



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

**PAPEL REGENERATIVO DE UN PÉPTIDO DERIVADO DE CEMP1 *IN VIVO* EN  
UN MODELO PILOTO DE DEFECTO PERIODONTAL EN RATAS WISTAR**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

PAOLA LIZBETH REYES CURIEL

TUTOR.

DRA.- LIA ALIOTH HOZ RODRÍGUEZ  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## INDICE:

1.- CUADRO DE ABREVIATURAS.....	6
2.- RESUMEN.....	9
3.- ABSTRACT.....	10
4.- INTRODUCCIÓN.....	11
4.1.- Periodonto.....	11
4.1.1.- Origen embriológico.....	12
4.1.2.- Encía.....	13
4.1.3.- Ligamento periodontal.....	14
4.1.4.- Hueso alveolar.....	15
4.1.5.- Cemento.....	16
4.2.- Proteínas de biomineralización implicadas en el periodonto.....	18
4.2.1.- Fosfasa alcalina.....	18
4.3.2.- Sialoproteína ósea.....	19
4.2.3.- Osteopontina.....	19
4.2.4.- Osteocalcina.....	20
4.2.5.- Proteínas de biomineralización cemento específicas.....	21
4.2.5.1.- Proteína de adhesión al cemento HACD1/CAP.....	21
4.2.6.1 - Proteína de cemento 1 CEMP1.....	22
4.3.- Péptido (CEMP1-p1) .....	24
4.4.- Modelo animal para regeneración periodontal.....	25
4.5.- Medicina regenerativa periodontal .....	26
5.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
6.- JUSTIFICACIÓN.....	29
7.- HIPÓTESIS.....	30
8.- OBJETIVO GENERAL.....	30
8.1.- Objetivos específicos.....	30

9.- MATERIAL Y METODOS.....	31
9.1.- Cultivo Celular.....	31
9.2.- Wester Blot.....	31
9.3.- Defectos periodontales en ratas Wistar.....	32
9.4.- Procesado histológico.....	35
9.5.- Inmunofluorescencia.....	37
10.- RESULTADOS.....	38
10.1.- Western Blot.....	38
10.1.- Defectos periodontales en ratas Wistar.....	39
10.3.- Análisis histomorfológico.....	41
10.4.- Inmunofluorescencia.....	45
10.5.-Analisis de resultados.....	46
11.- DISCUSIÓN.....	47
12.- CONCLUSIÓN.....	50
13.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	51

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme desarrollarme académicamente, personal y profesionalmente.

Al programa UNAM DGAPA-UNAM; PAPIIT IA203518 por el financiamiento otorgado al proyecto para la realización de esta tesis.

Al Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados de la DEPEI de la facultad de odontología de la UNAM, por abrirme sus puertas, en particular al Dr. Higinio Arzate, Dra. Lia Alioth Hoz Rodríguez, Dr. Enrique Romo Arévalo por brindarme su conocimiento.

Al comité tutorial y al jurado de esta tesis, por sus aportaciones para enriquecer este trabajo a pesar de su apretada agenda.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente Rita y Sonia, por apoyarme en la realización de mi proyecto y brindarme su amistad.

A mis compañeros de generación Lucía, Diana, Daniela e Iñigo por brindarme su amistad y apoyo incondicional.

A Jose Luis mi compañero de vida, ¡gracias por brindarme tu amor incondicionalmente y permitirme estar a tu lado!

## DEDICADORIA

A mis padres por su apoyo incondicional en todo momento, por guiarme desde mis primeros pasos, por sus consejos y sus enseñanzas, por ayudarme a levantarme en los momentos difíciles y claro, también por los buenos momentos que compartimos. ¡éste trabajo es para ustedes!

## 1.- CUADRO DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
<b>CEMP1</b>	Proteína del cemento 1 (siglas por su nombre en inglés “Cementum protein 1”).
<b>CEMP1-p1</b>	Péptido 1 derivado de la proteína del cemento 1 (siglas por su nombre en inglés “Cementum protein1-peptide1”).
<b>BSP</b>	Sialoproteína ósea (siglas por su nombre en inglés “Bone sialoprotein”).
<b>DMP1</b>	Proteína de matrix dentinaria (siglas por su nombre en inglés “Dentin matrix acidic phosphoprotein 1”).
<b>DSPP</b>	Sialoproteína dentinaria (siglas por su nombre en inglés “Dentin sialophosphoprotein”).
<b>OCN</b>	Osteocalcina (siglas por su nombre en inglés “Osteocalcin”).
<b>FN</b>	Fibronectina (siglas por su nombre en inglés “Fibronetin”).
<b>OPN</b>	Osteopontina (siglas por su nombre en inglés “Osteopontin”).
<b>HACD1/CAP</b>	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa 1 / Proteína de adhesión al cemento (siglas por su nombre en inglés “3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 1 / cementum attachment protein”).
<b>TGF-β</b>	Factor de crecimiento transformante beta (siglas por su nombre en inglés “Tumor growth factor β”).
<b>BMP-2</b>	Proteína morfogénica ósea 2 (siglas por su nombre en inglés “Bone morphogenetic protein 2”).
<b>CAA</b>	Cemento afibrilar acelular.
<b>CFAA</b>	Cemento de fibras ajenas acelular.
<b>CFPC</b>	Cemento de fibras propias celular.
<b>CFM</b>	Cemento de fibras mixtas.
<b>pH</b>	Potencial de hidrogeno.
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Ion magnesio.
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	Ion zinc.

<b>ALP</b>	Fosfatasa alcalina (siglas por su nombre en inglés “Alkaline phosphatase protein”).
<b>SDS-PAGE</b>	Dodecil sulfato de sodio - gel de electroforesis de poliacrilamida (siglas por su nombre en inglés “Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis”).
<b>pI</b>	Punto Isoeléctrico.
<b>SIBLING</b>	Proteínas SIBLING (siglas por su nombre en inglés “Small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein”).
<b>RGD</b>	Arginina-glicina-aspartato (siglas por su nombre en inglés “Arginine, glycine, and aspartate”).
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ion calcio.
<b>CaOx</b>	Oxalato de calcio (siglas por su nombre en inglés “ Calcium oxalate”).
<b>PTPLA</b>	Proteína tirosina similar a fosfatasa, miembro A variante 4 (siglas por su nombre en inglés “Protein tyrosine phosphatase-like, member A variant 4”).
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucleico mensajero (siglas por su nombre en inglés “messenger ribonucleic acid”).
<b>Runx2</b>	Factor de transcripción 2 asociado con Runt (siglas por su nombre en inglés “Runt-related transcription factor 2”)
<b>Cbfa1</b>	Factor de transcripción de unión al núcleo alfa 1 (sigla por su nombre en inglés “1 Core-binding factor alpha 1”).
<b>Ca(OH)<sub>2</sub></b>	Hidróxido de calcio.
<b>ERK</b>	Kinasa regulada por señales extracelulares (por sus siglas en inglés “Extracellular signal-regulated kinase”).
<b>MAPK</b>	Proteína kinasa activada por mitógenos (siglas por su nombre en inglés “Mitogen-activated protein kinase”).
<b>STRO-1</b>	Marcador para células troncales mesenquimales, nombrado en honor a sus descubridores Simmons and Torok-Storb, y 1 por ser el primer anticuerpo monoclonal para células troncales mesenquimales en ser aislado.



<b>PDL</b>	Células de ligamento periodontal (siglas por su nombre en inglés "Periodontal Ligament").
<b>PDLSC</b>	Células troncales de ligamento periodontal (siglas por su nombre en inglés "Periodontal Ligament Stem Cells")
<b>AMB</b>	Hueso mineral inorgánico (siglas por su nombre en inglés "Anorganic Bone Mineral")

## 2.- RESUMEN

El periodonto es una estructura que se encuentra en la cavidad oral y está conformada por dos tejidos blandos (encía y ligamento periodontal) y dos tejidos mineralizados (el cemento radicular y el hueso alveolar). Dichos tejidos pueden ser afectados por la enfermedad periodontal que ocasiona la degeneración y destrucción del periodonto, un enfoque actual para revertir los efectos de la enfermedad periodontal es el uso de la medicina regenerativa, ésta busca restablecer la integridad de los tejidos que conforman el periodonto y que las técnicas periodontales aplicadas actualmente no han podido solucionar. El objetivo de esta tesis fue demostrar el efecto regenerativo del péptido derivado de la proteína CEMP1 (CEMP1-p1) en defectos periodontales y poder ser aplicado en terapias de regeneración periodontal. Se utilizaron ratas Wistar macho, a las que se les realizaron defectos periodontales y se formaron los siguientes grupos: Grupo 1: satín; Grupo 2: andamio (esponja reabsorbible Gelfoam®) y satín; Grupo 3: CEMP1-p1, andamio y satín. La eutanasia se realizó a los 30 días posteriores a la implantación y se procesó el tejido para su análisis histomorfológico utilizando la tinción Hematoxilina y Eosina y Tricrómica de Masson e inmunofluorescencia para confirmar la formación de tejidos periodontales. Mediante Western Blot se confirmó la presencia de proteínas cemento específicas, después de la inducción con CEMP1-p1 *in vitro*. El análisis histomorfológico del grupo con CEMP1-p1, demostró la regeneración de cemento, hueso alveolar y ligamento periodontal de la superficie del defecto. En la inmunofluorescencia los defectos presentaban positividad para marcadores de cemento y hueso alveolar. CEMP1-p1, representa, entonces, ser un buen candidato que pueden ser usado en la medicina generativa para la regeneración del periodonto.

### 3.- ABSTRACT

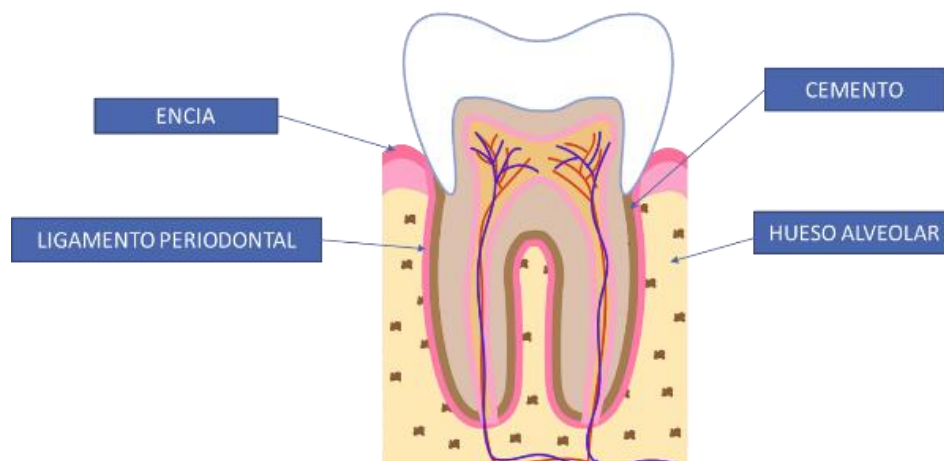
The periodontium is a structure that is found in the oral cavity and is made up of two soft tissues (gum and periodontal ligament) and two mineralized tissues (root cement and alveolar bone). These tissues can be affected by the periodontal disease that causes the degeneration and destruction of the periodontium, a current approach to reverse the effects of periodontal disease is the use of regenerative medicine, it seeks to restore the integrity of the tissues that make up the periodontium and that the periodontal techniques currently applied have not been able to solve. The objective of this thesis was to demonstrate the regenerative effect of the peptide derived from the CEMP1 protein (CEMP1-p1) in periodontal defects and be able to be applied in periodontal regeneration therapies. Male Wistar rats were used, to which periodontal defects were made and the following groups were formed: Group 1: satin; Group 2: scaffold and satin; Group 3: CEMP1-p1, scaffold and satin. The Euthanasia was done on days 30 after implantation and the tissue was processed for histomorphological analysis using Hematoxylin and Eosin and Masson's Trichrome staining and immunofluorescence to confirm periodontal tissue formation. The presence of specific cement proteins was confirmed by Western Blot, after induction with CEMP1-p1 in vitro. The histomorphological analysis of the group with CEMP1-p1, demonstrated the regeneration of cement, alveolar bone and periodontal ligament of the defect's area. In immunofluorescence, the defects presented positivity for cement markers and alveolar bone. CEMP1-p1, then, represents a good candidate that can be used in generative medicine for the regeneration of the periodontium.

## 4.- INTRODUCCIÓN

### 4.1.- Periodonto

El periodonto como su definición indica, perio = alrededor y odonto = diente, es la unidad estructural que rodea a los órganos dentales formando parte del sistema masticatorio, está conformada por cuatro tejidos, dos blandos (encía / ligamento periodontal) y dos duros (cemento / hueso alveolar) (**Figura 1**) (1).

La principal característica del complejo periodontal es su capacidad de funcionar en forma integral, manteniendo la homeostasis de los órganos dentarios, brinda protección de agentes patógenos externos con los que el huésped está en contacto, así mismo, actúa como un amortiguador de las fuerzas mecánicas masticatorias dispersando las mismas e impidiendo la reabsorción de los tejidos duros, además, permite la inervación, irrigación y vascularización. El periodonto es un conjunto de tejidos con gran variabilidad celular y de moléculas que lo constituyen, las cuales permiten la interacción entre encía, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar de manera óptima para cumplir su función (2,3).



**Figura 1.-** Estructuras del periodonto, señalando los tejidos que lo conforman, dos tejidos blandos: encía y ligamento periodontal, dos tejidos duros: hueso alveolar y cemento radicular. Fuente propia.

