

Patricia González-Alva¹,
Eduardo Gómez-Plata²,
Higinio Arzate¹

1.- Laboratorio de Biología
Periodontal y Tejidos
Mineralizados, Facultad de
Odontología, UNAM, Cd.
Universitaria, Coyoacán, México.

2.- Departamento de Patología
Centro Oncológico Estatal,
ISSEMYN, Toluca, México.

Localización de las proteínas específicas del cemento radicular CEMP1 y CAP en células neoplásicas. *Immunolocalization of cementum specific proteins CEMP1 and CAP in tumor cells*

Resumen: Introducción: Las proteínas CEMP1 y CAP presentes en los cementoblastos y sus progenitores contribuyen a los procesos de mineralización en tejidos del ligamento periodontal, incluyendo la migración y la proliferación de fibroblastos gingivales; sin embargo su papel y relación con procesos neoplásicos no se han estudiado a profundidad. Para lograr un mejor entendimiento de la posible contribución de estas proteínas en los procesos tumorales, particularmente en las metástasis óseas, se investigó su expresión y localización en tejidos y líneas celulares de cáncer humano. Materiales y métodos: Trece casos de cáncer de próstata y mama que desarrollaron enfermedad metastásica ósea fueron analizados por medio de inmunohistoquímica; mientras que la expresión de las proteínas en dos líneas celulares de carcinoma de próstata (PC-3) y mama (MCF-7) se estudió por medio de ensayos de Western Blot. Resultados: Los tejidos de cáncer revelaron expresión citoplasmática y ocasionalmente nuclear de CAP en células tumorales y estructuras glandulares pequeñas, así como en el citoplasma de los fibroblastos estromales adyacentes al frente de invasión tumoral. En lo correspondiente a CEMP1, su expresión se localizó en el citoplasma de las células tumorales de 5 casos, pero no en el estroma. Ensayos de Western Blot mostraron expresión de CEMP1 en las células PC-3 y MCF-7; y de CAP en las MCF-7. Conclusiones: Los resultados muestran que las proteínas de cemento radicular CEMP1 y CAP se expresan en tejidos neoplásicos y células neoplásicas, y que posiblemente contribuyen en ciertas condiciones patológicas como el cáncer metastásico en humanos.

Palabras claves: CEMP1, CAP, metástasis óseas, TWIST, Runx2.

González-Alva P, Gómez-Plata E & Arzate H. Localización de las proteínas específicas del cemento radicular CEMP1 y CAP en células neoplásicas. *J Oral Res* 2013; 2(1): 11-17.

Recibido: 05/03/13 | Revisado: 26/03/13 | Aceptado: 09/04/13 | Online: 09/04/13

Contacto: Dra. Patricia González-Alva. Ciudad Universitaria 3000, Col. Copilco Universidad. Coyoacán 04360, D.F. México. Tel: +52 1 55 48999053
Email: patriciaagoa@yahoo.com.mx

Introducción.

La mayoría de las personas que padecen de cáncer desarrollan y fallecerán por metástasis en alguna parte del cuerpo, además, con frecuencia el tipo de cáncer y su lugar de origen determinan el lugar al cual se propagará¹⁻⁴. Por ejemplo, cáncer como el de mama, próstata, y pulmón son tumores primarios propensos a metastatizar a hueso^{3, 4}.

Estudios recientes sugieren que la expresión aberrante del factor de transcripción Runx2/Cbfa1, miembro de la familia Runt y regulador esencial en la diferenciación de osteoblasto/condrocito, puede estar contribuyendo en la progresión y metástasis del cáncer en humanos;

investigaciones recientes demostraron que dicho factor de transcripción puede modular la expresión de sialoproteína ósea en células de cáncer de próstata, y promover el cáncer osteolítico de mama hacia la enfermedad metastásica ósea^{1, 5, 6}.

Otro factor de transcripción que ha mostrado contribuir en el desarrollo de metástasis óseas es TWIST, su expresión en tumores primarios se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar enfermedad metastásica; aunado a lo anterior, recientemente se ha demostrado que TWIST confiere resistencia al paclitaxel en células de cáncer prostático, la cual es una droga citotóxica usada en la quimioterapia y que actúa como

inhibidor mitótico en diversos tipos de cáncer, además, TWIST promueve la progresión del mismo a través de una transición epitelio-mesenquimal^{5, 7, 8}.

La información existente parece indicar que TWIST interacciona e inhibe la actividad de la transcripción de Runx2, consecuentemente inhibe la diferenciación en osteoblastos y la formación de hueso; aunque la mayoría de los estudios sugieren que la función de TWIST es mantener el linaje osteogénico a través de la preservación de las características osteoprogenitoras de las células, así como de inhibir la diferenciación terminal de los osteoblastos, su función exacta en cánceres humanos permanece elusiva⁵.

