



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

**Facultad de Odontología**  
**División de Estudios de Posgrado e Investigación**

Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados  
Campo de conocimiento: Ciencias Odontológicas Básicas  
(Biología Bucal)

**“REGENERACIÓN DEL DEFECTO PERIODONTAL *IN VIVO*,  
INDUCIDO A TRAVÉS DE UN PÉPTIDO DERIVADO DE LA  
PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO RADICULAR  
(CAPp-15)”**

**TESIS**

Que para optar por el grado de:  
**MAESTRA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

Presenta:

**C.D. VIRIDIANA AGUILAR SÁNCHEZ**

Tutora

Dra. Lia Alioth Hoz Rodríguez  
Facultad de Odontología

Vo Bo.  
*Lia Alioth Hoz*

Ciudad Universitaria, CDMX

Enero, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado una beca con el número de becario 752212, con la cual pude realizar y concluir mis estudios de maestría.

Agradezco al Dr. Higinio Arzate por la confianza que depositó en mí al abrirme las puertas del laboratorio, por su apoyo constante, sus indicaciones y orientaciones indispensables en el desarrollo de este proyecto de maestría y finalmente le agradezco darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

Agradezco a mi tutora la Dra. Lia Alioth Hoz Rodríguez por la confianza que ha puesto en mí por sobre todas las cosas, por su gran trabajo al guiarme por el camino correcto para culminar esta meta, gracias a sus conocimientos transmitidos, por su dedicación, empatía, paciencia y cariño. Pero además de eso gracias por siempre tener una solución ante cualquier adversidad, sin duda este proyecto de maestría es de ambas.

Agradezco a mis formadores profesionales Dr. Enrique, Dr. Gonzalo, Dra. Claudia, Dra. Rita, personas de gran sabiduría quienes se han esforzado por ayudarme a llegar al punto en el que me encuentro. Sencillo no ha sido el proceso, pero gracias a las ganas de transmitirme sus conocimientos y dedicación, he logrado importantes objetivos como culminar el desarrollo de mi tesis.

Agradezco al Sr. Juanito, por su amabilidad con la que me recibió, por su ayuda más allá de sus responsabilidades, por la calidez y respeto que me brindó.

Agradezco a mis amigos y compañeros de laboratorio Soni, Dina, Mikado, Ali Angie, Astrid, Pavel, Fer, Julio y Erika, gracias por su apoyo y compañerismo incondicional, por resolver mis dudas y orientarme en los momentos difíciles, gracias por la paciencia y por hacer el momento más alegre.

Gracias a mis amigos y compañeros de clase Danny, Fer, Jime y Ale, sin duda grandes personas que me puso el destino para acompañarme en este camino, gracias por el gran equipo de trabajo que formamos, por los conocimientos compartidos y por todas las dudas resueltas, gracias por brindarme su tiempo y su amistad.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme sus puertas desde hace más de 14 años, gracias a esta máxima casa de estudios me he rodeado de personas maravillosas y he adquirido una formación académica basada en el respeto y honestidad.

## DEDICATORIAS

No solo dedico esta tesis a una de las personas más importantes de mi vida, si no también le estoy eternamente agradecida por siempre confiar y creer en mí, pues nunca dudo de mis capacidades, gracias a ti papá Marco Antonio Aguilar Arzave por tu gran esfuerzo y dedicación para sacarme adelante y tomarme de la mano desde que inicie mi vida, gracias por que sin tu ayuda definitivamente no estaría hoy escribiendo estas palabras. Se que en aquel lugar maravilloso en el que te encuentras podrás verme culminar esta etapa y me guiaras en las siguientes. Te amare por siempre papá.

Te dedico esta tesis a ti mamá Lucia Sánchez Lara porque con tus sabios consejos y tu amor incondicional me has guiado para lograr concluir una meta más. Definitivamente tú has vivido cada etapa conmigo y esto nos ha permitido sentir la felicidad de lograrlo juntas, gracias por tus desvelos acompañándome, por tus cuidados y por tu valentía para ayudarme a salir adelante, pero sobre todo gracias por tenerme siempre presente en tus oraciones. Te amo mamá.

Dedico esta tesis a mi familia por siempre alentarme a ser mejor persona, por apoyarme sin esperar nada a cambio, por su confianza y cariño incondicional, este logro también es gracias a ustedes.

Dedico esta tesis a mi compañero de vida Marco Antonio Merín Alvarado, por ser parte fundamental de esa fuerza que me impulsa para seguir adelante, gracias por tus sabios consejos y motivaciones que me ha permitido mantenerme enfocada, gracias por los sacrificios, el amor, la compañía, el respeto y la paciencia que me has dado. Te amo.

*Gracias Dios por permitirme la dicha de la vida y por darme la oportunidad de llegar a este momento con salud y fe en ti.*

## ÍNDICE

I. ABREVIATURAS.....	1
II. CÓDIGO DE AMINOÁCIDOS.....	3
III. RESUMEN.....	4
IV. ABSTRACT.....	7
V. INTRODUCCIÓN .....	9
5.1 Periodonto .....	9
5.1.1 Embriogénesis del Periodonto.....	10
5.1.2 Encía.....	13
5.1.3 Ligamento Periodontal .....	15
5.1.4 Hueso Alveolar .....	17
5.1.5 Cemento radicular .....	19
5.2 Proteínas implicadas en el proceso de biomineralización del cemento radicular.....	22
5.2.1 Fosfatasa Alcalina (ALP).....	23
5.2.2 Sialoproteína Ósea (BSP) .....	23
5.2.3 Osteopontina (OPN) .....	24
5.2.4 Osteocalcina (OCN).....	25
5.2.5 Osteonectina (SPARC) .....	26
5.2.6 Integrinas y factores de crecimiento derivados del cemento.....	26
5.2.7 Proteínas cemento específicas.....	27
5.2.8 Proteína del cemento 1 (CEMP1) .....	28
5.2.9 Proteína de adhesión del cemento (HACD1/CAP) .....	29
5.3 Péptido CAPp-15 .....	32
5.4 Enfermedad periodontal .....	35

5.5	Medicina regenerativa periodontal .....	37
5.6	Modelo animal para la regeneración periodontal .....	39
VI.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	42
VII.	JUSTIFICACIÓN .....	42
VIII.	HIPÓTESIS .....	43
IX.	OBJETIVO GENERAL.....	44
X.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
XI.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
11.1	Población de estudio y consideraciones éticas .....	44
11.2	Criterios de selección .....	45
11.3	Variables .....	46
11.4	Selección de grupos.....	47
11.5	Síntesis del péptido CAPp-15.....	47
11.6	Preparación del andamio .....	48
11.7	Diseño del estudio .....	48
11.8	Defecto periodontal en rata Wistar.....	49
11.9	Eutanasia .....	53
11.10	Procesamiento de los tejidos: Fijación, Desmineralización, Deshidratación, Aclaramiento, Parafinización, Inclusión, Corte y Tinción.....	54
11.11	Inmunofluorescencia .....	56
XII.	RESULTADOS .....	57
12.1	Defectos periodontales en rata Wistar. ....	57
12.2	Eutanasia y procesamiento de los tejidos .....	61
12.3	Análisis histomorfológico .....	64
12.4	Inmunofluorescencia .....	70

XIII. DISCUSIÓN.....	72
XIV. CONCLUSIONES.....	76
XV. PERSPECTIVAS .....	77
XVI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78
XVII. ANEXOS.....	89



## I. ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
<b>HACD1/CAP</b>	3-hidroxiacil-CoA deshidratasa 1 / Proteína de adhesión del cemento (por sus siglas en inglés “3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 1; Isoform 2: Cementum attachment protein”).
<b>PTPLA</b>	Proteína tirosina similar a fosfatasa, miembro A variante 4 (por sus siglas en inglés “Protein tyrosine phosphatase-like, member A variant 4”).
<b>BMPs</b>	Proteínas morfogénicas óseas (por sus siglas en inglés “Bone morphogenic proteins”).
<b>FGF</b>	Factores de crecimiento fibroblástico (por sus siglas en inglés “Fibroblast growth factors”).
<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento similar a la insulina (por sus siglas en inglés “Insulin like growth factor 1”).
<b>TGFβ</b>	Factor de crecimiento transformante beta (por sus siglas en inglés “Tumor growth factor β”).
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (por sus siglas en inglés “Platelet derived growth factor”).
<b>CFG</b>	Factor de crecimiento derivado del cemento (por sus siglas en inglés “Cementum derived growth factor”).
<b>SHH</b>	(Por sus siglas en inglés “Proteins sonic hedgehog”). Es el ligando mejor estudiado de la vía de señalización hedgehog. Juega un papel esencial en la regulación de la organogénesis de los vertebrados.
<b>MSX-2</b>	(Por sus siglas en inglés “Protein homeobox 2”). Es un factor de transcripción que contienen un dominio de unión al ADN.
<b>WNT</b>	Familia diversa de glicoproteínas de señalización, Wnt es un acrónimo creado a partir de los nombres Wingless e Int-1.
<b>Runx-2</b>	Factor de transcripción 2 asociado con Runt (por sus siglas en inglés “Runt related transcription factor 2”). Es un factor de transcripción clave asociado con la diferenciación de osteoblastos.
<b>BSP</b>	Sialoproteína ósea (por sus siglas en inglés “Bone sialoprotein”).
<b>DMP-1</b>	Proteína de matriz de dentina (por sus siglas en inglés “Dentin matrix acidic phosphoprotein 1”).
<b>FN</b>	Fibronectina (por sus siglas en inglés “Fibronetin”).
<b>OCN</b>	Osteocalcina (por sus siglas en inglés “Osteocalcin”).
<b>SPARC</b>	Osteonectina (por sus siglas en inglés “Secreted protein acidic and rich in cysteine”).
<b>OPN</b>	Osteopontina (por sus siglas en inglés “Osteopontin”).
<b>ALP</b>	Fosfatasa alcalina (por sus siglas en inglés “Alkaline phosphatase protein”).
<b>AAC</b>	Cemento acelular afibrilar (por sus siglas en inglés “Acellular afibrilar cement”).
<b>AEFC</b>	Cemento acelular de fibras extrínsecas (por sus siglas en inglés “Acellular extrinsic fiber cement”).
<b>CIFC</b>	Cemento celular de fibras intrínsecas (por sus siglas en inglés “Intrinsic fiber cellular cement”).
<b>CMSC</b>	Cemento celular mixto estratificado (por sus siglas en inglés “Stratified mixed cellular cement”).
<b>IL-10</b>	Interleucina 10 (por siglas en inglés “Interleukin 10”), esta citocina tiene efectos pleiotrópicos en la inmunorregulación y la inflamación.
<b>IL-12</b>	Interleucina 12 (por siglas en inglés “Interleukin 12”), esta citocina participa en la formación de células T vírgenes y Th1.
<b>IL-3</b>	Interleucina 3 (por sus siglas en inglés “Interleukin 3”), es un factor estimulante de colonias hematopoyéticas pluripotentes derivado de células T

	necesarias para la supervivencia y proliferación de células progenitoras hematopoyéticas primitivas.
<b>IFN-γ</b>	Interferón gamma, es una citocina producida por linfocitos T CD4+ y linfocitos natural killer (NK) cuya función más importante es la activación de los macrófagos.
<b>αvβ3</b>	Es una integrina, también conocida como un receptor de vitronectina.
<b>α5β1</b>	Es una integrina, también conocida como receptor de fibronectina.
<b>NF-κβ</b>	Factor nuclear kappa beta (por sus siglas en inglés “nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”), es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN, la producción de citocinas y la supervivencia celular.
<b>MAPK</b>	Proteína cinasa activada por mitógenos (por sus siglas en inglés “Mitogen-activated protein kinase”).
<b>ERK</b>	Cinasa regulada por señales extracelulares (por sus siglas en inglés “Extracellular signal-regulated kinase”).
<b>c-fos</b>	Factor de transcripción que regula la expresión de genes.
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno.
<b>pI</b>	Punto Isoeléctrico.
<b>kDa</b>	Unidades kilodaltons.
<b>Mg<sup>+2</sup></b>	Magnesio.
<b>Zn<sup>+2</sup></b>	Zinc.
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	Calcio.
<b>PO<sub>4</sub><sup>-3</sup></b>	Fosfato.
<b>Be<sup>+2</sup></b>	Berilio.
<b>Fe<sup>+2</sup></b>	Hierro.
<b>Cu<sup>+2</sup></b>	Cobre.
<b>Ti</b>	Titanio.
<b>TiO<sub>2</sub></b>	Óxido de titanio.
<b>Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub></b>	Fosfato de calcio.
<b>Ca<sub>10</sub>[PO<sub>4</sub>]<sub>6</sub>[OH]<sub>2</sub></b>	Hidroxiapatita.
<b>SDS-PAGE</b>	Dodecil sulfato de sodio - gel de electroforesis de poliacrilamida (por siglas en inglés “Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis”).
<b>CD90</b>	Grupo de diferenciación 90 (por sus siglas en inglés “Cluster of differentiation 90”).
<b>CD73</b>	Grupo de diferenciación 73 (por sus siglas en inglés “Cluster of differentiation 73”).
<b>CD105</b>	Grupo de diferenciación 105 (por sus siglas en inglés “Cluster of differentiation 105”).
<b>CD44</b>	Grupo de diferenciación 44 (por sus siglas en inglés “Cluster of differentiation 44”).
<b>CD34</b>	Grupo de diferenciación 34 (por sus siglas en inglés “Cluster of differentiation 34”).
<b>CD45</b>	Grupo de diferenciación 45 (por sus siglas en inglés “Cluster of differentiation 45”).
<b>HLA-DR</b>	Antígeno leucocitario humano - isotipo DR (por sus siglas en inglés “Human Leukocyte Antigen – DR isotype”), es un receptor de superficie celular MHC de clase II.
<b>RGD</b>	Péptido o motivo de tres aminoácidos arginina-glicina-aspartato (por sus siglas en inglés “Arginine, glycine, and aspartate”).
<b>CEMP-1-p1</b>	Péptido 1 derivado de la proteína del cemento 1 (por sus siglas en inglés “Cementum protein1-peptide1”).
<b>P-15</b>	Es un péptido análogo altamente conservado del dominio de unión celular del colágeno tipo I.

<b>SPPS</b>	síntesis peptídica en fase sólida (por sus siglas en inglés “solid phase peptide synthesis”).
<b>Fmoc</b>	Fluorenil-9-metoxicarbonil.
<b>TFA</b>	Ácido tricloroacético.
<b>PBS</b>	Solución salina tamponada con fosfato.
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovina.

## II. CÓDIGO DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra
<b>Lisina</b>	Lys	K
<b>Histidina</b>	His	H
<b>Arginina</b>	Arg	R
<b>Ácido aspártico</b>	Asp	D
<b>Ácido glutámico</b>	Glu	E
<b>Serina</b>	Ser	S
<b>Treonina</b>	Thr	T
<b>Cisteína</b>	Cys	C
<b>Asparagina</b>	Asn	N
<b>Glutamina</b>	Gln	Q
<b>Prolina</b>	Pro	P
<b>Glicina</b>	Gly	G
<b>Alanina</b>	Ala	A
<b>Valina</b>	Val	V
<b>Leucina</b>	Leu	L
<b>Isoleucina</b>	Ile	I
<b>Metionina</b>	Met	M
<b>Fenilalanina</b>	Phe	F
<b>Tirosina</b>	Tyr	Y
<b>Triptófano</b>	Trp	W

### III. RESUMEN

El periodonto está compuesto por cuatro tejidos que protegen, rodean y soportan a los dientes (la encía, el ligamento periodontal, el hueso alveolar y el cemento radicular). Estos tejidos están en constante predisposición para sufrir algún proceso infeccioso o traumático que alteran su homeostasis y causan la degeneración o destrucción de cada uno. A estos procesos patológicos se les conoce como enfermedad periodontal, la cual si no se trata a tiempo pueden conducir a la pérdida dental generando una disfunción oral progresiva en cada individuo afectando así su calidad de vida. Recientemente, han aumentado los métodos de ingeniería de tejidos para controlar las enfermedades periodontales más allá de los enfoques tradicionales de las terapias periodontales. Sin embargo, la reconstrucción predecible de la organización y función innata del periodonto sigue siendo un desafío, ya que la clave se ha centrado en mimetizar los procesos de biomineralización en el cemento radicular y lograr la reinserción de las fibras de Sharpey del ligamento periodontal en las superficies radiculares y alveolares. Los avances de la medicina regenerativa apoyan el uso de péptidos bioactivos para lograr una regeneración periodontal completa. Recientemente se ha reportado que el péptido sintético CAPp-15 derivado de la porción C-Terminal de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) es una molécula bioactiva capaz de inducir la formación de cristales de hidroxiapatita *in vitro* y favorecer *in vivo* procesos de biomineralización, ya que promovió la formación de tejido óseo de *novo* en defectos de tamaño crítico en tibias de conejo Nueva Zelanda.

*Objetivos:* Determinar el papel regenerativo del péptido sintético CAPp-15, sobre los tejidos periodontales (cemento radicular, ligamento y hueso alveolar) en un defecto de tamaño crítico (3x2x1mm) en la raíz vestibular del primer molar mandibular en rata Wistar.

*Materiales y métodos:* Se emplearon ratas macho cepa Wistar para crear quirúrgicamente defectos periodontales de tamaño crítico (3x2x1mm) en la raíz vestibular del primer molar mandibular. Se dividieron en cuatro grupos de trabajo, el primero correspondía a los animales piloto utilizados para estandarizar la técnica quirúrgica, los tres grupos restantes se trataron con las siguientes condiciones:

- Grupo 1, experimental: Se trataron con satín más el andamio de Gelfoam® embebido con 25µg/mL del péptido de CAPp-15.
- Grupo 2, control positivo: Se trataron con satín y un andamio de Gelfoam®.
- Grupo 3, control negativo: Se trataron solo con satín.

La eutanasia se realizó a los 30 días posteriores al procedimiento quirúrgico y los tejidos obtenidos se procesaron para su análisis histomorfológico utilizando la tinción Tricrómica de Masson, para confirmar la formación de tejidos periodontales. Y se empleó la técnica de inmunofluorescencia para identificar la expresión de proteínas relacionadas con el proceso de biomineralización.

*Resultados:* El análisis histomorfológico del grupo tratado con el péptido sintético CAPp-15, demostró la regeneración de cemento y hueso alveolar al inducir la formación de una matriz cementoide y osteoide, el espacio del ligamento periodontal se mantuvo y la organización de sus fibras empezaban a adquirir una dirección oblicua, también se observó la inserción de las fibras de Sharpey en la matriz cementoide. A su vez los tejidos se encontraron altamente vascularizados e inervados, esta característica promueve la formación y maduración del tejido mineralizado. En los resultados de la inmunofluorescencia los defectos presentaban una expresión positiva para marcadores relacionados con la biomineralización del cemento y hueso alveolar.

*Conclusiones:* Con base a los resultados obtenidos, podemos asegurar que el péptido sintético (CAPp-15) derivado de la porción C-Terminal de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) es una molécula bioactiva capaz de inducir la regeneración de los tejidos periodontales *in vivo*, al favorecer procesos de biomineralización y la síntesis de fibras colágenas. Por lo tanto, es un buen candidato terapéutico para ser usado en la medicina regenerativa para la regeneración del periodonto.

#### IV. ABSTRACT

The periodontium is composed by four different tissues which protect, surround and support the teeth (the gingiva, the periodontal ligament, the alveolar bone and the root cement). These tissues are permanently exposed to suffer some infectious or traumatic process that modify their homeostasis and produce the degeneration or destruction of each one. These pathological processes are known as periodontal disease, which if not treated in advance can lead to tooth loss, generating a progressive oral dysfunction in each individual, thus affecting their life quality. Recently a number of tissue engineering methods have been developed to deal with periodontal diseases beyond traditional approaches to periodontal therapies.

However, the predictable reconstruction of the innate organization and function of the periodontium remains a challenge, as the key has focused on mimicking the biomineralization processes in the root cement and achieving the reinsertion of the Sharpey fibers of the periodontal ligament in the root and alveolar surfaces. Advances in regenerative medicine support the use of bioactive peptides to achieve complete periodontal regeneration. Recently, it has been reported that the synthetic peptide CAPp-15 derived from the C-Terminal portion of the adhesion protein of root cement (HACD1 / CAP) is a bioactive molecule capable of inducing the formation of in vitro hydroxyapatite crystals and favoring in vivo biomineralization processes, since it promoted de novo bone tissue formation in critical size defects in New Zealand rabbit tibias.

Objective: To determine the regenerative role of the synthetic peptide CAPp-15, on the periodontal tissues (root cement, periodontal ligament and alveolar bone) in a defect of critical size (3x2x1mm) in the vestibular root of the mandibular first molar in Wistar rats.

Materials and methods: Male Wistar strain rats were used to surgically create critical size periodontal defects (3x2x1mm) in the vestibular root of the mandibular first molar. They were divided into four working groups, the first corresponded to the pilot

animals used to standardize the surgical technique, the remaining three groups were treated with the following conditions:

- Group 1, experimental: They were treated with satin plus the Gelfoam® scaffold embedded with 25µg / mL the CAPp-15 peptide.
- Group 2, positive control: They were treated with satin and a Gelfoam® scaffold.
- Group 3, negative control: They were treated only with satin.

Euthanasia was performed 30 days after the surgical procedure and the tissues obtained were processed for histomorphological analysis using Masson's Trichrome stain, to confirm the formation of periodontal tissues. The immunofluorescence technique was used to identify the expression of proteins related to the biomineralization process.

Results: The histomorphological analysis of the group treated with the synthetic peptide CAPp-15, demonstrated the regeneration of cementum and alveolar bone by inducing the formation of a cementum and osteoid matrix, the periodontal ligament space was maintained and the organization of its fibers began to acquire an oblique direction, the insertion of Sharpey fibers into the cementum matrix was also observed. In turn, the tissues were found to be highly vascularized and innervated, this characteristic promotes the formation and maturation of mineralized tissue. In the immunofluorescence results, the defects demonstrated a positive expression for markers related to the biomineralization of the cementum and alveolar bone.

Conclusions: Based on the results obtained, we can ensure that the synthetic peptide (CAPp-15) derived from the C-Terminal portion of the root cement adhesion protein (HACD1 / CAP) is a bioactive molecule capable of inducing the regeneration of periodontal tissues in vivo, by favoring biomineralization processes and the synthesis of collagen fibers. Therefore, it is a good therapeutic candidate to be used in regenerative medicine for periodontal regeneration.

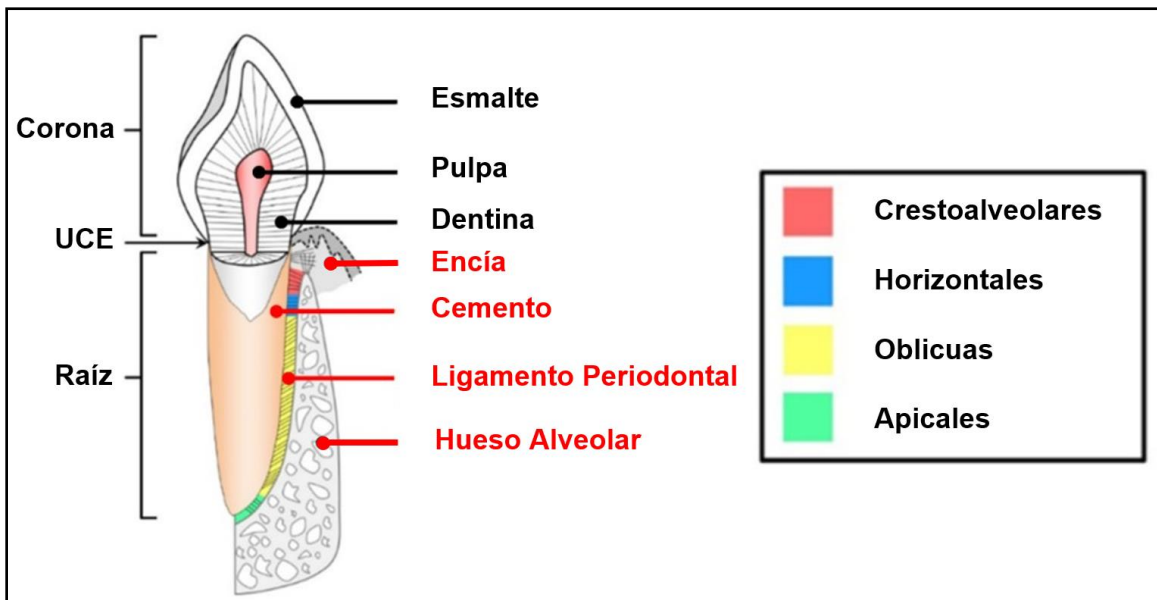


## V. INTRODUCCIÓN

### 5.1 Periodonto

El periodonto también llamado “aparato de inserción”, constituye una unidad biológica y funcional que en conjunto con los dientes ejerce la función de la masticación, fonación y habla. Es un tejido que se encuentra en constante remodelación ya que experimenta cambios con la edad y está sometido a modificaciones morfológicas relacionadas con alteraciones funcionales o cambios en el microambiente oral. Su principal función es anclar el diente al tejido óseo de los maxilares y mantener la integridad en la superficie de la mucosa masticatoria de la cavidad oral [1,2].

El periodonto está compuesto por cuatro tejidos que protegen, rodean y soportan a los dientes, estos comprenden, dos tejidos conectivos fibrosos la encía y el ligamento periodontal, así como dos tejidos conectivos mineralizados el cemento radicular y el hueso alveolar (Figura 1) [1-4].



**Fig. 1:** Esquema del periodonto. Las estructuras dentales están marcadas en negras y los tejidos del periodonto en letras rojas, en el recuadro se muestran los cuatro grupos de fibras del ligamento periodontal; UCE (Unión cemento esmalte) [3].

### 5.1.1 Embriogénesis del Periodonto

Las dos capas germinativas que participan en la formación de los dientes son: el epitelio ectodérmico, que origina el esmalte, y el ectomesénquima que forma los tejidos restantes (complejo dentinopulpar, cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar). Todas las etapas de la odontogénesis y cementogénesis se basan en la interacción epitelio-mesénquima, mediadas principalmente por la interacción las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), los factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs), el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), las proteínas Hedgehog (SHH), la proteína homeobox (MSX-2), el factor de transcripción RUNX-2 y las proteínas Wnt [5].

