



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA**

**AMELOGENINA, AMELOBLASTINA Y ENAMELINA, ROL EN LA
FORMACIÓN Y REGENERACIÓN ÓSEA: REVISIÓN EXPLORATORIA.**

***AMELOGENIN, AMELOBLASTIN AND ENAMELIN, ROLE IN BONE
FORMATION AND REGENERATION: SCOPING REVIEW***

Memoria presentada a la Escuela de Odontología de la
Universidad de Talca como parte de los requisitos científicos
exigidos para la obtención del título de Cirujano Dentista.

ESTUDIANTES: BÁRBARA FERNANDA SILVA BASTÍAS

PAULINA ANAY VERA FONSECA

PROFESOR GUÍA: DR. JAIME JACQUES

PROFESOR INFORMANTE: DR. CÉSAR RIVERA

TALCA - CHILE

2020

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

INFORMACIONES CIENTÍFICAS DEL PROFESOR GUÍA

Nombre
Jaime Jacques Bravo
ORCID
https://orcid.org/0000-0003-0789-0547
Google Scholar
https://scholar.google.com/citations?user=7D_GXJcAAAAJ&hl=es&oi=ao
Correo electrónico
jjacques@utalca.cl

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo incondicional de mi familia. A mis padres, por nunca soltarme y enseñarme a no rendirme nunca, estuvieron conmigo en cada victoria y fracasos de mi vida, con su amor y paciencia me acompañaron hasta el final. A mi hermana, quien siempre estuvo a mi lado, en los procesos más difíciles. A mis abuelos y a mis tias, Olga y Amelia, gracias por la fe y entrega de tanta energía.

A Fernando, por su amor, confianza y consejos. Gracias por ser un pilar en esta etapa.

A mis amigos de la vida y de la universidad, fueron un apoyo fundamental. Los quiero infinitamente.

A mi tutor Dr. Jaime Jacques por toda su ayuda incondicional y desinteresada siempre, gracias por creer en mí.

Gracias vida, por permitirme hacer lo que me gusta. Mereces lo que sueñas.

Bárbara Silva

Mi madre y mi padre son los pilares fundamentales de mi vida, son la base de mis sueños, me dan animos y sustento en cada etapa de mi vida y en estos momentos son a quienes mayormente les agradezco por todo el aguante, respaldo y sacrificio cada día.

A todas mis amigas, mis MAPS, que desde su perspectiva siempre supieron lo difícil que es este camino y con su amor supieron alentarme siempre a seguir adelante.

A mi compañera de tesis Bárbara, a nuestro Tutor Jaime Jacques y a la doctora Romina Hernández, muchas gracias por su paciencia, voluntad y gran esfuerzo realizado en conjunto durante todo este tiempo.

Esto no termina, es recién el inicio de lo que soñé desde pequeña.

¡Y gracias a ti, por interesarte y leer nuestro trabajo!

Paulina Vera.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	7
1.1. Palabras clave.....	7
2. ABSTRACT	8
2.1. Keywords.....	8
3. INTRODUCCIÓN.....	9
4. MÉTODOS	11
4.1. Diseño general.....	11
4.2. Extracción de datos.....	14
4.3. Análisis de Confiabilidad	15
5. RESULTADOS	16
5.1. Selección de Artículos e Información Bibliométrica	16
5.2. Descripción Metodológica de los artículos incluidos.....	17
5.3. Rol de las Proteínas Relacionadas al Esmalte en el desarrollo óseo.	22
5.3.1. Modelos Transgénicos AMELX	22
5.3.2. Modelos Transgénicos AMBN.	22
5.3.3. Modelos Transgénicos ENAM	24
5.4. Rol de las Proteínas Relacionadas al Esmalte como moléculas osteoinductoras.....	24
5.4.1. Modelos <i>In vitro</i>	25
5.4.2. Modelos <i>In vivo</i>	31
6.1. Análisis de Confiabilidad de los estudios revisados.....	34
6. DISCUSIÓN	39
7. REFERENCIAS.....	43
8. ANEXOS.....	57