La Proteína de Cemento 1 (CEMP1) es una proteína expresada por los cementoblastos, una subpoblación de células del ligamento periodontal y en células periféricas de los vasos localizados en el periodonto. La expresión de CEMP1 disminuye la expresión de Runx2 y osteocalcina en las células del ligamento periodontal, mismas que expresan TWIST; además de incrementar la expresión de la sialoproteína ósea y la mineralización en fibroblastos gingivales⁹.

Por otro lado la Proteína de Adhesión al Cemento (CAP), es considerada como una proteína específica de cemento presente en la matriz madura de cemento radicular en el periodonto adulto y en los cementoblastos, además, las células progenitoras del ligamento periodontal estimuladas con CAP expresan fosfatasa alcalina y forman tejidos mineralizados *in vitro*^{9, 10}.

La formación de tejidos mineralizados estimulada por CEMP1 y CAP se ha atribuido a la modulación de moléculas regulatorias en fibroblastos⁹⁻¹², dicho proceso puede ser crucial en el metabolismo óseo.

A pesar de que existe abundante información acerca de los efectos de CEMP1 y CAP y de la interacción de estas dos proteínas con los factores de transcripción TWIST y Runx2 en tejidos periodontales, la contribución de estas dos proteínas específicas de cemento no ha sido estudiada en los procesos neoplásicos.

Cabe mencionar que aún cuando TWIST y Runx2 son reconocidos en el campo del cáncer por sus propiedades oncogénicas, la mayoría de los estudios realizados sobre estos dos factores de transcripción se relacionan con el cáncer de próstata y de mama, probablemente basados en la idea que las células de cáncer dependen de los mecanismos involucrados con el mimetismo óseo.

Tomando en cuenta la información anterior y con el fin de lograr un mejor entendimiento de las alteraciones en el metabolismo óseo que se presentan en procesos neoplásicos, y considerando que actualmente muchos de los factores que causan metástasis ósea no se han identificado aún, se examinó inmunohistológicamente la localización de proteínas específicas del cemento radicular en tumores de próstata

y mama, así como la expresión de las mismas en dos líneas celulares neoplásicas.

Materiales y métodos.

El presente estudio fue aprobado por el comité de bioética del Centro Oncológico Estatal ISSEMYN, siguiendo los lineamientos establecidos por la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos, y respetando las Normas actualizadas de la Declaración de Helsinki, con el número de registro COE-RPI-2012-01.

Recolección de muestras: Se obtuvieron un total de 13 casos fijados y montados en parafina del archivo del Departamento de Patología del Centro Oncológico ISSEMYN, comprendiendo el periodo del año 2005 al 2012. Los especímenes incluían 8 casos de carcinoma de próstata, de alto grado con escala de Gleason mayor a 7; y 5 carcinomas canaliculares de mama de alto grado de malignidad (Tabla 1). Los casos fueron de tumores primarios que desarrollaron metástasis a hueso (30.8%) o de tumores con metástasis óseas al momento del diagnóstico (69.3%).

La enfermedad metastásica fue establecida en base a las características clínicas, y/o radiográficas, incluyendo la tomografía computarizada y gammagrafía ósea, de manera individual o en conjunto.

Los casos fueron seleccionados de manera consecutiva, siendo los criterios de exclusión: tumores que no evolucionaron a enfermedad metastásica ósea, terapia oncológica previa para cáncer de mama o próstata y tejido insuficiente para análisis inmunohistoquímico.

Los datos clínicos y la historia de seguimiento fueron consultados de la base de datos del hospital. El rango de edad de los pacientes fue de entre 53 y 85 años de edad (promedio: 67.3 años); la información clínica se enlista en la Tabla 1.

Preparación de Tejidos: Una vez que los especímenes fueron extraídos del archivo, los bloques de parafina se cortaron para un subsecuente examen histológico y selección para análisis inmunohistoquímico.

Cortes seriados fueron desparafinizados y sumergidos en metanol con 0.3% (v/v) de peróxido de hidrógeno por 15 minutos a temperatura ambiente para bloquear la actividad endógena de la peroxidasa; después de lavarlos en agua corriente y una solución salina tamponada (PBS, pH 7.4) se les sumergió en buffer de citrato al 0.01M (pH 6.0) y se trataron en un horno de microondas por 5 minutos a alta potencia, y 15 minutos a baja potencia para recuperación del antígeno.

Posteriormente, los cortes fueron incubados por 30 minutos con albúmina de suero bovino (BSA) libre de IgG al 2% para bloquear reacciones inespecíficas.

Anticuerpos primarios policlonales previamente diluidos y seleccionados de la siguiente manera: anti-CEMP1 (dilución 1:100), anti-CAP (dilución 1:100), anti-TWIST (H-81; Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA, dilución 1:100), anti-Runx2 (M-70; Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA, dilución 1:100), fueron aplicados a cada sección durante una noche a 4° C.