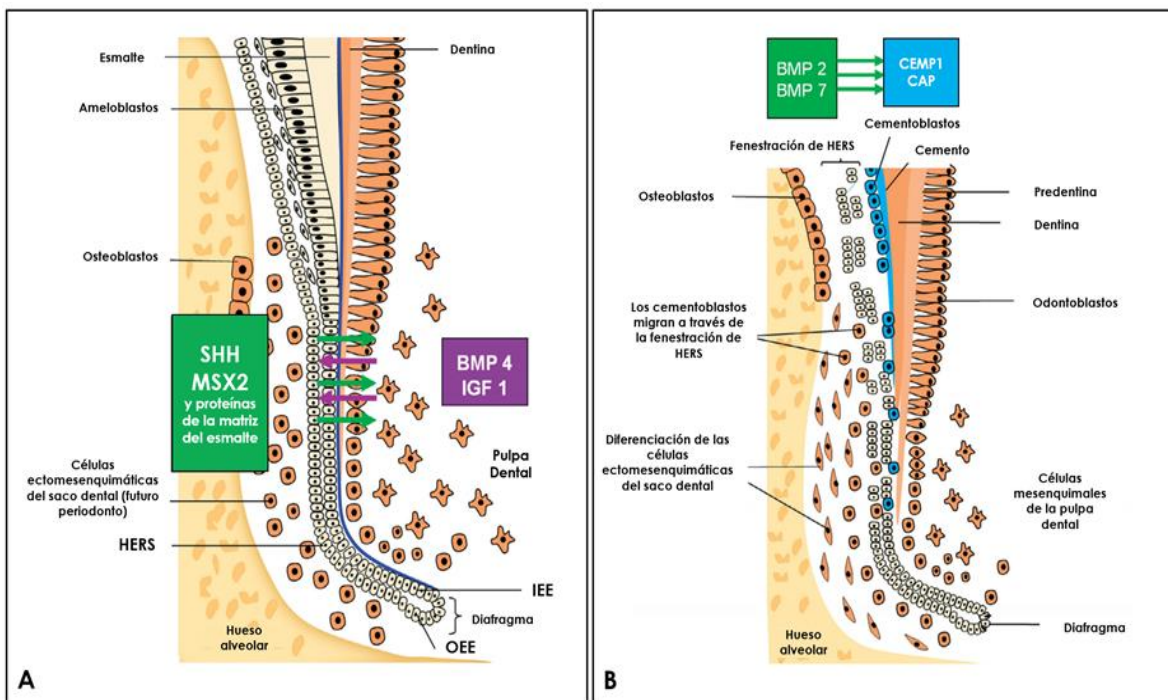
Estudios sugieren que las células progenitoras de cementoblastos provienen del saco dental, las cuales se originan del ectomesénquima. Sin embargo, actualmente se ha considerado que los cementoblastos pueden tener también un origen epitelial, derivado de la vaina epitelial de Hertwig la cual a través de proteínas quimiotácticas guían un mecanismo de diferenciación epitelio-mesénquima permitiendo así su diferenciación en cementoblastos funcionales [5-13]. Sin embargo, en la teoría clásica de la formación radicular, se ha reportado que esta comienza una vez formado el patrón coronario e iniciado el proceso de histomorfogénesis dental. Durante la etapa de campana tardía o etapa de maduración, cuando el epitelio interno y externo del órgano del esmalte se fusionan y forman la vaina epitelial de Hertwig a nivel del asa cervical, la vaina prolifera en profundidad en relación con el saco dentario por su parte externa y con la papila dentaria internamente. Al proliferar la vaina induce a las células de la papila dental para que se diferencien en odontoblastos radiculares, una vez depositada la primera capa de dentina radicular la vaina epitelial de Hertwig pierde su continuidad, es decir, que se fragmenta y forma los restos epiteliales de Malassez. Esta fragmentación permite la migración de las células ectomesenquimáticas de la capa interna del saco dentario, una vez que entran en contacto con la dentina de la raíz se diferencian en cementoblastos para producir cemento radicular (Figura 2) [14-16].

Cuando la corona se ha formado el órgano del esmalte se atrofia y constituye el epitelio dental reducido, que sigue unido a la superficie del esmalte como una membrana delgada. Cuando el diente hace erupción algunas células del epitelio reducido de las paredes laterales de la corona se unen a la mucosa bucal y forman el epitelio de unión. Dicho epitelio une la encía con la superficie del diente y establece un espacio virtual que se denomina surco gingival [5,14].

Es importante recordar que la cementogénesis tiene una actividad cíclica revelada por las líneas incrementales, estas líneas representan momentos de inactividad por parte de los cementocitos, mientras que las zonas más anchas dispuestas entre ellas son las laminillas, que corresponden a nuevas capas de cemento. En las laminillas, las fibras colágenas están dispuestas en forma más ordenada y altamente mineralizadas, mientras que en las zonas de reposo las fibras están dispuestas en forma irregular e hipomineralizadas. Al mismo tiempo que se produce la aposición del cemento van quedando incluidas en él las fibras colágenas del ligamento periodontal en formación, las cuales constituyen las fibras extrínsecas del cemento. Una vez que el diente entra en oclusión, en el tercio apical de la raíz continúa formándose cemento celular rápidamente, el cual se caracteriza por tener en su estructura cementocitos y fibras de colágena producidas por cementoblastos [7,14-17].

La osteogénesis en general ocurre de dos formas principales, la osificación endocondral para el hueso mandibular y la osificación intramembranosa para los huesos maxilares. Las apófisis alveolares se empiezan a formar a la par que el órgano del esmalte, iniciando como pequeños depósitos minerales producidos por osteoblastos los cuales se derivan de la condensación del mesénquima en la región facial. Estas pequeñas áreas mineralizadas aumentan de tamaño y se fusionan entre sí, posteriormente son reabsorbidas por osteoclastos y remodeladas hasta que se forma una masa ósea continua en torno a los dientes totalmente erupcionados [7,18,19].

Las fibras del ligamento periodontal se desarrollan en conjunto con la erupción del diente. En primer término, se detectan fibrillas pequeñas y delgadas con aspecto de cerdas de cepillo que emergen del cemento radicular y se proyectan en el espacio del ligamento periodontal. En esta fase, los fibroblastos del ligamento periodontal producen fibras colágenas que se irradian hacia el hueso alveolar y al cemento radicular para anastomosarse con las fibrillas del cemento. Y es así como las fibras de colágena se organizan en haces que discurren sin solución de continuidad desde el hueso hasta el cemento radicular [1,7].



**Fig. 2:** Esquema de la cementogénesis. A) Muestra las moléculas de señalización que participan en la proliferación y diferenciación celular del órgano del esmalte, lo que permite la unión del epitelio oral interno (IEE) con el epitelio oral externo (OEE) para formar la vaina epitelial de Hertwig (HERS). B) Las proteínas BMPs inducen la expresión de la proteína del cemento 1 (CEMP1) y de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/(CAP) para promover la diferenciación y proliferación celular de las células ectomesenquimáticas del saco dental y dar origen a los cementoblastos los cuales migraran a la zona de la dentina mineralizada y empiezan la producción del cemento radicular. Se observa de igual manera la fenestración de HERS que permite el paso a estas células [7].

### 5.1.2 Encía

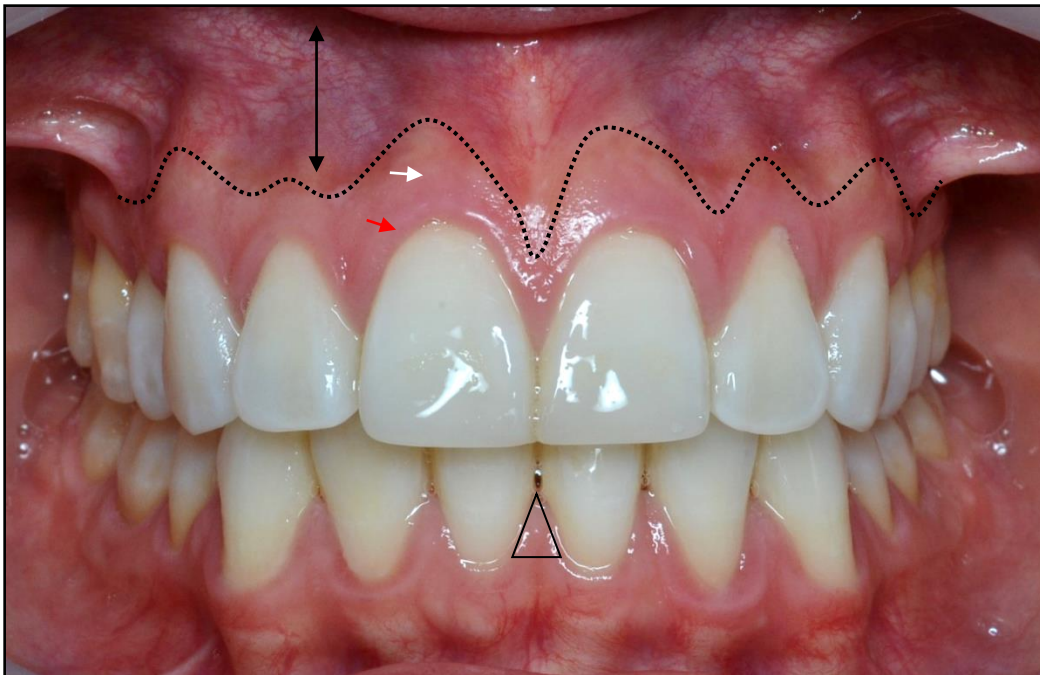
La encía es la parte de la mucosa masticatoria que recubre la apófisis alveolar, rodea la porción cervical de los dientes y cubre el hueso de los maxilares, en la zona vestibular se limita de la mucosa alveolar a través de la línea mucogingival y en la zona palatina se continúa con la mucosa masticatoria palatina, histológicamente se divide en epitelio, lámina basal y tejido conectivo [1,2].

El epitelio de la encía se clasifica según su localización, en epitelio oral en su parte externa, se continúa con el epitelio del surco en su parte interna y a éste le sigue el epitelio de unión el cual se adhiere al diente en la unión cemento esmalte, las células que conforman el epitelio presentan una alta capacidad proliferativa ya que están en constante descamación y a su vez aquellas que se localizan en la unión cemento esmalte forman 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, una importante característica es la producción de líquido crevicular el cual desemboca en el surco gingival y presenta propiedades antimicrobianas [1,2,20,21].

La colágena tipo I es el principal componente del tejido conectivo de la encía, existen también estructuras vasculares, nerviosas y una matriz extracelular formada por glicoproteínas y proteoglicanos, así como distintos tipos celulares [1-3,20,22].

Clínicamente en condiciones de salud periodontal el color de la encía suele describirse como “rosa coral”, el cual es producto del suministro vascular, el grosor, el grado de queratinización del epitelio y la presencia de melanocitos, suele tener proyecciones epiteliales interpapilares, lo que le da un aspecto de puntilleo como de “cáscara de naranja”, en cuanto a su forma depende considerablemente, del tamaño y forma de los dientes, así como su alineación en el arco y el tamaño del área interproximal [1,20,23].

Anatómicamente se clasifica en encía marginal, insertada e interdental (Figura 3) y cumple con dos funciones principales la primera es proteger a los dientes ya sea de fuerzas de masticación excesivas o de un cepillado traumático, la segunda función es de defensa ya que genera un sellado hermético con el diente en la unión cemento esmalte evitando así la entrada de bacterias periodontopatógenas lo que permite mantener una homeostasis celular [1-2,20,24].



**Fig. 3:** Localización de estructuras anatómicas de la encía. El triángulo indica la zona correspondiente a la encía insertada, la flecha roja señala la encía marginal, la flecha blanca señala la encía insertada, la línea punteada corresponde a la línea mucogingival mientras que la flecha negra abarca la mucosa alveolar [Fuente propia].

### 5.1.3 Ligamento Periodontal

El ligamento periodontal es un tejido conectivo fibroso altamente vascularizado derivado del saco dental el cual se origina de las células de la cresta neural [25,26,27].

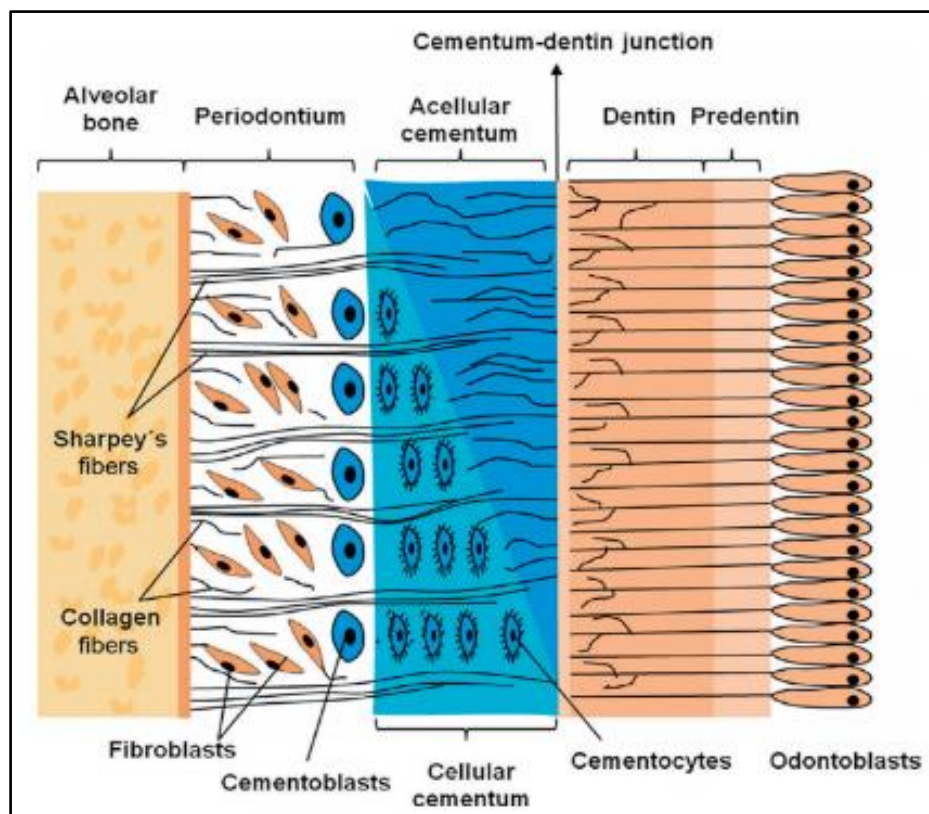
El ligamento periodontal rodea las raíces de los dientes y sus fibras se insertan por un lado en el cemento radicular y por el otro en la lámina dura del hueso alveolar, sus funciones principales son: mantener el diente en el alveolo, soportar y distribuir las fuerzas de la masticación sobre la apófisis alveolar y finalmente tiene la capacidad de ser un receptor sensorial para una correcta oclusión [1,28].

El ligamento periodontal se ubica en el espacio situado entre las raíces dentales y el hueso alveolar, este espacio tiene la forma de un reloj de arena siendo más angosto a nivel apical, su espesor es de 0.25 mm aproximadamente, en sentido coronal se comunica con el tejido conectivo de la encía [26].

Sus fibras pueden ser de origen colágena (75% tipo I, 20% tipo III y 5% tipo IV, V, VI y XII) o no colágenas (reticulina, oxitalán y elásticas) que pueden ser clasificadas en diferentes grupos según su localización como las fibras crestalveolares, horizontales, oblicuas y apicales, estas fibras presentan una remodelación constante es decir una resorción de fibras viejas y una formación de fibras nuevas gracias a la actividad del fibroblasto [5,28]. Las fibras que forman el anclaje con el cemento radicular y el hueso alveolar son llamadas fibras de Sharpey (Figura 4) su diámetro medio de estas fibras en el lado del hueso es significativamente mayor que en el lado del cemento, mientras que la densidad en el lado del hueso fue significativamente menor que en el lado del cemento; actualmente se sabe que las fibras de Sharpey están compuestas por colágena tipo III y VI, elastina, tenascina y fibronectina [5,6,28,29].

Las células presentes en el ligamento periodontal son fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos, osteoclastos, células epiteliales así como restos epiteliales de Malassez y fibras nerviosas, los fibroblastos se alinean paralelos a las fibras principales mientras que los cementoblastos recubren la superficie del cemento y

los osteoblastos la superficie del hueso, en los últimos años se han identificado una pequeña población de células troncales del ligamento periodontal que son capaces de migrar y diferenciarse en cementoblastos y osteoblastos en respuesta a lesiones para mantener y reparar los tejidos y la función del ligamento periodontal. Estas células se denominan PDLs por sus siglas en inglés, las cuales expresan marcadores de células troncales mesenquimales como CD105, CD90, CD44 y CD73 [1,2,25,26].



**Fig. 4:** Esquema del aparato de inserción del diente, través de las fibras de Sharpey que se anclan al hueso alveolar y al cemento radicular [7].



#### 5.1.4 Hueso Alveolar

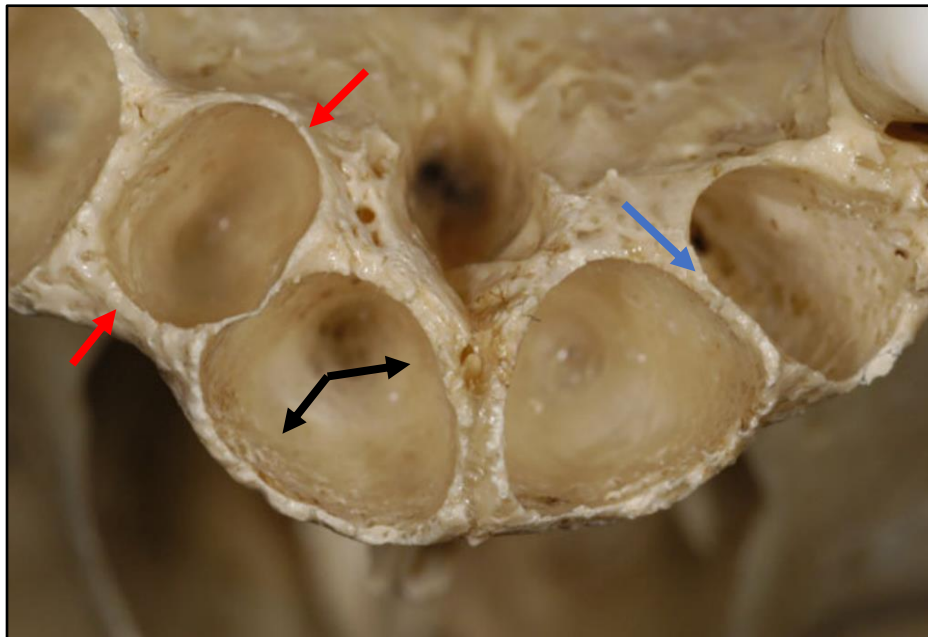
El hueso alveolar es un tejido conectivo mineralizado, forma parte de la mandibular y de los huesos maxilares este rodea y contiene los alvéolos dentarios, junto con el cemento radicular y el ligamento periodontal constituyen el aparato de inserción del diente cuya función principal consiste en distribuir y absorber las fuerzas generadas durante la masticación, cuando el diente se pierde por alguna patología o traumatismo el hueso alveolar se reabsorbe generando cambios volumétricos en su estructura y con el tiempo desaparece [1,30-32]. Aunque es fundamentalmente comparable a otros tejidos óseos del cuerpo, el hueso alveolar se somete a una remodelación rápida y continúa asociada con la erupción del diente y las demandas funcionales de la masticación este proceso le da la característica de presentar diferentes morfologías. La capacidad del hueso alveolar para someterse a una remodelación rápida también es importante para la adaptación posicional de los dientes, pero puede ser perjudicial para la progresión de la enfermedad periodontal [18,33,34].

Está constituido por células osteoprogenitoras, osteoblastos, células bordeantes óseas, osteocitos y osteoclastos. La matriz inorgánica contiene un 60% de sustancias minerales principalmente cristales de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10} [\text{PO}_4]_6 [\text{OH}]_2$ ), 20% de agua y 20% de componente orgánico que le proporcionan elasticidad. Su dureza es menor a la de la dentina y comparable a la del cemento. Alrededor del 80% al 90% de la matriz orgánica está constituida por colágena tipo I, seguido de colágena tipo III, V y XII. Presenta proteínas no colágenas (glicoproteínas) como osteocalcina, osteopontina, osteonectina, sialoproteína ósea y proteína morfogenética ósea, las cuales desempeñan un papel fundamental en el proceso de biomineralización y en la unión de la fase mineral a la matriz ósea, también se han identificado enzimas importantes como la fosfatasa alcalina, así como proteoglicanos y glucosaminoglicanos [18].

El tejido óseo puede ser dividido en dos compartimentos el primero es el hueso mineralizado que contiene estructuras llamadas osteonas, cada una de las cuales

contiene un vaso sanguíneo situado en un conducto de Havers, y el segundo compartimento es la médula ósea que contiene a adipocitos, estructuras vasculares y células mesenquimatosas indiferenciadas [1].

En cuanto a su localización el hueso alveolar adquiere diferentes nombres (Figura 5), el hueso que recubre las caras palatinas, linguales y vestibulares recibe el nombre de hueso compacto o cortical, este es anatómicamente más delgado de la parte vestibular de los dientes incisivos que en los molares lo que los hace más susceptibles a presentar defectos óseos como dehiscencias o fenestraciones, el área entre los alvéolos y las paredes del hueso compacto está ocupado por hueso esponjoso este ocupa la mayor parte de los tabiques interdientales o interradiculares, finalmente el hueso que reviste la pared de los alveolos se denomina hueso alveolar propiamente dicho estructuralmente este hueso presenta perforaciones que contienen los conductos de Volkmann por donde pasan vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas que van desde el hueso alveolar hasta el ligamento periodontal a su vez esta es la capa del hueso en la cual se insertan las fibras de Sharpey las cuales están mineralizadas en su periferia pero a menudo tienen un núcleo central no mineralizado [1,33].



**Fig. 5:** Vista oclusal de un maxilar de cráneo seco. Se aprecian diferentes estructuras óseas, las flechas rojas señalan el hueso cortical, las flechas negras el hueso alveolar propiamente dicho y la flecha azul los tabiques interdientales [33].

### 5.1.5 Cemento radicular

Durante el siglo XVIII los anatomistas consideraban que los dientes humanos estaban compuestos únicamente de esmalte y dentina. Sin embargo, los estudios de Tenon, Blake y de Cuvier en los dientes de muchas especies animales resultó en el reconocimiento de que el cemento era una parte constitutiva de todos los dientes. Fue hasta el año 1824 cuando Ringelmann inició los estudios del cemento sobre dientes humanos, seguido por los fisiólogos Jan Evangelista Purkinje y sus alumnos, Fraenkel y Raschkow, en 1835, y más tarde el histólogo Anders Adolf Retzi, en 1836, notó la presencia de “estrías” en cemento [35].

Hoy en día se sabe que el cemento es un tejido conectivo mineralizado que cubre la superficie radicular, desempeña un papel insustituible en la protección de la dentina radicular de los estímulos externos, sirviendo como sitio de anclaje para las fibras de Sharpey, permite mantener el espacio del ligamento periodontal y resiste el estrés multidireccional durante la masticación y contribuye en el proceso de reparación cuando la superficie radicular ha sido dañada [1,2,35,36]. Posee muchas características en común con el tejido óseo. Sin embargo, el cemento no contiene vasos sanguíneos ni linfáticos, carece de inervación, no experimenta remodelación fisiológica y se caracteriza porque se deposita durante toda la vida [1].

El cemento radicular se divide en diferentes subtipos (Figura 6) basados principalmente en la presencia o ausencia de células (cementocitos) y de fibras colágenas dentro de su estructura formadas por cementoblastos o por fibroblastos, respectivamente, clasificándose de la siguiente manera [1,14,35-38]:

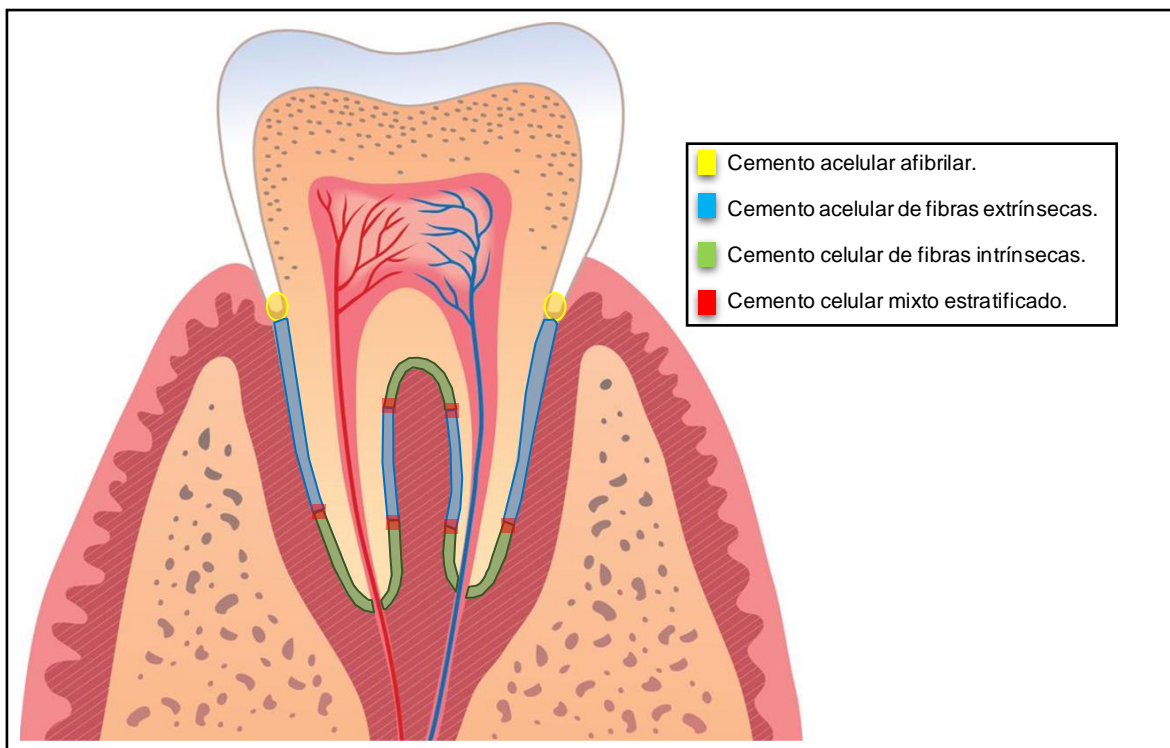
- *Cemento acelular afibrilar (AAC)*: Es una variedad de cemento que carece de fibras colágenas y cementocitos; se localiza generalmente a nivel cervical, especialmente, en los casos en el que el cemento se extiende cubriendo una pequeña zona del esmalte, su principal componente son glucosaminoglicanos y comienza a formarse al término de la maduración del esmalte.