#### 4.1.1.- Origen embriológico

El origen embriológico del epitelio bucal, inicia a partir del ectodermo que cubre el estomodeo, y del ectomesénquima originario de la cresta neural que migra a la región cefálica a partir de la formación del tubo neural; la interacción de estos componentes, principalmente por la inducción del ectomesénquima, permite la formación de la lámina dentaria de los futuros órganos dentarios hacia la octava semana de gestación, pasando a un estadio de casquete en la novena semana e iniciando los primeros primordios para la formación de la estructura del esmalte, después pasa al siguiente estadio de campana, donde se obtienen histológicamente tres estructuras embrionarias: órgano del esmalte (epitelio dentario interno, epitelio dentario externo y retículo estrellado), papila dental que origina el complejo dentino-pulpar y el saco dentario o folículo dental que originara al periodonto de inserción a excepción del denominado periodonto de protección que tiene dos orígenes uno ectodérmico a partir del epitelio bucal formando el tejido epitelial y del ectomesénquima formando el tejido conectivo (4).

Recientemente en el año 2013 se da conocer la vaina epitelial de Hertwig y su papel en el desarrollo del periodonto, teniendo gran relevancia; poco después de la formación de la corona e iniciando la formación de la raíz donde el epitelio dental interno y epitelio dental externo proliferan, se forma una prolongación apical que separa la papila dental y el folículo dental denominada vaina epitelial de Hertwig, la cual al mismo tiempo, secreta una matriz extracelular denominada capa hialina de Hopewell Smith; la vaina epitelial de Hertwig permite que las células de la papila dental sean estimuladas y se diferencien en odontoblastos, poco después del primer depósito de dentina, la vaina epitelial de Hertwig se fragmenta favoreciendo la formación de cemento mediante dos teorías: una en la cual las células sufren una transición epitelio-mesénquima y se diferencian a cementoblastos y otra donde las células del folículo dental quedan embebidas en la capa hialina de Hopewell Smith, induciéndolas para formar el cemento radicular; esta desintegración da como resultado el origen de los restos epiteliales de Malassez el cual persiste en el adulto y cumple varias funciones: homeostasis del ligamento periodontal (mantenimiento del espacio, previniendo anquilosis/reabsorción), permite la reparación de tejidos

del periodonto por la síntesis de proteínas de biomineralización, además contiene poblaciones de células troncales mesénquimales que son capaces de tener una transición epitelio-mesenquimal para regenerar tejidos del periodonto como: cemento, ligamento y hueso alveolar; esta estructura es fascinante y abre un punto de vista de cómo el periodonto mantiene su integridad desde la formación de los órganos dentales hasta la edad adulta (5).

#### **4.1.2.- Encía**

La encía es la parte de la mucosa bucal masticatoria que tapiza los procesos o rebordes alveolares, rodeando el cuello de los órganos dentarios, a los que se adhiere a través de la unión dentogingival, se puede clasificar en encía insertada, libre e interproximal (2).

Cumple la función principal de proteger los órganos dentales ya sea de las fuerzas de masticación, de abrasión al cepillado dental o implemento de hilo dental, entre otros, permitiendo un sello hermético del medio exterior a partir de la unión cemento-esmalte donde el huésped está en contacto constante con la microbiota, permitiendo una simbiosis de estos organismos sin que penetre más allá de esta zona, lo cual explica como la encía actúa como un sistema de defensa innato (6).

La mayoría del epitelio en la encía es epitelio plano queratinizado o paraqueratinizado, a excepción del epitelio de unión que se encuentra en contacto directo con el órgano dentario, el cual presenta características únicas como ser un epitelio plano estratificado no queratinizado, las células que lo conforman presentan una capacidad proliferativa mayor que permite la descamación constante, el número de células se reduce gradualmente en la porción coronal donde podemos tener aproximadamente de 15 a 30 hileras de células y en la porción cercana a la unión cemento esmalte se reduce aproximadamente de 1 a 3. Además estas células conforman una membrana basal interna que está en contacto directo con el diente y una membrana basal externa que está en contacto directo con el tejido conectivo gingival, cumpliendo funciones de compartimiento, permeabilidad selectiva, adhesión y migración, una importante característica es la síntesis del líquido

crevicular, que desemboca en el surco gingival el cual es un exudado de los vasos sanguíneos subepiteliales con propiedades antimicrobianas entre otras funciones (7).

#### **4.1.3.- Ligamento periodontal**

El ligamento periodontal es un tejido conectivo, tiene múltiples funciones importantes para el mantenimiento de los órganos dentales: actúa como un amortiguador y dispersor de fuerzas mecánicas, protege a los tejidos blandos como vasos sanguíneos y nervios de las fuerzas masticatorias, permite la unión del diente al hueso alveolar, además mantiene la encía al margen del diente promoviendo su protección (2).

Anatómicamente tiene contacto con la encía en la porción superior cerca de la unión cemento esmalte y en dirección apical con el cemento y el hueso alveolar manteniendo una interacción mutua con las fibras que se extienden a lo largo del cemento y hueso alveolar, las fibras se clasifican por su localización y función en 6 grupos: transeptales, de la cresta alveolar, horizontales, oblicuas, apicales e interradiculares. Las porciones finales de las fibras que se insertan en los tejidos mineralizados (cemento y hueso alveolar) se denominan fibras de Sharpey, su principal composición es colágena de tipo I y III, en menor medida colágena V, VI y VII; la presencia de colágena tipo I y XII es mayor cuando hay un proceso de reparación, además podemos encontrar fibras similares a elastina, eluanina y oxitalán, paralelos al diente y en dirección vertical, sugiriendo que la función es proveer de elasticidad al ligamento periodontal cumpliendo una función mecánica, además de brindar soporte vascular. Las principales células que lo conforman son los fibroblastos, estas células de forma alargada son las encargadas de sintetizar la matriz de colágena que forma las fibras del ligamento periodontal, así mismo son las encargadas de censar el medio y diversas fuerzas mecánicas mediante mecano-transductores que hasta la fecha son poco comprendidos, permitiendo la remodelación y adaptación del ligamento periodontal. Un proceso muy característico es la capacidad de los fibroblastos para fagocitar las fibras de

colágeno donde se quiere retirar alguna inserción y desintegrarla internamente por acción de sus lisosomas, impidiendo una actividad descontrolada por medio de colagenasas y por lo tanto lo hacen selectivamente. Pueden favorecer la reparación o regeneración por su capacidad de orientar la matriz extracelular que producen, también controlan su migración ya que presentan un citoesqueleto muy desarrollado que les permite la contracción y el movimiento, además sintetizan fosfatasa alcalina favoreciendo la formación de cemento y hueso alveolar (8).

El ligamento periodontal también está conformado por: osteoblastos y cementoblastos que participan en la formación de matriz extracelular, los restos epiteliales de Malassez antes mencionados, células de defensa, células vasculares y células troncales ectomesénquimales que tienen la capacidad de regenerar tejidos por su capacidad de autorenovación y diferenciación a múltiples linajes (6).

#### **4.1.4.- Hueso alveolar**

El hueso alveolar es un tejido conectivo especializado que sirve de sostén de los órganos dentarios, se origina a partir de la formación de hueso intramembranoso del maxilar y la mandibular, se puede subdividir en dos tipos: el proceso alveolar que es tejido óseo que rodea a los órganos dentales antes de su erupción y después, actuando como soporte estructural, y el hueso alveolar el cual cubre al órgano dentario que se forma cuando este erupciona. La pérdida del órgano dentario conduce a la reabsorción del hueso alveolar (9).

Anatómicamente se divide en tablas alveolares libres (vestibular, palatina y lingual) y tabiques alveolares (interdentario o interradiculares), y se estructura por dos capas de hueso cortical separadas por hueso esponjoso, en algunos casos particulares el hueso alveolar es delgado y por lo tanto no hay hueso esponjoso, en la mandíbula el grosor del hueso alveolar y placas corticales es mayor. El espacio de las trabéculas se rellena de medula ósea, con el paso de tiempo el tejido hematopoyético es sustituido por tejido adiposo, además las trabéculas del hueso tienen una estructura que le permite resistir al estrés provocado por las fuerzas de oclusión. Se clasifican en trabéculas de tipo I regulares, gruesas y horizontales (más



común en mandíbula) y trabéculas de tipo II finas delicadas y dispuestas irregularmente (más común en maxilar) (10).

Está conformado por un 65% de materia inorgánica en forma de cristales de hidroxiapatita y un 35% de materia orgánica, principalmente colágena tipo I en un 90% y en menor medida colágena tipo III. Las superficies inorgánicas del hueso están revestidas por osteoblastos, que son los responsables de sintetizar la matriz y formar el tejido óseo, los osteoblastos que quedan embebidos en la matriz mineral se llaman osteocitos, y son responsables del mantenimiento de la matriz ósea, otra célula son los osteoclastos, que son responsables de la reabsorción del hueso y pueden verse en las lagunas óseas, la inervación de estas células se da por el sistema de Havers y por los canales de Volkman (2).

#### **4.1.5.- Cemento**

El cemento es un tejido conectivo mineralizado que cumple varias funciones: sirve de anclaje a las fibras de Sharpey, controla el espacio del ligamento periodontal, permite repartir las fuerzas oclusales, compensa el desgaste del órgano dentario ocasionado por atriciones y participa en la remodelación (2).

Está compuesto por un 46-50% de materia inorgánica principalmente fosfato de calcio presentado como cristales de hidroxiapatita, 22% de materia orgánica principalmente colágena tipo I en un 90% y en menor medida colágena tipo III, además de colágeno tipo V, VI Y XIV en pequeñas cantidades, proteínas no colágenas como sialoproteína ósea (BSP), proteína de matriz de dentina (DMP1), sialoproteína destinaria (DSPP), osteocalcina (OCN), fibronectina (FN), osteopontina (OPN) y dos proteínas cemento específicas, la proteína de adhesión al cemento (HACD1/CAP), y la proteína del cemento 1 (CEMP1). Contiene además, factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y la proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2), glucosaminoglucanos y un 32% de agua, teniendo una composición muy similar al hueso (11).

El cemento radicular cubre la raíz del diente desde la unión cemento esmalte hasta el ápice, a excepción del foramen apical donde entran los vasos encargados de la

irrigación del órgano dentario, el cemento se estructura en laminillas formadas por el crecimiento en aposición del tejido mineralizado, clasificándose en cemento acelular formado en las primeras etapas del desarrollo del órgano dentario hasta antes de su oclusión (dos tercios en dirección coronal) y cemento celular en etapas posteriores a la oclusión del órgano dentario (un tercio en dirección apical), además estructuralmente presenta fibras intrínsecas sintetizadas por los cementoblastos principalmente durante la reparación del cemento y fibras extrínsecas sintetizadas por el ligamento periodontal encargadas del anclaje, clasificándose en: cemento afibrilar acelular (CAA), cemento de fibras ajenas acelular (CFAA), cemento de fibras propias celular (CFPC) y cemento de fibras mixtas (CFM) ; este tejido no está vascularizado ni innervado, y solo realiza aposición constante del tejido en la porción del cemento celular sin remodelación, permitiendo al órgano dental mantenerse estable ante las fuerzas constantes aplicadas principalmente por tratamientos de ortodoncia, estas características son dadas por las células que se encuentran en su medio, entre ellas se localizan los cementoblastos ya que son los encargados de sintetizar la matriz extracelular, estas células se encuentran en lagunas similares a los odontoblastos, su estructura es amorfa con muchas prolongaciones y con una orientación principalmente hacia el ligamento periodontal donde recibe los nutrientes necesarios para subsistir, cuando el tejido mineralizado empieza a crecer las células quedan embebidas en las lagunas y se transforman a cementocitos encargados del mantenimiento del tejido; a menudo en el cemento, se pueden observar irregularidades denominadas lagunas encapsuladas los cuales son restos epiteliales de Malassez importantes para el mantenimiento y la formación del cemento radicular, además, en algunas patologías podemos encontrar células parecidas a los osteoclastos encargados de la reabsorción del cemento. Este tejido es único con características muy particulares, en la actualidad las diversas técnicas aplicadas no permiten la neo-formación del tejido, siendo un reto importante en el área de la odontología que actualmente, busca poder restaurarlo a su forma original (6,12).

## **4.2.- Proteínas de biomineralización implicadas en el periodonto.**

El proceso de biomineralización es un proceso biológico característico de los tejidos mineralizados. Las células encargadas de este proceso en el periodonto son los odontoblastos y cementoblastos, que se inicia con la formación de vesículas que permiten la acumulación de fosfato y calcio, permitiendo la formación de hidroxiapatita, dichas vesículas son secretados al medio extracelular en el entramado de fibras de colágena, en ese sentido, diversas moléculas del medio extracelular como los glucosaminoglucanos y las proteínas con mayor composición de aminoácidos ácidos (ácido aspártico, ácido glutámico) y que además presentan fosforilaciones (serina y treonina) son muy importantes ya que algunas favorecen la crecimiento y otras la inhibición, esto se atribuye a su interacción con diversos iones permitiendo la nucleación de cristales de hidroxiapatita, además la cantidad de iones que se encuentren en el medio, el potencial de Hidrogeno (pH), la orientación de las moléculas favorecen la biomineralización, los cuales determinan el grado de crecimiento de los cristales que es dependiente de las condiciones de la matriz extracelular (13,14).

### **4.2.1.- Fosfatasa alcalina (ALP)**

La fosfatasa alcalina es una glicoproteína dimérica que requiere iones magnesio ( $Mg^{2+}$ ) y Zinc ( $Zn^{2+}$ ) como cofactores, está anclada a la membrana plasmática, cataliza la hidrolisis de los grupos fosfatos de diferentes sustratos en un ambiente alcalino liberando fosforo inorgánico (Pi), se mantiene activo a pH fisiológico, la masa molecular varia de 70 a 280 kDa, regulando el metabolismo del fosfato y tiene un papel vital en el transporte activo de las células (15).