LISTA DE ABREVIACIONES

ALP: Fosfatasa alcalina
AMBN: Ameloblastina
AMELX: Amelogenina
AmgCP: Péptido C-terminal de amelogenina humana
ARN: Ácido Ribonucleico
AT1: Receptor de angiotensina II tipo 1
AT2: Receptor de angiotensina II tipo 2
BMP: Proteína morfogenética ósea
BMM: Macrófagos derivados de la médula ósea
BMSC: Células de médula ósea
BSP: Sialoproteína ósea
COL1: Colágeno tipo 1
CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
EMD: Derivados de la matriz del esmalte
EMP: Proteínas de la matriz del esmalte
ENAM: Enamelina
ERP: Proteínas relacionadas al esmalte
HAC: Células de cartílago articular humano Primario
HDLC: Células cementoblásticas humanas
IMR-90: Fibroblastos de pulmón fetal humano
JNK: Quinasa N-terminal c-Jun
KO: Knock-out o anulación
LAMP-1: Proteína de membrana asociada a lisosomas 1
LMW: Bajo peso molecular
LRAP: Péptido de Amelogenina rico en Leucina
MAPK-ERK: Proteína quinasa activada por mitógenos–quinasa reguladora de señal extracelular ½
MC3T3-E1: Células osteoblásticas de calvarias de ratón
MEC: Matriz extracelular
MG63: Célula de osteosarcoma humano
MSC: Células madre mesenquimales
Nos-1: Célula de osteosarcoma humano
OB: Osteoblastos
OCN: Osteocalcina
ON: Osteonectina
OP: Osteopontina
OPG: Osteoprotegerina
OSX: Osterix
PDLC: Células del ligamento periodontal humano

PI3K: Fosfatidilinositol- 3-kinasa
P38MARK: proteína quinasa activada por mitógenos p38
RANK L: Ligando del receptor activador del factor nuclear Kappa b
RANK: Receptor activador del factor nuclear Kappa b
ROS: Células de osteosarcoma de rata
RUNX2: Factor de transcripción relacionado con runt 2
SAOS-2: Célula de osteosarcoma humano
SRC: Tirosina quinasa no receptora
STAT 1: Transductor de señal y activador de transcripción 1
STAT2: Transductor de señal y activador de transcripción 2
ST2: Células estromales bipotenciales de médula ósea
TGF- β : Factor del crecimiento transformante β
TRAP: Péptido de Amelogenina rico en Tirosina
3T3: Fibroblastos embrionarios de ratón

1. RESUMEN

Amelogenina, Ameloblastina y Enamelina son conocidas por participar en la formación del esmalte y estimular la regeneración de tejidos periodontales, además de ser parte de los derivados de la matriz del esmalte. Desde el año 2006 numerosos estudios plantearon que la distribución de estas proteínas no estaría limitada al tejido dentario, proponiendo funciones de señalización ósea, sin embargo, sus metodologías son heterogéneas y sus resultados dispersos, dificultando su comprensión y generalización.

Resumimos mediante una revisión exploratoria, los principales hallazgos experimentales relativos al potencial de las Proteínas Relacionadas al Esmalte (ERP) como moléculas inductoras del desarrollo y regeneración del tejido óseo. La búsqueda fue realizada en MEDLINE/PubMed, Scopus y Web of Science, incluyendo solo estudios experimentales publicados desde el 2006, estudiando las ERP en procesos de señalización, formación o regeneración ósea. Adicionalmente, realizamos un análisis de confiabilidad.

Cincuenta y ocho artículos fueron seleccionados, la mayoría estudió la Amelogenina y Ameloblastina, distinguiéndose cuatro modelos: transgénicos, *in vitro*, *in vivo* y mixtos, mostrando la participación de las ERP en procesos de proliferación, diferenciación y mineralización ósea aumentando genes marcadores óseos como RUNX2, ALP y OCN. Estas proteínas son capaces de modular la actividad osteoblástica y osteoclástica, dependiendo de su concentración, mediante vías de señalización como Wnt y MAPK-ERK1/2.