- *Cemento acelular de fibras extrínsecas (AEFC)*: También llamado cemento primario; este cemento comienza a formarse antes de que el diente erupcione al mismo tiempo que se está formando la dentina se deposita lentamente de manera que los cementoblastos que lo forman retroceden mientras lo van secretando; se localiza desde la región cervical hasta dos tercios de la raíz, es aquí donde se insertan las fibras de Sharpey provenientes del ligamento periodontal.
- *Cemento celular de fibras intrínsecas (CIFC)*: También llamado cemento secundario, este tipo de cemento tiene un espesor mayor en comparación con los demás tipos de cemento, dentro de su composición se encuentra una alta cantidad de proteoglicanos. Comienza a depositarse rápidamente cuando el diente entra en oclusión, por lo cual algunos cementoblastos quedan incluidos en la matriz transformándose en cementocitos, adyacentes a estos y paralela a la raíz se observan las líneas incrementales hipomineralizadas, que representan una característica distintiva de este tejido; se localiza, por lo general, en el tercio apical, en bifurcaciones y en sitios de fractura. Las fibras están orientadas paralelamente a la superficie radicular y rodean al diente; se sabe, que este cemento continúa depositándose durante toda la vida lo cual constituye un mecanismo de compensación al desgaste oclusal de los dientes.
- *Cemento celular mixto estratificado (CMSC)*: Se caracteriza por tener capas alternadas de CIFC y AEFC lo que permite observar también líneas incrementales; se localiza en el tercio apical de las raíces y en bifurcaciones.

El cemento está formado por elementos celulares (cementoblastos, cementocitos, cementoclastos y restos epiteliales de Malassez) así como de una matriz extracelular calcificada compuesta por un 46-50% de materia inorgánica principalmente fosfato de calcio presentado como cristales de hidroxapatita, 22% de materia orgánica principalmente colágena tipo I en un 90%, colágena tipo III en un 5% y en menor proporción colágena tipo V, VI, XII y XIV asociada a las fibras de Sharpey. La sustancia fundamental está integrada por proteoglicanos, glucosaminoglicanos y proteínas no colágenas como sialoproteína ósea (BSP),

proteína de matriz de dentina (DMP1), fibronectina (FN), osteocalcina (OCN), osteonectina (SPARC), osteopontina (OPN). A la fecha, se han reportado dos proteínas específicas del cemento radicular, la proteína de adhesión del 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), glucosaminoglicanos y un 32% de agua [35,36,39-42].

Hoy en día se sabe que cualquier anomalía en cuanto a la composición o estructura del cemento radicular puede resultar en un periodonto defectuoso altamente susceptible a la invasión bacteriana y destrucción microbiana [35,43-45].



**Fig. 6:** Esquema de los diferentes tipos de cemento radicular y su localización. El recuadro muestra un código de color para cada tipo de cemento [Fuente propia].

## 5.2 Proteínas implicadas en el proceso de biomineralización del cemento radicular.

La biomineralización se ha definido como “la formación biológica de minerales por organismos vivos”, este proceso depende de la interacción célula-matriz y se regula por la actividad entre las moléculas orgánicas y los minerales. Las células que se encargan de llevar a cabo este proceso en los vertebrados son los condrocitos, osteoblastos, odontoblastos, ameloblastos y cementoblastos [46,47].

El proceso de biomineralización se divide en dos fases. Durante la primera fase, en zonas específicas de la membrana celular donde los fosfolípidos son en su mayoría ácidos interactúan con proteínas de andamiaje (axinas tipo I, V y VI) para facilitar la formación de vesículas de matriz, así como la atracción de iones  $\text{Ca}^{+2}$  [47,48]. Al mismo tiempo la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) favorece la concentración de  $\text{PO}_4^{-3}$  en el interior de las vesículas. La acumulación de  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{Ca}^{+2}$  permite la formación de precipitados primarios de fosfato de calcio  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  que posteriormente darán origen a cristales de hidroxiapatita. La segunda fase de la biomineralización comienza con la liberación de cristales a través de la membrana de las vesículas de matriz, exponiendo los cristales de hidroxiapatita preformados al líquido extracelular, estos entrarán en contacto con las fibras de colágena tipo I, estas les proporcionan un andamio sobre el cual podrán interactuar con otras moléculas orgánicas. El grado de madurez de los cristales depende de las condiciones extracelulares, como las concentraciones de iones de fosfato de calcio, la presencia de proteínas no colágenas y de un pH neutro (~7.2-7.4). Se ha informado que la nucleación de los cristales minerales sucede inicialmente entre los espacios de las fibras de colágena, lugar donde se van agregando más moléculas hasta formar una nueva fase mineral, que con el paso del tiempo madurará [48-51].

### 5.2.1 Fosfatasa Alcalina (ALP)

Son una superfamilia de metaloenzimas homodiméricas que hidrolizan grupos fosfatos que están unidos a nucleótidos, proteínas y muchos otros sustratos a un pH entre 8-11 y en presencia de iones zinc ( $Zn^{+2}$ ) y magnesio ( $Mg^{+2}$ ). Se inhiben con berilio ( $Be^{+2}$ ), hierro ( $Fe^{+2}$ ) y cobre ( $Cu^{+2}$ ) y varios polianiones <sup>[52,53]</sup>. Se localiza en la porción externa de la membrana citoplasmática y en las vesículas de la matriz, que son organelos producidos por las células mineralizantes, las cuales contribuyen a la mineralización de la matriz extracelular formando fosfatos de calcio amorfos y cristales de hidroxiapatita. Varios estudios estructurales, cinéticos y genéticos revelan nuevos roles metabólicos y funcionales para esta proteína; por ejemplo, se ha demostrado que se encuentra altamente expresada en células del ligamento periodontal, osteoblastos, células endósteales y cementoblasto, por lo cual al relacionarse con el metabolismo del fosfato participa en las primeras etapas de la biomineralización tanto del hueso como del cemento radicular, usándose actualmente como un marcador temprano de la biomineralización <sup>[16,35,49,54]</sup>.

### 5.2.2 Sialoproteína Ósea (BSP)

Es una fosfoproteína altamente glicosilada y sulfatada que se encuentra casi exclusivamente en los tejidos conectivos mineralizados. Tiene un peso molecular teórico de 33.6 kDa, aunque al separarla por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), la proteína puede ser identificada con una banda cerca de los 80 kDa, esto por el alto contenido característico de ácido glutámico el cual le permite unirse a la hidroxiapatita. También presenta motivos arginina-glicina-aspartato (RGD), que le permite tener la capacidad de unirse a integrinas de la superficie celular respectivamente. La BSP tiene las propiedades biofísicas y químicas de un nucleador de cristales de hidroxiapatita, y su expresión temporoespacial coincide con la mineralización de *novo* en hueso y cemento radicular ya que actúa como un quimioatrayente de

precegmentoblastos, promueve su adhesión y su diferenciación. Además, permite la unión a la colágena por interacciones electrostáticas proporcionándole direccionalidad al tejido mineralizado en formación. Por sus amplias funciones se le considera uno de los factores principales en la biología de los tejidos mineralizados tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, siendo así un marcador importante de tejidos mineralizados [35,55,56].

### 5.2.3 Osteopontina (OPN)

También conocida como sialoproteína ósea 1 (BSP-1), activación temprana de linfocitos T (ETA-1) o fosfoproteína secretada 1 (SPP1); Es una glicofosfoproteína altamente fosforilada que tiene características ácidas y es rica en aminoácidos cargados negativamente como aspartato y glutamato, consta de aproximadamente 314 aminoácidos con un peso molecular que varía entre 44 y 75 kDa. Fue la primera proteína de matriz extracelular identificada en tejido óseo por Franzén y colaboradores, quienes mencionaron que el nombre "osteopontina" es una combinación de las palabras "osteo" que significa "hueso" y "pontin" que significa "puente", ya que refleja un potencial para servir como un puente entre las células y los cristales de hidroxapatita a través de sus dominios RGD. Se ha localizado en múltiples tejidos incluyendo hueso, dentina, cemento, ligamento periodontal, riñón, cerebro, células endoteliales, células del músculo liso y esquelético, células de glándulas mamarias, útero, los ganglios del oído interno, las glándulas salivales y sudoríparas, la bilis y los tractos pancreáticos [35,57]. La OPN actúa sobre los organismos desempeñando un papel clave en los niveles de secreción de diferentes interleucinas como la (IL-10), (IL-12) y (IL-3), el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), la integrina  $\alpha\beta 3$ , el factor nuclear kappa  $\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ), en los macrófagos y las células T durante el proceso de inflamación, suprime la calcificación ectópica y la sobremineralización desempeñando un papel activo en la cicatrización de heridas y la prevención de la formación de cálculos renales [57,58]. Se considera que la OPN actúa frente al proceso de biomineralización al regular la adhesión celular, la actividad de los



osteoclastos y la mineralización de la matriz extracelular. Sin embargo, estudios recientes sugieren que su papel en el proceso de biomineralización está asociado a la regulación del crecimiento de los cristales de hidroxiapatita mediante la actividad de los osteoclastos [57].

#### **5.2.4 Osteocalcina (OCN)**

También conocida como proteína Gla ósea, esto porque dentro de su secuencia tiene cinco residuos de ácido glutámico. Hoy en día es un marcador de la dentina, el cemento y el hueso ya que se ha expresado en odontoblastos, cementoblastos y osteoblastos. Es una proteína que en los humanos se compone de 46 aminoácidos [35]. El péptido maduro se genera mediante eventos postraduccionales de escisiones secuenciales seguidos de la  $\gamma$ -carboxilación de tres residuos de ácido glutámico en las posiciones 17, 21 y 24 y un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína en las posiciones 23 y 29. Los tres eventos de carboxilación de glutamato ocurren mediante la actividad de la  $\gamma$ -glutamylcarboxilasa. Esta enzima utiliza  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  y vitamina K como cofactores. Después la proteína osteocalcina carboxilada madura y se empaqueta en vesículas intracelulares para su secreción en la matriz ósea [59, 60]. La presencia de los dos grupos carboxilo provoca que la OCN  $\gamma$ -carboxilada tenga una gran afinidad por el  $\text{Ca}^{+2}$  por lo cual al liberarse al medio extracelular se une en gran proporción a la hidroxiapatita del hueso. Sin embargo, la OCN presenta una característica única, y es que puede ser bio-activada secundariamente por la acción de los osteoclastos al crear una zona de reabsorción ósea en la matriz extracelular que generan un pH ácido (4.5) necesario para la activación de la OCN, actuando así como un regulador de la biomineralización [35, 59]. Estudios en ratones han demostrado que la OCN no carboxilada llega al torrente sanguíneo para ejercer una función hormonal al aumentar la secreción y la sensibilidad de la insulina [60, 61].

### **5.2.5 Osteonectina (SPARC)**

También llamada proteína SPARC por sus siglas en inglés “Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine”, es una proteína de 33 kDa que sufre una glicosilación postraducciona, de modo que la proteína SPARC es de aproximadamente 43 kDa en la mayoría de los tejidos. Su función principal es unirse a la colágena a través del dominio extracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  en la porción C-terminal de la proteína y así promover la síntesis y el ensamblaje de fibras, por lo que se asocia frecuentemente a tejidos con altas tasas de recambio de colágena, como el hueso alveolar y el ligamento periodontal. También se le han atribuido varias actividades adicionales, por ejemplo, se demostró que modula las interacciones célula-matriz e influye en la eficacia de ciertos factores de crecimiento durante la cicatrización de las heridas, así mismo, durante la cementogénesis, es sintetizada por cementoblastos y cementocitos. Sin embargo, se ha demostrado que al unirse a los cristales de hidroxiapatita actúa como un regulador negativo ya que controla el crecimiento y maduración de la matriz extracelular [35,62].

### **5.2.6 Integrinas y factores de crecimiento derivados del cemento.**

Durante el desarrollo y la cicatrización de heridas, la interacción matriz-integrina promueve eventos de señalización para la adhesión celular, la migración y la expresión génica. Las integrinas son proteínas que funcionan como receptores de membrana en forma de heterodímeros de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . Presentan tres dominios, el primero es el dominio N-terminal o extracelular que es el sitio de unión al ligando, el segundo dominio es el transmembranal y el tercer dominio es el C-terminal o intracelular el cual se encuentra unido al citoesqueleto. Algunas de estas integrinas pueden ser específicas para una sola molécula, pero en cambio hay otras que pueden reconocer diferentes ligandos. Al unirse al ligando, las integrinas transducen señales al interior de la célula; pero también, pueden recibir señales intracelulares que regulan su afinidad de unión al ligando. Es probable que las interacciones

específicas entre las integrinas y la matriz regulen procesos que son cruciales para la diferenciación de las células del folículo dentario a cementoblastos, osteoblastos y células del ligamento periodontal durante la embriogénesis del periodonto [15,63,64]. Hoy en día se sabe que los tejidos mineralizados como el hueso, la dentina y el cemento radicular son excelentes reservorios de factores de crecimiento los cuales pueden ser liberados y sirven para reparar o regenerar tejidos. Especialmente en el cemento se han identificado factores de crecimiento como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor transformante beta ( $TGF\beta$ ), el factor de crecimiento tipo insulínico (IGF-I), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) y el factor de crecimiento derivado del cemento (CFG), entre otros, los cuales, tiene la capacidad de promover una variedad de actividades biológicas como la migración, adhesión y diferenciación celular, procesos que son esenciales para la regeneración periodontal. Estudios informaron que el CFG activa vías de señalización asociadas con la mitogénesis y además favorece la diferenciación de las células progenitoras a cementoblastos [15,35].

### **5.2.7 Proteínas cemento específicas**

La matriz extracelular de diferentes tejidos comparte muchas similitudes y, sin embargo, tienen diferentes propiedades funcionales que las hacen únicas. Estas propiedades podrían ser el resultado de diferencias cuantitativas y/o cualitativas entre sus componentes. Durante años se creyó que los diferentes tejidos mineralizados contenían moléculas específicas que no estaban presentes en ningún otro tejido, es decir, se consideran como marcadores específicos, por ejemplo, la amelogenina en el esmalte y la sialofosfoproteína en la dentina. Sin embargo, actualmente gracias a las técnicas de inmunolocalización, se encontró que también se expresaban en otros tejidos, aunque en concentraciones considerablemente más bajas, y por lo tanto aún podrían considerarse como marcadores específicos [35]. En cuanto a el cemento radicular al ser un tejido único, cuenta con sus propias

proteínas específicas que participan en el proceso de biomineralización y que han sido expresadas por cementoblastos y células precursoras formadoras de dicho tejido. Estas proteínas son; La proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) [65].

### 5.2.8 Proteína del cemento 1 (CEMP1)

La proteína de cemento 1 (CEMP1) se aisló por primera vez en el cemento radicular humano y en medios de cultivo condicionados derivados del cementoblastoma humano [66]. Se encuentra codificada en un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 16 segmento 13.3 (16p13.3), presenta un peso molecular teórico de 25.9 kDa, es una proteína alcalina ya que su punto isoeléctrico es de 9.73. Su expresión *in vitro* se limita a cementoblastos putativos, células derivadas del ligamento periodontal con una localización perivascular, cementoblastos y células de los espacios endósteales [35,67-69]. CEMP1 se compone de 247 aminoácidos principalmente prolina, glicina y alanina, los aminoácidos 30-110 muestran un 48% de similitud con la colágena humana tipo I, un 46% de similitud con la tipo XI y un 40% de similitud con la tipo X, estas características sugieren alguna relación entre la proteína CEMP1 y la condrogénesis, proceso que resulta en la formación de intermediarios de cartílago y conlleva al osificación endocondral durante el desarrollo esquelético [35,68,70].

Los análisis *in silico* demostraron que se caracteriza por presentar cambios postraduccionales como N-glicosilaciones en los aminoácidos 20 y 25 (Asn-X Ser/Thr), también se ha detectado la presencia de fosforilaciones en CEMP1 y a su vez carece de péptido señal, lo que la hace ser una proteína citosólica durante su traducción. Los análisis de dicroísmo circular predicen que la estructura secundaria de esta proteína es principalmente de hojas  $\beta$  (32.4%  $\beta$  -antiparalela, 16.7% giros- $\beta$  y 5.8%  $\beta$  - paralela), 10% de  $\alpha$ -hélice y 35% de estructura aleatoria (*random coil*). Esta característica está asociada con proteínas que regulan el crecimiento y la composición de los cristales de hidroxapatita [35,71].

Estudios *in vitro* realizados en células no mineralizantes como los fibroblastos gingivales, a los cuales se les realizó la transfección de CEMP1, demostraron que mejoraron su tasa de proliferación, e indujo la expresión de proteínas asociadas al cemento y al hueso, lo que favoreció la mineralización de la matriz extracelular [35,67]. También se ha comprobado que CEMP1 juega un papel clave durante el proceso de biomineralización al regular la tasa de deposición, la composición y la morfología de los cristales de hidroxiapatita. Además, mediante estudios *in vivo* se demostró que promueve la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico en la calvaria de rata, lo que confirma las propiedades osteoinductoras de esta proteína y su potencial para ser utilizada en procesos de regeneración periodontal [35,69,72].

### 5.2.9 Proteína de adhesión del cemento (HACD1/CAP)

La proteína de adhesión del cemento (HACD1/CAP) fue la primera proteína cemento específica aislada del cemento radicular humano. Se encuentra codificada en un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 10, segmento 13.14 (10p13.14) compuesto por 6 exones, dicho gen durante los procesos de transcripción genera mediante un splicing alternativo dos isoformas completamente diferentes; la primera isoforma es la proteína 3-hidroxiacil-CoA-deshidratasa 1 antiguamente denominada PTPLA y actualmente conocida como HACD1, la cual está constituida por 288 aminoácidos y cuya función se relaciona con la formación de precursores lipídicos mediante la elongación de los ácidos grasos de cadena larga durante la formación de fibras musculares [73,74]; La segunda isoforma codificada por el mismo gen es la proteína HACD1/CAP conformada por 140 aminoácidos. El análisis *in silico*, reveló que de los 140 aminoácidos que componen a la proteína HACD1/CAP los 125 aminoácidos correspondientes a la porción N-terminal son idénticos a HACD1, mientras que los 15 aminoácidos correspondientes a la porción C-terminal no están presentes en la secuencia de HACD1. Este producto de las modificaciones postranscripcionales (splicing alternativo) donde se elimina la secuencia **IVHCLIGIVPT** (motivo de unión de la fosfatasa) de los residuos

del exón 3 de HACD1 y lo sustituye por la secuencia de 15 aminoácidos **VSFPSCCFSIAVIFM** (específica de CAP) codificados en el intrón río abajo del exón 2, inmediatamente después del segundo dominio transmembrana iniciado en el exón 2 la proteína se trunca, por lo cual carece del sitio activo para la actividad fosfatasa de HACD1. Es así como estas modificaciones producen un cambio en la función de la proteína (Figura 7) [74,75].

El producto de traducción predicho tiene un peso molecular calculado de 14.9 kDa, presenta una carga eléctrica neutra a un pH fisiológico (pI 7.78). Asimismo, refieren que su localización es citoplasmática en un 94.19% debido a la carencia de péptido señal. Se han descrito dentro de su secuencia de aminoácidos la presencia de Ser/Thr que le confieren la capacidad de poder sufrir modificaciones postraduccionales como fosforilaciones [74,76].

HACD1/CAP ha sido aislada, caracterizada y purificada de extractos de cemento maduro humano y bovino a partir de un anticuerpo monoclonal *anti-CAP bovino*, además, se ha inmunolocalizado fuertemente en la matriz del cemento radicular, en espacios endósteales del hueso alveolar y en las zonas paravasculares del ligamento periodontal, así como en tejidos del corazón e hígado levemente [74,77,79]. A partir de estudios de dicroísmo circular, se ha comprobado que su estructura secundaria se encuentra fundamentalmente compuesta por un 45.9% de estructuras aleatorias, un 43.2% de estructuras  $\alpha$ -hélice, un 8.9% de hojas  $\beta$  y un 2% de giro  $\beta$ . Investigaciones con FE-SEM indican que esta proteína se autoensambla en nanoesferas con tamaños que van desde 7 a 27 nm de diámetro [80]. Estudios recientes han demostrado que HACD1/CAP induce la diferenciación de células troncales derivadas del ligamento periodontal humano hacia un fenotipo mineralizante *in vitro* promoviendo la nucleación de cristales de hidroxiapatita y aumentando la actividad de la ALP, así como la expresión de proteínas asociadas al proceso de biomineralización, también presenta una actividad biológica al favorecer la quimiotaxis de las células del ligamento periodontal y del hueso alveolar hacia la superficie radicular. Se sugiere que su papel durante la adhesión podría estar mediado por el receptor de integrinas  $\alpha 5\beta 1$ , así como por una alta afinidad por

la fibronectina, la hidroxiapatita, la dentina y el cemento radicular. Se ha demostrado que la proteína (HACD1/CAP) induce la proliferación de fibroblastos gingivales mediante la activación de la vía MAPK; esto es, a partir de la activación de ERK2 por fosforilación, lo cual finalmente conduce a la activación del factor de transcripción *c-fos* y *c-jun*, dichos factores de transcripción se encuentra relacionado a la proliferación celular [38,77,80]. Otro hallazgo importante fue que HACD1/CAP promueve la formación de hueso nuevo en un defecto de tamaño crítico en calvaria de rata en un 73% ± 2,19% y un 87% ± 1,97% a las 4 y 8 semanas respectivamente. Por lo tanto, esta molécula tiene un gran potencial para ser utilizada en bioingeniería y regeneración de tejidos mineralizados [80].

		10	20	30	40	50	60
CAP		MGRLTEAAAA	GSGSRAAGWA	GSPPTLLPLS	PTSPRCAATM	ASSDEDGTNG	GASEAGEDRE
HACD1		.....	.....	.....	.....	.....	.....
		10	20	30	40	50	60
		70	80	90	100	110	120
CAP		APGERRRLGV	LATAWLTFYD	IAMTAGWLVL	AIAMVRFYME	KGTHRGLYKS	IQKTLKFFQT
HACD1		... ..	.....	.....	.....	.....	.....
		70	80	90	100	110	120
		130	140	150	160	170	180
CAP		FALLEVSFPS	<b>CCFSIAVIFM</b>				
HACD1		.....					
		FALLEIVHCL	<u>IGIVPTSVIV</u>	TGVQVSSRIF	MVWLITHSIK	PIQNEESVVL	FLVAWTVTEI
		190	200	210	220	230	240
HACD1		TRYSFYTFSL	LDHLPYFIKW	ARYNFFIILY	PVGVAGELLT	IYAALPHVKK	TGMFSIRLPN
		250	260	270	280		
HACD1		KYNVSEFDYYY	FLITMASYI	PLFPQLYFHM	LRQRRKVLHG	EVIVEKDD	

**Fig. 7:** Secuencia de aminoácidos de las isoformas HACD1/CAP y HACD1. Las letras en negrita indican los últimos quince aminoácidos de la porción C-terminal de la proteína HACD1/CAP que están ausentes en HACD1, mientras que las letras subrayadas indican el sitio activo de la proteína HACD1. Fuente: ExPASy Bioinformatics Resource Portal

### 5.3 Péptido CAPp-15

Como se mencionó anteriormente, HACD1/CAP es una proteína de 140 aminoácidos de los cuales mediante un splicing alternativo la secuencia de 15 aminoácidos (VSFPSCCFSIIVIFM) de la porción C-terminal sustituye el sitio de actividad de la proteína HACD1, por lo cual se ha propuesto que esta modificación genera un cambio en la función de la proteína, lo que hace única esta región [81].

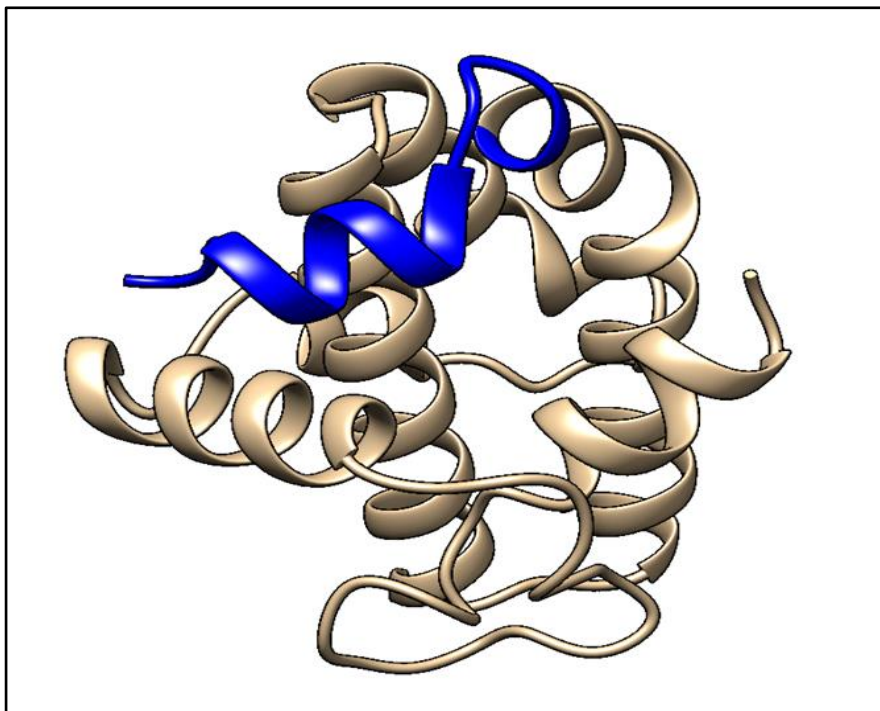
CAPp-15 es un péptido derivado de dicha secuencia, presenta aminoácidos como valina, fenilalanina, prolina, isoleucina, alanina y metionina que le confieren un comportamiento hidrofóbico al estar en contacto con soluciones acuosas (Figura 8 y Tabla 1), con base en análisis *in silico* se ha propuesto que posee un punto isoeléctrico (pI) teórico de 5.48 y un peso molecular de 1.65 kDa. Estos dos últimos datos, son sumamente importantes ya que se ha informado que el peso molecular al ser menor que el de la proteína completa disminuyen la probabilidad de desencadenar una respuesta inmune, además, el pI es un indicador de que el péptido adquiere una carga negativa al encontrarse en una disolución a un pH fisiológico (pH ~7.4) debido a un proceso de desprotonación; esta carga le permitirá interactuar con cationes divalentes como el calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ), un elemento imprescindible en el proceso de biomineralización. Así mismo, el péptido ya ha sido sintetizado [81,82].