Los anticuerpos policlonales conejo antihumano-CEMP-1 y conejo antihumano-CAP fueron previamente sintetizados en nuestro laboratorio por Perez *et al.*¹³ y por Valdés De Hoyos *et al.*¹⁴ respectivamente, la especificidad de los anticuerpos fue comprobada por inmunoblotting.

A continuación los cortes fueron lavados, incubados y revelados con el kit ImmunoCruz Rabbit (SC-2051; Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante; posteriormente los núcleos se contrastaron con Hematoxilina de Philips. Los cortes fueron incubados con 2% BSA/PBS en lugar de los anticuerpos primarios como control negativo, y se confirmó que no estuvieran teñidos.

La reacción inmunohistoquímica de los anticuerpos fue evaluada por su extensión e intensidad, lo cual se estatifico con una escala arbitraria de tres grupos, (-) negativo, (+) pobre a moderadamente positivo, y (++) fuertemente positivo.

Ensayos de Western Blot: Los detalles de los procedimientos experimentales se prepararon de acuerdo a lo previamente descrito por Álvarez Pérez *et al.*¹² y por Carmona *et al.*¹. Brevemente, líneas celulares de cáncer humano de mama MCF-7, y de cáncer osteolítico de próstata (American type culture collection, Manassas, VA) se mantuvieron en DMEN (Dulbecco's modified Eagle's médium) suplementadas con 10% de suero fetal bovino (FBS), y antibióticos (streptomycin 100mg/ml, penicilina 100 unidades/ml). Los cultivos celulares se mantuvieron en una atmósfera con 95% de aire/5% de CO₂ a 37° C y humedad del 100%, hasta alcanzar aproximadamente un 80% de confluencia, posteriormente las células se lavaron con PBS frío para agregarles buffer de lisis (0.05 M Tris-HCl pH 7.4, 0.15 M NaCl, 1 mM PMFS, 1% Triton X-100, 10mM fluoruro de sodio, cOmpete EDTA-free Roche Diagnostics, Indianapolis USA) y se extrajeron con una espátula flexible y centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm. Después, al pellet obtenido se le centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos a 4° C, las muestras precipitadas fueron extraídas y almacenadas a -20° C.

Tipo Histológico	Sexo	Edad	Tipo	Lugar de Metástasis	Metástasis extra óseas
1. Carcinoma Canalicular	F	65	MD	Columna dorsal	Pulmón, hígado
2. Carcinoma Canalicular	F	65	MD	Costillas	
3. Carcinoma Canalicular	F	56	P	Columna dorsal y vertebral	
4. Carcinoma Canalicular	F	53	P	Cráneo, clavícula, arcos costales, columna dorsal, rama isquio pubiana	
5. Carcinoma Canalicular	F	55	MD	Cráneo, esternón, humero, omoplató, columna dorsal, parrilla costal, articulación sacro-iliaca	
6. Carcinoma Acinar	M	67	MD	Columna lumbar	
7. Carcinoma Acinar	M	72	P	Cráneo, esternón, columna vertebral, arcos costales, pelvis, fémur	
8. Carcinoma Acinar	M	70	MD	Columna vertebral, arcos costales, articulación sacro-iliaca, fémur	
9. Carcinoma Acinar	M	85	MD	Columna dorsal y lumbar, articulación sacro-iliaca	
10. Carcinoma Acinar	M	72	MD	Cráneo, esternón, parrillas costales, pelvis, fémur	
11. Carcinoma Acinar	M	77	P	Arcos costales, columna vertebral, fémur	
12. Carcinoma Acinar	M	64	MD	Noveno arco costal	Cerebro
13. Carcinoma Acinar	M	74	MD	Médula ósea	

Edad media de los pacientes 67.3 años. MD; tumor con metástasis al momento del diagnóstico, P; tumor primario.

Tabla 1.

Características clínicas e histopatológicas de los pacientes.

La concentración de proteína fue determinado por medio de espectrofotómetro V.3, NP-1000 (Nano Drop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) de acuerdo a las instrucciones del proveedor; para cada anticuerpo (CEMP1 y CAP), cantidades iguales de proteína (20µg) fueron cargas en geles de policrilamida SDS-PAGE al 12%.

Finalmente las proteínas fueron transferidas por medio de electroforesis a membranas de nitrocelulosa Immobilon-P PVDF (millipore, Bredfor, MA). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% durante 1 h; seguida de la incubación por una noche con los anticuerpos policlonales recombinantes humanos CEMP, CAP; o la proteína de referencia GAPDH (FL-335; Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA) para control interno.

Después de lavar las membranas se les agregó el anticuerpo secundario IgG-anticonejo-HRP conjugado con peroxidasa (sc-2030, cabra anti-conejo IgG-HRP; Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA) por 1 h, en seguida, se lavaron con PBS y se revelaron con solución de 12.5% de diaminobenzidina, 5% de cloruro de níquel y 2.5% de peróxido de hidrógeno.