Existe gran diversidad de estudios confiables, confirmando el potencial osteogénico, osteoinductor y como molécula de señalización ósea, principalmente en Amelogenina y Ameloblastina. Sin embargo, no existen suficientes estudios *in vivo* y ninguno en humanos, que permitan prever una aplicación clínica, al menos a corto plazo.

1.1. Palabras clave.

Proteínas del esmalte dental, Amelogenina, Ameloblastina, Osteoblastos, Huesos.

2. ABSTRACT

Amelogenin, Ameloblastin and Enamelin are known to participate in the formation of enamel and stimulate the regeneration of periodontal tissues, in addition to being part of the derivatives of the enamel matrix. Since 2006, numerous studies have suggested that the distribution of these proteins would not be limited to dental tissue, proposing bone signaling functions, however, their methodologies are heterogeneous and their results scattered, making it difficult to understand and generalize.

Through a Scoping Review, we summarize the main experimental findings regarding the potential of ERPs (enamel related proteins) as molecules that induce the development and regeneration of bone tissue. The search was carried out in MEDLINE/PubMed, Scopus and Web of Science, including only experimental studies published since 2006, studying ERPs in bone signaling, formation or regeneration processes. Additionally, a reliability analysis was performed.

Fifty-eight articles were selected, the majority studied Amelogenin and Ameloblastin, distinguishing four models: transgenic, *in vitro*, *in vivo* and mixed. Demonstrating the participation of ERP in processes of proliferation, differentiation and bone mineralization, showing an increase in bone marker genes such as RUNX2, ALP and OCN. These proteins are capable of modulating osteoblastic and osteoclastic activity, depending on their concentration, through signaling pathways such as Wnt and MAPK-ERK1/2.

There is a great diversity of reliable studies, confirming the potential for osteogenic, osteoinductive and as a bone signaling molecule, mainly in Amelogenin and Ameloblastin. However, there are not enough studies *in vivo*, or in humans, to anticipate a clinical application, at least in the short term.

2.1. Keywords.

Dental enamel proteins, Amelogenin, Ameloblastin, Enamelin, Bone

3. INTRODUCCIÓN

Las “Proteínas de la matriz del esmalte (EMP)”, son secretadas por ameloblastos durante la formación del esmalte, cumpliendo un rol fundamental durante la mineralización y maduración de este tejido (1), siendo las principales y las más estudiadas las Amelogeninas (AMELX), la Ameloblastina (AMBN) y la Enamelina (ENAM). Durante años, se consideró que la distribución de las EMP estaba limitada al esmalte y al ameloblasto, su célula secretora, ambos de origen epitelial (2, 3). Sin embargo, su expresión y funciones se han extendido a un segundo compartimento odontogénico, el ectomesénquima, siendo reportadas en la matriz dentinaria (4, 5), odontoblastos (6), pulpa dental (7) y cementoblastos (8, 9). La expresión de estas proteínas en células ectomesenquimatosas supuso su expresión en otras células compartiendo el mismo origen embriológico, tales como las células óseas, lo cual motivó su observación en este tejido. Es así como desde el año 2006, las EMP han sido observadas y reportadas en compartimientos fuera del diente tales como tejido óseo (10) y células de huesos largos (11). En el año 2014, se propuso cambiar la denominación “Proteínas del Esmalte” (enamel matrix proteins = EMP) por “Proteínas Relacionadas al Esmalte” (enamel related proteins = ERP) (12). En el hueso estas proteínas presentan niveles de expresión variable según zona involucrada y la ontogénesis de los individuos (13), surgiendo preguntas acerca de la célula productora, receptor, función de estas proteínas en este tejido.