En los últimos años las investigaciones de esta secuencia peptídica demostraron que tiene la capacidad de mimetizar algunas funciones de la proteína completa, por ejemplo, al realizar estudios *in vitro* en un sistema de contradifusión libre de células el péptido CAPp-15 a una concentración de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  demostró que promovió la nucleación y reguló el crecimiento de esférulas de hidroxiapatita hasta un tamaño aproximado de 200 $\mu\text{m}$ , las cuales presentaron un crecimiento prismático muy ordenado [83]. Posteriormente, a partir de estudios *in vivo* en defectos segmentales de tamaño crítico (10mm) en la tibia de conejos Nueva Zelanda, el péptido CAPp-15 a una concentración de 3.4mg y después de 20 semanas posoperatorias estimuló la regeneración ósea mediante un modelo de crecimiento endocondral, lo



que favoreció la neoformación tisular a diferencia de los defectos controles [75]. Otro resultado importante, fue que en ratas cepa Wistar a las cuales se les realizó ovariectomía bilateral para mimetizar la osteoporosis postmenopáusicas, el péptido CAPp-15 a una concentración de 40 y 80 µg/día durante 12 semanas de tratamiento demostró que detuvo la pérdida ósea y aumentó la ganancia de tejido mineralizado hasta en un 92% en el hueso cortical del fémur y hasta un 95% en la vértebra L4, a diferencia de los controles [81]. Finalmente en el último año se analizó la funcionalización del péptido CAPp-15 sobre superficies de titanio (Ti) y óxido de titanio (TiO<sub>2</sub>), los resultados revelaron que el péptido posee una adsorción preferencial a las películas de TiO<sub>2</sub>, promoviendo la precipitación de hidroxiapatita carbonatada después de 21 días de incubación en una disolución fisiológica simulada, así mismo las superficies de Ti y TiO<sub>2</sub> tratadas con CAPp-15 presentaron un incremento significativo a diferencia de los controles durante un ensayo de proliferación celular al transcurrir 72h de cultivo y finalmente aumentaron los mecanismos de adhesión y migración celular de fibroblastos gingivales durante un ensayo del cierre de una herida [82].

Estos hallazgos condujeron a preguntarnos si el péptido CAPp-15 sería capaz de ejercer su efecto regenerativo a nivel de los tejidos periodontales, principalmente en aquellos que dan el anclaje y soporte a los dientes, por lo cual se buscó generar un defecto de tamaño crítico (3x2x1mm) en la raíz vestibular del primer molar inferior derecho en rata Wistar, para poder comprobarlo.



**Fig. 8:** Modelo teórico de la estructura secundaria de la proteína HACDI/CAP, conformado por un 45.9% de estructuras aleatoria, un 43.2% de estructuras  $\alpha$ -hélice, un 8.9% de hojas  $\beta$  y un 2% de giro  $\beta$ . La región en azul indica la zona de 15 aminoácidos en el extremo C-terminal correspondientes al péptido CAPp-15. Fuente: ExPASy Bioinformatics Resource Portal

VSFPSCCFSIAVIFM		
No polares Alifáticos	No polares Aromáticos	Polares sin carga
V-P-I-A-M	F	S-C
<p>Punto isoelectrico (pI) de 5.48 Peso molecular de 1.65 kDa</p>		

**Tabla 1:** Características fisicoquímicas de la secuencia de aminoácidos del péptido CAPp-15.

## 5.4 Enfermedad periodontal

La destrucción del periodonto se asocia normalmente con la enfermedad periodontal, aunque muchos otros factores, como traumatismos, envejecimiento, infecciones, movimientos dentales de ortodoncia, enfermedades sistémicas y genéticas, pueden contribuir a este proceso [35,43].

La periodontitis forma parte de la clasificación de las enfermedades periodontales, su fisiopatología se ha caracterizado por una inflamación crónica, que conduce a la activación de proteinasas derivadas del huésped en respuesta a la colonización de microorganismos periodontopatógenos (*Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotellas*, *Bacteroides forsythus*, *Eikenella*, y *Capnocytophaga*) dentro de biopelículas bacterianas alrededor del diente en el surco gingival. Los signos patognomónicos de esta enfermedad incluyen sangrado al sondeo, aumento de la profundidad de la bolsa, encía inflamada o enrojecida, pérdida ósea y alteraciones en la estructura del cemento radicular, lo que conlleva a la pérdida de inserción dental, por ende, las raíces de los dientes quedan expuestas aumentando así la sensibilidad dental y, finalmente, la pérdida de los dientes. Esto genera un impacto significativo en la salud bucal y la calidad de vida en general de los pacientes [62,84-88]. La evidencia actual respalda la influencia de enfermedades multifactoriales, como el tabaquismo, en múltiples respuestas inmunoinflamatorias que hacen que los cambios en el microbioma disbiótico sean más probables en algunos pacientes que en otros y probablemente influyan en la gravedad de la enfermedad en dichos individuos [84].

La enfermedad periodontal es un problema de salud grave y generalizado en la población adulta en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud estima que la periodontitis grave, definida como una bolsa subgingival de profundidad mayor o igual a 6 mm, ocurre en el 5-20% de los adultos en todo el mundo, pero cuando se incluyen individuos con formas más leves de la enfermedad, es decir, bolsas de 4 a 5 mm de profundidad, la prevalencia de periodontitis aumenta hasta aproximadamente el 35-50% de la población adulta, por lo cual el tratamiento y la

prevención de esta enfermedad toma importancia tanto para los especialistas periodontales, los programas de salud bucodental, la medicina regenerativa periodontal y la ingeniería de tejidos [84].

La terapia periodontal convencional está dirigida al control de la infección, al eliminar o reducir las bacterias localizadas en la placa dentobacteriana mediante técnicas de desbridamiento de la superficie radicular para inducir la curación a través de vías de reparación. De hecho, cuando la lesión periodontal se trata retirando la biopelícula de las raíces afectadas, las células epiteliales de la encía repoblarán la herida, debido a su recambio de población más rápido, y establecerán una interfaz entre los tejidos blandos y la raíz formando un epitelio de unión largo, ya que el periodonto tiene una capacidad limitada para la auto regeneración. Aun así, durante décadas, se han utilizado varios procedimientos, incluidas las proteínas derivadas de la matriz del esmalte (Emdogain®) [89], la regeneración tisular guiada [90] y la colocación de injertos óseos [89]. Sin embargo, el tratamiento de los defectos infraóseos se asocia con un alto grado de variabilidad en los resultados clínicos [91]. En consecuencia, la regeneración de hueso, cemento y ligamento periodontal eficaz sigue siendo un desafío. Por lo cual deben desarrollarse nuevos tratamientos para la periodontitis que mimeticen los procesos fisiológicos para permitir generar nuevamente una homeostasis celular capaz de orquestar la regeneración periodontal. Los avances recientes en la medicina regenerativa han encontrado el camino para tales mejoras al presentar oportunidades innovadoras para la ingeniería de tejidos periodontales. [3,92-95].

## 5.5 Medicina regenerativa periodontal

La regeneración se define cómo la reproducción y reconstrucción de una parte del cuerpo perdida o lesionada de tal manera que la arquitectura y la función de los tejidos perdidos o lesionados se restablecen por completo [25].

La ingeniería de tejidos es un campo científico enfocado principalmente en restaurar los órganos dañados a su forma y función originales a través de la combinación de células, andamios biomiméticos y biomoléculas (factores de crecimiento, citocinas y péptidos) que tengan la capacidad de promover la migración y unión de las células apropiadas al sitio de curación con la posterior diferenciación celular, es decir en el caso de los tejidos periodontales, actuar como osteoblastos, cementoblastos o fibroblastos del ligamento periodontal. Por lo tanto, el objetivo final de la medicina regenerativa periodontal y de la ingeniería de tejidos periodontales es mejorar la migración, proliferación y diferenciación de las células troncales endógenas y/o exógenas hacia fenotipos terminales apropiados y favorecer la biosíntesis de los componentes de la matriz extracelular que apoyan la recuperación y regeneración del periodonto, previniendo así la pérdida dental [25,95,96].

Numerosos estudios *in vitro* han descrito el potencial de las células troncales mesenquimales (MSC) de origen dental, para diferenciarse no solo hacia los tres linajes estromales principales (hueso, grasa y cartílago) sino también hacia hepatocitos, miocitos y neuronas [25,97,98]. Para esto, estas células tienen que cumplir con características como una alta expresión de antígenos de superficie CD90, CD73, CD105 y CD44, y carecer de la expresión de marcadores hematopoyéticos, incluidos CD34, CD45 y HLA-DR [99]; A la luz de su capacidad de autorrenovación y su vasta plasticidad, estas células pueden cubrir un amplio espectro de aplicaciones clínicas tanto en medicina como en odontología. Sin embargo, los problemas relacionados con el lugar de recolección han llevado cada vez más la investigación hacia tejidos más accesibles donde encontrar MSC. La última frontera de la regeneración de tejidos se ha logrado con el novedoso concepto de la medicina basada en residuos biológicos. Aquí, los tejidos “desperdiciados” como los terceros

molares y los dientes deciduos exfoliados son un recurso de compuestos biológicamente activos, al igual que de MSC [95]. Independientemente, siempre se debe tomar en cuenta la presencia de MSC endógenas las cuales residen en microambientes especializados también llamados nichos, que las mantienen en un estado indiferenciado y autorrenovable. Por lo tanto, las MSC endógenas son capaces de iniciar un proceso de proliferación y diferenciación celular, siempre y cuando sean biológicamente activadas de manera adecuada [100].

Aun así, la ingeniería de tejidos periodontales debe enfrentarse a varios desafíos. Por ejemplo, igualar las características micro ambientales naturales de los tejidos, la biocompatibilidad y biomecánica de los andamios, la optimización del número y la calidad de las células. Igualmente, sería importante incluir la capacidad de un agente que promueva la biomineralización de cemento nuevo a lo largo la superficie radicular, para favorecer la inserción de las fibras del ligamento periodontal en el cemento radicular y hueso alveolar [15]. Por lo cual, para favorecer estos procesos, actualmente se han utilizado péptidos sintéticos que tienen la capacidad de influir en el comportamiento celular y modificar las propiedades del andamio, dando como resultado una mejora en la adhesión, proliferación, migración, diferenciación, angiogénesis y biomineralización celular que se requieren dada la naturaleza compleja de los tejidos periodontales. Entre estos péptidos se han reportado secuencias como el péptido de crecimiento osteogénico (OGP), el péptido de tres aminoácidos arginina-glicina-aspartato (RGD), los péptidos derivados principalmente de BMP-2, BMP-7 y BMP-9, el péptido P-15, así como el péptido 1 derivado de la proteína del cemento 1 (CEMP-1-p1), cada uno presenta actividades celulares específicas. Sin embargo, todos comparten ventajas terapéuticas sobre otras moléculas como mayor estabilidad, buena biocompatibilidad con el andamio, son moléculas bioactivas fáciles de producir, procesar y modificar, pueden prepararse en condiciones bien definidas y controladas, por lo cual presentan menor costo y complejidad de producción en comparación con los biofarmacéuticos basados en proteínas, también presentan mayor especificidad hacia los tejidos, por lo general, son menos inmunogénicos que las proteínas y los anticuerpos recombinantes, esto porque los productos de degradación de los péptidos son

aminoácidos y, dada su vida media corta, pocos péptidos se acumulan en los tejidos, lo que minimiza los riesgos de toxicidad causados por sus metabolitos. Por lo cual estas moléculas facilitan para la ingeniería de tejidos periodontales el desarrollo de nuevas técnicas regenerativas mínimamente invasivas <sup>[101]</sup>.

## 5.6 Modelo animal para la regeneración periodontal

La aplicación traslacional del conocimiento experimental *in vitro* e *in vivo* al entorno clínico es el objetivo final de la investigación biomédica. Cada vez más, la justificación de la investigación básica debe basarse en la relevancia y aplicabilidad a un problema clínico. Sin embargo, como requisito previo para los estudios clínicos, se requieren modelos para explicar la causalidad de las observaciones y los resultados del tratamiento. Aunque se puede realizar algo de trabajo utilizando sistemas *in vitro*, en última instancia, se requieren sistemas animales para probar la seguridad y eficacia de los datos adquiridos antes de transferirlos a los seres humanos <sup>[102]</sup>.

Las investigaciones destinadas a comprender los mecanismos celulares y moleculares que controlan el desarrollo y la regeneración de los tejidos periodontales han utilizado modelos *in vitro* e *in vivo*. Los modelos *in vitro* incluyen cultivos celulares en los que las células pueden manipularse de diversas formas para imitar el entorno *in vivo* dando así una aproximación a los procesos fisiológicos. Sin embargo, la respuesta completa del huésped no puede ser estudiada solo *in vitro*, por lo tanto, la inclusión de diversos modelos animales es de vital importancia para la ingeniería de tejidos periodontales, ya que se puede alcanzar a reflejar las interacciones entre el huésped-célula-andamio-biomoléculas, por lo tanto, permiten monetizar con mayor precisión las actividades regenerativas en humanos <sup>[15]</sup>.

Durante las investigaciones *in vivo*, la especie animal utilizada depende en gran medida de la pregunta de investigación o del modelo de enfermedad. En general, las especies más pequeñas como roedores, conejos y hurones son más

convenientes para la investigación relacionada con enfermedades, mientras que los animales más grandes como caninos, felinos, cerdos miniatura y primates no humanos son más apropiados en los estudios dirigidos a la curación de tejidos. En comparación con las especies más pequeñas, la anatomía de los animales más grandes se parece más a la arquitectura dentoalveolar humana. Sin embargo, estos animales presentan desventajas como, un costo elevado para el cuidado y la crianza, problemas de manejo por su tamaño, alteraciones oclusales traumáticas y se requiere de 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 modificaciones genéticas y requieren menor tiempo para la obtención de resultados, la única desventaja es que sus incisivos no tienen raíces o, si tienen, son pequeñas, abiertas apicalmente y crecen continuamente durante toda la vida. Por lo tanto, los modelos de defectos periodontales en roedores solo se pueden practicar en los dientes molares ya que son los únicos que comparten una anatomía dental similar al humano [102,103].

En los roedores se han utilizado muchos modelos de enfermedad periodontal. Por ejemplo, se ha demostrado el desarrollo de periodontitis, después de la colocación de ligaduras en el surco gingival alrededor de los molares, con el objetivo de aumentar la acumulación de biopelícula bacteriana [104,105], también diferentes investigadores han utilizado tejido gingival inoculado con sustancias químicas, microorganismos o sus productos para provocar la enfermedad periodontal o han usados cepas de roedores manipuladas genéticamente para centrarse en los componentes individuales de la respuesta del huésped [106,107]. Recientemente, en diferentes cepas de ratas, incluidas Sprague-Dawley y Wistar se ha estandarizado un modelo de “defecto periodontal de tamaño crítico” o también llamado “modelo de fenestración de la raíz del diente”, el cual permite la eliminación de los tres tejidos del aparato de soporte del diente (cemento, ligamento y hueso) y la creación de un defecto estandarizado aislado de la cavidad bucal, el procedimiento comienza con una incisión extraoral lateral a la mandíbula y la debridación del músculo masetero. Posteriormente en el hueso mandibular lateral a la altura de una protuberancia ósea en forma de lágrima o gota se extrae la cortical ósea con dimensiones



estandarizadas (3x2x1mm) para visualizar las raíces de los dientes, seguido de la eliminación del ligamento periodontal y del cemento radicular para exponer la dentina del diente. Finalmente, el material de prueba se puede aplicar en el defecto y se reposicionan los tejidos <sup>[108,109]</sup>. Este modelo es una herramienta ideal ya que presenta la capacidad de mantener las cargas mecánicas fisiológicas y controla otros factores externos, como la influencia microbiana, lo cual, es de gran valor para probar nuevos biomateriales o biomoléculas como péptidos. También permite evaluar mediante microtomografía computarizada, técnicas histológicas descriptivas, inmunotinción o análisis de ARN, si un factor provoca una respuesta biológica favorable durante los procesos de regeneración periodontal <sup>[108]</sup>.

## **VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Según la Academia Americana de Periodoncia en el año 2016, el 70% de la población mexicana, presentaba algún tipo de enfermedad periodontal, principalmente periodontitis. Esta enfermedad ocasiona la destrucción de los tejidos del periodonto y si no es tratada a tiempo causará la pérdida de los dientes, generando alteraciones en el estado de salud y calidad de vida de cada individuo. Por lo que, el objetivo de la terapia periodontal se basa principalmente en detener la evolución de la enfermedad y regenerar las estructuras perdidas. Aun así, durante décadas, se han utilizado varios procedimientos, incluidas las proteínas derivadas de la matriz del esmalte (Emdogain®), la regeneración tisular guiada y la colocación de injertos óseos. Sin embargo, el tratamiento de los defectos infraóseos se asocia con un alto grado de variabilidad en los resultados clínicos. En consecuencia, la regeneración de las estructuras de soporte de los dientes, es decir, las interfaces cemento-ligamento-hueso son limitadas ya que se requieren la sinergia de todos los eventos celulares y moleculares involucrados en la regeneración de estos tejidos.

Para lograr una reparación y regeneración completas es necesario recapitular el proceso de desarrollo del cemento radicular, hueso alveolar y fibras del ligamento periodontal. El conocimiento detallado de la biología del cemento es clave para comprender cómo funciona el periodonto, identificar problemas patológicos y desarrollar terapias exitosas dirigidas a la completa regeneración del aparato de inserción.

## **VII. JUSTIFICACIÓN**

La medicina regenerativa periodontal y la ingeniería de tejidos periodontales, ha realizado múltiples investigaciones enfocadas en averiguar los procesos necesarios en la regeneración de los tejidos del periodonto y han comprobado que las células, proteínas y biomoléculas de señalización encontradas en el periodonto presentan

una capacidad reparativa y regenerativa, que les permite inducir la síntesis de colágeno, la osteogénesis y cementogénesis. Por lo tanto, el péptido CAPp-15 al ser originado de una proteína cemento específica, puede lograr una interacción positiva con los tejidos de soporte del periodonto para inducir dichos procesos. Con base a las investigaciones previas, se ha demostrado que tiene la capacidad de promover la nucleación de cristales de hidroxiapatita, favoreciendo así la regeneración ósea en modelos *in vivo*, además, aumenta los mecanismos de adhesión y migración celular de los fibroblastos gingivales. Al tratarse de un péptido nos brinda ventajas como una estructura química más estable, su tamaño reduce la probabilidad de desencadenar una respuesta inmune y su síntesis resulta más económica. Fue así, como este proyecto se centró en el estudio de las interacciones del péptido sintético CAPp-15 (derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular HACD1/CAP) sobre los tejidos periodontales (cemento radicular, ligamento y hueso alveolar), con la finalidad de evaluar su capacidad regenerativa en un defecto de tamaño crítico (3x2x1mm) en la raíz vestibular del primer molar mandibular en rata Wistar.

## VIII. HIPÓTESIS

- **Hipótesis de trabajo**

El péptido sintético CAPp-15, induce la regeneración de los tejidos periodontales (cemento radicular, ligamento y hueso alveolar) en un defecto de tamaño crítico (3x2x1mm) en la raíz vestibular del primer molar mandibular en rata Wistar.

- **Hipótesis nula**

El péptido sintético CAPp-15, no induce la regeneración de los tejidos periodontales (cemento radicular, ligamento y hueso alveolar) en un defecto de tamaño crítico (3x2x1mm) en la raíz vestibular del primer molar mandibular en rata Wistar.

## **IX. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el papel regenerativo del péptido sintético CAPp-15, sobre los tejidos periodontales (cemento radicular, ligamento y hueso alveolar) en un defecto de tamaño crítico (3x2x1mm) en la raíz vestibular del primer molar mandibular en rata Wistar.

## **X. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar los defectos periodontales en ratas Wistar mediante análisis histomorfológico, para determinar la actividad del péptido CAPp-15, en la neoformación de los tejidos de soporte del periodonto.
- Evaluar la actividad del péptido CAPp-15 durante la expresión de biomarcadores relacionados con los procesos de biomineralización, mediante técnicas de inmunofluorescencia.

## **XI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **11.1 Población de estudio y consideraciones éticas**

Se utilizaron 36 ratas macho, cepa Wistar de 18 semanas de edad con peso 250-300 gr, obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y mantenidas en el bioterio de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPEI) en Odontología, UNAM.

Se manejaron siguiendo el parámetro de la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999; la cual describe las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Además, para poder iniciar con el procedimiento quirúrgico, así como la estandarización de la técnica, se redactó y se envió el

protocolo al Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Odontología, (CICUAL-FO), una vez que este fue aprobado se le asignó el número FO-M001- 0001-2019 (ANEXO 1).

## 11.2 Criterios de selección

- **Criterios de Inclusión:**

Ratas macho cepa Wistar de 18 semanas de edad con peso 250-300 gr, obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); y mantenidas en el bioterio de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI) en Odontología, UNAM.

- **Criterios de Exclusión:**

Ratas con enfermedades sistémicas, lesiones tisulares en la zona quirúrgica.

- **Criterios de Eliminación:**

Ratas que durante el procedimiento quirúrgico se haga contacto directo con el nervio dental de la raíz vestibular del primer molar mandibular o ratas que desarrollen infecciones tisulares a causa de enfermedades infectocontagiosas (virus, hongos o bacterias) por causas no consecuentes al estudio, las cuales, en caso de presentarse, serán evaluadas por un Médico Veterinario Zootecnista.

## 11.3 Variables

Tabla 2: Variables del proyecto.

Nombre de la variable	Definición conceptual	Definición operacional	Clasificación de la variable según su función en el estudio	Escala de medición	Unidades de medición o posibles valores	Función de la variable
<b>Especie animal</b>	Los individuos de una misma especie comparten caracteres genéticos que les permiten asemejarse entre sí y distinguirse del resto de las especies.	Una rata de laboratorio es una especie animal que se utiliza para la investigación científica biomédica.	Independiente	Cualitativa	Wistar Sprague-Dawley Long Evans	Variable de caracterización que me permite saber las características de la especie en estudio.
<b>Edad del animal</b>	Tiempo que ha vivido la rata Wistar contando desde su nacimiento.	Se calculo según la fecha marcada en la bitácora del animal hasta el día de su eutanasia.	Independiente	Continua	Semanas	Variable de intervención que me permite saber el completo desarrollo de la raíz vestibular del primer molar mandibular.
<b>Sexo del animal</b>	Condición orgánica que distingue a los machos de las hembras.	Dato recolectado de la bitácora clínica.	Independiente	Dicotómica	Macho Hembra	Variable clínica que me permite seleccionar el grupo de estudio según sus cualidades.
<b>Tiempo</b>	Período determinado durante el cual se realizará una acción o se desarrollará un acontecimiento.	Período que transcurre entre el evento quirúrgico y la eutanasia del animal para su posterior análisis histológico e histomorfométrico.	Independiente	De razón	Día cero al día treinta.	Variable de intervención que me permite medir los días de evolución de cada uno de los grupos experimentales.
<b>Defecto periodontal de tamaño crítico</b>	Son defectos periodontales, que por sí solos no inducen procesos de regeneración.	Es un defecto creado en la raíz vestibular del primer molar mandibular, con las siguientes dimensiones (3x2x1mm).	Independiente	De intervalo	Milímetros	Variable que me permite controlar y estandarizar los defectos periodontales en todos los grupos experimentales.
<b>Péptido CAPP-15</b>	Polvo de péptido sintético derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular HACD1/CAP. Conformado por la secuencia de 15 aminoácidos (VSFPSCCFSAIVFM) de la porción C-terminal de la proteína <i>per se</i> .	Esponja de Gelfoam® estéril (3x2x1mm), embebida con el péptido CAPP-15 a una concentración de 34µg/mL.	Independiente	Continua	Cero concentración del péptido y concentración experimental	Variable que me permite identificar cada uno de los resultados según la comparación entre grupos controles y experimentales.
<b>Gelfoam® y Satín hemostático</b>	Hemostáticos 100% bioabsorbibles.	Gelfoam®: Gelatina de piel porcina purificada, indicada en procedimientos quirúrgicos como un auxiliar para la hemostasia. Satín hemostático: Es un sustrato a base de fibras de celulosa oxidada, con propiedades hemostáticas y de alta adherencia.	Independiente	Dicotómica	Presente Ausente	Variable que me permite identificar cada uno de los resultados según la comparación entre grupos controles y experimentales.
<b>Tejido regenerado</b>	Proceso que llevan a cabo ciertos organismos para recuperar y restablecer las funciones de órganos células o tejidos perdidos o dañados.	A través de análisis histomorfológicos se evaluará la presencia de los tejidos periodontales regenerados.	Dependiente	Dicotómica	Presencia o ausencia de tejidos vascularizados con la neoformación del cemento, ligamento y hueso	Variable que me permite identificar la inserción de las fibras de Sharpey provenientes del ligamento periodontal, en el cemento radicular y hueso alveolar.
<b>HACD1/CAP, CEMP1, OCN y BSP</b>	Proteínas asociadas a los procesos de biomineralización.	Utilizados como anticuerpos, en las técnicas de inmunofluorescencia.	Dependiente	Dicotómica	Se expresa No se expresa	Variable que me permite identificar en los tejidos del defecto periodontal, la presencia de marcadores relacionados con los procesos de biomineralización.

## 11.4 Selección de grupos

Se construyeron cuatro grupos de trabajo, dentro de los cuales, un grupo era piloto, dos grupos fueron de control y uno experimental. Los animales fueron asignados aleatoriamente para cada una de las diferentes condiciones para formar así, el total de la población (n=36). Cada grupo estuvo constituido por 10 animales, a excepto del grupo piloto que constaba de 6 animales, detallados a continuación:

- A. Grupo 0, piloto:** Durante el procedimiento quirúrgico se trataron con satín más el andamio de Gelfoam® embebido con 25µg/mL del péptido de CAPp-15.
- B. Grupo 1, experimental:** Durante el procedimiento quirúrgico se trataron con satín más el andamio de Gelfoam® embebido con 25µg/mL el péptido de CAPp-15.
- C. Grupo 2, control positivo:** Durante el procedimiento quirúrgico se trataron con satín y un andamio de Gelfoam®.
- D. Grupo 3, control negativo:** Durante el procedimiento quirúrgico se trataron solo con satín.

## 11.5 Síntesis del péptido CAPp-15

La síntesis de la secuencia VSFPSCCFSIAVIFM fue llevada a cabo por la casa comercial NEP (New England Peptide) a partir de la técnica de síntesis peptídica en fase sólida (SPPS). Durante este proceso los ciclos repetitivos de acoplamiento-lavado-desprotección-lavado son muy meticulosos ya que se requiere del empleo de agentes de acoplamiento, es este caso se utilizó Fluorenil-9-metoxicarbonil (Fmoc) como protector de extremo amino terminal, t-Butil-éster para la porción carboxilo terminal y ácido tricloroacético (TFA) como eluyente. Posteriormente el péptido se preparó a una concentración de 25µg/mL en agua bidestilada.

## 11.6 Preparación del andamio

Se utilizó como matriz Gelfoam®, previamente fue cortada a las medidas exactas del defecto periodontal (3x2x1mm), posteriormente se embebió con 1mL del péptido CAPp-15, el cual ya estaba diluido en agua bidestilada a una concentración de 25µg/mL, este procedimiento se realizó bajo condiciones de esterilidad, y al final el andamio se colocó durante 24h con luz UV.

## 11.7 Diseño del estudio

Este estudio se realizó mediante un diseño experimental de tipo comparativo, (Figura 9).