Resultados.

Independientemente de la intensidad de la reacción inmunohistoquímica, los 13 casos examinados eran positivos para CAP; el patrón de tinción se observó principalmente en el citoplasma de las células tumorales y de las estructuras glandulares (Figura 1A y 1B), además de una expresión ocasional en el núcleo. La

expresión de CAP también se observó en los fibroblastos estromales adyacentes al frente de invasión tumoral; y cerca de las células tumorales individuales, dichos fibroblastos eran en su mayoría morfológicamente largos, abultados y con citoplasma de forma ahusada

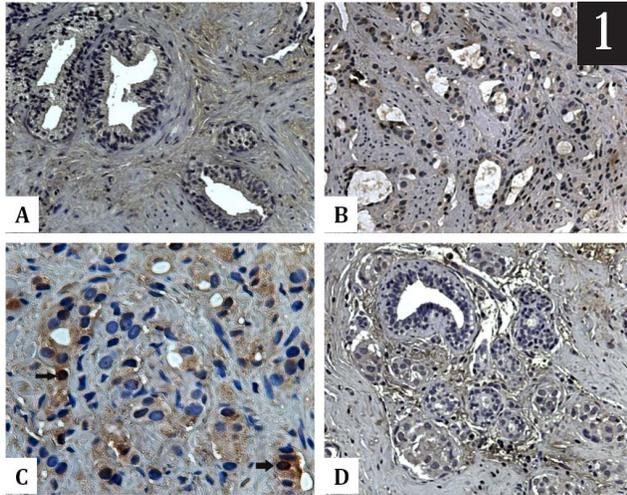


Figura 1

Reacción inmunohistoquímica de CAP (A,B,C,D). A, expresión citoplasmática moderada en células tumorales y estructuras glandulares pequeñas de carcinoma de próstata, así como en fibroblastos morfológicamente grandes, abultados y con citoplasma ahusado (20X). B, carcinoma acinar de próstata con reacción citoplasmática positiva (20X). C, carcinoma acinar de próstata algunas células tumorales presentan reacción nuclear para CAP (flechas, 40X). D, escasa reacción positiva en células tumorales en carcinoma canalicular en el frente invasivo del tumor, acompañado de una fuerte reacción del estroma tumoral para la proteína (20X).

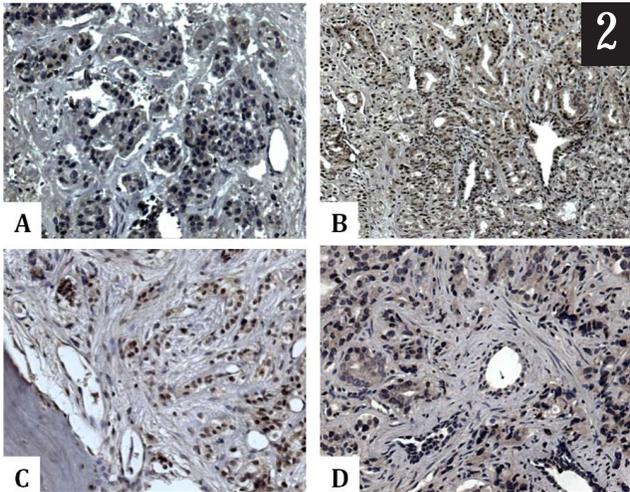


Figura 2

Reacción inmunohistoquímica de CEMP1 (A), TWIST (B,C) y Runx2 (D) en tejidos de cáncer. A, Carcinoma canalicular infiltrante de mama tratado con CEMP1, la expresión citoplasmática es pobre a moderadamente positivo en células tumorales, el estroma es negativo para la proteína (10X). B, Expresión de TWIST en carcinoma de próstata con expresión fuerte y generalizada en células tumorales y reacción nuclear ocasional (10X). C, expresión de TWIST en carcinoma de mama, las células adyacentes a tejido óseo muestran una reacción positiva (20X). D, expresión citoplasmática difusa de Runx2 en células tumorales de carcinoma de próstata, algunos fibroblastos estromales presentan una reacción débil para la proteína (20X).

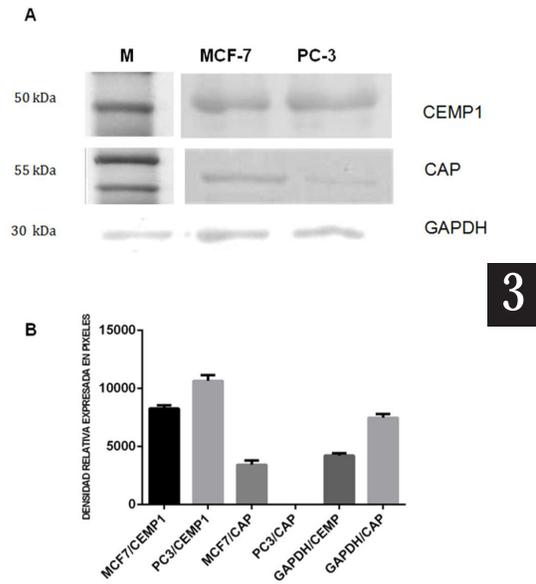


Figura 3

A) Western Blots para la detección de CEMP1 y CAP en las líneas celulares de carcinoma de próstata (PC-3) y mama (MCF-7). M, marcador de peso molecular. B) Análisis de la densidad de bandeos de los Westerns Blots

(Figura 1C y 1D). No hubo diferencias significativas en el patrón de tinción de los tumores primarios y los tumores metastásicos al momento del diagnóstico.