Los maxilares pueden verse afectados por una serie de procesos patológicos tales como enfermedad periodontal, traumatismos, lesiones quísticas o infecciones de origen osteogénico los cuales dejarán como consecuencia una pérdida ósea. La regeneración del tejido óseo es así uno de los grandes desafíos de la odontología moderna, existiendo actualmente una serie de procedimientos que promueven el uso de autoinjertos, solo o en combinación con aloinjertos y/o xenoinjertos (14, 15). La aplicación de estos protocolos tiene algunos inconvenientes, tales como su alto costo, su dificultad técnica, morbilidad y la necesidad de un segundo sitio quirúrgico. Actualmente, el conocimiento de ciertas moléculas osteoinductoras, así como la creciente aplicación de principios de ingeniería tisular, han permitido el desarrollo de nuevas estrategias buscando potenciar la capacidad

osteogénica de los tejidos del paciente. Tal es el caso de los derivados de la matriz del esmalte (EMD), compuesto derivado del esmalte porcino, conocido comercialmente como Emdogain® (Institut Straumann AG, Postfach, Basilea, Suiza), Xelma® (Mölnlycke Health Care, Gotemburgo, Suecia) u Osteogain® (Institut Straumann AG, Postfach, Suiza), el cual tendría el potencial de regenerar tejidos blandos, así como las estructuras periodontales perdidas (8, 16, 17). El componente principal de las EMD son las ERP, cuyo potencial regenerativo no estaría limitado a los tejidos periodontales, pudiendo estimular la adhesión, la proliferación celular (18) y la angiogénesis (19).

La presencia mayoritaria de las Amelogeninas en la composición de los EMD, ha llevado a atribuir la capacidad de regeneración de estos compuestos a esta proteína (20). Es así como, de acuerdo a los estudios de Nebgen, serían las ERP, derivados de la matriz dentinaria, las responsables del potencial de osteoinducción observado en su estudio (21). Sin embargo, los EMD no solo están compuestos por las ERP, sino que por una mezcla de moléculas, incluyendo proteínas, factores de crecimiento y enzimas (22), lo cual no permite determinar de manera absoluta el potencial de señalización, como molécula osteoinductora, de cada una de estas proteínas. Es así que, en los últimos años, un gran número de estudios, sugieren una participación directa de las ERP en la formación y desarrollo del tejido óseo (13, 23), donde estas moléculas tendrían la capacidad de estimular el metabolismo de los osteoblastos (24). Desafortunadamente, la heterogeneidad de las metodologías empleadas en estos estudios dificulta la lectura, e interpretación de los resultados.

Existen numerosas revisiones narrativas que intentan recoger la información publicada en los últimos años respecto al potencial de señalización de las ERP o de su capacidad como moléculas de señalización. Sin embargo, estas revisiones por su naturaleza, no presentan una metodología respecto a los estudios incluidos (25), estando la mayor parte de ellas centradas en el rol terapéutico de los EMD, o bien en la capacidad de señalización de solo una de las ERP, la AMELX (26), faltando estudios que incluyan a la AMBN y la ENAM. El objetivo del presente trabajo es resumir a través de una Revisión Exploratoria la literatura, publicada desde el año 2006, destacando los principales hallazgos experimentales relativos al potencial de las ERP como moléculas inductoras del desarrollo y la regeneración del tejido óseo.

4. MÉTODOS

4.1. Diseño general

Realizamos una revisión exploratoria, basado en la declaración PRISMA-ScR (27), con el objetivo de estudiar el alcance de la literatura respecto al rol de las ERP en la formación y regeneración de los tejidos óseos.

La búsqueda fue realizada en tres bases de datos: MEDLINE, a través del buscador PubMed, Scopus y Web of Science. La selección de artículos y la extracción de datos fue realizada por 4 investigadores (RH, JJ, BS y PV), divididos en dos equipos de dos integrantes cada uno que trabajaron de forma independiente. Los criterios de inclusión fueron: 1. Artículos que estudiaron la participación directa de la Amelogenina, la Ameloblastina y/o la Enamelina en procesos de formación o estimulación regeneración del tejido óseo, así como la participación en vías de señalización ósea. 2. Estudios Experimentales *In vivo* o *In vitro*. 3. Publicados desde el año 2006, 4. Idioma inglés, español o francés. El criterio de exclusión empleado fue: 1. Artículos cuyo único objeto fue el estudio de derivados de la matriz del esmalte.