Se encuentra en el periodonto en células del ligamento periodontal, osteoblastos, células endoteliales y cementoblastos. Esta proteína es necesaria en el periodonto para el inicio de la formación de cristales de hidroxiapatita siendo necesaria en los procesos de biomineralización y representa ser un marcador temprano de dicho proceso. Alteraciones en los niveles de ALP impide el desarrollo de tejidos mineralizados en el periodonto, por lo tanto, la modulación de los niveles de

fosfatasa alcalina debe ser regulada por el tejido, permitiendo mantener su función y/o integridad (16,17).

#### **4.2.2.- Sialoproteína ósea (BSP)**

La sialoproteína ósea es una glicoproteína de 301 aminoácidos en humanos con una movilidad relativa de aproximadamente 70 a 80 kDa en un gel de electroforesis SDS-PAGE; debido a su punto isoeléctrico (pI) y las muchas modificaciones postraduccionales puede aumentar el peso de la proteína hasta un 50%, se encuentra principalmente en tejidos mineralizados como hueso, dentina y cemento radicular, expresándose en estadios tempranos y maduros de los órganos dentario. Forma parte del grupo de proteínas denominadas SIBLING, las cuales comparten características comunes, tales como: motivos RGD (arginina-glicina-aspartato) que median la unión/señalización celular a través de sus interacciones con integrinas en la superficie celular, con extensas modificaciones postraduccionales como fosforilaciones y glicosilaciones, capacidad de unión a iones de calcio ( $Ca^{2+}$ ) por presentar un alto contenido de aminoácidos negativos como ácido glutámico que le permite la nucleación de cristales de hidroxapatita. Además, permiten la unión a la colágena por interacciones electrostáticas y le da direccionalidad al tejido mineralizado en formación. Por sus amplias funciones BSP participa como uno de los principales actores en la biología de los tejidos mineralizados estudiado tanto *in vitro* como *in vivo* (18–20).

#### **4.2.3.- Osteopontina (OPN)**

La osteopontina es una glicofosfoproteína de 44 kDa que varía con el nivel de modificaciones postraduccionales, está conformado por 314 aminoácidos, con altas concentraciones de aminoácidos negativos, principalmente ácido aspártico y fosforilaciones confiriéndole una carga negativa, contiene motivos RGD que participan en la adhesión celular, se encuentra principalmente en tejido óseo, pero también se puede encontrar en otros sitios como saliva, cerebro, riñón, placenta, en células como osteoblastos, osteoclastos, células endoteliales, células de músculo

liso y esquelético, así como células de glándulas mamarias, con la cual le confiere múltiples funciones, su participación en tejido óseo, principalmente con osteoclastos, es ayudar en el remodelado óseo, inhibiendo la mineralización para regular el crecimiento de los cristales de manera organizada. Además, está relacionado con la inducción de la respuesta inflamatoria permitiendo la migración de diversas células del sistema inmune entre ellos macrófagos y linfocitos T. Por lo tanto, tiene un gran valor diagnóstico en diversas patologías y funge como un importante eslabón en la reparación de tejidos ya que promueve que los macrófagos secreten factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) e induce a las células como los fibroblastos para que produzcan matriz extracelular y promover el cierre de la herida (21–23).

#### **4.2.4.- Osteocalcina (OCN)**

La osteocalcina, ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico o también conocido como proteína Gla es una proteína de 40 a 50 aminoácidos, tiene un alto número de aminoácidos negativos (ácido glutámico), con un peso de 5.2- 5.8 kDa. En el humano solo existen dos isoformas de las proteínas Gla, es sintetizada por odontoblastos, cementoblastos y condrocitos hipertróficos e inducida por el calcitrol de la vitamina D, permitiendo un papel muy importante en la mineralización de tejidos, esta proteína es dependiente de la vitamina K la cual actúa como cofactor, permitiendo la carboxilación de los residuos de ácido glutámico adquiriendo una carga negativa, esto facilita su interacción con iones  $Ca^{2+}$  participando en la formación de cristales de hidroxiapatita y su papel en la biomineralización (24,25).

Además la osteocalcina cumple una variedad de funciones que se extienden desde la regularización del metabolismo al aumentar la proliferación de las células  $\beta$ , permite que las células de músculo esquelético y adiposo respondan a la osteocalcina aumentando la sensibilidad a la insulina, y en el sistema nervioso participa en la síntesis de neurotransmisores en los testículos, aumentando la síntesis de testosterona (26).

#### **4.2.5.- Proteínas de biomineralización cemento específicas**

Los tejidos mineralizados que forman parte del periodonto, tienen varias proteínas implicadas en el proceso de biomineralización similares al tejido óseo; el cemento radicular por ser un tejido único, cuenta con sus propias proteínas de biomineralización permitiendo distinguirlo de otros tejidos y expresándose por células como cementocitos, cementoblastos y células precursoras formadoras de dicho tejido.

Estas proteínas son:

- Proteína de adhesión del cemento radicular HACD1/CAP
- Proteína del cemento CEMP1

##### **4.2.5.1.- Proteína de adhesión del cemento radicular HACD1/CAP**

La proteína de adhesión del cemento radicular HACD1/CAP, fue la primera proteína cemento específica aislada del cemento radicular humano, se localiza en el cromosoma 10, región p13-p14 y posee 6 exones, con un peso molecular de 14.5 kDa, es una variante producida por el splicing alternativo para la 3-hidroxilacil-CoA-dehidratasa 1 antiguamente denominada PTPLA y actualmente denominada HACD1 (27,28).

La proteína HACD1/CAP está conformada por 140 aminoácidos de los cuales 125 del extremo amino terminal son idénticos a la proteína HACD1, el análisis *in silico* muestra que su carga es neutra a un pH fisiológico (pI 7.78), además es una proteína hidrofóbica y se localiza en el citoplasma en un 94.19% debido a la carencia de un péptido señal, tiene gran afinidad a la fibronectina e hidroxiapatita (29).

Se expresa en cementoblastos y algunas células del ligamento periodontal desempeñando funciones en el reclutamiento y diferenciación durante la formación del cemento, además se ha demostrado su expresión en células del folículo dental que promueven la adhesión y la diferenciación. La obtención de la proteína recombinante a través de sistemas procariontes ha permitido realizar investigaciones

*in vitro* permitiendo conocer su actividad en la formación de cristales de hidroxiapatita y en la formación de tejido mineralizado en defectos críticos en calvaria de ratas Wistar *in vivo* (30–32).

#### 4.2.5.2- Proteína del cemento 1 (CEMP1)

Las primeras investigaciones sobre la proteína CEMP1 inician con el cultivo y aislamiento de una línea celular derivada de un cementoblastoma humano, el cual sirvió como una fuente de cemento radicular y sus componentes fundamentales. Dicha línea celular presenta características físicas, químicas y morfológicas que se adaptan a un fenotipo cementoblastico humano (33).

Su gen contiene 1 exón y se localiza en el cromosoma 16 región p13.3, está conformado por 1374 pares de bases que contienen un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido de 247 aminoácidos, su peso molecular es de 25.9 kDa, después de la traducción muestra una movilidad relativa de 50 kDa. Es una proteína alcalina con un pI de 9.73, se localiza en la matriz del cemento, en los cementoblastos de toda la superficie de la raíz y subpoblaciones de células del ligamento periodontal, así como células mesénquimales ubicadas paravascularmente en el ligamento periodontal, además entre el 98% de los cementoblastos y 15% de células del ligamento periodontal expresan CEMP1 *in vitro* (34,35).

Una vez identificada y aislada la región codificante de CEMP1, se obtuvo la proteína mediante tecnología recombinante expresada en fibroblastos gingivales humanos, en dicha línea, la proteína recombinante presenta una Mr de 50 kDa en un gel de electroforesis (36).

En otro proyecto se realizó la caracterización estructural de la proteína recombinante expresada en *Pichia pastoris*, identificando que es una proteína termoestable glicosilada al 2.4%, y posee una masa molecular de 28.77 kDa, además, su estudio mediante difracción circular reveló que su estructura secundaria está compuesta por un 28.6% de hélice alfa, 9.9% de lámina beta y 61.5% de estructura aleatoria, su estudio tridimensional *in silico* define a la proteína como

intrínsecamente desorganizada, además demostrando que tiene una actividad similar a lectina tipo C permitiendo reconocer específicamente el *manopyranoside*. Los ensayos de actividad biológica demuestran su participación en la nucleación y regulación en el crecimiento de cristales de hidroxiapatita, también se ha probado su participación en la biomineralización dependiente de la dosis, con la proteína recombinante obtenida a través de *Escherichia coli* (37,38).

CEMP1 funciona como una macromolécula que regula localmente la diferenciación hacia cementoblastos, incluso en células sin un fenotipo osteogénico, permitiendo la mineralización de la matriz del cemento, lo cual se demostró mediante la transfección de la proteína de CEMP1 en fibroblastos gingivales y la expresión de proteínas implicadas en los procesos de biomineralización como: fosfatasa alcalina, sialoproteína ósea, osteocalcina, osteopontina, factor de transcripción Runx2/Cbfa, la proteína de adhesión del cemento radicular HACD1/CAP y la proteína del cemento 1 (CEMP1), así como la producción de hidroxiapatita de tipo biológico (39). Para comprender aún más el funcionamiento de CEMP1, se investigó la expresión de CEMP1 durante la diferenciación de células del ligamento periodontal humano, las células positivas a fosfatasa alcalina expresaron preferentemente CEMP1 y su expresión disminuyó cuando se diferenciaron a osteoblastos, por lo tanto CEMP1 regula el compromiso a un linaje cementoblastico. Además, se ha reportado la expresión de CEMP1 a través de la vía de señalización ERK/MAPK y esto a su vez permite que CEMP1 reclute células mesenquimales progenitoras STRO-1 positivas, mediando la migración, proliferación y diferenciación de las células troncales de ligamento periodontal (PDL) hacia un fenotipo cementoblasto, lo que sugiere que CEMP1 está implicada en el reclutamiento de células troncales adultas paravasculares del ligamento periodontal (40,41).

Recientemente, a partir de un cultivo tridimensional *in vitro* mediante un biorreactor se indujo la diferenciación de células de ligamento periodontal añadiendo la proteína recombinante de CEMP1 permitiendo la formación de tejidos como cartílago, hueso y cemento, de igual manera en un estudio *in vivo* la colocación CEMP1 en defectos críticos de calvaria en ratas Wistar promovió la formación de tejido mineralizado en un 97% a las 16 semanas (42,43).



### 4.3- Péptido CEMP1-p1

Es un péptido sintético obtenido a partir de la técnica de síntesis de fase sólida, permitiendo sintetizarlo con una secuencia específica de 20 aminoácidos (MGTSSTDSQQAGAGRRTSTSN), tomados del extremo amino terminal de la proteína CEMP1. Esta secuencia se seleccionó de un estudio *in silico*, el cual sugirió que el péptido se encuentran en la superficie de la proteína plegada y cumple funciones biológicas importantes; confirmando que CEMP-1-p1 es un péptido intrínsecamente desordenado, lo cual le brinda propiedades dinámicas, con una estructura que puede ser parcial o completamente extendida, el 65% de los aminoácidos que conforman CEMP1-p1 promueven la desorganización y 5% promueven el orden, con base a estudios informáticos se concluyó que los dominios intrínsecamente desordenados son responsables del ensamblaje de la matriz extracelular y del ordenamiento jerárquico. Se eligió esta secuencia porque se cree que tiene sitios de actividad para la mineralización, por su plasticidad y facilidad para unirse a los cristales de hidroxapatita; esto está dado gracias a las propiedades fisicoquímicas del ácido aspártico (D), aminoácido cargado negativamente y las fosforilaciones en serinas (S), importantes en procesos de biomineralización (44).

Se han realizado diversos estudios comparando su efecto con relación a la proteína nativa, obteniendo una función similar: *in vitro* participa en la formación de cristales de hidroxapatita en geles de silicato, en un cultivo de células del ligamento periodontal mostró favorecer la proliferación y la formación de tejido mineralizado así como estimular su diferenciación hacia un fenotipo mineralizante, así mismo se realizaron estudios *in vivo* en defectos críticos de calvaria en ratas Wistar donde se observó su participación en la formación de tejido mineralizado, actuando no solo como quimioatrayente para reclutar células mesenquimales precursoras sino también como un diferenciador de células que permiten la formación de tejido óseo. Además, al hacer un análisis más profundo aparte de sus funciones, se obtienen mayores ventajas del péptido CEP1-p1 a comparación con la proteína del cemento 1 (CEMP1), como se observa en la tabla 1, que permiten ser un buen

candidato con potencial aplicación en la medicina regenerativa y más importante aún, en la regeneración periodontal (45,46).

Tabla 1.- Tabla comparativa de las diferentes características de la proteína del cemento 1 (CEMP1) vs el péptido derivado de la proteína del cemento 1 (CEMP1-p1).

<b>Variable</b>	<b>CEMP1</b>	<b>CEMP1-p1</b>
<b>COSTO</b>	Requiere equipo, reactivos y personal	No requiere equipo más que pedir a proveedores
<b>CONCENTRACIÓN</b>	Menor concentración se ocupa más tipo, obtención más complicada	Mayor concentración en menos tiempo, fácil de sintetizar con mayor pureza
<b>FUNCIONES</b>	Igual	Igual
<b>TAMAÑO</b>	Mayor tamaño 247 a.a.	Menor tamaño 20 a.a.
<b>Pi</b>	8.2 a pH 7.4 con carga positiva	9.73 a pH 7.4 con carga + positiva
<b>VIDA MEDIA</b>	30 Horas	30 Horas
<b>ESTABILIDAD</b>	Mayor inestabilidad 72.42	Menor inestabilidad 58.39

#### 4.4.- Modelo animal para regeneración periodontal

Los estudios tanto in vivo como in vitro han aportado grandes conocimientos a las ciencias biológicas, incluida la periodoncia, aunque los cultivos celulares nos dan una aproximación de los procesos fisiológicos celulares que suceden en la regeneración periodontal, la respuesta compleja del huésped no puede ser estudiada solo in vitro, por lo tanto la inclusión de diversos modelos animales es de vital importancia para el estudio de andamios, células y/o biomoléculas que permitan la regeneración periodontal; existe una gran variedad de modelos animales que

evalúan la regeneración, como son los primates no humanos, perros, cerdos miniatura, tienen como ventaja tener una morfología oral muy similar al humano, sus desventajas son el costo alto para el cuidado y la crianza, presentan problemas de manejo y requieren mucho tiempo para obtener resultados, en cambio los roedores tiene como ventaja tener un menor costo para el cuidado y crianza, no presentan problemas de manejo, se pueden obtener con diferentes genomas y requieren menor tiempo para lo obtención de resultados, su desventaja es que no presentan una morfologías similar oral similar al humano pero su estructura anatómica de los molares es similar al humano, dichos modelos presentan ventajas y desventajas únicas, que permitirán al investigador seleccionar el modelo más adecuado para realizar su estudio (47,48).