La proteína CEMP1 fue detectada principalmente en el citoplasma de células neoplásicas en nichos tumorales pequeños y estructuras glandulares de dos tumores de mama y tres de próstata (Figura 2A). Tres fueron primarios y tres metastásicos al momento del diagnóstico. Las células estromales no presentaron reacción positiva para CEMP1, no se encontró diferencias entre el patrón de tinción o la intensidad de los tumores primarios comparados con los metastásicos.

El análisis inmunohistoquímico de TWIST (H-81) en los tejidos de cáncer examinados reveló expresión positiva para la proteína en 8 casos, 5 de cáncer de próstata y 3 de mama (Figura 2B). La localización fue principalmente intracelular citoplasmática y ocasionalmente nuclear; las células estromales fueron en su mayoría negativas para el anticuerpo. Sin embargo, los casos con metástasis al momento del diagnóstico mostraron una reacción positiva para TWIST en las células adyacentes a tejidos óseos (Figura 2C).

Los 8 tumores positivos para TWIST constituyen el 69.2% de la muestra, solo un tumor era primario, dicho tumor fue fuertemente positivo para el anticuerpo y la expresión nuclear fue más conspicua que en los otros tumores positivos para TWIST (Figura 2B).

La expresión de la proteína Runx2 se observó en seis casos (46.2%), cuatro de próstata y dos de mama, la localización fue citoplasmática en células tumorales

individuales, en nichos tumorales y estructuras glandulares pequeñas (Figura 2D); en general, la intensidad de la reacción fue de pobre a moderada en todos los casos; también se observó una reacción difusa en los fibroblastos estromales en 3 de los tumores examinados. Solo dos tumores fueron primarios, y cuatro presentaban metástasis al momento del diagnóstico.

Además del análisis inmunohistoquímico en tumores de cáncer, los ensayos de Western Blot revelaron la expresión de la proteína CEMP1 y CAP en la línea osteolítica de cáncer de próstata PC-3 y la de mama MCF-7, y la de CAP en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (Figura 3).

Discusión.

En general, las proteínas CAP y CEMP1 son consideradas como proteínas específicas del cemento radicular y los cementoblastos, y que están involucradas en el proceso de mineralización de las células del ligamento periodontal; CAP por ejemplo, es una colágena que participa en la formación de la matriz del cemento radicular, pero no en la formación de tejidos fibrosos en el periodonto^{9, 15}.

Por otro lado, la proteína CEMP1, se expresa en cementoblastos y sus progenitores, induciendo mineralización en fibroblastos gingivales^{11, 12}, además de ser capaz de reducir la diferenciación osteoblástica de las células del ligamento periodontal *in vitro*⁹. Particularmente, la sobre-expresión de CEMP1 disminuye la expresión de CAP y del marcador osteoblástico Runx2 en células del ligamento periodontal, y contrariamente lo incrementa en fibroblastos gingivales humanos *in vitro*; además, las células de ligamento periodontal expresan TWIST, factor de transcripción que regula la diferenciación osteoblástica y la mineralización^{9, 16}.

La relación que existe entre CEMP1, CAP, Runx2 y TWIST, así como la relación de estas moléculas con el proceso de mineralización fueron algunas de las razones por la que se decidió examinar la expresión de las proteínas específicas de cemento en tejidos de cáncer metastásico. Sin embargo, la mayoría de los estudios de cáncer que involucran a Runx2, Twist y la enfermedad metastásica han sido realizados en el contexto de cáncer de próstata y mama, probablemente sobre la idea de que la frecuente diseminación de células cancerosas mamarias y prostáticas a hueso puede depender de los mecanismos involucrados en el mimetismo óseo. Por lo anterior, se decidió trabajar en cáncer de próstata y mama, antes que en cáncer metastásico de cabeza y cuello.

En el presente estudio, la proteína CAP se localizó predominantemente en el citoplasma, y ocasionalmente en el núcleo de las células epiteliales tumorales de especímenes de cáncer de próstata y mama que eventualmente evolucionaron a enfermedad metastásica ósea o fueron

metastásicos al momento del diagnóstico. Todos los tejidos de mama eran casos de alto grado de malignidad, y los de próstata tenían una escala Gleason mayor a 7.