Incluimos en la búsqueda el uso de términos MeSH y términos libres relacionados con el área investigada (Tabla 1). Para realizar la búsqueda aplicamos filtros: rango de año (desde 2006) e idioma (inglés, español o francés). Los términos MeSH y los términos de texto libre fueron combinados secuencialmente utilizando los operadores booleanos OR / AND / NOT. Las formulas fueron buscadas, primero, por separado: # 1 = Dental Enamel Proteins OR Enamel Matrix Proteins; # 2 = Amelogenin OR Ameloblastin OR Enamelin y # 3 = Osteoblast OR Osteoclast OR Osteocyte OR Mouse Model OR Rat model OR Knock-out OR Bone* OR Signaling; # 4 Enamel matrix derivate OR Emdogain OR Osteogain OR Xelma. Luego, en una quinta búsqueda, el operador booleano AND realizó la combinación de las 3 primeras fórmulas y se excluyó, con el operador booleano NOT, la cuarta fórmula, resultando: (#1 AND #2 AND #3 NOT #4 [TITLE]).

TÉRMINOS MeSH	Dental enamel proteins		Amelogenin		Osteoblast OR Osteoclast OR Osteocyte
TÉRMINOS LIBRES	OR	AND	OR	AND	OR
	Enamel matrix proteins		Ameloblastin OR Enamelin		Mouse Model OR Rat model OR Knock-out OR Bone* OR Signaling
	NOT (En título)				
Enamel matrix derivate OR Emdogain OR Osteogain OR Xelma					

Tabla 1. Estrategia de búsqueda. Seleccionamos términos MeSH, los que se encuentran en la parte superior, y términos libres los que se encuentran en la parte inferior de la tabla. Existe una subdivisión donde se consideró al operador booleano NOT para excluir a los derivados de la matriz del esmalte en la búsqueda en título.

Los estudios obtenidos fueron exportados al gestor bibliográfico EndNote (Clarivate Analytics, Filadelfia, Estados Unidos), donde una vez removidos los estudios duplicados, fue aplicado el protocolo PRISMA-ScR (28) para llevar a cabo las distintas fases de la revisión exploratoria (27). En una primera etapa, de tamizaje seleccionaron los artículos según su título y resumen, aplicando los criterios de elegibilidad previamente acordados (Figura 1). Esta etapa fue llevada a cabo por dos revisores que trabajaron de manera independiente y previamente calibrados. De este modo, se realizó la valoración del Coeficiente Kappa (29) obtenido luego de la lectura de series de 20 títulos y resúmenes, hasta llegar a una concordancia inter-observador superior a 0.8, categorizado así, como muy buena concordancia, la cual fue obtenida luego de la lectura de la segunda serie de 20 artículos. En caso existir duda, se consultó a un tercer revisor (experto) quien determinó si el artículo continuaba a la lectura de texto completo. En caso de persistir la duda, seleccionamos el artículo automáticamente para el análisis a texto completo. El registro de los artículos identificados por la búsqueda, fue realizado en una hoja de cálculo donde se anotaron los artículos incluidos, los excluidos y su razón de exclusión. Los artículos seleccionados fueron cargados en la plataforma Rayyan (30), a fin de facilitar el proceso de

análisis y selección final, en base a criterios de elegibilidad, luego de su lectura *in extenso*. Los desacuerdos en la elegibilidad fueron resueltos de manera similar a lo realizado en la etapa anterior.