#### **4.5.- Medicina regenerativa periodontal**

La medicina regenerativa es un campo multidisciplinario que busca restaurar o establecer la estructura y función de un órgano o tejido dañado, se ha buscado aplicar la medicina regenerativa en la odontología, con el objetivo de regenerar tejidos como el periodonto, el cual es afectado diverso procesos patológicos como enfermedad periodontal, trauma, enfermedades sistémicas, patologías maxilares etc, que afecta las estructuras de soporte de los dientes (la encía, el hueso y el ligamento periodontal), donde diversos laboratorios están en la búsqueda de tratamientos y/o técnicas, que permitan la formación de hueso y cemento, favoreciendo así la integración de fibras de ligamento periodontal, permitiendo restablecer un periodonto normal, funcional y estable (49). Existen numerosas técnicas implementadas en la clínica para lograr la reparación y/o regeneración como son el curetaje, raspado y alisado radicular incluyendo el uso de membranas para regeneración tisular guiada compuestas por diversos materiales (colágena, cartílago, polímeros como poliácido láctico, polietilenglicol), injertos (autoinjertos, alóinjertos, xenoinjertos) y biomateriales activos mediante células troncales, materiales osteoinductivo y moléculas de señalización como: proteínas de matriz del esmalte (EMDOGAIN®), factores de crecimiento como la proteínas

morfogénicas óseas, nanopartículas y péptidos bioactivos que han probado promover la regeneración de tejidos mineralizados como se observa en la tabla 2 (50).

La terapia de regeneración periodontal desde una perspectiva biológica busca mantener un ambiente propicio para promover la migración celular, la adhesión, proliferación, y diferenciación, todo en un contexto coordinado en tiempo y espacio de la múltiples células que se encuentran en el medio, así como los componentes de su matriz extracelular, y para lograrlo es necesario conocer con profundidad los tejidos que conforman el periodonto a fin de diseñar la estrategia que nos permita promover la regeneración (51).

Tabla 2.- Estudios en modelos animales y clínicos de diversos péptidos bioactivos que permiten la regeneración de tejidos mineralizados.

Autor	Modelo	Péptido	Resultado
Zhao, et. Al. 2011 (52).	Conejo Distracción tibia.	Péptido de crecimiento osteogénico (OGP), es un péptido altamente conservado que consta de 5 aminoácidos, abundante en sangre de mamíferos, es un péptido relacionado con las histonas H4, ejerce un efecto anabólico sobre las células óseas, lo que resulta en un aumento de la formación ósea y la masa ósea en general.	Una mayor rigidez, un mayor número de condrocitos y una cantidad de hueso recién formado
Hanratty, et. Al. 2009 (53).	Rata Fractura femoral.	El péptido de trombina 508 (TP508), también conocido como Chrysalin, es un péptido sintético de 23 aminoácidos que representa el	Aumentaron significativamente la formación ósea y la rigidez. Se observó menos tejido cicatricial y mayor formación de vasos sanguíneos cuando se inyectó TP508 en los

		<p>Dominio de unión al receptor no proteolítico de la trombina. Se descubrió que TP508 aumenta la proliferación y diferenciación e induce la quimiotaxis en los osteoblastos humanos. Mejora la angiogénesis estimulada por VEGF y atenúa los efectos de la hipoxia crónica</p>	<p>músculos adyacentes a la fractura</p>
<p>Travis KE. et. al 2002 (54),</p> <p>Kasaj et.al. 2008 (55).</p>	<p>Humanos Defecto periodontales infraóseos.</p>	<p>El péptido P-15 es un péptido altamente conservado que consta de 15 aminoácidos idénticos a la región de unión celular del colágeno tipo I. Mejora la unión celular a los sustitutos óseos y la producción de matriz extracelular (ECM). Cuando se agrega P-15 en el material del andamio, resulta en una expresión génica significativamente mayor de la fosfatasa alcalina (ALP), BMP-2 y BMP-7, promoviendo proliferación y diferenciación en osteoblastos humanos.</p>	<p>Los resultados favorables de 3 años con P-15 combinado con Hueso mineral inorgánico (ABM) sugieren que puede tener un efecto beneficioso a largo plazo en la formación de tejidos periodontales.</p> <p>Resultados clínicos significativamente mejorados en comparación con el desbridamiento de colgajo abierto.</p>

## **5.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En la actualidad existe una alta prevalencia de la enfermedad periodontal a nivel mundial que afectan las estructuras de soporte de los órganos dentarios como son hueso alveolar, cemento radicular, ligamento periodontal y encía, ocasionando que se pierda la integridad de este complejo y se genere una pérdida paulatina de los órganos dentarios. Es un problema de salud importante ya que es una enfermedad endógena infamatoria de origen multifactorial que afecta a diversas poblaciones demográficas, ocasionando una gran demanda por la atención bucodental, ya que la población acude en estados avanzados de la enfermedad, donde se requiere un tratamiento de rehabilitación con un costo excesivo y pronóstico reservado; mediante la medicina regenerativa y/o ingeniería de tejidos, se busca regenerar estas estructuras de soporte del diente sin embargo, los tratamientos odontológicos brindados actualmente no han logrado obtener resultados satisfactorios en dicho sentido. Las alternativas estudiadas en diversas investigaciones actuales han logrado la formación de algunos tejidos periodontales, pero no han logrado regenerar el tejido menos estudiado del cuerpo humano, el cemento radicular, que es la clave para la re inserción de las fibras de colágena del ligamento periodontal, fundamentales para lograr el adecuado equilibrio de amortiguación que permite soportar las fuerzas mecánicas que sufre el periodonto. Una pregunta de investigación sería: ¿El péptido CEMP1-p1 puede ser utilizado como una estrategia, en la terapia para la regeneración de los tejidos mineralizados, que eventualmente permitan la formación de los diversos tejidos del periodonto?

## **6.- JUSTIFICACIÓN**

Debido a la alta prevalencia de enfermedades periodontales, muchas investigaciones se centran en la regeneración de estos tejidos. Actualmente, se buscan diversas alternativas para su control y tratamiento, intentando disminuir la incidencia de dichas alteraciones; una de las estrategias principales se centra en la estimulación a través de péptidos bioactivos, que induzcan la regeneración periodontal como alternativa para el tratamiento de estas patologías. El péptido

CEMP1-p1 es un péptido derivado de CEMP1 el cual ha probado tener las mismas características funcionales que la proteína nativa, permitiendo la formación de tejidos mineralizados, además de tener un papel inductor en células troncales mesenquimales, que podría permitir la neoformación de cemento radicular y hueso alveolar y eventualmente lograr la integración de ligamento periodontal, restableciendo el complejo de tejidos que conforman el periodonto, por lo tanto se busca realizar un modelo preclínico que nos permita evaluar dichas características de CEMP1-p1 en defectos periodontales en ratas Wistar y buscar en un futuro su aplicación en diversas alteraciones periodontales promoviendo la regeneración de este complejo, mejorando así la salud bucodental (44).

## **7.- HIPÓTESIS**

El péptido CEMP1-p1 inducirá la regeneración de tejidos del periodonto *in vivo* en un modelo piloto de defecto periodontal en ratas Wistar.

## **8.- OBJETIVO GENERAL**

Determinar el papel regenerativo de CEMP1-p1 sobre los tejidos periodontales *in vivo* en un modelo piloto de defecto periodontal de ratas Wistar.

### **8.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar *in vitro* con células de ligamento periodontal si la aplicación de 20µg del péptido CEMP1-p1 permite la expresión de proteínas cemento específicas importantes para la regeneración del cemento radicular.
- Diseñar y realizar el primer modelo piloto de defecto periodontal en ratas Wistar para el estudio del péptido CEMP1-p1.
- Evaluar los defectos periodontales en ratas Wistar mediante análisis histomorfológico para determinar la participación del péptido CEMP1-p1, en la

formación de tejidos de soporte del periodonto como: hueso alveolar, cemento radicular, ligamento periodontal.

- Evaluar si la aplicación de CEMP1-p1 permite la expresión de marcadores de biomineralización que permitirán la regeneración de tejidos mineralizados del periodonto en los defectos periodontales en ratas Wistar.

## **9.- MATERIALES Y METODOS**

### **9.1.-Cultivo celular**

Se cultivaron celular de células del ligamento periodontal (PDL). La línea celular se obtuvo por el método de explante y se cultivaron en cajas de cultivo de 75cm<sup>2</sup> en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con SFB (Suero Fetal Bovino) al 10% y antibióticos (100µg/ml estreptomina y 100UI/ml penicilina, Sigma Chemical CO, Saint Louis MO). Las células se incubaron en un ambiente 100% de humedad a 37 °C, 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos celulares se utilizaron en el 2do pase para los procedimientos experimentales. Las células se colocaron bajo 3 condiciones; células en medio DMEM, células en medio DMEM con medio mineralizante, células en medio DMEM con medio mineralizante y el péptido CEMP1-p1 a una concentración 20 µg/ml. Los medios se cambiaron cada 3 días. Los cultivos fueron mantenidos durante 10 días bajo las condiciones.

### **9.2.- Western Blot**

Para realizar el Western Blot se recolectaron las células y se suspendieron en amortiguador de lisis frío (20mM NaCl, 20mM Acetato, 2mM PMSF), se centrifugaron 15 min a 14,000 rpm en 3 tubos eppendorff. Se cargaron geles de poliacrilamida al 12% con igual cantidad de proteína (20µg) que se determinó por el método de Bradford, usando BSA como estándar. Las proteínas se separaron por



electroforesis y se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Millipore, Bedford, MA). Las membranas se bloquearon con leche al 5% por una hora y se incubaron los anticuerpos policlonales de conejo CEMP1 y HACD1/CAP (dilución 1:1000) toda la noche a 4°C. Se lavaron y se incubaron en una dilución de 1:1000 con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa cabra anticonejo IgG por 1h a temperatura ambiente, después se lavó con PBS y se reveló con diaminobenzidina (DAB tetrahidrocloreto de 3, 3'-diaminobenzidina, NiCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PBS). Los blot se escanearon y analizaron con el sistema de análisis ImageJ.

### **9.3.- Defectos periodontales en ratas Wistar.**

Se utilizaron 30 ratas macho, cepa Wistar de 18 semanas y peso 250-300 gramos. Dichas ratas se dividieron en 3 grupos siguiendo el parámetro de la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999; la cual describe las especificaciones técnicas, cuidados y uso de animales de laboratorio. Además de los procedimientos establecidos por el comité de ética de la facultad de odontología de la UNAM.

Protocolo de la cirugía de ratas Wistar:

- 1.- Recolección de ratas cepa Wistar cerca de los 300 gr para asegurar el correcto desarrollo de la raíz vestibular.
- 2.- Las ratas se alojaron en el bioterio y durante 7 días se mantuvieron en observación.
- 3.- Mediante la anestesia y sedación se realizó el procedimiento quirúrgico utilizando Zolazepam (20-40 mg/kg) y Maleato de Acepromacina (0.5-1 mg/kg) vía intramuscular. Se realizó antisepsia con yodopovidona y colocación de anestésico en la zona quirúrgica utilizando mepivacaína/epinefrina, se localizaron los puntos de referencia anatómicos glándula parótida y comisura labial realizando una incisión lineal de 5mm a través de la piel, levantando el colgajo (Figura 2).

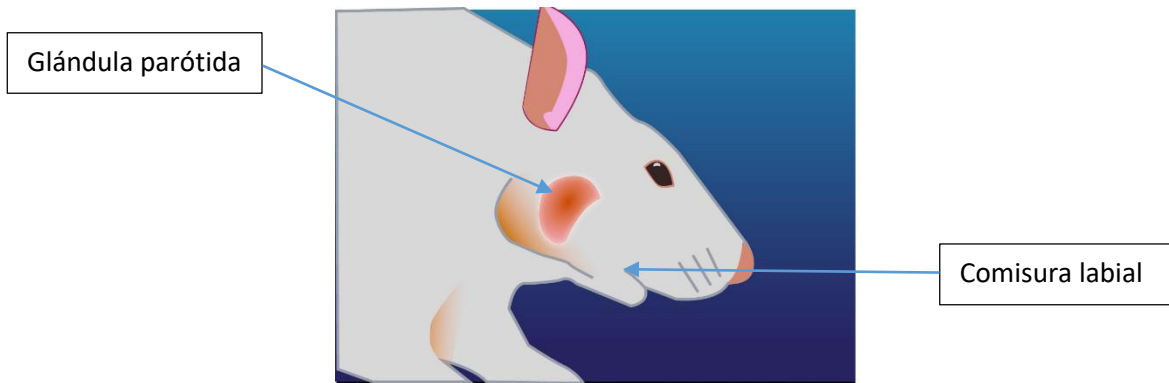


Figura 2.- Referencias anatómicas para la incisión en piel en ratas Wistar.  
Fuente propia.