Las células estromales de los casos examinados también fueron positivas para CAP, particularmente, los fibroblastos con una morfología predominantemente abusada de tamaño grande y citoplasma abultado.

Los fibroblastos presentes en el estroma tumoral son importantes en el desarrollo y la progresión de los carcinomas por la interacción que tienen con las células epiteliales¹⁷, se ha propuesto que estos exhiben un amplio rango de activación, y que fibroblastos morfológicamente grandes, alargados y semejantes a células mesenquimales generalmente expresan actina a de músculo liso (a-SMA), dichos fibroblastos son conocidos también como miofibroblastos asociados a cáncer (FAC)¹⁸.

Inesperadamente, se encontró que la expresión de CAP era más frecuente en las células estromales que en las células tumorales de próstata y mama, además, la expresión de la proteína no era frecuente en el estroma de tejidos mamarios o prostáticos no cancerosos. Las células estromales positivas para CAP eran fibroblastos grandes, abultados y con citoplasma abusado, adyacentes al frente invasivo de los nichos tumorales, por otro lado, los fibroblastos pequeños con citoplasma ondulado no mostraban reacción por la proteína CAP en ninguno de los casos examinados.

Aun cuando no se examinó la expresión de a-SMA, la morfología histológica de los fibroblastos que expresan CAP en conjunto con los resultados presentados en este estudio sugieren que CAP pudiera ser considerado como un marcador de FAC en cáncer de próstata y mama, y que posiblemente estas células contribuyan con un efecto sinérgico con las células tumorales promoviendo la progresión de cáncer de mama y próstata, así como al proceso de metástasis óseas.

En el caso de CEMP1, los seis tumores positivos para la proteína presentaron una expresión citoplasmática, sin diferencias significativas entre tumores primarios y metastásicos, o entre cáncer de mama y próstata. Estudios previos han demostrado que CEMP1 contribuye a disminuir la expresión de marcadores relacionados con la mineralización como Runx2 y osteocalcina en células del ligamento periodontal^{9-11, 19}. La contribución de CEMP1 en la formación de tejidos mineralizados a través de la modulación de moléculas en los fibroblastos, debe constituir un proceso importante en el metabolismo óseo, y quizás sea capaz de estimular otras funciones y procesos celulares en células malignas en todos los estadios de la tumorigénesis, particularmente en aquellos tumores que evolucionan a una enfermedad metastásica ósea.

La localización citoplasmática de CEMP1 podría estar relacionada con una remodelación en el citoesqueleto de las células tumorales, sin embargo, nuestra muestra

de tumores es pequeña, y es difícil sacar conclusiones concretas de los datos aquí presentados.

Los resultados revelaron la expresión de CAP y CEMP1 en tejidos de cáncer de próstata y mama que eventualmente desarrollaron metástasis a hueso, dichas proteínas habían sido consideradas como específicas de cemento; el presente estudio parece ser el primero en identificarlas en tejidos de cáncer en humanos.

La expresión de la proteína CEMP1 en las líneas celulares PC-3 y MCF-7, y la de CAP en la MCF-7 parecen corroborar que las proteínas de cemento radicular se encuentran expresadas en células neoplásicas; examinar diferentes líneas celulares ampliaría información acerca de la expresión de estas proteínas en cáncer en humanos.

Las metástasis óseas han sido ligadas a una alteración del metabolismo óseo, en el caso de los cánceres de próstata y mama, se ha descrito especialmente el mimetismo óseo, el cual consiste en la adquisición de un fenotipo tipo osteoblástico por parte de las células tumorales, así como de la adquisición de varios factores óseos importantes²⁰.

La adquisición del mimetismo óseo ha sido considerado como una causa importante en la progresión del cáncer a enfermedad metastásica ósea, ya que permite a las células epiteliales de cáncer resistir y proliferar dentro del hueso; por ejemplo, uno de los factores más importantes durante la adquisición del mimetismo óseo es Runx2, ya que tiende a modular la expresión de la sialoproteína ósea en cáncer de próstata, además de promover la metástasis ósea en cáncer de mama^{21, 22}.

Por otro lado el factor de transcripción TWIST ha demostrado que interactúa e impide la actividad de Runx2, promoviendo la inhibición de la diferenciación osteoblástica y la formación de hueso; además, una disminución en TWIST ha mostrado disminuir la expresión de osteocalcina^{5, 8}. La relación de TWIST y Runx2, así como su contribución a la progresión del cáncer ha sido estudiada en diferentes tumores²³, además, TWIST ha sido reportado como un promotor de metástasis y que correlaciona con un mal pronóstico clínico⁵.

El presente estudio reveló que la expresión de TWIST estaba presente en el 69.2% de los casos, y que la dicha expresión estaba limitada a un reducido número de células; los resultados de cierta manera concuerdan con los reportados por Yuen *et al.*⁸, quienes encontraron que 63.9% de los casos de cáncer de próstata examinados eran positivos para Twist, de igual manera la expresión predominantemente citoplasmática y esporádicamente nuclear, con poca o sin expresión en el estroma tumoral fue la misma encontrada por dichos investigadores.

