluble osteogenic molecular signals and the induction of bone formation. In *Biomaterials*. England.
- Ripamonti, U., M. Heliotis, D. C. Rueger, and T. K. Sampath. 1996. Induction of cementogenesis by recombinant human osteogenic protein-1 (hop-1/bmp-7) in the baboon (*Papio ursinus*). In *Arch Oral Biol*. England.
- Ripamonti, U., and A. H. Reddi. 1994. Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins. *J Periodontol Res* 29 (4):225-35.
- Rizzuti, M., M. Nizzardo, C. Zanetta, A. Ramirez, and S. Corti. 2014. Therapeutic applications of the cell-penetrating HIV-1 Tat peptide. In *Drug Discov Today*: 2014 Elsevier Ltd.
- Rutherford, R. B., M. E. Ryan, J. E. Kennedy, M. M. Tucker, and M. F. Charette. 1993. Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys. *J Clin Periodontol* 20 (7):537-44.
- Schroeder, H. E. 1992. Biological problems of regenerative cementogenesis: synthesis and attachment of collagenous matrices on growing and established root surfaces. *Int Rev Cytol* 142:1-59.
- Scott, J. E. 1980. Collagen--proteoglycan interactions. Localization of proteoglycans in tendon by electron microscopy. *Biochem J* 187 (3):887-91.
- Selvig, K. A., U. M. Wikesjo, G. C. Bogle, and R. D. Finkelmann. 1994. Impaired early bone formation in periodontal fenestration defects in dogs following application of insulin-like growth factor (II). Basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta 1. *J Clin Periodontol* 21 (6):380-5.
- Slavkin, H. C., C. Bessem, A. G. Fincham, P. Bringas, Jr., V. Santos, M. L. Snead, and M. Zeichner-David. 1989. Human and mouse cementum proteins immunologically related to enamel proteins. In *Biochim Biophys Acta*. Netherlands.
- Sodek, J., B. Ganss, and M. D. McKee. 2000. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 11 (3):279-303.
- Somerman, M. J., J. J. Sauk, R. A. Foster, K. Norris, K. Dickerson, and W. S. Argraves. 1991. Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum. *J Periodontol Res* 26 (1):10-6.
- Stout, B. M., B. J. Alent, P. Pedalino, R. Holbrook, J. Gluhak-Heinrich, Y. Cui, M. A. Harris, A. C. Gemperli, D. L. Cochran, D. E. Deas, and S. E. Harris. 2014. Enamel matrix derivative: protein components and osteoinductive properties. *J Periodontol* 85 (2):e9-e17.
- Terkeltaub, R. A. 2001. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am J Physiol Cell Physiol* 281 (1):C1-C11.
- Thomas, H. F. 1995. Root formation. *Int J Dev Biol* 39 (1):231-7.
- Torres-Quintana, M. A., S. Lecolle, and M. Goldberg. 1998. Effects of inositol hexasulphate, a casein kinase inhibitor, on dentine phosphorylated proteins in organ culture of mouse tooth germs. In *Arch Oral Biol*. England.
- Tozum, T. F., and B. Demiralp. 2003. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. *J Can Dent Assoc* 69 (10):664.
- Tutar, Y. 2014. Editorial: controlled release and drug delivery in diseases. In *Protein Pept Lett*. Netherlands.
- Vogel, K. G., M. Paulsson, and D. Heinegard. 1984. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J* 223 (3):587-97.

- Wang, H. L., T. D. Pappert, W. A. Castelli, D. J. Chiego, Jr., Y. Shyr, and B. A. Smith. 1994. The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: an autoradiographic study on dogs. *J Periodontol* 65 (5):429-36.
- Wikesjo, U. M., R. G. Sorensen, A. Kinoshita, X. Jian Li, and J. M. Wozney. 2004. Periodontal repair in dogs: effect of recombinant human bone morphogenetic protein-12 (rhBMP-12) on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. In *J Clin Periodontol*. Denmark.
- Worapamorn, W., Y. Xiao, H. Li, W. G. Young, and P. M. Bartold. 2002. Differential expression and distribution of syndecan-1 and -2 in periodontal wound healing of the rat. *J Periodontol Res* 37 (4):293-9.
- Yamamoto, T., T. Domon, S. Takahashi, A. K. Arambawatta, and M. Wakita. 2004. Immunolocation of proteoglycans and bone-related noncollagenous glycoproteins in developing acellular cementum of rat molars. *Cell Tissue Res* 317 (3):299-312.
- Yamashita, Y., M. Sato, and T. Noguchi. 1987. Alkaline phosphatase in the periodontal ligament of the rabbit and macaque monkey. *Arch Oral Biol* 32 (9):677-8.
- Zeichner-David, M. 2001. Is there more to enamel matrix proteins than biomineralization? In *Matrix Biol*. Germany.
- Zeichner-David, M. 2006. Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited. In *Periodontol 2000*. Denmark.
- Zeichner-David, M., L. S. Chen, Z. Hsu, J. Reyna, J. Caton, and P. Bringas. 2006. Amelogenin and ameloblastin show growth-factor like activity in periodontal ligament cells. In *Eur J Oral Sci*. Denmark.
- Zeichner-David, M., F. Hall, R. Williams, F. Thiemann, S. Yen, M. MacDougall, and H. C. Slavkin. 1995. Characterization of protein kinases involved in dentinogenesis. *Connect Tissue Res* 33 (1-3):87-95.
- Zeichner-David, M., K. Oishi, Z. Su, V. Zakartchenko, L. S. Chen, H. Arzate, and P. Bringas, Jr. 2003. Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Dev Dyn* 228 (4):651-63.
- Zhu, L., P. Hwang, H. E. Witkowska, H. Liu, and W. Li. 2013. Quantitatively and kinetically identifying binding motifs of amelogenin proteins to mineral crystals through biochemical and spectroscopic assays. *Methods Enzymol* 532:327-41.