Después se localizó nuevamente 2 estructuras anatómicas el conducto parotídeo y el nervio facial, realizando una segunda incisión sobre el musculo masetero y el periostio en la porción postero-inferior de la mandíbula (Figura 3).

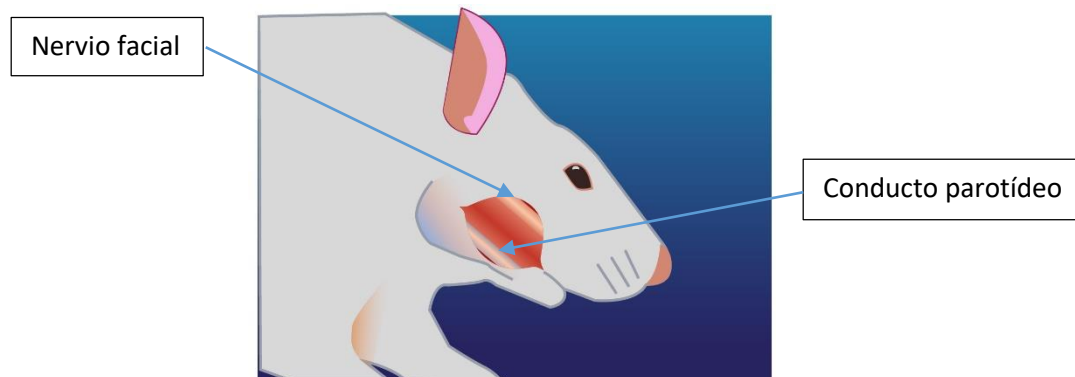


Figura 3.- Referencias anatómicas para la segunda incisión sobre el musculo masetero en ratas Wistar. Fuente propia.

Se disecaron los músculos e inserciones en ligamentos superpuestos hasta exponer el cuerpo mandibular (Figura 4).

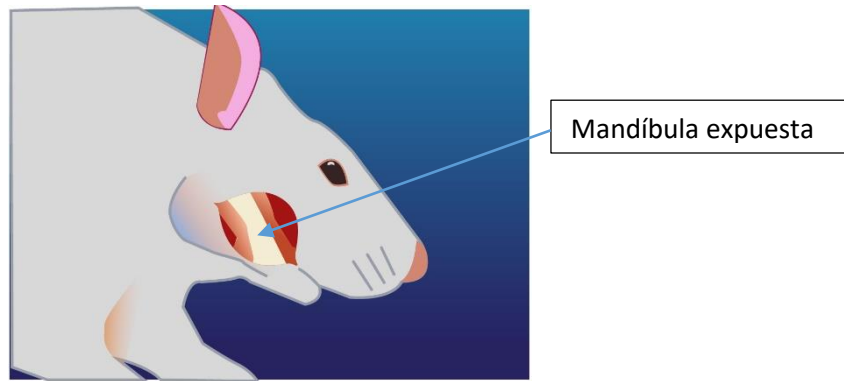


Figura 4.- Explosión mandibular en ratas Wistar para la respectiva identificación anatómica denominada gota. Fuente propia.

Para la realización del defecto periodontal, se localizó en el plano mandibular una región opaca con un aumento de tamaño óseo en forma de “gota” marcando la región de acceso para el primer molar y 2mm hacia la derecha el defecto periodontal se delimita en la raíz vestibular del primer molar usando una fresa de bola del número 4, retirando el hueso alrededor quedando al descubierto la raíz, realizando un campo operatorio de 3 x 2mm en 3 caras de la raíz vestibular, con el exportador se retira el ligamento periodontal y raspado de cemento, por último con un ultrasonido y una punta E7D NSK ISO 005 se retira cemento y parte de la dentina sin llegar a la pulpa, se irriga con solución amortiguadora de fosfato estéril (PBS) .

4- Después se coloca el material de la siguiente forma:

- |  |   |   |
|--|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Grupo 1 (control negativo, n=6): satín.</li> <li>- Grupo 2 (control negativo, n=6): Gelfoam + satín.</li> </ul>   | } | Tinción hematoxilina<br>eosina +<br>inmunofluorescencia |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Grupo 3 (experimental, n=6): CEMP-1p1 20µg +Gelfoam+ Satín.</li> <li>- Grupo 1 (control negativo, n=6): satín.</li> <li>- Grupo 3 (experimental, n=6): CEMP-1p1 20µg +Gelfoam+ Satín</li> </ul> | } | Tinción tricromía<br>masson +<br>inmunofluorescencia    |

5 - Para el cierre del sitio quirúrgico se reposionaron los músculos y se suturó con puntos simples de ácido poliglicólico 4-0 y la piel con seda 4-0.

6.- El cuidado post operatorio fue durante 7 días, se mantuvieron con tratamiento inyectable de antibiótico y antiinflamatorio, después de 4 semanas (30 días) se realizó eutanasia con monóxido de carbono para evitar dolor y sufrimiento a los animales de experimentación.

#### **9.4.- Procesamiento histológico**

Posterior a la eutanasia se retiraron las mandíbulas junto con el musculo, evitando retirar los tejidos cerca del defecto periodontal. Los tejidos se fijaron con formol al 10% durante 48 horas durante una semana, después se delimito el defecto periodontal, realizando el primer corte de las mandíbulas respetando los parámetros anatómicos (Tabla 3, Figura 5), implementado la pieza de alta velocidad e irrigación constante con agua corriente, se tuvo máximo cuidado de cortar la periferia del defecto común con un margen de seguridad de 10mm, se lavaron cuidadosamente las muestras, posteriormente se colocaron en una solución de EDTA al 10% durante 4 semanas para su descalcificación. Se incluyeron en parafina para mantener el tejido fijo, permitiendo realizar un segundo corte y una delimitación más precisa de los defectos periodontales, respetando parámetros anatómicos establecidos (Tabla 3, Figura 5), bajo el microscopio óptico. Se realizaron los cortes de 5 µm en el micrótopo y los especímenes se tiñeron con hematoxilina y eosina o tricotómica de masson. Las laminillas se montaron y observaron mediante microscopia óptica utilizando el microscopio Axioskope II (Carl Zeiss, Alemania).

Tabla 3.- Parámetros anatómicos para la delimitación y la obtención de los cortes histológico de los defectos periodontales en ratas Wistar.

Cortes para delimitar el defecto periodontal	Parámetros anatómicos para la delimitación
<b>Primer</b>	Primer corte en la base del cuerpo de la mandíbula por debajo de la estructura anatómica del incisivo paralelo al plano oclusal, segundo corte entre la rama mandibular y el cuerpo de la mandíbula al límite de la raíz distal del tercer molar paralelo a la raíz mesial del primer molar, tercer corte en el cuerpo de la mandíbula al límite de la raíz mesial del primer molar paralelo a la raíz distal del tercer molar, eliminando el incisivo.
<b>Segundo</b>	Primer corte se realiza en el cuerpo de la mandíbula por arriba del incisivo paralelo al plano oclusal, segundo corte entre la raíz distal del primer molar y raíz mesial del segundo molar cargándose el corte hacia la raíz distal del primer molar con el objetivo de limitar el número de laminillas al momento de buscar el defecto y observar la raíz vestibular del primer molar.

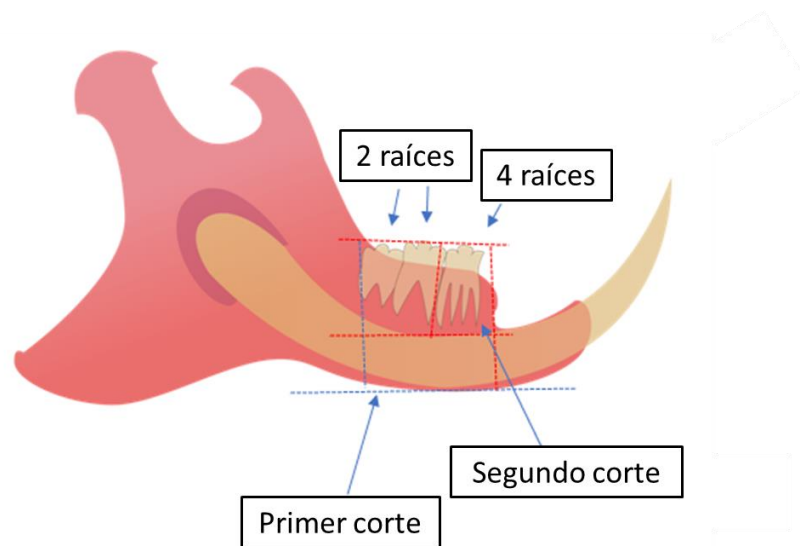


Figura 5.- Imagen representativa de los cortes realizados para delimitar el defecto periodontal y la obtención de cortes histológicos. Fuente propia.

### 9.5.- Inmunofluorescencia

Las laminillas se desparafinaron con xilol y se rehidrataron en concentraciones descendentes de alcohol etílico y por último se lavaron con PBS por 5 min posteriormente fueron incubados con los anticuerpos primarios a una dilución de 1:100 en PBS + 2mg/ml de BSA. Se incubaron toda la noche a 4°C, se lavaron en PBS + Tween 20 al 0.01% por 5 min dos veces y el último lavado con PBS. Después de transcurrido el tiempo de incubación, se coloca el anticuerpo secundario acoplado a isotiocianato de fluorescencia (FITC) a una dilución de 1:50 o Alexa Rojo a una dilución 1:400, durante 2h a temperatura ambiente. Se lava con PBS + Tween 20 al 0.01% por 5 min y el ultimo con PBS. Las laminillas se montaron y observaron en un microscopio de epifluorescencia indirecta Axioskope II (Carl Zeiss, Alemania).

## 10.- RESULTADOS

### 10.1.- Western blot

Se realizó cuantificación relativa de Western Blot para confirmar la presencia de proteínas cemento específicas: HACD1/CAP y CEMP1 a los 10 días de la colocación de 20µg/ml del péptido CEMP1-p1 en células del ligamento periodontal. Se observó una mayor densidad de proteínas en el grupo experimental, comparada con los grupos controles. Las densidades en pixeles se obtuvieron comparando contra la densidad en pixeles del gen endógeno GAPDH, la cual representa el 100% (Figura 6).

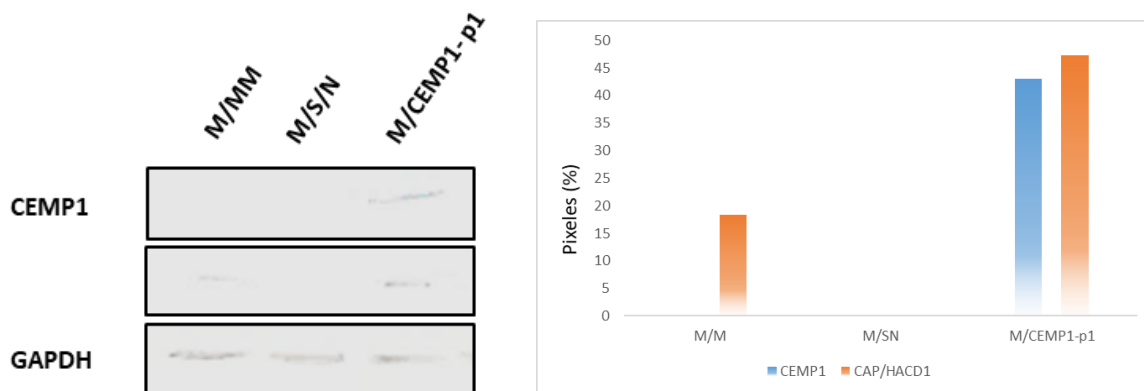


Figura 6.- Western Blot. -Se observa una mayor densidad de las proteínas en el grupo con el péptido de CEMP1-p1. Y en la cuantificación de pixeles se confirma este incremento. M/MM.- Medio DMEM más medio mineralizante. M/SN. - Medio DMEM. M/CEMP1-p1.- Medio DMEM con medio mineralizante y el péptido CEMP1-p1.

## 10.2.- Defectos periodontales en ratas Wistar

Bajo el protocolo establecido se realizó el procedimiento quirúrgico en ratas Wistar, originando un defecto periodontal de 2x3mm en la raíz vestibular del primer molar inferior derecho, sin afectación de otras estructuras como corona dentaria y encía. El defecto abarca aproximadamente 2/3 de raíz con pérdida de hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento (Figura 7, 8).

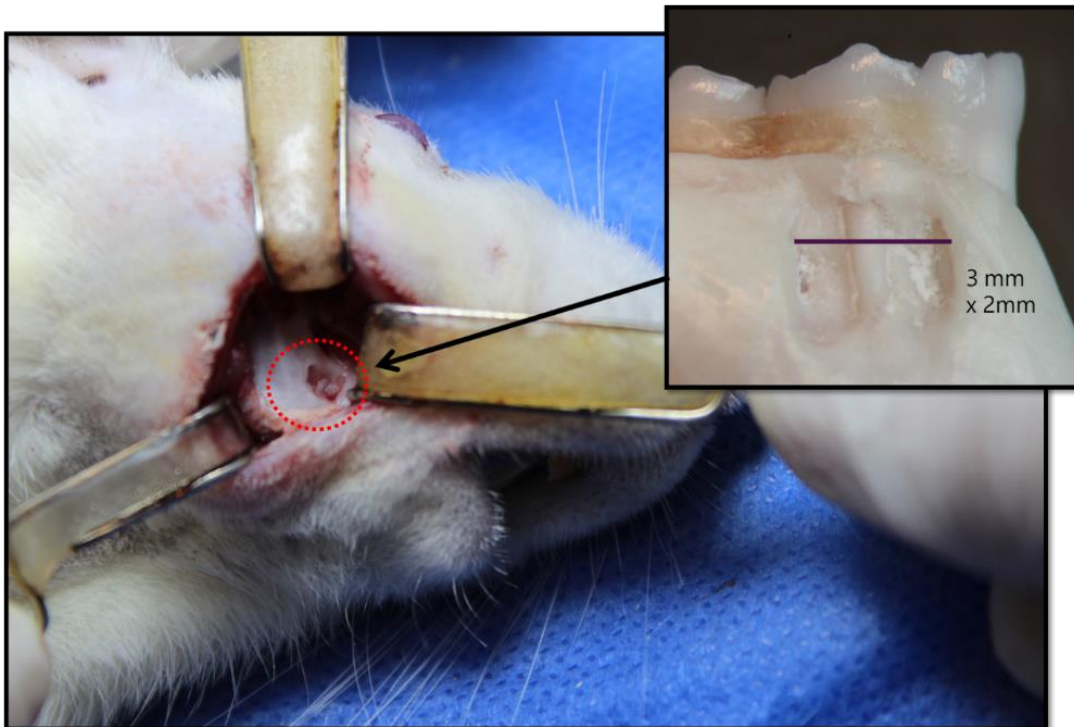


Figura 7.- Fotografía del defecto periodontal 2x3mm en ratas Wistar.