Solo el 46.2% de los casos examinados fueron positivos para la proteína Runx2, no se encontraron diferencias significativas entre tumores primarios y aquellos

que fueron metastásicos al momento del diagnóstico, tampoco se encontró correlación entre la expresión de Runx2 y otras proteínas examinadas o parámetros clínicos, aunque esto podría estar influenciado por el tamaño de la muestra.

El factor de transcripción Runx2 es crítico para la regulación de genes que mantienen la formación de hueso, tumores que han metastatizado a hueso generalmente presentan anomalías en la expresión de este factor; además de que su expresión en diferentes líneas celulares que metastatizan a hueso está bien documentada^{24, 25}.

La osteopontina y la sialoproteína ósea son proteínas de matriz ósea y cuya expresión ha sido encontrada en diferentes tipos de cáncer con propensión a formar metástasis en huesos, y están asociadas con una baja supervivencia a la enfermedad; ambas proteínas están influenciadas por la expresión de Runx2 y TWIST en células de cáncer de mama y próstata¹.

En el presente estudio encontramos un grupo de casos que presentaba una expresión anormal de ambos factores en cáncer de próstata y mama, sin embargo, es necesario un análisis más profundo de la correlación entre los parámetros clínicos, así como de mayor número de casos antes de establecer cualquier conclusión.

La información existente acerca de estos dos factores de transcripción Runx2 y TWIST, en conjunto con la recolectada en el presente estudio, sugiere que la expresión de factores de transcripción relacionados con los osteoblastos y de proteínas de matriz ósea en cáncer en humanos proporciona un cierto mecanismo a las células de cáncer de mama y próstata que facilita la adhesión y la metástasis a hueso de las mismas^{21, 22}.

Los mecanismos responsables por el crecimiento de células tumorales dentro del hueso son complejos, y probablemente involucra una estimulación de osteoclastos y osteoblastos por parte del tumor, así como de una respuesta por parte del microambiente tumoral²⁶.

En base a los datos obtenidos, podría ser relevante discutir en detalle los mecanismos de acción entre las proteínas CEMP1 y CAP, y su relación con factores de transcripción relacionados con el metabolismo óseo como TWIST y Runx2. Sin embargo, la información del presente estudio simplemente sugiere que las proteínas CEMP1 y CAP previamente consideradas como específicas del cemento radicular no son enteramente específicas del mismo, que se encuentran expresadas en otros tejidos malignos en humanos, y que pueden estar involucradas en condiciones patológicas como cáncer de mama y próstata.

Agradecimientos.

Agradecemos la colaboración del T.H. Andrés Reyes Montes en la preparación de las muestras de tejido empleados en el presente estudio.

Abstract: Introduction: CEMP1 and CAP are recognized as cementum proteins, they appear to be limited to cementoblasts and their progenitors, and participate in the mineralization process of periodontal ligament tissues, including the proliferation and migration of periodontal ligament fibroblasts. However, their contribution in neoplastic processes had not been explored. In the present study, we investigated their protein expression and localization in cancer tissues and cells. Materials and Methods: CEMP1 and CAP expressions were analyzed immunohistochemically in 13 cancer cases with bone metastasis. In addition, Western Blot essays were used to detect expression of the proteins in the prostate (PC-3) and mama (MCF-7) cancer cell lines. Results: CAP expression was detected in all tissues examined. Strong cytoplasmic and rarely nuclear staining was found in small tumor nests, glandular structures and, in the stromal fibroblasts at the immediate vicinity of the tumor nests. CEMP1 was found in the cytoplasm of tumor cells in 5 cases, but its expression was negative in the stromal tissues. Also, cancer lines PC-3 and MCF-7 showed CEMP1 expression; however, CAP expression was observed only in MCF-7 cells. Conclusions: The results suggest that CEMP1 and CAP are present in tissues other than cementum and possibly contribute to pathological conditions such as metastatic cancer.

Keywords: CEMP1, CAP, metástasis óseas, TWIST, Runx2.

Referencias.