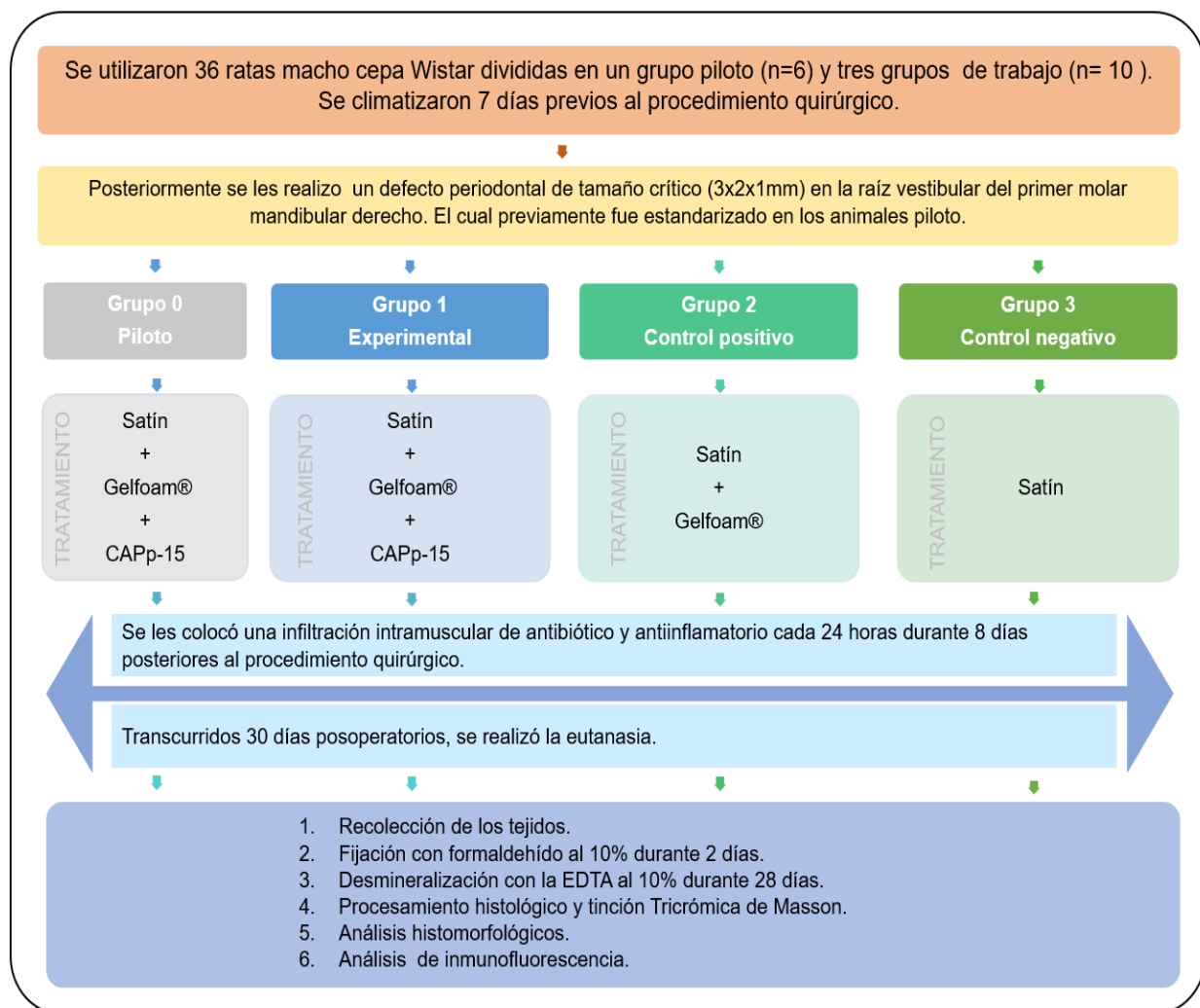


Fig. 9: Esquema general del diseño experimental.



## 11.8 Defecto periodontal en rata Wistar

Inicialmente los animales se climatizaron durante 7 días previos al procedimiento quirúrgico, con agua y alimento *ad libitum*, con ciclos de luz de 12h iniciando a las 7 am., en cuartos a 18-22°C con el 30-70% de humedad. Primero se realizó la prueba piloto en seis animales. Esto nos permitió identificar los tiempos operatorios y evaluar con precisión la localización anatómica de la zona quirúrgica, así como el manejo de los tejidos y el posoperatorio de los animales, con la finalidad de mejorar o corregir los problemas surgidos en el pre, trans, posoperatorio y durante el procesado de los tejidos. Para finalmente estandarizar la técnica quirúrgica. El cirujano y el equipo de apoyo (instrumentista, circulante, técnico encargado del bioterio y veterinario) operaron a todos los animales tanto en la prueba piloto como en el resto de los procedimientos experimentales.

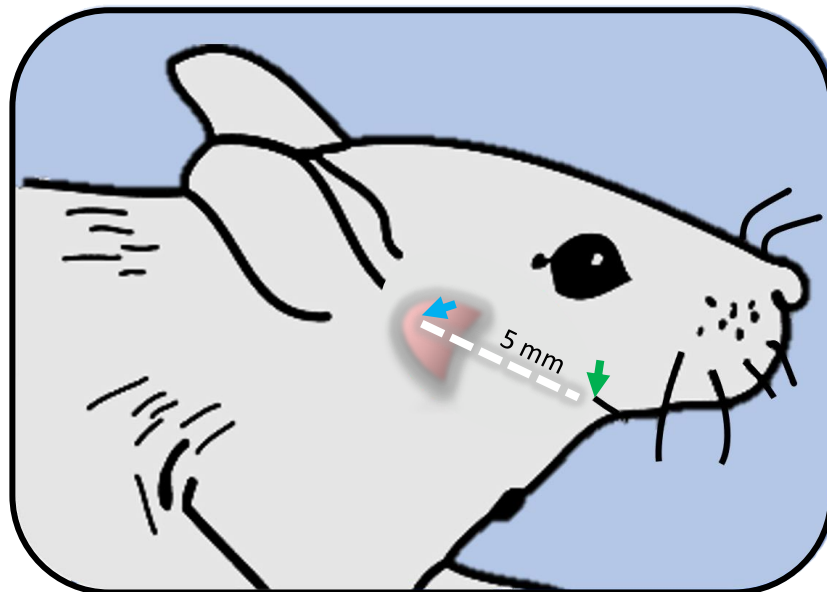
Una vez que la técnica ya estaba estandarizada, se llevó a cabo el defecto periodontal de tamaño crítico (3x2x1mm) en la raíz vestibular del primer molar mandibular derecho en cada animal de los respectivos grupos. Durante el procedimiento se filmó un video, así como la toma de imágenes de cada una de las etapas del procedimiento quirúrgico, las cuales se presentan más adelante. Los pasos del procedimiento quirúrgico son los siguientes:

1. Se realizó anestesia y sedación utilizando Zolazepam (20-40 mg/kg) y Maleato de Acepromacina (0.5-1 mg/kg) vía intramuscular.
2. Se rasura la zona quirúrgica.
3. Después se realizó la asepsia y antisepsia de la zona quirúrgica con Gluconato de Clorhexidina al 4%, posteriormente se reforzó la anestesia de manera local mediante técnica infiltrativa, utilizando 0.2 ml de lidocaína (HCL) al 2% con epinefrina 1:100000.

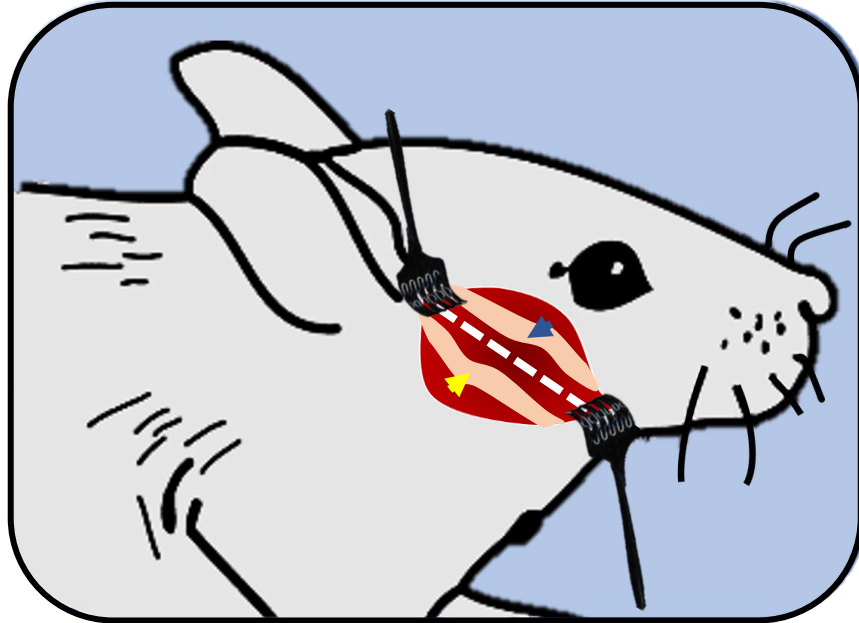
4. A continuación, se localizaron dos puntos de referencia anatómicos (la glándula parótida y comisura labial) para realizar una incisión lineal de 5 mm entre cada punto (Figura 10), después se levantó un colgajo epitelial para localizar dos estructuras anatómicas que guiarán la segunda incisión, estas son el conducto parotídeo y el nervio facial (Figura 11).
5. Inmediatamente se realizó una segunda incisión sobre el músculo masetero en el centro de los puntos de referencia, hasta llegar al periostio del borde inferior de la mandíbula, esta incisión nos permitió disecar los músculos e inserciones de los ligamentos superpuestos y así poder exponer el cuerpo mandibular (Figura 12).
6. 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”, en el centro de esta región se delimitó con una fresa de bola No. 2 la raíz vestibular del primer molar, posteriormente se realizó el defecto periodontal con una fresa de bola No. ¼, hasta tener un campo operatorio de 3x2x1 mm (Figura 13), abarcando así las tres caras de la raíz vestibular (mesial, vestibular y distal).
7. Posteriormente con el explorador se retira el ligamento periodontal y se raspa el cemento radicular.
8. Durante todo el procedimiento quirúrgico se mantiene con irrigación constante con solución amortiguadora de fosfato estéril (PBS).
9. Después se colocaron los andamios respectivos para cada grupo.
10. Finalmente se realizó el cierre de la herida, con una sutura de ácido poliglicólico (PGA) de 4-0 mediante la técnica de sutura continúa festoneada, primero se

afrontaron los planos profundos (tejidos musculares) y posteriormente se suturó la piel con la misma técnica y sutura.

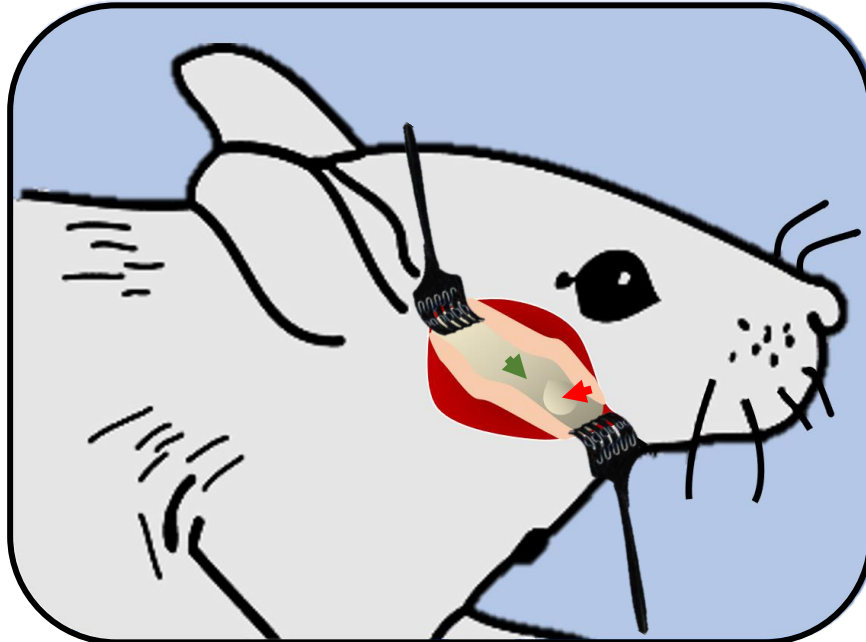
11. Una vez que el procedimiento quirúrgico terminó, las ratas se mantuvieron con un tratamiento posoperatorio el cual correspondía a una infiltración intramuscular de antibiótico (enrofloxacina 50 mg/ 1ml, [0.005mL] cada 24 horas durante 8 días) y de antiinflamatorio (meloxicam 20 mg/ 1ml, [0.1mL] cada 24 horas durante 8 días).



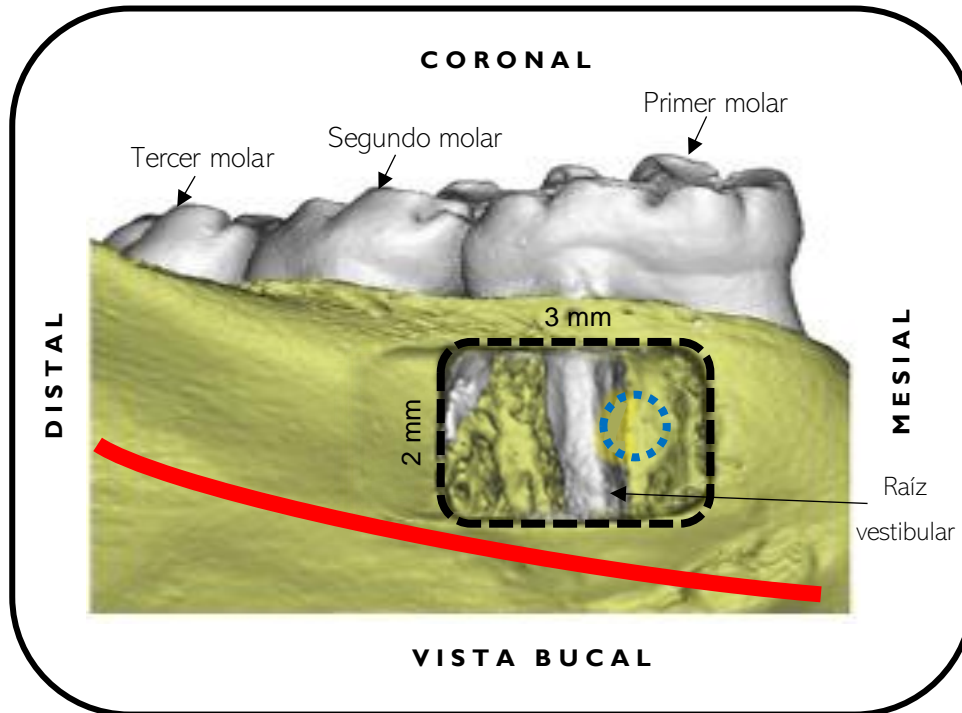
**Fig. 10:** Modelo esquemático del procedimiento quirúrgico para crear un defecto periodontal crítico en rata Wistar; Se identifican las referencias anatómicas: glándula parótida (flecha azul) y la comisura labial (flecha verde), para realizar la primera incisión de 5mm (línea punteada blanca) en el centro de estas estructuras <sup>[Fuente propia]</sup>.



**Fig. 11:** Modelo esquemático del procedimiento quirúrgico para crear un defecto periodontal crítico en rata Wistar; Se identifican las referencias anatómicas, el Conducto parotídeo (flecha amarilla) y el nervio facial (flecha azul), en el centro de estas estructuras, sobre el músculo masetero se realiza una segunda incisión marcada por la línea punteada blanca <sup>[Fuente propia]</sup>.



**Fig. 12:** Modelo esquemático del procedimiento quirúrgico para crear un defecto periodontal crítico en rata Wistar; Una vez realizada la segunda incisión, se puede observar el borde inferior de la mandíbula (flecha verde), después se localiza una región opaca con un aumento de tamaño óseo en forma de “gota” (flecha roja), en esta zona se iniciará la eliminación de la cortical ósea hasta localizar la raíz vestibular del primer molar <sup>[Fuente propia]</sup>.



**Fig. 13:** Modelo esquemático en 3D, del procedimiento quirúrgico para crear un defecto periodontal crítico en rata Wistar; Una vez eliminada la cortical ósea del hueso mandibular (recuadro punteado negro) se observa la raíz vestibular del primer molar, sobre la cual se elimina cemento radicular y ligamento periodontal (circulo punteado azul). La línea roja representa el trayecto intraóseo del nervio alveolar inferior <sup>[Fuente propia]</sup>.

## 11.9 Eutanasia

Al término de la cuarta semana posoperatoria (30 días), se realizó la eutanasia con monóxido de carbono para evitar dolor y sufrimiento a los animales.

Después mediante técnicas de disección se retiró la piel, músculos y huesos circundantes para obtener el hueso mandibular derecho, en seguida se lavó con agua corriente y se fijó por inmersión con formaldehído al 10% durante dos días, para evitar la autólisis y permitir que los tejidos permanezcan sin cambios luego de subsecuentes tratamientos.

### **11.10 Procesamiento de los tejidos: Fijación, Desmineralización, Deshidratación, Aclaramiento, Parafinización, Inclusión, Corte y Tinción.**

Una vez transcurrido el tiempo de fijado, los tejidos se desmineralizaron con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 10% con un pH de 7.4 durante cuatro semanas. Al término de este tiempo, el tejido se lavó con agua corriente y se colocó durante una hora en alcohol al 70%.

Posteriormente, el tejido fue deshidratado mediante un esquema nocturno con ayuda de un Histoquinete (Leica TP1020) durante 14h, lo que permitió controlar los tiempos de calor, vacío, presión y agitación, los perfiles de alcoholes fueron los siguientes:

- a) Alcohol al 80% durante una hora
- b) Alcohol al 95%, 3 cambios, durante una hora c/u.
- c) Alcohol absoluto, 3 cambios, durante una hora c/u.
- d) Xileno, 3 cambios, durante una hora c/u.
- e) Parafina, 3 cambios, durante una hora c/u.
- f) Parafina, al vacío durante una hora.

Antes de iniciar la inclusión en parafina, el sitio quirúrgico se delimitó para focalizar la zona del defecto periodontal con ayuda de un microscopio estereoscópico (STEMI SV 11 Carl Zeiss). El tejido correspondiente sólo incluía la zona del hueso mandibular donde se localizaba el primer molar, después con ayuda de un centro de inclusión de parafina, se realizaron los siguientes pasos para incluir los tejidos.

- a) Se eligieron los moldes de inclusión adecuados según el tamaño del espécimen.
- b) Con unas pinzas precalentadas se colocó el tejido en el centro del molde de inclusión y posteriormente se llenó parcialmente con parafina.
- c) Se acomodó en la posición deseada el tejido y posteriormente se colocó sobre el molde la caja procesadora.

- d) Enseguida se termina de llenar el molde con parafina (Histoplast PE, Thermo scientific) y se transfiere de la platina caliente a la platina fría.
- e) Una vez que el molde se frío y la parafina solidificó, se desmontó la caja procesadora, la cual tenía ahora el tejido de interés.

Posteriormente, para realizar los cortes del tejido a 5µm de grosor, se empleó un micrótomo (KD-3358) con cuchillas de alto perfil (Leica 818).

Después los cortes obtenidos fueron montados en porta laminillas, las cuales previamente habían sido salanizadas con Poli-L-lisina al 1%.

Finalmente se realizó la técnica de tinción Tricrómica de Masson, conforme a los siguientes pasos.

- a) Desparafinar y lavar con agua corriente seguido de una hidratación con agua destilada.
- b) Posteriormente se mordentaron las laminillas con solución de Bouin durante toda la noche a temperatura ambiente.
- c) A continuación, se lavaron las laminillas con agua corriente hasta que las secciones se aclararon coma seguido de un enjuague con agua destilada.
- d) Las laminillas se colocaron en solución de hematoxilina de hierro de Weigert durante 10 minutos, después se lavaron con agua corriente durante 10 minutos más y se enjuagaron con agua destilada.
- e) Las laminillas se colorearon con la solución de fucsina ácida-escarlata de Biebrich, durante 15 minutos seguido de un lavado con agua destilada.
- f) Posteriormente se colocaron en solución de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico, durante 10 a 15 minutos seguido de un lavado con agua destilada.
- g) Las laminillas se colocaron en una solución de contraste de azul de anilina durante 5 a 10 minutos, seguido de un lavado con agua destilada.
- h) Se colocaron en ácido acético al 1% durante 3 a 5 minutos.
- i) Finalmente se deshidrataron y aclararon a través del uso de alcohol etílico al 95%, alcohol etílico absoluto y xileno, se requirieron dos de cada uno, durante 2 minutos.

j) Para concluir se montaron con un medio resinoso.

Las laminillas se observaron mediante microscopía óptica, utilizando el microscopio Axioskope II (Carl Zeiss, Alemania), se realizó la toma de secuencias fotográficas, para la posterior conformación de la imagen microscópica.

### **11.11 Inmunofluorescencia**

Para detectar HACD1/CAP y proteínas involucradas en el proceso de biomineralización, las laminillas se desparafinaron en xileno (2 veces por 10 minutos), se deshidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 90%, 80%, 70%, 60% y 50%) durante 5 minutos cada una, seguido de 2 lavados con PBS durante 5 minutos cada uno. Las secciones se incubaron toda la noche a 4°C, con los anticuerpos primarios (BSP, OCN, CEMP1 y HACD1/CAP) a una dilución de 1:100 en PBS más 2mg/ml de BSA. Al día siguiente se lavaron con PBS más Tween 20 al 0.01% por 5 min cada una y finalmente un último lavado solo con PBS. En seguida se realizó la incubación del anticuerpo secundario acoplado a la enzima isotiocianato de fluorescencia (FITC) a una dilución de 1:50 o Alexa Rojo a una dilución 1:400, durante 2h a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, se realizaron los lavados de la misma forma descrita en la incubación del anticuerpo primario. Las laminillas se montaron y observaron en un microscopio de epifluorescencia indirecta Axioskope II (Carl Zeiss, Alemania).

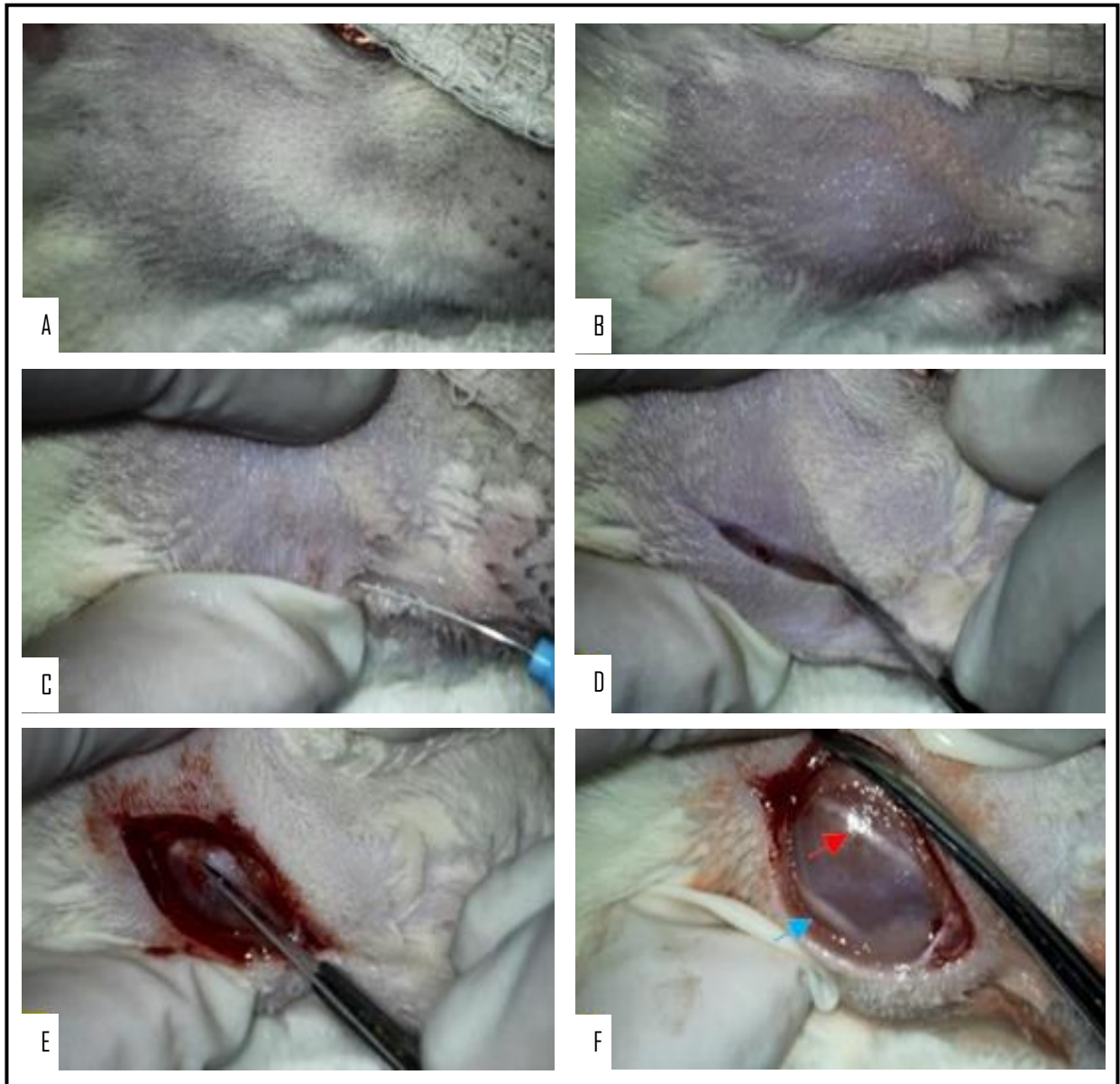


## **XII. RESULTADOS**

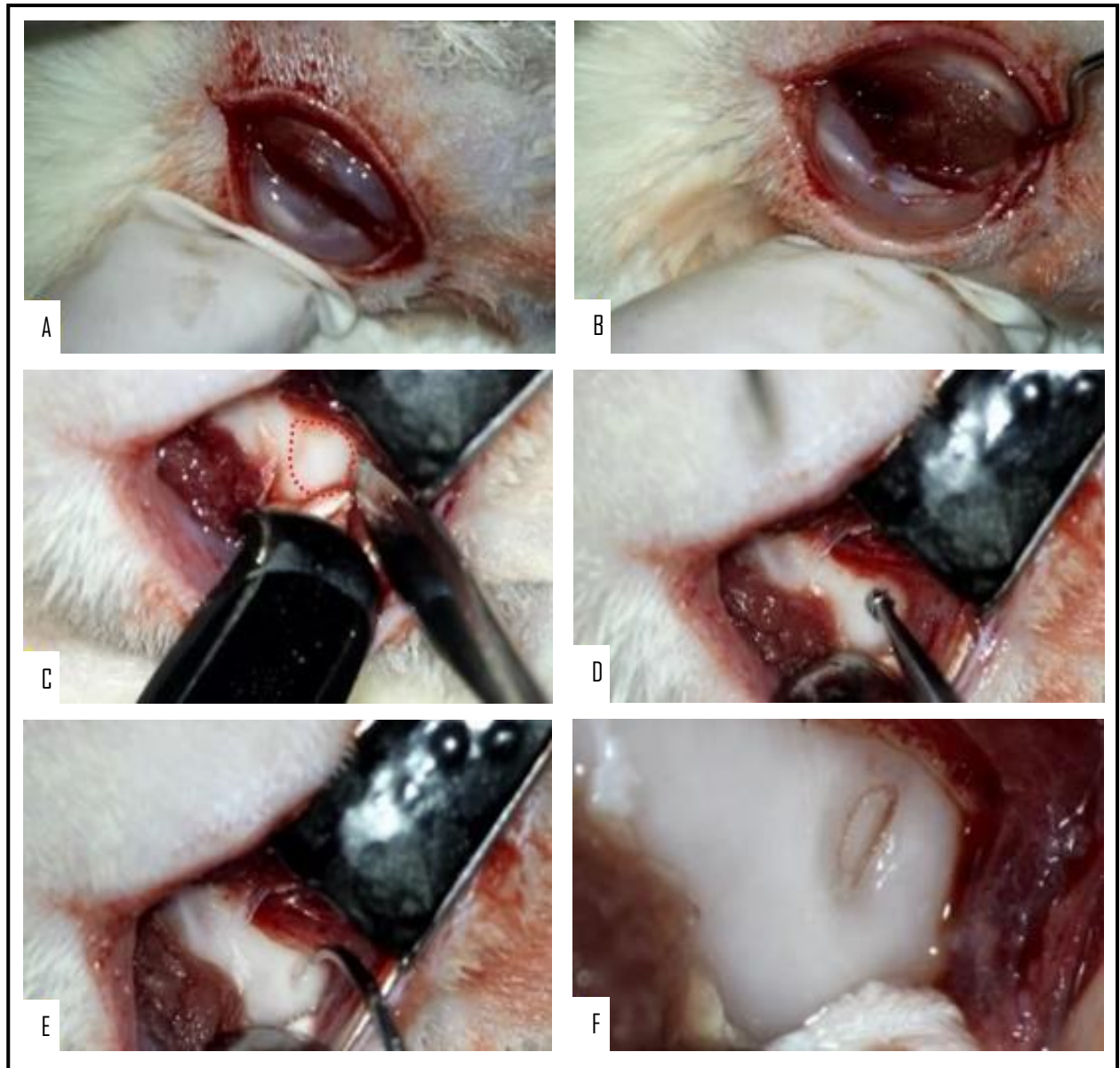
### **12.1 Defectos periodontales en rata Wistar.**

Se realizó el procedimiento quirúrgico, con los pasos ya establecidos en la raíz vestibular del primer molar mandibular derecho en ratas Wistar, originando un defecto periodontal de tamaño crítico de las siguientes dimensiones: 2 mm de alto, 3 mm de ancho y 1 mm de profundidad. Durante la cirugía se respetaron las estructuras dentarias adyacentes y la unión epitelial, lo que evitó tener contacto con la cavidad oral propiamente dicha. Para iniciar con el defecto, se creó una fenestración ósea sobre los 2/3 cervicales de la raíz vestibular, por lo tanto, en esta zona se eliminó la cortical ósea vestibular, después se retiró el ligamento periodontal y el cemento radicular. Durante todo el procedimiento se tomaron series fotográficas (Figura 14, 15 y 16) y se filmó un video (Anexo 2).