Se obtuvieron 30 mandíbulas de 56 ratas operadas, y se descartando las ratas que no cumplieron con las características anteriormente descritas.



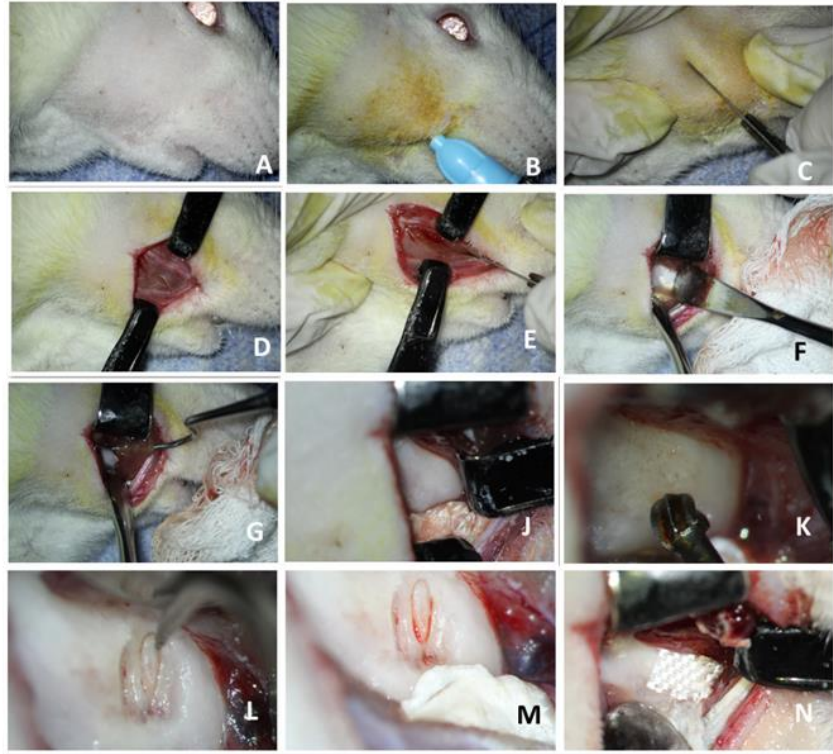


Figura 8.- Procedimiento quirúrgico en ratas Wistar. A) Rata Wistar con tricromía en la zona quirúrgica. B) asepsia y antisepsia con yodopovidona y anestesia. C) incisión en piel de 5mm. D) levantamiento de epitelio y localización del conducto parotídeo y nervio facial. E) segunda incisión en músculos. F) desbridamiento y observación de mandíbula. G) eliminación de inserciones. H) observación de la estructura anatómica denominada gota. I) eliminación de tejido óseo con fresa de bola. J) raspado de cemento y ligamento periodontal con el explorador. K) defecto periodontal bien delimitado. L) colocación del andamio y cierre de herida.

### **10.3.- Análisis histomorfológico.**

Se estudiaron cortes histológicos con diversas condiciones: satín solo, satín más andamio y satín más andamio con el péptido CEMP1-p1. Los defectos se analizaron a los 30 días.

El grupo con satín solo y satín más andamio presentaban en la superficie del defecto periodontal cemento radicular remanente de estructura amorfa y regiones con pérdida del tejido. El espacio del ligamento periodontal se pierde, hay mayor número de vasos sanguíneos de amplio calibre a lo largo del ligamento periodontal, que posiblemente conlleven a una respuesta inflamatoria exacerbada, sugiriendo una pobre reparación del complejo. En hueso alveolar se observa solo una matriz mineralizada de reparación mínima con osteocitos y osteoblastos en la periferia. A mayor aumento se observa la falta de integración de fibras del ligamento periodontal en la superficie del defecto y hueso alveolar e incluso, algunos especímenes presentaron integración de hueso alveolar a la superficie de la dentina provocando una posible anquilosis. Además, los fibroblastos del ligamento periodontal se aglomeraron observando una notable desorganización del complejo. Por último, el grupo que contenía satín más andamio con el péptido CEMP1-p1 mostraron la formación de cemento radicular que favorece el crecimiento laminar característico del propio tejido. El espacio del ligamento periodontal se mantiene y el número de vasos sanguíneos es notoriamente menor y de menor calibre. En hueso alveolar se observa en el centro hueso lamelar y en la periferia hueso reticular con una matriz mineralizada osteoide, además de irrigación e inervación que promueve la formación y maduración del tejido mineralizado, permitiendo un proceso de regeneración. A mayor aumento se observa la integración de fibras del ligamento periodontal al cemento radicular y hueso alveolar, solo en algunos especímenes no se llegó a observar la integración ya que el tejido se encontraba en estadios de premineralización, además los fibroblastos del ligamento periodontal mantenían una organización y/o orientación favorable evitando la aglomeración y obteniendo una morfología muy similar de un periodonto sano (Figura 9,10,11).

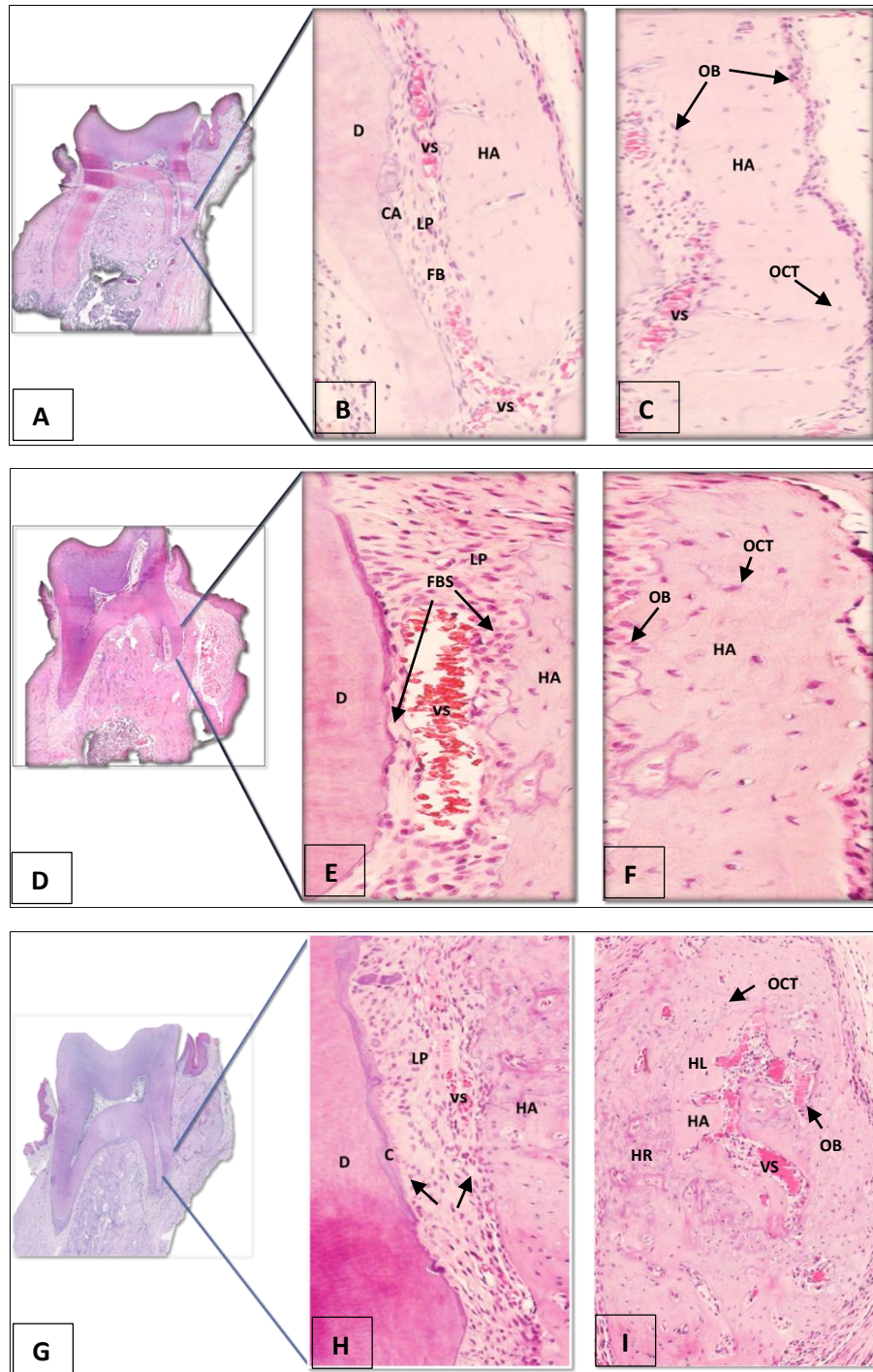


Figura 9.- Reconstrucción panorámica de los defectos periodontales en ratas Wistar a los 30 días. A). grupo satín solo. B). Grupo satín más andamio C) grupo satín más andamio con el péptido CEMP1-p1. Hallazgos histológicos B.E.H) estructura de soporte del periodonto C.F.I) hueso alveolar. LP. Ligamento periodontal. VS. Vaso sanguíneo. HA.- Hueso alveolar. HL. Hueso lamelar. HR. Hueso reticular. D.- Dentina. C. Cemento radicular CA. - Cemento amorfo. FBS. Fibroblastos. OB. Osteoblastos. OCT. Osteocito. Teñidos con hematoxilina y eosina.

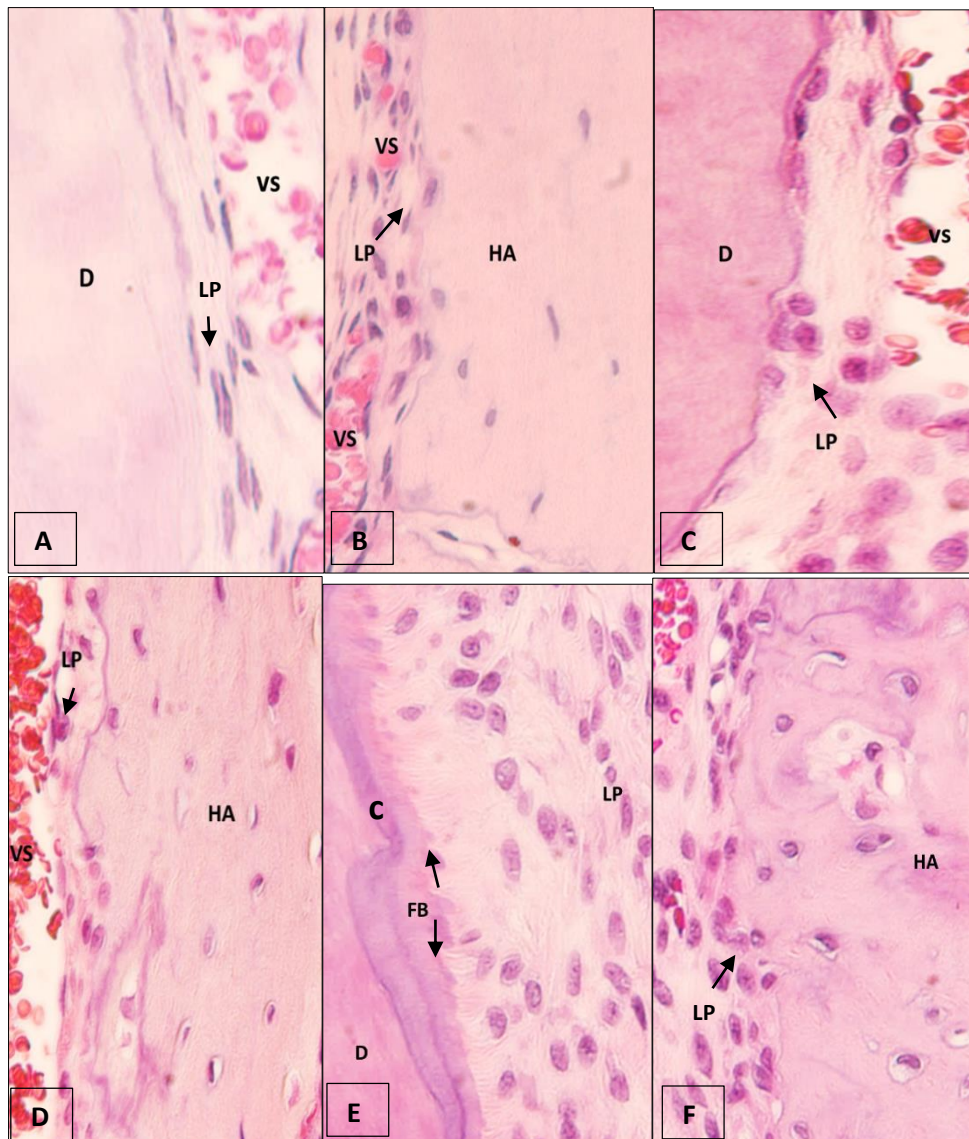


Figura 10.- Hallazgos histológico amplificación de la estructura de soporte de periodonto. A.B.C.D. grupo con satín solo y satín más andamio con falta de integración de fibras del ligamento periodontal en la superficie del defecto periodontal y hueso alveolar en reparación. E.F) grupo satín mas andamio con el péptido CEMP1-p1 integración de fibras del ligamento periodontal en cemento radicular regenerado a excepción del hueso alveolar. LP. Ligamento periodontal. VS. Vaso sanguíneo. HA.- Hueso alveolar. D.- Dentina. C. Cemento radicular. FB. Fibras del ligamento periodontal. Teñidos con hematoxilina y eosina.