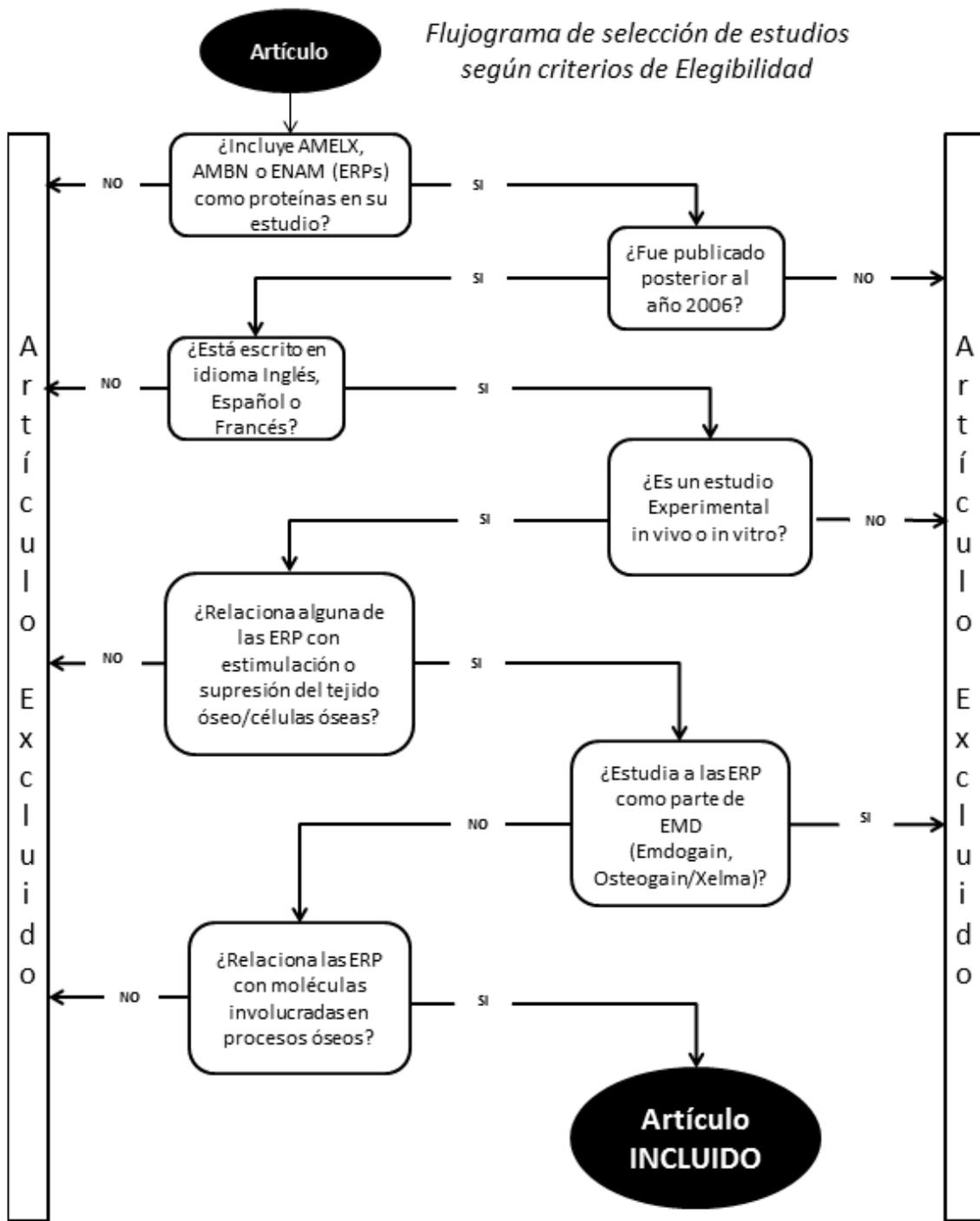


Figura 1. Flujograma de selección de estudios según criterios de elegibilidad. El artículo arrojado por la búsqueda debió cumplir con una secuencia de preguntas respondidas de manera dicotómica (sí o no)

relacionadas con los criterios de elegibilidad, hasta finalmente llegar a la inclusión si corresponde o en su defecto, excluido del estudio.

4.2.Extracción de datos

La extracción de datos de la revisión exploratoria fue confeccionada a partir de un resumen lógico y descriptivo de los resultados encontrados en los artículos seleccionados que se alinearon con el/los objetivo/s de la revisión (31) (Tabla 2). De acuerdo con lo propuesto por Peters, los antecedentes y datos recabados (bajo la forma de un formulario de extracción de datos) permitieron registrar características esenciales de los estudios incluidos, los cuales fueron relevantes para la respuesta de la pregunta de investigación.