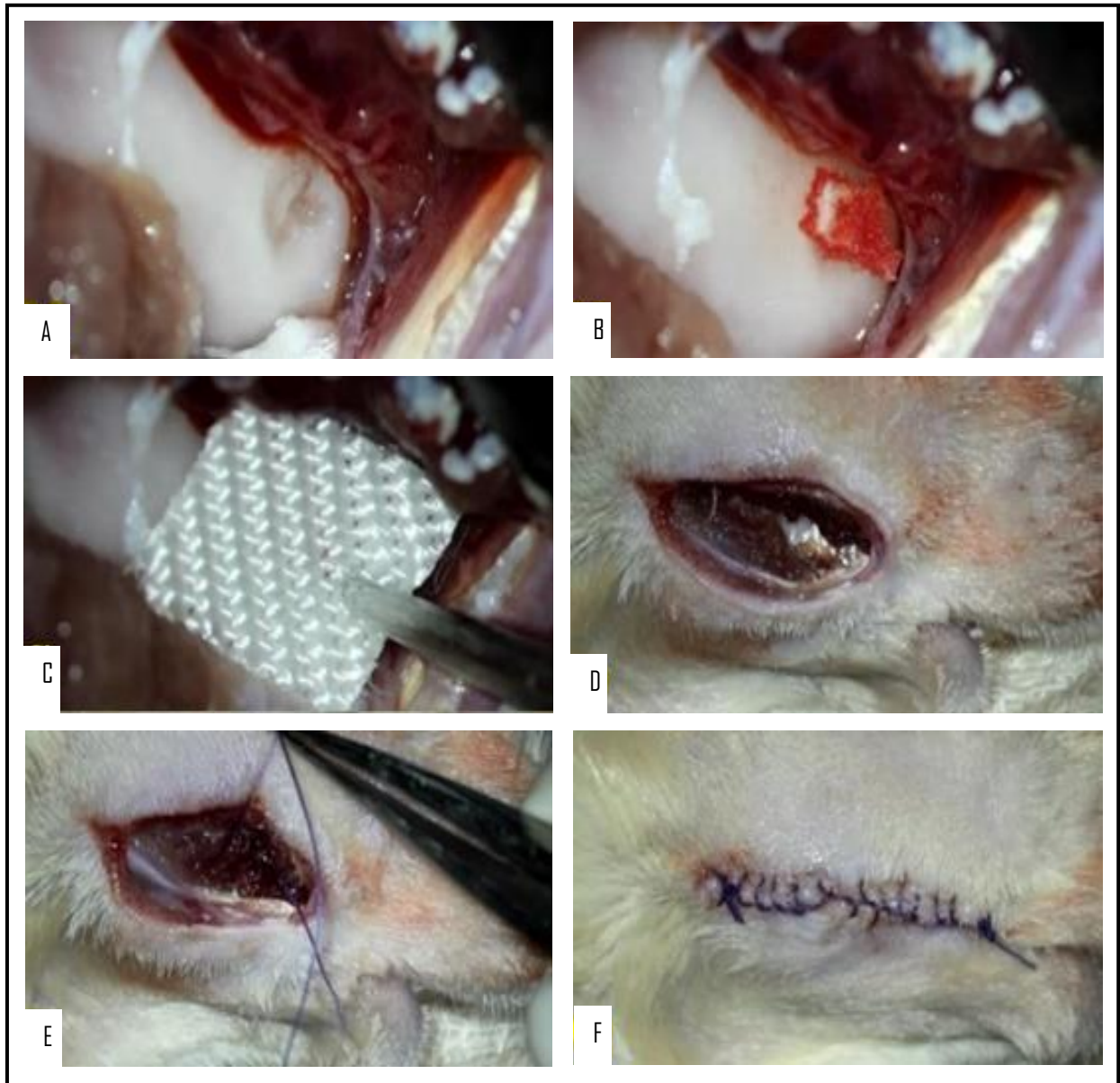
En total se operaron 42 animales, de los cuales 6 formaron parte de la prueba piloto, 6 se descartaron del proyecto según nuestros criterios de eliminación y los 30 animales restantes formaron parte de cada grupo. El seguimiento de cada uno de los animales se describe en las tablas ubicadas en el Anexo 3.



**Fig. 14:** Procedimiento quirúrgico del defecto periodontal sobre la raíz vestibular del primer molar mandibular derecho. (A) Vista de la zona quirúrgica, (B) Asepsia y antisepsia con gluconato de clorhexidina, (C) Anestesia local infiltrativa, (D y E) Primera incisión, guiada de la altura de la glándula parótida hacia la comisura bucal, (F) Referencias anatómicas que guían la segunda incisión, la flecha roja señala el nervio facial y la flecha azul señala el conducto parotídeo.



**Fig. 15:** *Procedimiento quirúrgico del defecto periodontal sobre la raíz vestibular del primer molar mandibular derecho.* (A) Segunda incisión, (B) Disección de músculos y ligamentos superpuestos, (C) Exposición del cuerpo mandibular, la zona punteada limita la “gota”, (D) Fresado óseo, (E) Localización de la raíz vestibular y eliminación del ligamento periodontal, (F) Vista a mayor escala de la raíz vestibular.



**Fig. 16:** *Procedimiento quirúrgico del defecto periodontal sobre la raíz vestibular del primer molar mandibular derecho.* (A) Una vez realizado el segundo fresado se observa la lesión en el periodonto, que abarca el cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar, (B) Colocación del andamio de Gelfoam sobre la lesión, (C) Colocación del satín, (D) Reposicionamiento de los tejidos, (E) Sutura muscular continúa festoneada, (F) Sutura epitelial continúa festoneada.

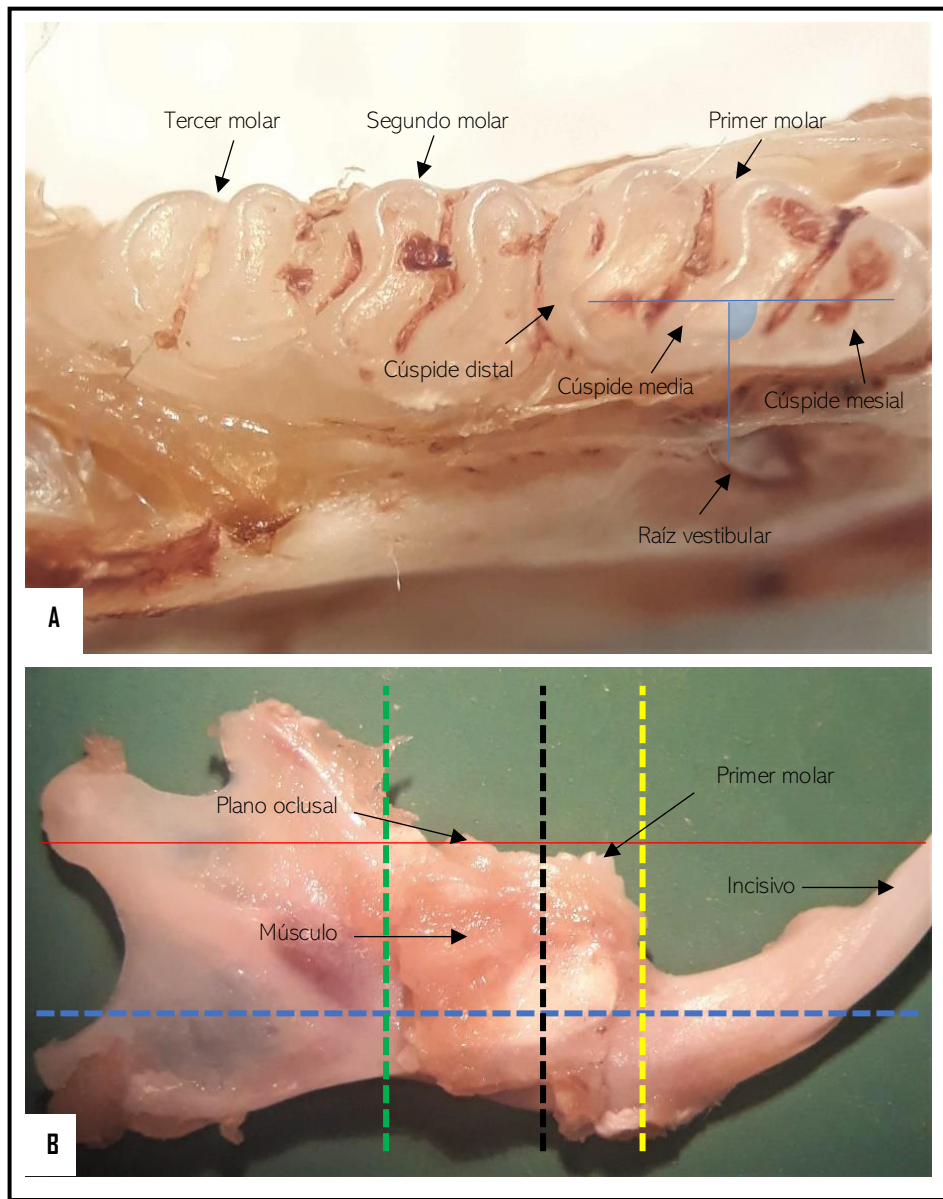
## 12.2 Eutanasia y procesamiento de los tejidos

Transcurridos los 30 días posoperatorios, se realizó la eutanasia con monóxido de carbono a todos los animales. Se les retiraron las mandíbulas junto con el músculo, evitando desprender los tejidos cercanos al defecto periodontal. Después los tejidos se procesaron siguiendo los parámetros ya mencionados, pero antes de incluirlos en parafina, se delimitó el defecto periodontal con la ayuda de un microscopio estereoscópico (STEMI SV 11 Carl Zeiss), para esto, se realizaron cortes verticales y horizontales (Tabla 3, Figura 17), con la finalidad de minimizar el número de laminillas al momento de buscar el defecto periodontal y poder observar la raíz vestibular del primer molar. Posteriormente se realizó la técnica de inclusión en parafina y después se recolectaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de grosor.

Los tejidos se tiñeron con la técnica Tricrómica de Masson y las laminillas se montaron y observaron mediante microscopía óptica utilizando el microscopio Axioskope II (Carl Zeiss, Alemania).

Tabla 3: Parámetros anatómicos para la delimitación del defecto periodontal en la raíz vestibular del primer molar mandibular derecho, en rata Wistar.

Cortes para delimitar el defecto periodontal	Parámetros anatómicos para la delimitación
<b>Primero</b>	Se realizó en dirección horizontal, en el cuerpo de la mandíbula, paralelo al trayecto del nervio alveolar del incisivo y al plano oclusal. Al realizar este corte se elimina a su vez el nervio alveolar del incisivo.
<b>Segundo</b>	Se realizó en dirección vertical, sobre la rama mandibular al límite de la raíz distal del tercer molar y paralelo a la raíz mesial del primer molar.
<b>Tercero</b>	Se realizó en dirección vertical, sobre el reborde óseo y el diente incisivo, paralelo a la raíz mesial del primer molar este corte nos permitió eliminar el incisivo.
<b>Cuarto</b>	Se realizó en dirección vertical, entre la raíz distal del primer molara y raíz mesial del segundo molar cargando 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.



**Fig. 17:** *Parámetros anatómicos para la delimitación del defecto periodontal en la raíz vestibular del primer molar mandibular derecho, en rata Wistar.* A) Vista oclusal de los molares mandibulares correspondiente a una de las ratas piloto. La raíz vestibular se localiza perpendicular a la cúspide media del primer molar. B) Vista bucal de la mandíbula derecha correspondiente a una de las ratas piloto. Los tejidos musculares circundantes al defecto periodontal no se eliminaron, porque ya se había localizado previamente la raíz vestibular del primer molar. Para iniciar los cortes, se identificó el plano oclusal (línea roja) y el diente incisivo. Primer corte (línea punteada azul), segundo corte (línea punteada verde), tercer corte (línea punteada amarilla) y cuarto corte (línea punteada negra).

### 12.3 Análisis histomorfológico

El análisis histomorfológico se hizo con el microscopio óptico Axioskope II (Carl Zeiss, Alemania). Se tomaron microfotografías de los cortes histológicos con el fin de analizar las zonas correspondientes a los bordes del defecto, así como las estructuras del tejido regenerado, para poder observar los patrones de regeneración periodontal. Se valoró la vascularización de los tejidos, zonas de mineralización, cuerpos celulares como fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos, osteoclastos, así como la presencia de reacciones inflamatorias.

Se estudiaron cada uno de los cortes histológicos correspondientes a los cuatro grupos de trabajo.

Dentro del grupo de animales piloto que se trataron con satín + Gelfoam® y el péptido sintético CAPp-15 (Figura 18), se observa la presencia de cemento radicular, ligamento y hueso alveolar en la zona del defecto periodontal, aun así, como la técnica de tinción fue deficiente, se calibraron los parámetros para cada una de las tinciones subsecuentes, esto nos permitió mejorar la visualización de los tejidos. También se corrigió la posición del defecto, este pasó de una zona cervical a una más apical sobre la raíz vestibular, esto para descartar la inserción de las fibras de la encía y enfocarnos en la inserción de las fibras de Sharpey del ligamento periodontal.

Posteriormente ya estandarizada la técnica, los resultados histomorfológicos del grupo 1 de animales: que se trataron con satín + Gelfoam® y el péptido sintético CAPp-15 (Figura 19-A), muestran en la zona del defecto la formación continua de una matriz cementoide a los 30 días posoperatorios, esta se identificó por una coloración azul con la técnica Tricrómica de Masson, el espacio del ligamento periodontal se mantuvo y la organización de sus fibras empezaban a adquirir una dirección oblicua. En el hueso alveolar se observa una matriz osteoide hiper celular con centros azules de colágena y gran actividad de osteoclastos, característico de

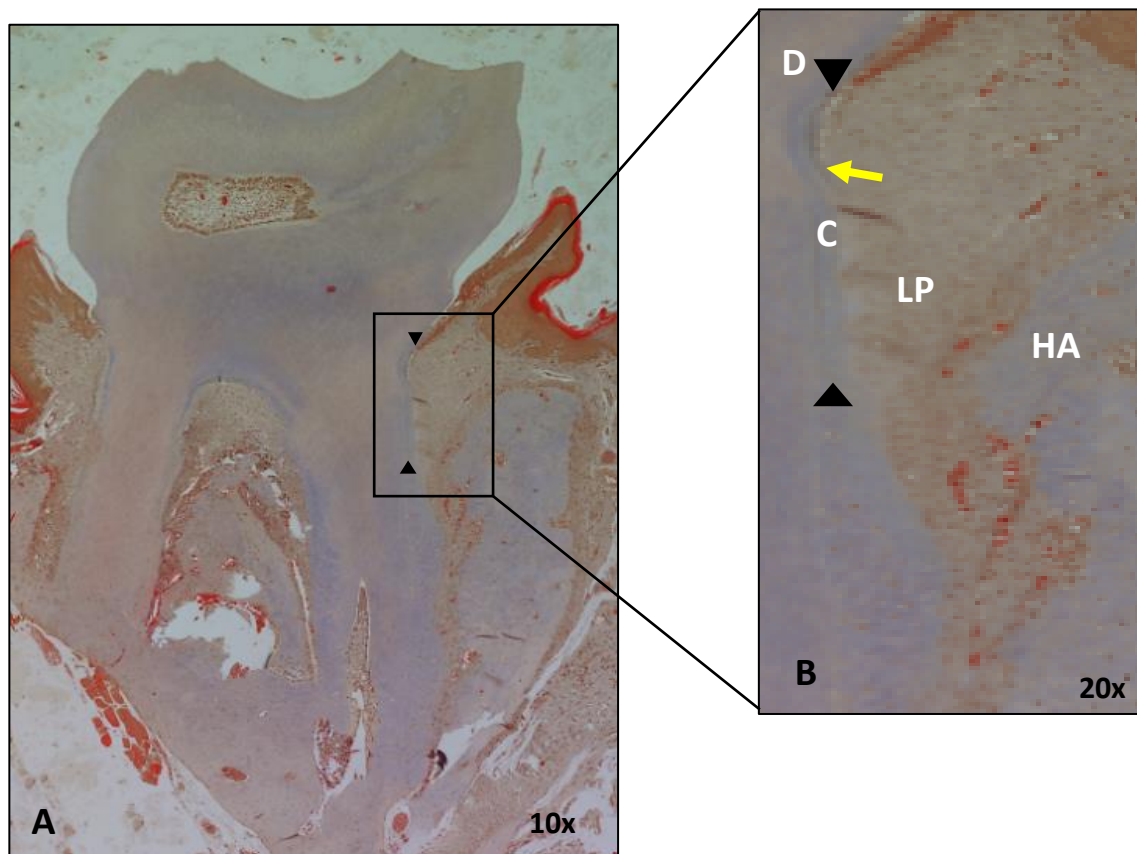


un hueso en formación. Además, los tejidos se encuentran altamente vascularizados e inervados, lo que promueve la formación y maduración del tejido mineralizado, permitiendo así llevar a cabo un proceso de regeneración periodontal. A mayor aumento (Figura 19-B), se observa la inserción de las fibras de Sharpey del ligamento periodontal en la matriz cementoide, se denota a la periferia de esta matriz la presencia de cementoblastos y fibroblastos. Dentro del ligamento periodontal se localiza la formación de cementículos (formación mineralizada circular de cemento). Por lo cual, podemos decir que en el grupo experimental tratado con el péptido sintético CAPp-15, se ha obtenido la regeneración de los tejidos del periodonto, con una morfología muy similar a un periodonto sano en desarrollo.

El grupo 2 de animales: que se trataron con satín + Gelfoam® (Figura 20-A), presentan en la superficie del defecto periodontal pérdida de la continuidad del cemento radicular y algunas zonas con cemento remanente de estructura amorfa. El espacio del ligamento periodontal está disminuido y sus fibras están muy desorganizadas. El hueso alveolar se observa como una matriz osteoide hipercelular con centros azules de colágena y también con gran actividad de osteoclastos alejados del defecto. Hay mayor número de vasos sanguíneos a lo largo del ligamento periodontal, que posiblemente conlleven a una respuesta inflamatoria exacerbada. A mayor aumento (Figura 20-B), no se observa la inserción de las fibras de Sharpey del ligamento periodontal en el cemento remanente, lo que nos sugiere una pobre reparación del complejo periodontal.

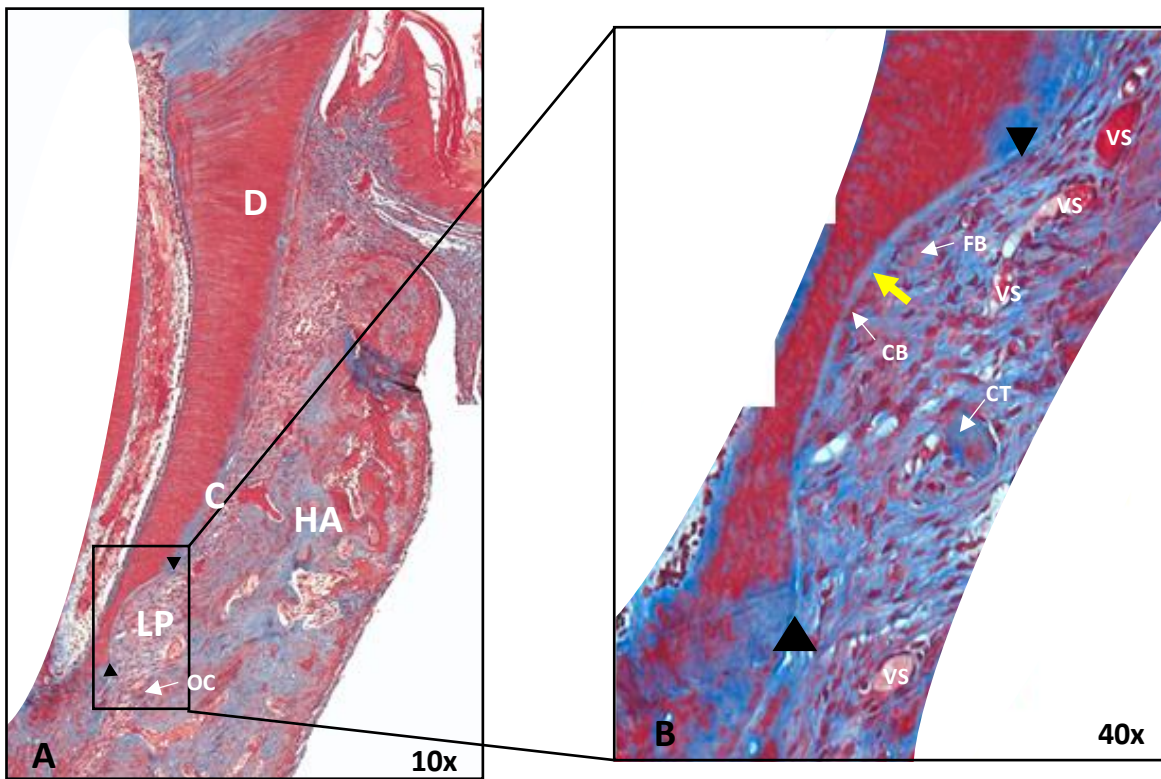
El grupo 3 de animales: tratados solo con satín (Figura 21-A), se muestra una pérdida continua del cemento radicular, el espacio del ligamento periodontal está disminuido y el hueso alveolar se observa como una matriz osteoide con poca actividad celular. El número de vasos sanguíneos fue menor comparado con los dos grupos anteriores. A mayor aumento (Figura 21-B), en la superficie del defecto, se observa la falta de inserción de las fibras del ligamento periodontal hacia la superficie del cemento radicular ya que este está ausente, incluso las fibras que se insertan

en la matriz osteoide son deficientes. Además, los fibroblastos del ligamento periodontal se aglomeraron observando una notable desorganización del complejo. Finalmente, con estos resultados podemos decir, que el péptido sintético CAPp-15, induce la regeneración de los tejidos periodontales (cemento, ligamento y hueso alveolar) en un defecto de tamaño crítico (3x2x1mm) en la raíz vestibular del primer molar mandibular en rata Wistar a diferencia de los dos grupos controles.