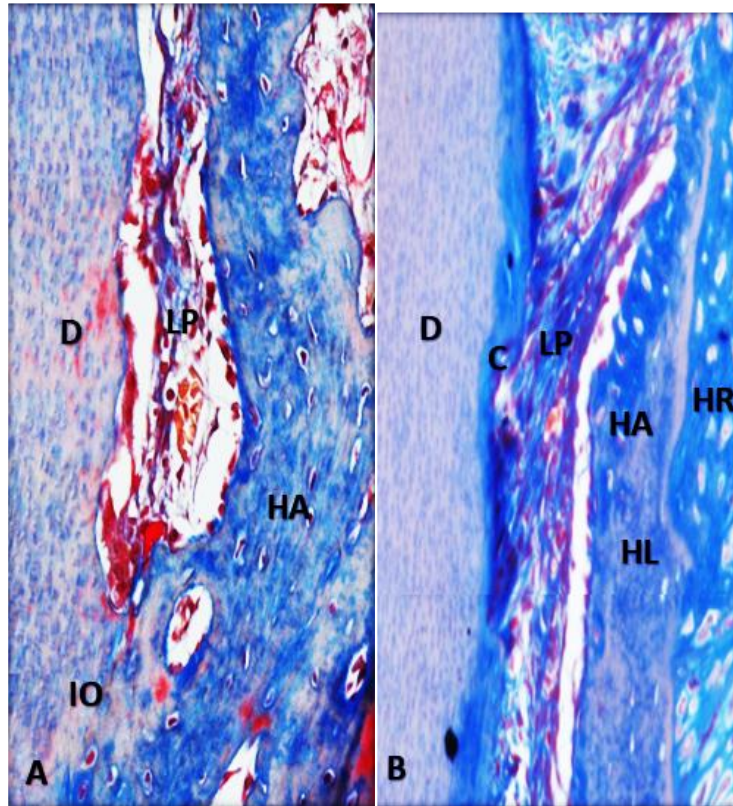


Figura 11.- Hallazgos histológico amplificación de la estructura de soporte de periodonto. A) grupo satin mas andamio con falta de integracion de fibras de ligamento peridontal y integracion osea (hueso alveolar) a la superfie de la dentina probocano una posible anquilosis. B) grupo satin mas andamion con el peptido CEMP1-p1 promoviendo la integracion de fibras del ligamento peridontal en hueso alveolar y cemnto radicular. LP.- ligamento peridontal, HA.- hueso alveolar, C.- Cemento radicular, D.- dentina, IO.- integracion osea. HL. Hueso lamelar. HR. Hueso reticular. Tincion Tricrómica de Masson.

## 10.4.- Inmunofluorescencia

La expresión de marcadores para tejidos mineralizados se evaluó a los 30 días a través de doble marcaje. Para el grupo satín más andamio con el péptido CEMP1-p1, la proteína de adhesión al cemento (CAP) y la proteína del cemento 1 (CEMP1) estaban expresadas en los fibroblastos del ligamento periodontal, cementoblastos del cemento radículas recién regenerado y en osteoblastos y osteocitos del hueso alveolar (Figura 12 A.B.C.I.K.N.O). Ameloblastina (AMBN), amelogenina (AMEL), osteocalcina (OCN) y Sialoproteína dentinaria (BSP) estaban expresadas en cementoblastos del cemento radicular recién formado y en osteoblastos del hueso alveolar, principalmente en el frente de osificación y solo AMEL y BSP se expresaban en fibroblastos del ligamento periodontal (Figura 12 E.F.G.J.K.M.O). Para el grupo satín solo (no mostrada) y satín más andamio, ningún marcador fue positivo en las zonas evaluadas (Figura 13).

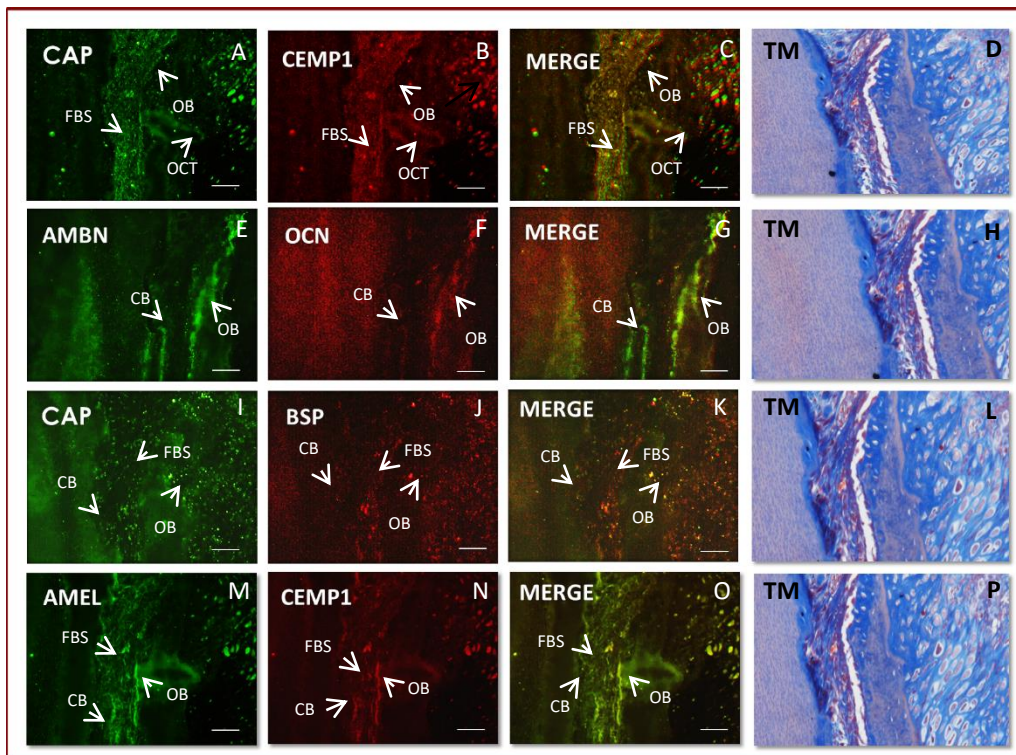


Figura 12.- Inmunofluorescencia del grupo satín más andamio con el péptido CEMP1-p1 a los 30 días. FBS. Fibroblastos. CB. Cementoblastos. OB. Osteoblastos. OCT. Osteocitos (barra de escala= 50µm).

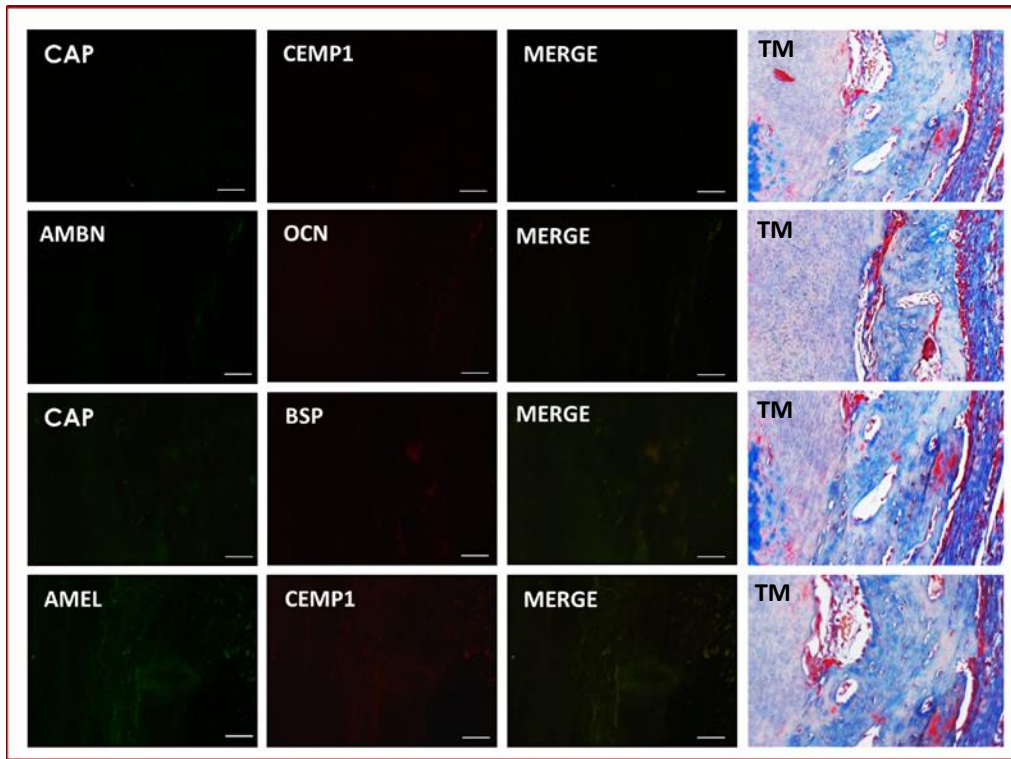


Figura 13.- Inmunofluorescencia del grupo satín más andamio a los 30 días. (barra de escala= 50 $\mu$ m).

### 10.5.- Análisis de resultados

Los resultados del Western Blot se representaron mediante una descripción cuantitativa, el nivel relativo de cada proteína se evaluó midiendo la intensidad de todos los píxeles en cada banda, excluyendo el fondo. Los resultados se expresaron como porcentajes de intensidad de proteína obtenida en cultivo control comparado con el experimental y utilizando GAPDH como proteína constitutiva de control de carga. Para el análisis histológico los resultados de los cortes se representaron mediante una descripción cualitativa con base a las observaciones presentadas y analizado por un patólogo oral, además de comprobar la expresión de proteínas a través de la inmunofluorescencia.

## 11.- DISCUSIÓN

Diversos estudios han corroborado que el péptido CEMP1-p1 cumple las mismas funciones que la proteína completa. Su aplicación confiere mayor ventaja comparado con la proteína nativa, ya que es una molécula de menor tamaño y por lo tanto, no es detectada por el sistema inmune, tiene mayor estabilidad, presenta la misma vida media que la proteína nativa, y además se obtiene con mayor pureza y con un menor costo, permitiendo ser un buen candidato para aplicarse en la regeneración periodontal (44,56).

Existen estudios en la literatura que apoyan el uso de péptidos bioactivos en modelos animales, también existen estudio en casos clínicos como estrategia orientada para la formación de tejidos mineralizados y periodontales como se observa en tabla 2. Estos estudios reportaron el uso de péptidos biactivos como es la OPG y TP508 en modelo preclínicos. Los estudios se realizaron en conejos y roedores, a los que se les depositaron estos péptidos en la tibia y el fémur permitiendo la formación de tejidos mineralizados. Así mismo, se inició la aplicación del péptido P-15 en el área de la periodoncia en humanos, en defectos periodontales infraóseos, pero los resultados obtenidos no fueron muy significativos, ya que no mostraron que tipo de tejido periodontal fue formado después de la aplicación del péptido. En nuestro modelo se puede evaluar las propiedades regenerativas del péptido CEMP1-p1 a nivel histológico y celular, ello nos permite comprender los procesos celulares involucrados, lo cual podría ser importante para su aplicación en un futuro en el área de periodoncia. Además, el péptido CEMP1-p1 presenta características únicas que lo diferencian de los demás péptidos, está constituido por 8 aminoácidos que pueden ser fosforilados, para modificar su carga y, por lo tanto, su estructura y función. Más aún, cuenta con un aminoácido de carga negativa, que promueve la reorganización incidiendo en el crecimiento de cristales de hidroxiapatita, en contraste con los péptidos OPG y P-15 que tienen una secuencia pobre o nula de aminoácidos con carga negativa y menor cantidad de aminoácidos que pueden fosforilarse. Solo TP508 presenta 6 aminoácidos negativos y 1



aminoácido con posible fosforilación, resaltando el motivo RGD que le permite interactuar con integrinas, y activar vías de señalización implicadas en la angiogénesis. Por lo tanto, se decidió aplicar el péptido de CEMP1-p1 en un modelo de defecto periodontal en ratas Wistar, para evaluar su capacidad regenerativa (52–55).

Se demostró que el péptido CEMP1-p1 permite la expresión de proteínas cemento específicas (HACD1/CAP y CEMP1) a los 10 días, teniendo una expresión mayor del 40% en el grupo experimental con péptido CEMP1-p1 y una expresión menor del 20% de HACD1/CAP en el grupo con el medio mineralizante, y nula para CEMP1. Con estos resultados se evidenció, la necesidad de aplicar CEMP1-p1 para la expresión de las dos proteínas cemento específicas. Estos resultados son similares a los obtenidos en el estudio realizado por Pérez Soria en 2015, que mostraron que una concentración mínima de 3000ng/ml de CEMP1-p1 en células del ligamento periodontal, permite la expresión de dichas proteínas e induce un proceso de diferenciación (56).