1. Pratap J, Lian JB, Javed A, Barnes GL, van Wijnen AJ, Stein JL. Regulatory roles of Runx2 in metastatic tumor and cancer cell interactions with bone. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25(4): 589-600.
2. Mundy GR. Metastasis to bone: Causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nature Rev Cancer.* 2002;2(8): 584-93.
3. Suva LJ, Washam C, Nicholas RW, Griffin RJ. Bone metastasis: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nature Rev Endocrinol.* 2011;7(4):208-18.
4. Coleman RE. Prevention and treatment of bone metastases. *Nature Rev Clinical Oncol.* 2012;9(2):76-8.
5. Yuen HF, Kwok WK, Chan KK, Chua CW, Chan YP, Chu YY. TWIST modulates prostate cancer cell-mediated bone cell activity and is upregulated by osteogenic induction. *Carcinogenesis.* 2008;29(8):1509-18.
6. Saad F, Clarke N, Colombel M. Natural history and treatment of bone complications in prostate cancer. *Eur Urol.* 2006;49(3):429-40.
7. Yu L, Li H-z, Lu S-m, Tian J-j, Ma J-k, Wang H-b. Down-regulation of TWIST decreases migration and invasion of laryngeal carcinoma Hep-2 cells by regulating the E-cadherin, N-cadherin expression. *J Cancer Res Clinical Oncol.* 2011;137(10): 1487-93.
8. Yuen HF, Chua CW, Chan YP, Wong YC, Wang X, Chan KW. Significance of TWIST and E-cadherin expression in the metastatic progression of prostatic cancer. *Histopathology.* 2007;50(5): 648-58.
9. Komaki M, Iwasaki K, Arzate H, Narayanan AS, Izumi Y, Morita I. Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *J Cellular Physiol.* 2012;227(2):649-57.
10. Arzate H, Olson SW, Page RC, Gown AM, Narayanan AS. Production of a monoclonal-antibody to an attachment protein derived from human cementum. *Faseb J.* 1992;6(11):2990-5.
11. Carmona-Rodriguez B, Alvarez-Perez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, Molina-Guarneros J. Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Comm.* 2007;358(3):763-9.
12. Perez MAA, Pitaru S, Fregoso OA, Gasga JR, Arzate H. Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line. *J Structural Biol.* 2003;143(1):1-13.
13. Alvarez Perez MA, Pitaru S, Alvarez Fregoso O, Reyes Gasga J, Arzate H. Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line. *J Structural Biol.* 2003;143(1):1-13.
14. De Hoyos AV, Hoz-Rodriguez L, Arzate H, Narayanan AS. Isolation of Protein-Tyrosine Phosphatase-like Member-a Variant from Cementum. *J Dent Res.* 2012;91(2):203-9.
15. Saito M, Iwase M, Maslan S, Nozaki N, Yamauchi M, Handa K. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone.* 2001;29(3):242-8.
16. Komaki M, Karakida T, Abe M, Oida S, Mimori K, Iwasaki K, Noguchi K, Oda S, Ishikawa I. Twist negatively regulates osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. *J Cellular Biochem.* 2007;100(2):303-14.
17. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature Rev Cancer.* 2006;6(5): 392-401.
18. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - Bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Rev Cancer.* 2004;4(11): 839-49.
19. Hoz L, Romo E, Zeichner-David M, Sanz M, Nunez J, Gaitan L, Mercado G, Arzate H. Cementum protein 1 (CEMP1) induces differentiation by human periodontal ligament cells under three-dimensional culture conditions. *Cell Biol Int.* 2012;36(2):129-36.
20. Koeneman KS, Yeung F, Chung LWK. Osteomimetic properties of prostate cancer cells: A hypothesis supporting the prediction of prostate cancer metastasis and growth in the bone environment. *Prostate.* 1999;39(4):246-61.
21. Barnes GL, Javed A, Waller SM, Kamal MH, Hebert KE, Hassan MQ, Bellahcene A, Van Wijnen AJ, Young MF, Lian JB, Stein GS, Gerstenfeld LC. Osteoblast-related transcription factors Runx2 (Cbfa1/AML3) and MSX2 mediate the expression of bone sialoprotein in human metastatic breast cancer cells. *Cancer Res.* 2003;63(10):2631-7.
22. Barnes GL, Hebert KE, Kamal M, Javed A, Einhorn TA, Lian JB, Stein GS, Gerstenfeld LC. Fidelity of Runx2 activity in breast cancer cells is required for the generation of metastases-associated osteolytic disease. *Cancer Res.* 2004;64(13):4506-13.
23. Sung CO, Lee K-W, Han S, Kim S-H. Twist1 Is Up-Regulated in Gastric Cancer-Associated Fibroblasts with Poor Clinical Outcomes. *Am J Pathol.* 2011;179(4):1827-38.
24. Javed A, Barnes GL, Pratap J, Antkowiak T, Gerstenfeld LC, van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB, Stein GS. Impaired intranuclear trafficking of Runx2 (AML3/CBFA1) transcription factors in breast cancer cells inhibits osteolysis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(5):1454-9.
25. Inman CK, Shore P. The osteoblast transcription factor Runx2 is expressed in mammary epithelial cells and mediates osteopontin expression. *J Biological Chem.* 2003;278(49):48684-9.
26. Sathi GSA, Nagatsuka H, Tamamura R, Fujii M, Gunduz M, Inoue M, Rivera RS, Nagai N. Stromal cells promote bone invasion by suppressing bone formation in ameloblastoma. *Histopathology.* 2008;53(4):458-67.