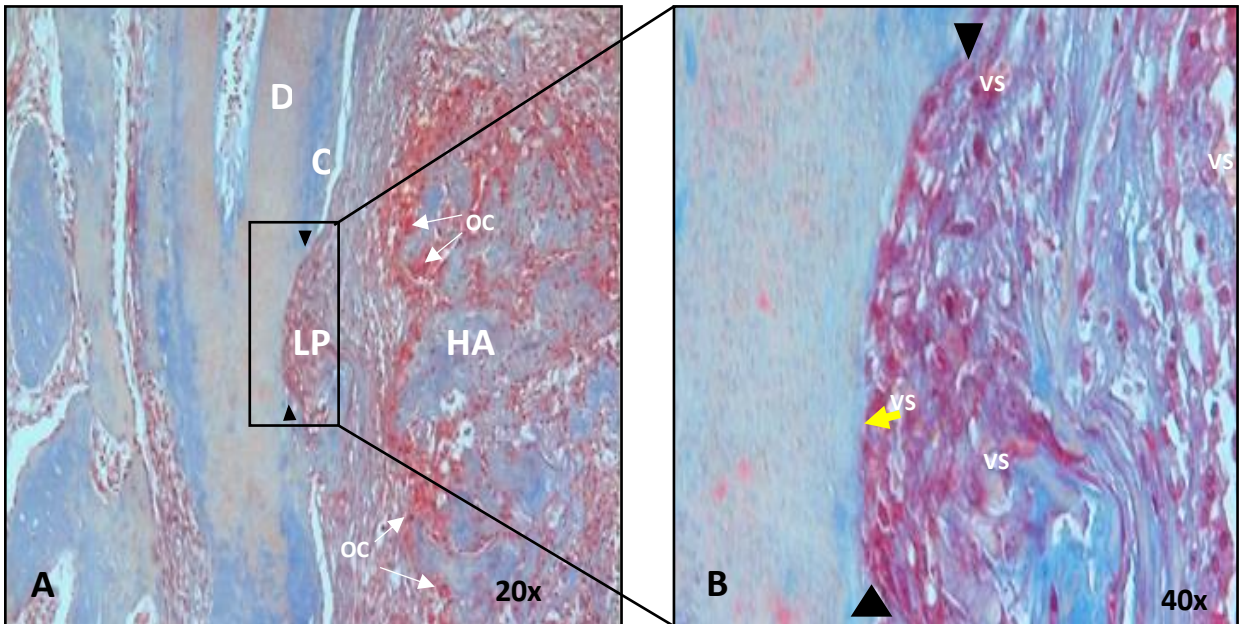
**Fig. 18:** *Imágenes histológicas representativas del grupo piloto a los 30 días posoperatorios.*

**A)** Estructuras del periodonto teñidas con tinción Tricrómica de Masson, se observa el defecto periodontal cercano a la unión cemento esmalte sobre la raíz vestibular del primer molar mandibular derecho en rata Wistar, clave de laminilla BP-110-19. **B)** Amplificación de la estructura de soporte del periodonto, las flechas negras delimitan el defecto periodontal, y la flecha amarilla señala la matriz cementoide. D- dentina, C- cemento radicular, LP- ligamento periodontal y HA- hueso alveolar. Se observa regeneración de los tejidos del periodonto.



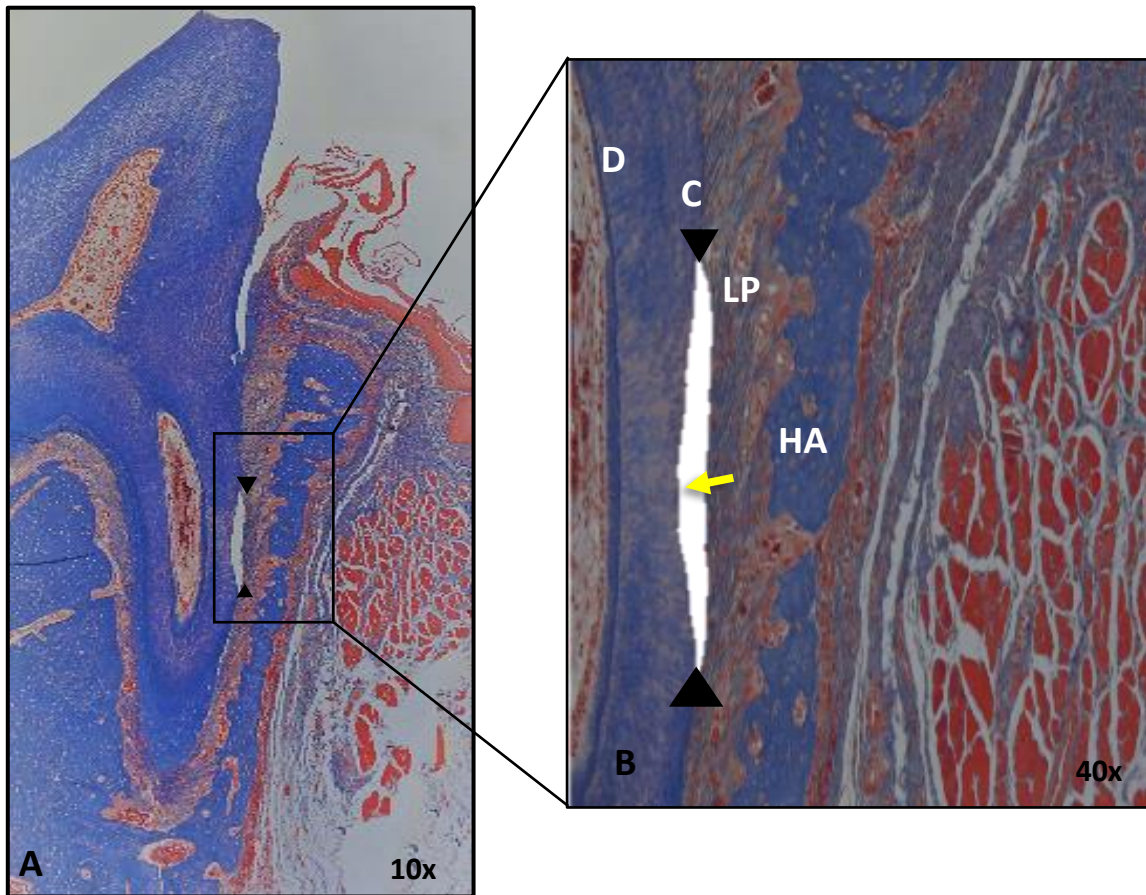
**Fig. 19:** *Imágenes histológicas representativas del grupo 1 “Experimental” a los 30 días posoperatorios.*

**A)** Estructuras del periodonto teñidas con tinción Tricrómica de Masson, se observa el defecto periodontal localizado apicalmente sobre la raíz vestibular del primer molar mandibular derecho en rata Wistar, clave de laminilla BP-168-19. D- dentina, C- cemento radicular, LP- ligamento periodontal, HA- hueso alveolar y OC- osteoclastos. **B)** Amplificación de la estructura de soporte del periodonto, las flechas negras delimitan el defecto periodontal y la flecha amarilla señala la matriz cementoide, que es completamente continua durante todo el trayecto del defecto. Se señalan estructuras celulares como fibroblastos (FB) y cementoblastos (CB), también la presencia de un cementículo (CT) y varios vasos sanguíneos (VS). Se observa la regeneración del cemento radicular iniciando con una matriz cementoide, la reorganización de las fibras del ligamento periodontal y su reinscripción tanto en la matriz cementoide, así como en la matriz osteoide.



**Fig. 20:** *Imágenes histológicas representativas del grupo 2 “Control positivo” a los 30 días posoperatorios.*

**A)** Estructuras del periodonto teñidas con tinción Tricrómica de Masson, se observa el defecto periodontal localizado apicalmente sobre la raíz vestibular del primer molar mandibular derecho en rata Wistar, clave de laminilla BP-162-20. D- dentina, C- cemento radicular, LP- ligamento periodontal y HA- hueso alveolar. Se observa una matriz osteoide hiper celular con gran actividad de osteoclastos (OC). **B)** Amplificación de la estructura de soporte del periodonto, las flechas negras delimitan el defecto periodontal y la flecha amarilla señala el cemento radicular remanente de estructura amorfa, con pérdida de la continua durante todo el trayecto del defecto, así mismo las fibras de colágena del ligamento periodontal se encuentran completamente desorganizadas. Se señalan varios vasos sanguíneos (VS). En resumen, en este grupo control positivo solo se observa una gran actividad ósea, una pérdida de la continuidad del cemento radicular y ausencia de la reinscripción de las fibras de Sharpey.



**Fig. 21:** *Imágenes histológicas representativas del grupo 3 “Control negativo” a los 30 días posoperatorios.*

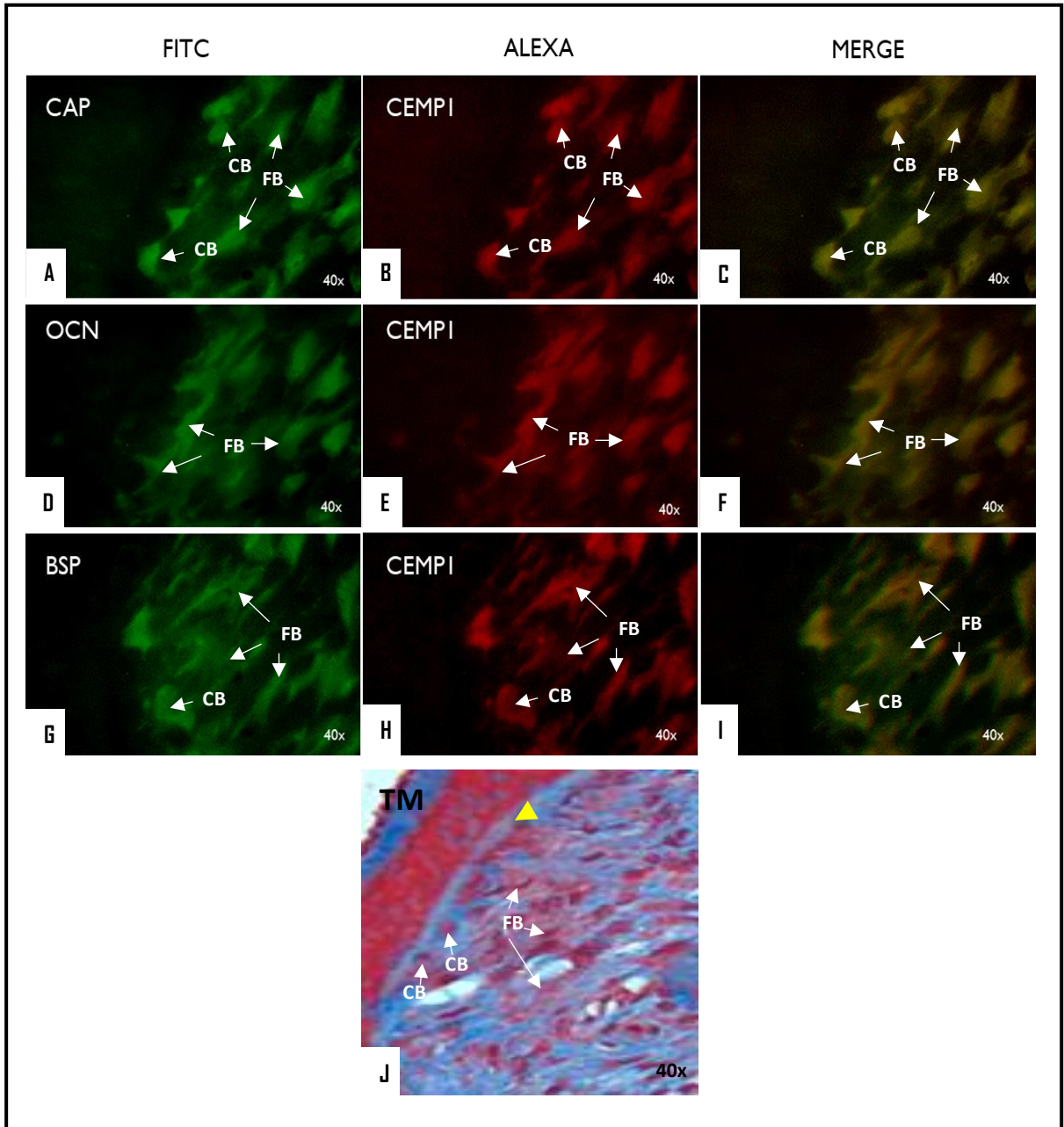
**A)** Estructuras del periodonto teñidas con tinción Tricrómica de Masson, se observa el defecto periodontal localizado apicalmente sobre la raíz vestibular del primer molar mandibular derecho en rata Wistar, clave de laminilla BP-162-20. **B)** Amplificación de la estructura de soporte del periodonto, las flechas negras delimitan el defecto periodontal y la flecha amarilla señala la pérdida de la continuidad del cemento radicular. Se observa ausencia de la reinserción de las fibras de Sharpey. D- dentina, C- cemento radicular, LP- ligamento periodontal y HA- hueso alveolar.

## 12.4 Inmunofluorescencia

Las laminillas se observaron al microscopio de epifluorescencia indirecta Axioskope II (Carl Zeiss, Alemania), se tomaron fotografías a 40x y se compararon con su correspondiente laminilla teñida con la tinción Tricrómica de Masson. Se evaluó la expresión de marcadores relacionados con el proceso de biomineralización, a los 30 días posoperatorios a través de un doble marcaje.

En el grupo1 “Experimental”, tratado con el péptido sintético CAPp-15 se expresó, HACD1/CAP, CEMP1, OCN y BSP en los cementoblastos circundantes a la matriz cementoide y en los fibroblastos ubicados en el ligamento periodontal (Figura 22: A, B, C, D, E, F, G, H e I).

Nota: A causa de la pandemia que estamos viviendo, solo pudo realizar la inmunotinción en las laminillas correspondientes al grupo 1 “Experimental”.



**Fig. 22:** *Inmunofluorescencia del grupo 1 "Experimental" a los 30 días posoperatorios.*

**A)** Estructuras del periodonto positivas a HACD1/CAP. **B, E y H)** Estructuras del periodonto positivas a CEMP1. **C)** Estructuras del periodonto positivas a HACD1/CAP y CEMP1. **D)** Estructuras del periodonto positivas a OCN. **F)** Estructuras del periodonto positivas a OCN y CEMP1. **G)** Estructuras del periodonto positivas a BSP. **I)** Estructuras del periodonto positivas a BSP y CEMP1. **J)** Fotomicrografía teñida con Tricrómica de Mason, en la zona del defecto periodontal observamos la presencia de matriz cementoide (triángulo amarillo), se señalan estructuras celulares como fibroblasto (FB) y cementoblastos (CB). Clave de laminilla BP-168-19.

### XIII. DISCUSIÓN

En los últimos años las investigaciones del péptido sintético CAPp-15, demostraron que tiene la capacidad de mimetizar algunas funciones de la proteína completa [75,80,83].

Algunos de los beneficios al usar péptidos bioactivos son que al tener una cadena corta de aminoácidos pueden ser sintetizados con mayor pureza y a menor costo, logrando usar un dominio funcional sin dificultades, al ser moléculas de menor tamaño evitan el proceso de degradación proteolítica y eliminan o disminuyen una respuesta inflamatoria causada por el sistema inmune. Esto hace que los péptidos bioactivos sean buenos candidatos para la ingeniería de tejidos, al emplearlos como moléculas de señalización, ya que tienen la capacidad de influir en el comportamiento celular, dando como resultado una mejora en la adhesión, proliferación, migración, diferenciación, angiogénesis y biomineralización celular [101]. Por ejemplo, se han empleado estos péptidos para tratar defectos óseos, como el péptido de crecimiento osteogénico (OGP) incorporado en membranas de biopolímeros de celulosa bacteriana o colágena para determinar el potencial osteoinductor *in vivo* en defectos segmentales en fémur de rata, sus resultados mostraron que indujo un mayor porcentaje de tejido óseo en el área reparada a las 2 y 4 semanas a diferencia de las otras membranas [110], también se han usado péptidos derivados de las proteínas BMP-2, BMP-7 y BMP-9 que han demostrado promover la diferenciación osteogénica *in vitro* y la formación ósea *in vivo* [111]. Otro péptido que se empleó para favorecer la regeneración ósea en un modelo de fenestración dental en perros fue el péptido análogo al dominio de unión celular de la colágena de tipo I (P-15), este se incorporó a un injerto mineral óseo inorgánico (ABM) con hialuronato de sodio, sus resultados mostraron un aumento en la formación de hueso nuevo en un 49% en comparación de los controles, aun así, no se determinó la concentración utilizada para obtener dicho resultado [112]. Como podemos darnos cuenta existen varias secuencias peptídicas capaces de inducir procesos de biomineralización osteogénica, sin embargo, lograr la regeneración de



todas las estructuras del periodonto ha sido un desafío para los investigadores, pues la clave siempre ha sido inducir la biomineralización del cemento y por ende el anclaje de las fibras de Sharpey en este tejido neoforado. Los hallazgos de este estudio muestran que el péptido sintético de 15 aminoácidos de longitud (CAPp-15) derivado de la porción C-Terminal de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) es una molécula bioactiva capaz de inducir la regeneración de los tejidos periodontales, especialmente en aquellos que insertan y soportan los dientes (cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar) al favorecer procesos de biomineralización y la síntesis de fibras colágenas. Dicha capacidad como promotor del proceso de biomineralización ha sido basada en investigaciones previas realizadas por Salgado <sup>[75]</sup> y Hernández <sup>[81]</sup> en donde demostraron a partir de estudios *in vivo*, que CAPp-15 posee la capacidad de promover la formación ósea *de novo* en tibias de conejo Nueva Zelanda y promover el proceso de remineralización en ratas cepa Wistar con osteoporosis inducida. Cabe mencionar que hace poco tiempo, nuestro grupo de trabajo ha reportado el empleo del péptido 1 derivado de la proteína del cemento 1 (CEMP-1-p1) <sup>[54]</sup>, en un modelo piloto de regeneración periodontal en rata Wistar al igual que el modelo de defecto creado en este proyecto, los resultados indicaron que a una concentración de 20µg CEMP-1-p1 favorece los procesos de regeneración periodontal, estos hallazgos encaminan nuestras investigaciones para buscar una sinergia de ambos péptidos como inductores de la regeneración de los tejidos del periodonto.

Con base en nuestros resultados, comprobamos que la homeostasis de la biomineralización periodontal es un factor clave para la estabilidad a largo plazo del complejo periodontal recién formado. Idealmente, el hueso alveolar y el cemento radicular neoforados deben estar mineralizados, pero el ligamento periodontal no debe estar mineralizado a largo plazo. Sin embargo, el ligamento periodontal regenerado puede verse influenciado por los tejidos duros circundantes, lo que lleva a una mineralización gradual, adelgazándolo y finalmente desapareciendo para causar anquilosis dental. Por lo tanto, el mantenimiento de la homeostasis en la biomineralización periodontal es fundamental para la estabilidad a largo plazo de los tejidos regenerados. Una posible solución es la estimulación mecánica en el

periodonto en regeneración, que se cree que previene la anquilosis dentoalveolar y la mineralización del ligamento periodontal <sup>[113]</sup>. Nuestro modelo de “fenestración” proporciona un defecto más estandarizado capaz de mantener intactas las fuerzas mecánicas de la masticación, ya que no se realiza ninguna intervención intrabucal y por ende no se modifican las caras oclusales de los molares, lo que disminuye la aparición de una oclusión patológica que puede conllevar a una anquilosis dental. Esto nos ha facilitado el análisis de resultados al descartar factores externos como traumas oclusales que pueden dar falsos resultados. Así mismo, Hernández <sup>[81]</sup> informo que el péptido CAPp-15 presenta propiedades biomecánicas como soporte, fuerza y resistencia a cargas mecánicas, lo que favoreció la recuperación de la función ósea, estos resultados son relevantes ya que nos hacen creer que el péptido CAPp-15 disminuye la resorción ósea y radicular en nuestro modelo de trabajo, al resistir y disipar las cargas mecánicas de la masticación dentro de los tejidos mineralizados.

En la actualidad existen una gran variedad de modelos animales que han sido usados para el estudio de la regeneración periodontal, sin embargo, los roedores han sido considerados como buenos candidatos, debido a que el costo de su cuidado y crianza es menor, también tienen un tamaño que facilita su manejo en comparación con los modelos en primates, perros y cerdos miniatura <sup>[102,103]</sup>. Una de las desventajas de usar este modelo animal durante el proyecto, es que se requiere de gran habilidad y precisión quirúrgica, así como de una buena visualización para lograr estandarizar y ejecutar el defecto periodontal en todos los grupos de animales, ya que al ser una zona quirúrgica muy reducida se corre el riesgo de afectar tejidos y estructuras anatómicas cercanas al defecto, lo cual puede alterar el resultado. Esto sucedió en dos animales durante el procedimiento quirúrgico al tener contacto con el nervio dental de la raíz vestibular, por lo cual, se eliminaron del estudio, para evitar tener resultados falsos positivos. Aun así, nuestros resultados del grupo 1 (experimental) tratados con satín más Gelfoam® y el péptido sintético CAPp-15 (Figura 19), muestran en la zona del defecto la formación continua de una matriz cementoide a los 30 días posoperatorios, el espacio del ligamento periodontal se mantuvo y la organización de sus fibras

empezaban a adquirir una dirección oblicua, en el hueso alveolar se observa una matriz osteoide hiper celular con centros azules de colágena y gran actividad de osteoclastos, característico de un hueso en formación. Además, los tejidos se encuentran altamente vascularizados e innervados, lo que promueve la formación y maduración del tejido mineralizado, permitiendo así llevar a cabo un proceso de regeneración periodontal. En la literatura se han mencionado el empleo de péptidos proangiogénicos como los péptidos miméticos del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), sin embargo, estos péptidos requieren la combinación con materiales osteogénicos para favorecer procesos de biomineralización [114].

En cuanto a los resultados obtenidos del grupo 1 (experimental) es importante enfatizar que se observa la inserción de las fibras de Sharpey del ligamento periodontal en la matriz cementoide. Al comparar este resultado con el empleo de proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) en defectos periodontales creados en dientes mandibulares de babuinos, se reportó a los 5 meses posoperatorios un aumento en el relleno oseó, así como en el grosor del cemento, pero este perdía su contacto con la dentina adyacente, así como su continuidad en ciertas zonas, a su vez se presentaron áreas con una baja inserción de las fibras de Sharpey [115]. Por lo cual, podemos decir que en el grupo experimental tratado con el péptido sintético CAPp-15, se ha obtenido la regeneración de los tejidos del periodonto en un modelo *in vivo*, con una morfología muy similar a un periodonto sano en desarrollo.

Los resultados de la técnica de inmunofluorescencia, nos permitieron identificar en el grupo 1 “experimental” tratados con 25µg/mL del péptido sintético CAPp-15, la expresión de proteínas involucradas en la formación de tejidos mineralizados como la sialoproteína ósea (BSP), lo cual demuestra que se está promoviendo la nucleación de cristales de hidroxapatita ya que la expresión temporoespacial de BSP coincide con la mineralización de hueso y de cemento radicular, esto al actuar como un quimioatrayente de precementoblastos y promover su adhesión y diferenciación. Además, permite la unión a la colágena por interacciones electrostáticas proporcionándole direccionalidad al tejido mineralizado en formación

[35,55,56]. Por otro lado, la expresión de Osteocalcina (OCN), indica la formación de tejido mineralizado durante las últimas etapas de mineralización de la matriz extracelular, esto por gran afinidad al  $\text{Ca}^{+2}$  y a la hidroxiapatita [35,59]. Por último, también se expresaron las proteínas cemento específicas como HACD1/CAP y CEMP1, esto nos asegura que en el tejido neoformado se están llevando a cabo procesos celulares como la proliferación, diferenciación, quimiotaxis y la adhesión celular, además estas proteínas han demostrado que aumentan la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), que regulan el crecimiento y la composición de los cristales de hidroxiapatita, por lo tanto inducen procesos de biomineralización, respectivamente [35,38,67,69,72,77,80]. Por lo tanto, toda esta evidencia señala que el péptido sintético CAPp15 induce la participación de estas proteínas en la neoformación de cemento radicular y hueso alveolar mediante un proceso de biomineralización. Finalmente, la presencia de HACD1/CAP en el ligamento periodontal pudiera indicar que las células del ligamento periodontal como fibroblastos o incluso las células troncales adquieren un fenotipo precursor de cementoblastos y/o osteoblastos, dando lugar a la formación de nuevo tejido mineralizado, esta idea se sustenta con los resultados obtenidos de Montoya [38].

#### **XIV. CONCLUSIONES**

Con base en los resultados, concluimos que el péptido sintético de 15 aminoácidos de longitud (CAPp-15) derivado de la porción C-Terminal de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) es una molécula bioactiva capaz de inducir los procesos de regeneración periodontal en el cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar. Demostró a los 30 días posoperatorios en la zona del defecto la formación continua de una matriz cementoide, el espacio del ligamento periodontal se mantuvo y la organización de sus fibras empezaban a adquirir una dirección oblicua, también se observó la inserción de las fibras de Sharpey en la matriz cementoide. En el hueso alveolar se observó una matriz osteoide hiper celular con centros azules de colágena y gran actividad de osteoclastos, característico de

un hueso en formación. Además, los tejidos se encuentran altamente vascularizados e inervados, lo que promueve la formación y maduración del tejido mineralizado, permitiendo así llevar a cabo los procesos de regeneración periodontal. También indujo la expresión de proteínas involucradas en la formación de tejidos mineralizados. Sin embargo, estos últimos resultados no pudieron ser comparados con los controles, por lo que se necesita concluir con estas pruebas para sustentar los hallazgos de la técnica de inmunofluorescencia. Aun así, los resultados histomorfológicos nos abren un panorama alentador en el entendimiento de los procesos de regeneración periodontal *in vivo* para dar lugar al uso del péptido sintético CAPp-15 en nuevas terapias en el área de medicina regenerativa periodontal.

## **XV. PERSPECTIVAS**

Como los resultados obtenidos se limitaron a solo 30 días posoperatorios, y durante este tiempo se inició la formación de matriz cementoide y osteoide pero no se terminó la maduración de estos tejidos, sugerimos ampliar los tiempos posoperatorios para la eutanasia, ya que suponemos que facilitaría la visualización de los tejidos completamente mineralizados. Así mismo, sugerimos realizar los mismos ensayos *in vivo*, pero ahora investigando la capacidad regenerativa de CAPp-15 en combinación con el péptido sintético CEMP-1-p1, pero como las concentraciones adecuadas para la combinación de estas moléculas bioactivas no han sido reportadas, se sugiere realizar ensayos *in vitro* a diferentes concentraciones para permitir resolver estas dudas ya que el uso excesivo o la insuficiencia de cada péptido compromete los resultados *in vivo*.

Durante el análisis de resultados, podría mejorarse la visualización y medición del defecto y de los tejidos regenerados empleando herramientas como la microtomografía computarizada.

## XVI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lindhe J, Lang N, Karring T. (2016). *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. 6ª ed. España: Panamericana; Tomo I. 3-46.
2. Carranza F, Takei H, Klokkevold P, Newman M. (2010). *Periodontología Clínica*. 10ª ed. México, Mc Graw-Hill. 4,45-61, 369, 975-1018.
3. Park C. H. (2019). Biomaterial-Based Approaches for Regeneration of Periodontal Ligament and Cementum Using 3D Platforms. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4364.
4. Nanci, A., & Bosshardt, D. D. (2006). Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000*, 40, 11–28.
5. Cho, M. I., & Garant, P. R. (2000). Development and general structure of the periodontium. *Periodontology 2000*, 24, 9–27.
6. Xiong, J., Gronthos, S., & Bartold, P. M. (2013). Role of the epithelial cell rests of Malassez in the development, maintenance and regeneration of periodontal ligament tissues. *Periodontology 2000*, 63(1), 217–233.
7. Matalová, E., Lungová, V., Sharpe, P. (2015). *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*, Chapter 26: *Development of Tooth and Associated Structures*, Ed, Academic Press, 335-346, doi.org/10.1016/B978-0-12-397157-9.00030-8.
8. Garant PR. (2003). Oral Cells and Tissues. Quintessence Books, Chapter 7: Root formation and cementogenesis. *Quintessence Publishing Co. Inc.*, 197-189.
9. Zeichner-David M. (2006). Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited. *Periodontology 2000*, 41, 196–217.
10. Thomas H. F. (1995). Root formation. *The International journal of developmental biology*, 39(1), 231–237.
11. Lindskog S. (1982). Formation of intermediate cementum. II: a scanning electron microscopic study of the epithelial root sheath of Hertwig in monkey. *Journal of craniofacial genetics and developmental biology*, 2(2), 161–169.