En la actualidad existen una gran variedad de modelos animales que han sido usados para el estudio de la regeneración periodontal, sin embargo, las ratas han sido consideradas como los mejores candidatos, debido a que tienen un tamaño que facilita su manejo, comparados los modelos de los primates, perros y cerdos miniatura (47,48). Nuestros resultados demostraron que el grupo experimental satín más andamio con el péptido CEMP1-p1 en los defectos periodontales indujo una respuesta regenerativa controlada, con neoformación de cemento radicular de forma laminar y la organización de los complejos celulares que lo constituyen, permitiendo la reintegración de fibras de ligamento periodontal. Mientras que en el hueso alveolar se observó osificación intramembranosa, indicativo de la formación de hueso. Al aumentar su tamaño se fusiona para formar trabéculas, dando lugar a hueso esponjoso con cierre de vasos sanguíneos, resultados que concuerdan con los estudios realizados en defectos críticos en calvaria de ratas Wistar favorecidos por el péptido CEMP1-p1 (44). Por último, se mantiene el espacio del ligamento periodontal, donde los fibroblastos mantienen una organización y orientación,

(6,57). La neoformación de tejido inducido por el péptido CEMP1-p1 podría permitir la migración y diferenciación de células troncales del ligamento periodontal hacia el fenotipo específico de las células que conforman el periodonto, como se reportó en los estudios de la proteína completa CEMP1 y del péptido CEMP1-p1 (41,44,51).

Además, se identificó en el grupo experimental tratado con el péptido CEMP1-p1, la expresión de proteínas implicadas en la formación de tejidos mineralizados como son: Sialoproteína ósea (BSP), lo cual demuestra que se está promoviendo la adhesión celular y la diferenciación, y que también participa en la nucleación de cristales de hidroxapatita (58). Por otro lado, la expresión positiva de Osteocalcina (OCN) indica la formación ósea durante las últimas etapas de diferenciación, lo que permite regular la mineralización de la matriz (24,25). Las proteínas del esmalte la Ameloblastina (AMBM) y Amelogenina (AMEL) también se expresaron. Estos resultados sugieren que las proteínas asociadas al esmalte pueden participar de forma sinérgica en la regulación de la diferenciación y en el depósito de tejidos periodontales, principalmente del cemento radicular, lo que nos orienta a comprender de una manera más clara cómo se regula el proceso de cementogénesis (59). Por último, también se analizó como las proteínas cemento específicas como HACD1/CAP y CEMP1 participan en la quimiotaxis, adhesión y formación de tejido mineralizados y en la proliferación, biomineralización, quimiotaxis y diferenciación celular, respectivamente. Los resultados sugieren la posible participación de estas proteínas en la formación de cemento radicular y hueso alveolar mediante un proceso de biomineralización. Más aún, la presencia de CEMP1 en el ligamento periodontal pudiera indicar que las células troncales ubicadas paravascularmente adquieren un fenotipo precursor de cementoblastos y/o osteoblastos, dando lugar a la formación de nuevo tejido mineralizado (32, 60).

## 12.- CONCLUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que el péptido CEMP1-p1 es una molécula bioactiva, que permite la formación de tejidos mineralizados como cemento y hueso alveolar favoreciendo la integración de fibras del ligamento periodontal, lo cual promueve la regeneración de los tejidos que conforman el periodonto, por lo que podría ser buen candidato hacia la medicina regenerativa periodontal. Además, se podrían realizar estudios clínicos, para que estos péptidos pudieran ser aplicados eventualmente, en pacientes y contribuir a disminuir la prevalencia de alteraciones periodontales, que afectan a la población mundial.

### 13.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease\*. *Periodontol 2000*. 2006;40:11–28.
2. Newman, Takei, Klokkevoid, Carranza. *periodontologia clinica*. McGraw Hill Education, editor. 2010. 1286 pages.
3. Bosshardt DD, Stadlinger B, Terheyden H. Cell-to-cell communication - periodontal regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(3):229–39.
4. Cho M II, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol 2000*. 2000;24(1):9–27.
5. Xiong J, Gronthos S, Bartold PM. Role of the epithelial cell rests of malassez in the development, maintenance and regeneration of periodontal ligament tissues. *Periodontol 2000*. 2013;63(1):217–33.
6. María Elsa Gómez de Ferraris ACM. *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental*. 3a ed. Mexico: panamericana; 2009. 482 p.
7. Bosshardt DD, Lang NP. The Junctional Epithelium : from Health to Disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;2004(li):9–20.
8. Beertsen W, McCulloch CAG, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000*. 1997;13(1):20–40.
9. Chu TMG, Liu SSY, Babler WJ. *Craniofacial Biology, Orthodontics, and Implants*. Reserved. EIA rights, editor. *Basic and Applied Bone Biology*. 2013. 225-242 p.
10. Gulabivala K, Ng YL. *Tooth organogenesis, morphology and physiology*. *Endod Fourth Ed*. 2014;2–32.
11. Hoz L. Cementoblastos humanos expresan marcadores de cartilago, cemento radicular y promueven la regeeración ósea en defectos de tamaño crítico en calvarias de ratas. UNAM; 2015.
12. Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000*. 1997;13(1):41–75.
13. Hasegawa T. Ultrastructure and biological function of matrix vesicles in bone mineralization. *Histochem Cell Biol*. 2018;149(4):289–304.
14. Veis A, Dorvee JR. Biomineralization Mechanisms: A new paradigm for crystal nucleation in organic matrices. *Calcif Tissue*. 2014;93(4):307–15.

15. Simko V. Alkaline phosphatases in biology and medicine. *Dig Dis.* 1991;9(4):189–209.
16. Bolean M, Simão AMS, Barioni MB, Favarin BZ, Sebinelli HG, Veschi EA, et al. Biophysical aspects of biomineralization. *Biophys Rev.* 2017;9(5):747–60.
17. Orimo H, Division. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch.* 2010;77(1):4-12.
18. Bouleftour W, Juignet L, Bouet G, Granito RN, Vanden-Bossche A, Laroche N, et al. The role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in skeletal biology - Contribution of mouse experimental genetics. *Matrix Biol.* 2016;52–54:60–77.
19. Qin C, Baba O, Butler WT. Post - translational modifications of SIBLING proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(3):126–36.
20. Harris NL, Rattray KR, Tye CE, Underhill TM, Somerman MJ, D'Errico JA, et al. Functional analysis of bone sialoprotein: Identification of the hydroxyapatite-nucleating and cell-binding domains by recombinant peptide expression and site-directed mutagenesis. *Bone.* 2000;27(6):795–802.
21. Billy GG. Extracellular matrix mineralization in periodontal tissues: Noncollagenous matrix proteins, enzymes, and relationship to hypophosphatasia and X-linked hypophosphatemia. *Periodontol 2000.* 2015;6(9):790–5.
22. Icer MA, Gezmen-Karadag M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clin Biochem.* 2018;59(July):17–24.
23. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol.* 2000;19(7):615–22.
24. Hauschka P V., Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev.* 1989;69(3):990–1047.
25. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone.* 2016;82:42–9.
26. Mizokami A, Kawakubo-Yasukochi T, Hirata M. Osteocalcin and its endocrine functions. *Biochem Pharmacol.* 2017;132:1–8.
27. Ikeda M, Kanao Y, Yamanaka M, Sakuraba H, Mizutani Y, Igarashi Y, et al. Characterization of four mammalian 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases involved in very long-chain fatty acid synthesis. *FEBS Lett.* 2008;582(16):2435–40.
28. S. Pitaru S.A. Narayanan S. Olson N. Savion H. Hekmati I. Alt Z. Metzger. Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces. *J periodont.* 1995;360–8.

29. Hernandez Cortes S. Péptido derivado de CAP para el tratamiento de la osteoporosis en un modelo animal. UNAM; 2016.
30. Saito M, Iwase M, Maslan S, Nozaki N, Yamauchi M, Handa K, et al. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone*. 2001;29(3):242–8.
31. Handa K, Saito M, Yamauchi M, Kiyono T, Sato S, Teranaka T, et al. Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. *Bone*. 2002;31(5):606–11.
32. Montoya G, Arenas J, Romo E, Zeichner-David M, Alvarez M, Narayanan AS, et al. Human recombinant cementum attachment protein (hrPTPLa/CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation in vitro and bone healing in vivo. *Bone*. 2014;69:154–64.
33. H. Arzate, L.F. Jiménez-García, M.A. Álvarez-Pérez, A. Landa, I. Bar-Kana and SP. Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein. *J Dent Res*. 2002;541–6.
34. Bermúdez M, Imaz-Rosshandler I, Rangel-Escareño C, Zeichner-David M, Arzate H, Mercado-Celis GE. CEMP1 induces transformation in human gingival fibroblasts. *PLoS One*. 2015;10(5):1–20.
35. Alvarez-Pérez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodríguez Carmona B, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone*. 2006;38(3):409–19.
36. Villarreal-Ramírez E, Moreno A, Mas-Oliva J, Chávez-Pacheco JL, Narayanan AS, Gil-Chavarría I, et al. Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): Primary role in biomineralization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;384(1):49–54.
37. Romo-Arévalo E, Arzate H, Montoya-Ayla G, Rodríguez-Romero A. High-level expression and characterization of a glycosylated human cementum protein 1 with lectin activity. *FEBS Lett*. 2016;590(1):129–38.
38. Chen X, Liu Y, Yang J, Wu W, Miao L, Yu Y, et al. The synthesis of hydroxyapatite with different crystallinities by controlling the concentration of recombinant CEMP1 for biological application. *Mater Sci Eng C*. 2016;59:384–9.
39. Carmona-Rodríguez B, Álvarez-Pérez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, Molina-Guarneros J, et al. Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;358(3):763–9.

40. Komaki M, Iwasaki K, Arzate H, Narayanan AS, Izumi Y, Morita I. Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *J Cell Physiol.* 2012;227(2):649–57.
41. Paula-Silva FWG, Ghosh A, Arzate H, Kapila S, Da Silva LAB, Kapila YL. Calcium hydroxide promotes cementogenesis and induces cementoblastic differentiation of mesenchymal periodontal ligament cells in a CEMP1- and ERK-dependent manner. *Calcif Tissue Int.* 2010;87(2):144–57.
42. Hoz L, Romo E, Zeichner-David M, Sanz M, Nuñez J, Gaitán L, et al. Cementum protein 1 (CEMP1) induces differentiation by human periodontal ligament cells under three-dimensional culture conditions. *Cell Biol Int.* 2012;36(2):129–36.
43. Serrano J, Romo E, Bermúdez M, Narayanan AS, Zeichner-David M, Santos L, et al. Bone regeneration in rat cranium critical-size defects induced by cementum protein 1 (CEMP1). *PLoS One.* 2013;8(11).
44. Correa R, Arenas J, Montoya G, Hoz L, López S, Salgado F, et al. Synthetic cementum protein 1–derived peptide regulates mineralization in vitro and promotes bone regeneration in vivo. *FASEB J.* 2018;fj.201800434RR.
45. Correa Prado R. Nucleación y/o inhibición del proceso de mineralización in vitro a partir de péptidos derivados de proteínas del cemento. UNAM; 2016.
46. Pérez Soria A. Efecto biológico de un péptido de la proteína del cemento 1 (CEMP1) en el proceso de diferenciación de células derivadas del ligamento periodontal humano. UNAM 2015.
47. Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Animal models for periodontal regeneration and peri-implant responses. *Periodontol* 2000. 2015;68(1):66–82.
48. Padial-Molina M, Rodriguez JC, Volk SL, Rios HF. Standardized in vivo model for studying novel regenerative approaches for multitissue bone-ligament interfaces. *Nat Protoc.* 2015;10(7):1038–49.
49. Alvares OF. Periodontal diseases. *Nutr Asp Aging Vol 2.* 2018;3:159–74.
50. Chen X, Wu G, Feng Z, Dong Y, Zhou W, Li B, et al. Advanced biomaterials and their potential applications in the treatment of periodontal disease. *Crit Rev Biotechnol.* 2016;36(4):760–75.
51. Grzesik WJ, Narayanan AS, Hill C. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(6):474–84.
52. Zhao ZY, Shao L, Zhao HM, Zhong ZH, Liu JY, Hao CG. Osteogenic growth peptide accelerates bone healing during distraction osteogenesis in rabbit tibia. *J Int Med Res.* 2011;39(2):456–63.

53. Hanratty BM, Ryaby JT, Pan XH, Li G. Thrombin related peptide TP508 promoted fracture repair in a mouse high energy fracture model. *J Orthop Surg Res.* 2009;4(1):1–10.
54. Travis KE, Ben-Shachar M, Feldman HM, Leitner Y, Yeom KW. Thirty-six month follow-up of 25 patients treated with combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell-binding peptide (P-15) bone replacement grafts in human infrabony defects. I. *J Child Neurol.* 2015;31(3):321–7.
55. Kasaj A, Röhrig B, Reichert C, Willershausen B. Clinical evaluation of anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix/ cell-binding peptide (P-15) in the treatment of human infrabony defects. *Clin Oral Investig.* 2008;12(3):241–7.
56. Pérez Soria A. Efecto biológico de un péptido de la proteína del cemento 1 (cemp1) en el proceso de diferenciación de células derivadas del ligamento periodontal humano. UNAM; 2015.
57. López S. Células troncales derivadas de la lámina propia de la mucosa bucal: su potencial en la regeneración ósea in vivo. 2017.
58. Bouleftour W, Juignet L, Bouet G, Granito RN, Vanden-Bossche A, Laroche N, et al. The role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in skeletal biology - Contribution of mouse experimental genetics. *Matrix Biol.* 2016;52–54:60–77.
59. Nuñez J, Sanz M, Hoz-Rodríguez L, Zeichner-David M, Arzate H. Human cementoblasts express enamel -associated molecules in vitro and in vivo. *J Periodontal Res.* 2010;45(6):809–14.
60. Arzate H, Zeichner-David M, Mercado-Celis G. Cementum proteins: Role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontol 2000.* 2015;67(1):211–33.