12. Bosshardt, D. D., & Nanci, A. (2004). Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth. *Journal of clinical periodontology*, 31(3), 184–192.
13. Arzate, H., Portilla Robertson, J., & Aguilar Mendoza, M. E. (1996). Recombination of epithelial root sheath and dental papilla cells in vitro. *Archives of medical research*, 27(4), 573–577.
14. Gómez de Ferraris M.E., Campos Muñoz A., (2019) *Histología y embriología bucodental*. 4ª ed., Madrid – España, Editorial Médica Panamericana, 317-385.
15. Saygin, N. E., Giannobile, W. V., & Somerman, M. J. (2000). Molecular and cell biology of cementum. *Periodontology 2000*, 24, 73–98.
16. Arroyo C. Santa R. Determinación del papel individual y/o sinérgico de CEMPI y CAP en el proceso de mineralización *in vitro* utilizando ARN de interferencia. (Tesis de maestría), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 2013.
17. Romo A. Enrique. Caracterización estructural de la proteína del cemento I (CEMPI) y su relación con la función biológica. (Tesis de doctorado), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 2014.
18. Sodek, J., & McKee, M. D. (2000). Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology 2000*, 24, 99–126.
19. Runyan, C. M., & Gabrick, K. S. (2017). Biology of Bone Formation, Fracture Healing, and Distraction Osteogenesis. *The Journal of craniofacial surgery*, 28(5), 1380–1389.
20. Garant PR. (2003). Oral Cells and Tissues. Quintessence Books, Chapter 5: Gingiva *Quintessence Publishing Co. Inc.*, 125-135.
21. Yuan, X., Chen, J., Grauer, J. A., Xu, Q., Van Brunt, L. A., & Helms, J. A. (2021). The Junctional Epithelium Is Maintained by a Stem Cell Population. *Journal of dental research*, 100(2), 209–216.
22. Romanos, G. E., & Bernimoulin, J. P. (1990). Das Kollagen als Basiselement des Parodonts: Immunhistochemische Aspekte beim Menschen und bei Tieren. I. Gingiva und Alveolarknochen [Collagen as a basic element of the periodontium: immunohistochemical aspects in the human and animal. I. Gingiva and alveolar bone]. *Parodontologie (Berlin, Germany)*, 1(4), 363–375.

23. Bartold, P. M., & Narayanan, A. S. (2006). Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontology 2000*, 40, 29–49.
24. Wennström, J., & Lindhe, J. (1983). Role of attached gingiva for maintenance of periodontal health. Healing following excisional and grafting procedures in dogs. *Journal of clinical periodontology*, 10(2), 206–221.
25. Tomokiyo, A., Wada, N., & Maeda, H. (2019). Periodontal Ligament Stem Cells: Regenerative Potency in Periodontium. *Stem cells and development*, 28(15), 974–985.
26. Beertsen, W., McCulloch, C. A., & Sodek, J. (1997). The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontology 2000*, 13, 20–40.
27. McCulloch, C. A., Lekic, P., & McKee, M. D. (2000). Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament. *Periodontology 2000*, 24, 56–72.
28. Barczyk, M., Bolstad, A. I., & Gullberg, D. (2013). Role of integrins in the periodontal ligament: organizers and facilitators. *Periodontology 2000*, 63(1), 29–47.
29. Liang, Y., Hu, Z., Chang, B., & Liu, X. (2020). Quantitative characterizations of the Sharpey's fibers of rat molars. *Journal of periodontal research*, 55(2), 307–314.
30. Monje, A., Chan, H. L., Galindo-Moreno, P., Elnayef, B., Suarez-Lopez del Amo, F., Wang, F., & Wang, H. L. (2015). Alveolar Bone Architecture: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of periodontology*, 86(11), 1231–1248.
31. Urban, I. A., & Monje, A. (2019). Guided Bone Regeneration in Alveolar Bone Reconstruction. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America*, 31(2), 331–338.
32. Gultekin, B. A., Bedeloglu, E., Kose, T. E., & Mijiritsky, E. (2016). Comparison of Bone Resorption Rates after Intraoral Block Bone and Guided Bone Regeneration Augmentation for the Reconstruction of Horizontally Deficient Maxillary Alveolar Ridges. *BioMed research international*, 2016, 4987437.
33. Araújo, M. G., Silva, C. O., Misawa, M., & Sukekava, F. (2015). Alveolar socket healing: what can we learn?. *Periodontology 2000*, 68(1), 122–134.
34. Feller, L., Khammissa, R. A., Schechter, I., Thomadakis, G., Fourie, J., & Lemmer, J. (2015). Biological Events in Periodontal Ligament and Alveolar Bone Associated with Application of Orthodontic Forces. *TheScientificWorldJournal*, 2015, 876509.



35. Arzate, H., Zeichner-David, M., & Mercado-Celis, G. (2015). Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontology 2000*, 67(1), 211–233.
36. Diekwisch T. G. (2001). The developmental biology of cementum. *The International journal of developmental biology*, 45(5-6), 695–706.
37. Gonçalves PF, Sallum EA, Sallum AW, Casati MZ, Toledo S, Nociti FH. (2005). Dental cementum reviewed: development, structure, composition, regeneration and potential functions. *Braz J Oral Sci*. Vol.4 - Number 12
38. Montoya A. Gonzalo. La proteína recombinante de adhesión del cemento radicular (hrCAP) induce la diferenciación de células troncales derivadas del ligamento periodontal humano y regula el proceso de mineralización in vitro. (Tesis de maestría), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 2011.
39. Arzate, H., Chimal-Monroy, J., Hernández-Lagunas, L., & Díaz de León, L. (1996). Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *Journal of periodontal research*, 31(2), 144–148.
40. Wu, D., Ikezawa, K., Parker, T., Saito, M., & Narayanan, A. S. (1996). Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 11(5), 686–692.
41. Hoz R. Lia A. Perfiles de expresión génica de células derivadas del ligamento periodontal humano in vitro tratadas con la proteína del cemento I (CEMPI). (Tesis de maestría), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 2011.
42. Bosshardt, D. D., & Schroeder, H. E. (1996). Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars. *The Anatomical record*, 245(2), 267–292.
43. Highfield J. (2009). Diagnosis and classification of periodontal disease. *Australian dental journal*, 54 Suppl 1, S11–S26.
44. Yang, T., Li, Y., Hong, Y., Chi, L., Liu, C., Lan, Y., Wang, Q., Yu, Y., Xu, Q., & Teng, W. (2020). The Construction of Biomimetic Cementum Through a Combination of Bioskiving and Fluorine-Containing Biomineralization. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 341.

45. Zhang, Y., Li, S., & Wu, C. (2014). The in vitro and in vivo cementogenesis of  $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$  bioceramic scaffolds. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 102(1), 105–116.
46. De Melo Pereira, D., & Habibovic, P. (2018). Biom mineralization-Inspired Material Design for Bone Regeneration. *Advanced healthcare materials*, 7(22), e1800700.
47. Golub E. E. (2009). Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochimica et biophysica acta*, 1790(12), 1592–1598.
48. Kirsch T. (2005). Annexins - their role in cartilage mineralization. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 10, 576–581.
49. Romo A. Enrique. Papel inductor de la proteína del cemento I recombinante humana (hrCEMPI) en el proceso de mineralización in vitro. (Tesis de maestría), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 2010.
50. Murshed M. (2018). Mechanism of Bone Mineralization. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(12), a031229.
51. Anderson H. C. (2003). Matrix vesicles and calcification. *Current rheumatology reports*, 5(3), 222–226.
52. Mercado G., Duarte N., Álvarez E., Rosa L., Wall A. (2012). Fosfatasa alcalina (E.C.3.1.3.1): bioquímica y aplicaciones en las ciencias biomédicas, ecológicas y alimentarias. *Tecnociencia Chihuahua*, 6(2), 112-122.
53. Coleman J. E. (1992). Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 21, 441–483.
54. Reyes C. Paola L. Papel regenerativo de un péptido derivado de CEMPI in vivo en un modelo piloto de defecto periodontal en ratas Wistar. (Tesis de maestría), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 2019.
55. Ganss, B., Kim, R. H., & Sodek, J. (1999). Bone sialoprotein. *Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists*, 10(1), 79–98.
56. Ogata Y. (2008). Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism. *Journal of periodontal research*, 43(2), 127–135.
57. Icer, M. A., & Gezmen-Karadag, M. (2018). The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clinical biochemistry*, 59, 17–24.

58. Zhou, H. F., Jiang, T., Li, M. Q., Ren, K., & Zhao, G. J. (2018). Osteopontin inhibits macrophage cholesterol efflux via NF- $\kappa$ B/ABCA1 pathway. *International journal of cardiology*, 268, 44.
59. Oury J., Oury F. (2018). L'os, un organe pas si inerte...Osteocalcin, a key molecule for bone endocrine functions. *Med Sci (Paris)*, 34: 54–62.
60. Zoch, M. L., Clemens, T. L., & Riddle, R. C. (2016). New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*, 82, 42–49.
61. Wei, J., & Karsenty, G. (2015). An overview of the metabolic functions of osteocalcin. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 16(2), 93–98.
62. Trombetta, J. M., & Bradshaw, A. D. (2010). SPARC/osteonectin functions to maintain homeostasis of the collagenous extracellular matrix in the periodontal ligament. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 58(10), 871–879.
63. Takada, Y., Ye, X., & Simon, S. (2007). The integrins. *Genome biology*, 8(5), 215.
64. Hynes R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6), 673–687.
65. González P., Gómez E., Arzate H. (2013). Immunolocalization of cementum specific proteins CEMPI and CAP in tumor cells. *Journal of Oral Research*.
66. Alvarez-Pérez, M. A., Narayanan, S., Zeichner-David, M., Rodríguez Carmona, B., & Arzate, H. (2006). Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone*, 38(3), 409–419.
67. Carmona-Rodríguez, B., Alvarez-Pérez, M. A., Narayanan, A. S., Zeichner-David, M., Reyes-Gasga, J., Molina-Guarneros, J., García-Hernández, A. L., Suárez-Franco, J. L., Chavarría, I. G., Villarreal-Ramírez, E., & Arzate, H. (2007). Human Cementum Protein I induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*, 358(3), 763–769.
68. Hoz, L., Romo, E., Zeichner-David, M., Sanz, M., Nuñez, J., Gaitán, L., Mercado, G., & Arzate, H. (2012). Cementum protein I (CEMPI) induces differentiation by human periodontal ligament cells under three-dimensional culture conditions. *Cell biology international*, 36(2), 129–136.

69. Komaki, M., Iwasaki, K., Arzate, H., Narayanan, A. S., Izumi, Y., & Morita, I. (2012). Cementum protein I (CEMPI) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *Journal of cellular physiology*, 227(2), 649–657.
70. Runyan, C. M., & Gabrick, K. S. (2017). Biology of Bone Formation, Fracture Healing, and Distraction Osteogenesis. *The Journal of craniofacial surgery*, 28(5), 1380–1389.
71. Alvarez Pérez, M. A., Pitaru, S., Alvarez Fregoso, O., Reyes Gasga, J., & Arzate, H. (2003). Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line. *Journal of structural biology*, 143(1), 1–13.
72. Serrano J, Romo E, Bermúdez M, Narayanan AS, Zeichner-David M, Santos L, et al. (2013) Bone Regeneration in Rat Cranium Critical-Size Defects Induced by Cementum Protein I (CEMPI). *PLoS ONE* 8(11): e78807.
73. Ikeda, M., Kanao, Y., Yamanaka, M., Sakuraba, H., Mizutani, Y., Igarashi, Y., & Kihara, A. (2008). Characterization of four mammalian 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases involved in very long-chain fatty acid synthesis. *FEBS letters*, 582(16), 2435–2440.
74. Valdés De Hoyos, A., Hoz-Rodríguez, L., Arzate, H., & Narayanan, A. S. (2012). Isolation of protein-tyrosine phosphatase-like member-a variant from cementum. *Journal of dental research*, 91(2), 203–209.
75. Salgado C. Fabiola. Inducción de la regeneración ósea en defectos óseos severos por el efecto del péptido novel derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (PTPLA/CAP). (Tesis de maestría), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 2014.
76. Valdés DH. Ana E. Expresión y caracterización de la proteína de adhesión del cemento radicular humano (hrCAP/PTPLA) en un sistema procarionte y expresión y su localización en tejidos humanos. (Tesis de doctorado), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 2011.
77. Saito, M., Iwase, M., Maslan, S., Nozaki, N., Yamauchi, M., Handa, K., Takahashi, O., Sato, S., Kawase, T., Teranaka, T., & Narayanan, A. S. (2001). Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone*, 29(3), 242–248.

78. Saito M, Narayana AS. Signaling reactions induced in human fibroblasts during adhesion to cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res.* 1999 Jan;14(1):65-72. doi: 10.1359/jbmr.1999.14.1.65. PMID: 9893067.
79. Arzate, H., Jiménez-García, L. F., Alvarez-Pérez, M. A., Landa, A., Bar-Kana, I., & Pitaru, S. (2002). Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein. *Journal of dental research*, 81(8), 541–546.
80. Montoya, G., Arenas, J., Romo, E., Zeichner-David, M., Alvarez, M., Narayanan, A. S., Velázquez, U., Mercado, G., & Arzate, H. (2014). Human recombinant cementum attachment protein (hrPTPLa/CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation in vitro and bone healing in vivo. *Bone*, 69, 154–164.
81. Hernández C. Sinaí. Péptido derivado de CAP para el tratamiento de la osteoporosis en un modelo animal. (Tesis de maestría), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 2016.
82. Ureiro C. Guadalupe. Papel de un péptido derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACDI/CAP) en la funcionalización de superficies de titanio y óxido de titanio. (Tesis de maestría), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 2020.
83. Montoya A. Gonzalo. Estudio de cristales inducidos con el péptido de la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP) en un sistema libre de células. (Tesis de doctorado), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 2015.
84. Shao, H., & Demuth, D. R. (2010). Quorum sensing regulation of biofilm growth and gene expression by oral bacteria and periodontal pathogens. *Periodontology 2000*, 52(1), 53–67.
85. Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 17038.
86. Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of clinical periodontology*, 45 Suppl 20, S149–S161.
87. Armitage G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology*, 4(1), 1–6.

88. Gerritsen, A. E., Allen, P. F., Witter, D. J., Bronkhorst, E. M., & Creugers, N. H. (2010). Tooth loss and oral health-related quality of life: a systematic review and meta-analysis. *Health and quality of life outcomes*, 8, 126.
89. Esposito, M., Grusovin, M. G., Papanikolaou, N., Coulthard, P., & Worthington, H. V. (2009). Enamel matrix derivative (Emdogain(R)) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2009(4), CD003875.
90. Needleman, I., Worthington, H. V., Giedrys-Leeper, E., & Tucker, R. (2019). WITHDRAWN: Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. *The Cochrane database of systematic reviews*, 5(5), CD001724.
91. Aichelmann-Reidy, M. E., & Reynolds, M. A. (2008). Predictability of clinical outcomes following regenerative therapy in intrabony defects. *Journal of periodontology*, 79(3), 387–393.
92. Monsarrat, P., Vergnes, J. N., Nabet, C., Sixou, M., Snead, M. L., Planat-Bénard, V., Casteilla, L., & Kémoun, P. (2014). Concise review: mesenchymal stromal cells used for periodontal regeneration: a systematic review. *Stem cells translational medicine*, 3(6), 768–774.
93. Liang, Y., Luan, X., & Liu, X. (2020). Recent advances in periodontal regeneration: A biomaterial perspective. *Bioactive materials*, 5(2), 297–308.
94. Nuñez, J., Vignoletti, F., Caffesse, R. G., & Sanz, M. (2019). Cellular therapy in periodontal regeneration. *Periodontology 2000*, 79(1), 107–116.
95. Tatullo, M., Codispoti, B., Paduano, F., Nuzzolese, M., & Makeeva, I. (2019). Strategic Tools in Regenerative and Translational Dentistry. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 1879.
96. Abou Neel, E. A., Chrzanowski, W., Salih, V. M., Kim, H. W., & Knowles, J. C. (2014). Tissue engineering in dentistry. *Journal of dentistry*, 42(8), 915–928.
97. Iwasaki, K., Komaki, M., Akazawa, K., Nagata, M., Yokoyama, N., Watabe, T., & Morita, I. (2019). Spontaneous differentiation of periodontal ligament stem cells into myofibroblast during ex vivo expansion. *Journal of cellular physiology*, 234(11), 20377–20391.

98. Caputi, S., Trubiani, O., Sinjari, B., Trofimova, S., Diomede, F., Linkova, N., Diatlova, A., & Khavinson, V. (2019). Effect of short peptides on neuronal differentiation of stem cells. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 33, 2058738419828613.
99. Tatullo, M., Marrelli, M., Shakesheff, K. M., & White, L. J. (2015). Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 9(11), 1205–1216.
100. Birbrair A. (2017). Stem Cell Microenvironments and Beyond. *Advances in experimental medicine and biology*, 1041, 1–3.
101. Bermúdez M., Hoz L., Montoya G., Nidome M., Pérez A., Romo E., Soto U., Garnica J., Aguilar M., Ramos R., Villegas C., (2021). Bioactive Synthetic Peptides for Oral Tissues Regeneration. *Frontiers in Materials*, 8, 63.
102. Kantarci, A., Hasturk, H., & Van Dyke, T. E. (2015). Animal models for periodontal regeneration and peri-implant responses. *Periodontology 2000*, 68(1), 66–82.
103. Bright, R., Hynes, K., Gronthos, S., & Bartold, P. M. (2015). Periodontal ligament-derived cells for periodontal regeneration in animal models: a systematic review. 50(2), 160–172.
104. Sun, W., Wang, Z., Xu, Q., Sun, H., Liu, X., Yang, J., & Hong, R. (2019). The treatment of systematically transplanted gingival mesenchymal stem cells in periodontitis in mice. *Experimental and therapeutic medicine*, 17(3), 2199–2205.
105. Wu, X., Qiu, W., Hu, Z., Lian, J., Liu, Y., Zhu, X., Tu, M., Fang, F., Yu, Y., Valverde, P., Tu, Q., Yu, Y., & Chen, J. (2019). An Adiponectin Receptor Agonist Reduces Type 2 Diabetic Periodontitis. *Journal of dental research*, 98(3), 313–321.
106. Alayan, J., Ivanovski, S., & Farah, C. S. (2007). Alveolar bone loss in T helper 1/T helper 2 cytokine-deficient mice. *Journal of periodontal research*, 42(2), 97–103.
107. Nakajima, K., Hamada, N., Takahashi, Y., Sasaguri, K., Tsukinoki, K., Umemoto, T., & Sato, S. (2006). Restraint stress enhances alveolar bone loss in an experimental rat model. *Journal of periodontal research*, 41(6), 527–534.
108. Padial-Molina, M., Rodriguez, J. C., Volk, S. L., & Rios, H. F. (2015). Standardized in vivo model for studying novel regenerative approaches for multitissue bone-ligament interfaces. *Nature protocols*, 10(7), 1038–1049.

109. Iwasaki, K., Nagata, M., Akazawa, K., Watabe, T., & Morita, I. (2019). Changes in characteristics of periodontal ligament stem cells in spheroid culture. *Journal of periodontal research*, 54(4), 364–373.
110. Saska, S., Pigossi, S. C., Oliveira, G., Teixeira, L. N., Capela, M. V., Gonçalves, A., de Oliveira, P. T., Messaddeq, Y., Ribeiro, S., Gaspar, A., & Marchetto, R. (2018). Biopolymer-based membranes associated with osteogenic growth peptide for guided bone regeneration. *Biomedical materials* (Bristol, England), 13(3), 035009.
111. Wang, C., Liu, Y., Fan, Y., & Li, X. (2017). The use of bioactive peptides to modify materials for bone tissue repair. *Regenerative biomaterials*, 4(3), 191–206.
112. Vastardis, S., Yukna, R. A., Mayer, E. T., & Atkinson, B. L. (2005). Periodontal regeneration with peptide-enhanced anorganic bone matrix in particulate and putty form in dogs. *Journal of periodontology*, 76(10), 1690–1696.
113. Kim, J. H., Kang, M. S., Eltohamy, M., Kim, T. H., & Kim, H. W. (2016). Dynamic Mechanical and Nanofibrous Topological Combinatory Cues Designed for Periodontal Ligament Engineering. *PLoS one*, 11(3), e0149967.
114. De Rosa, L., Di Stasi, R., & D'Andrea, L. D. (2018). Pro-angiogenic peptides in biomedicine. *Archives of biochemistry and biophysics*, 660, 72–86.
115. Cochran, D. L., King, G. N., Schoolfield, J., Velasquez-Plata, D., Mellonig, J. T., & Jones, A. (2003). The effect of enamel matrix proteins on periodontal regeneration as determined by histological analyses. *Journal of periodontology*, 74(7), 1043–1055.



## XVII. ANEXOS

**Anexo 1:** Aprobación del protocolo “REGENERACIÓN DEL DEFECTO PERIODONTAL IN VIVO, INDUCIDO A TRAVÉS DE UN PÉPTIDO DERIVADO DE LA PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO RADICULAR (CAPp-15)”, por medio del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Odontología (CICUAL-FO).



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO**



Ciudad Universitaria a 1 de mayo de 2020

**CICUAL-FO/0008.2020**  
**ASUNTO:** Estatus de protocolo

**VIRIDIANA AGUILAR SÁNCHEZ**  
**P R E S E N T E**

**Atención: Dra. Lia Alioth Hoz Rodríguez**

Por medio la presente, me permito hacer de su conocimiento que una vez puesto a revisión ante el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la Facultad de Odontología (CICUAL-FO) el protocolo denominado “**REGENERACIÓN DEL DEFECTO PERIODONTAL IN VIVO, INDUCIDO A TRAVÉS DE UN PÉPTIDO DERIVADO DE LA PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO RADICULAR (CAPP-15)**” cuenta con el estatus de “**APROBADO**” con el siguiente número asignado por el CICUAL-FO: **FO-M001-0001-2019**.

Sin más por el momento, quedo al pendiente para cualquier aclaración o duda, así mismo, pongo a su disposición el correo del CICUAL-FO: [cicual-fo@fo.odonto.unam.mx](mailto:cicual-fo@fo.odonto.unam.mx)

Saludos cordiales.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**



**MVZ. MARIO ALBERTO NIDOME CAMPOS**  
**SECRETARIO DEL CICUAL-FO**

**Anexo 2:** Para ver el video del procedimiento quirúrgico, copia el siguiente link en tu el buscador de Google.

<https://drive.google.com/file/d/1uQgUwgOZHvTDMieZB8Yu9wXbUaggL76g/view?usp=sharing>

**Anexo 3:** Tablas de seguimiento de cada uno de los animales.

Los números horizontales ordenados del 1 al 12, representan las siguientes etapas del proyecto:

1. Cirugía
2. Posoperatoria (30 días)
3. Eutanasia
4. Fijación (2 días)
5. Desmineralización (4 semanas)
6. Deshidratación (14 horas)
7. Delimitación del defecto
8. Inclusión en parafina
9. Corte
10. Tinción
11. Toma de micrografías
12. Inmunofluorescencia

No. de animal	Clave de laminilla	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Comentario
1	BP-105-19	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			Grupo 1: Piloto
2	BP-106-19	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			Grupo 1: Piloto
3	BP-107-19	•	•	•	•	•	•	•	•	•				Grupo 1: Piloto
4	BP-109-19	•	•	•	•	•	•							Grupo 1: Piloto
5	BP-110-19	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	Grupo 1: Piloto, (Figura 18)
6	BP-111-19	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			Grupo 1: Piloto
7	BP-112-19	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			Grupo 1: Se elimina, por contacto con el nervio dental
8	BP-113-19	•	•	•	•	•	•	•						Grupo 1: Se elimina, por problemas técnicos durante la delimitación del defecto
9	BP-131-19	•	•	•	•	•	•	•	•	•				Grupo 1
10	BP-132-19	•	•	•	•	•	•	•	•	•				Grupo 1

11	BP-148-19	•	•	•												Grupo 1: Se elimina, por presentar un proceso infeccioso
12	BP-153-19	•	•	•	•	•	•	•								Grupo 1: Se elimina, por problemas técnicos durante la delimitación del defecto
13	BP-154-19	•	•	•	•	•	•	•	•	•						Grupo 1
14	BP-163-20	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•					Grupo 1: Se elimina, por contacto con el nervio dental
15	BP-164-20	•	•	•	•	•	•	•	•	•						Grupo 1
16	BP-165-20	•	•	•	•	•	•	•	•	•						Grupo 2
17	BP-166-20	•	•	•	•	•	•	•	•							Grupo 1
18	BP-167-20	•	•	•	•	•	•	•	•							Grupo 1
19	BP-168-20	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			Grupo 1: (Figura 19 y 22)
20	BP-169-20	•	•	•	•	•	•	•	•							Grupo 1
21	BP-170-20	•	•	•	•	•	•	•	•							Grupo 1
22	BP-171-20	•	•	•	•	•	•	•	•							Grupo 1
23	BP-180-20	•	•	•	•	•	•	•	•							Grupo 2
24	BP-147-19	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•					Grupo 2
25	PB-149-19	•	•	•												Grupo 2: Se elimina, por presentar un proceso infeccioso
26	BP-155-19	•	•	•	•	•	•	•	•							Grupo 2
27	BP-159-20	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•					Grupo 2
28	BP-160-20	•	•	•	•	•	•	•	•							Grupo 2
29	BP-161-20	•	•	•	•	•	•	•	•							Grupo 2

30	BP-162-20	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			Grupo 2: (Figura 20)
31	BP-172-20	•	•	•	•	•	•	•	•						Grupo 2
32	BP-181-20	•	•	•	•	•	•	•	•						Grupo 2
33	BP-108-19	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•			Grupo 3: (Figura 21)
34	BP-150-19	•	•	•	•	•	•	•	•						Grupo 3
35	PB-156-19	•	•	•	•	•	•	•	•						Grupo 3
36	BP-173-20	•	•	•	•	•	•	•							Grupo 3
37	BP-174-20	•	•	•	•	•	•	•	•						Grupo 3
38	BP-175-20	•	•	•	•	•	•	•	•						Grupo 3
39	BP-176-20	•	•	•	•	•	•	•	•						Grupo 3
40	BP-177-20	•	•	•	•	•	•	•							Grupo 3
41	BP-178-20	•	•	•	•	•	•	•	•	•					Grupo 3
42	BP-179-20	•	•	•	•	•	•	•							Grupo 3