- (1) Título
- (2) Autor
- (3) Año
- (4) DOI/PMDI
- (5) Origen/país de origen
- (6) Objetivos/propósito
- (7) ERP involucrada
- (8) Concepto/s
- (9) Tipo de estudio
- (10) Modelo/s
- (11) Experimentos/naturaleza (n°1/n°2/n°3/n °4)
 - Metodología general
 - Especie/célula
 - Edad
 - Técnicas
 - Comparador o control (si corresponde)
 - Dosis/frecuencia/fuerza
 - Duración de la intervención (si corresponde)
 - Cómo se miden los resultados
 - Resultados n°1/n°2/n°3
 - Conclusión general del experimento
- (12) Pruebas estadísticas
- (13) Hallazgos claves relacionados con la pregunta de investigación
- (14) Conclusiones
- (15) Otros

Tabla 2. Resumen de tabla de extracción de datos para lectura texto completo de artículos seleccionados. Formulario a completar para cada artículo seleccionado donde se recopiló de manera estructurada información resumida del estudio sobre los datos de identificación, experimentos y conclusiones.

Los dos equipos de revisores probaron el formulario de manera previa a la recolección general de antecedentes de los estudios, en la etapa de lectura de texto completo. Debido a la naturaleza de una Revisión Exploratoria, fue necesario refinar el formulario (31), a medida que los artículos fueron analizados y los datos fueron extraídos y agrupados.

4.3. Análisis de Confiabilidad

Con la finalidad de comparar y/o categorizar la relevancia de los estudios seleccionados, e interpretar adecuadamente los resultados de esta revisión, se realizó un análisis de confiabilidad de los artículos luego de su lectura del texto completo. Para esto, se utilizó una modificación de la herramienta ToxRTool (Toxicological data Reliability Assessment Tool) (32) (Anexo 1), cuya versión original permite evaluar la fiabilidad de los datos de estudios toxicológicos. Esta herramienta de evaluación se genera a partir de una serie de preguntas a las cuales se les establece un puntaje (1: cumple; 0: no cumple) a cada artículo, para finalmente sumar y asignar una categoría Klimisch (Tabla 3), que permitió la valoración de la confiabilidad metodológica del estudio. Hay que destacar que existen criterios relacionados al sujeto y molécula de prueba, clasificados como “criterio rojo”, los que estrictamente deben cumplirse para considerar un artículo confiable. Asimismo, los estudios *in vivo* que tengan más de 13 puntos e *in vitro* más de 11 puntos una vez realizada la suma total de los criterios. Dadas las características de esta herramienta, ella fue aplicada solo a los estudios *in vivo* e *in vitro*.

	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	Categorización Klimisch
1	18-21	15-18	Confiable sin restricciones
2	13-17	11-14	Confiable con restricciones
3	<13 o no se cumplen todos los criterios rojos	<11 o no se cumplen todos los criterios rojos	No confiable
4			No asignable: documentación insuficiente. Aplicable en modelos transgénicos y estudio de sobreexpresión.

Tabla 3. Análisis de confiabilidad ToxRTool Modificado 2020. A cada artículo seleccionado se asignó un puntaje y se clasificó dentro de la categorización Klimisch. Incluimos los artículos confiables sin y con restricciones. Los artículos con modelo de estudio transgénicos, o con estudios de sobreexpresión de las proteínas, han sido clasificados en categoría Klimisch N°4 como no asignables. (Anexo 1).

5. RESULTADOS

5.1. Selección de Artículos e Información Bibliométrica

El diagrama de flujo del proceso de selección de los artículos en las diferentes etapas de la revisión exploratoria, según formato PRISMA, se muestra en la figura 2. Destacar que al total de artículos incluidos, se agregaron 2 de forma manual por ser relevantes para nuestro estudio.

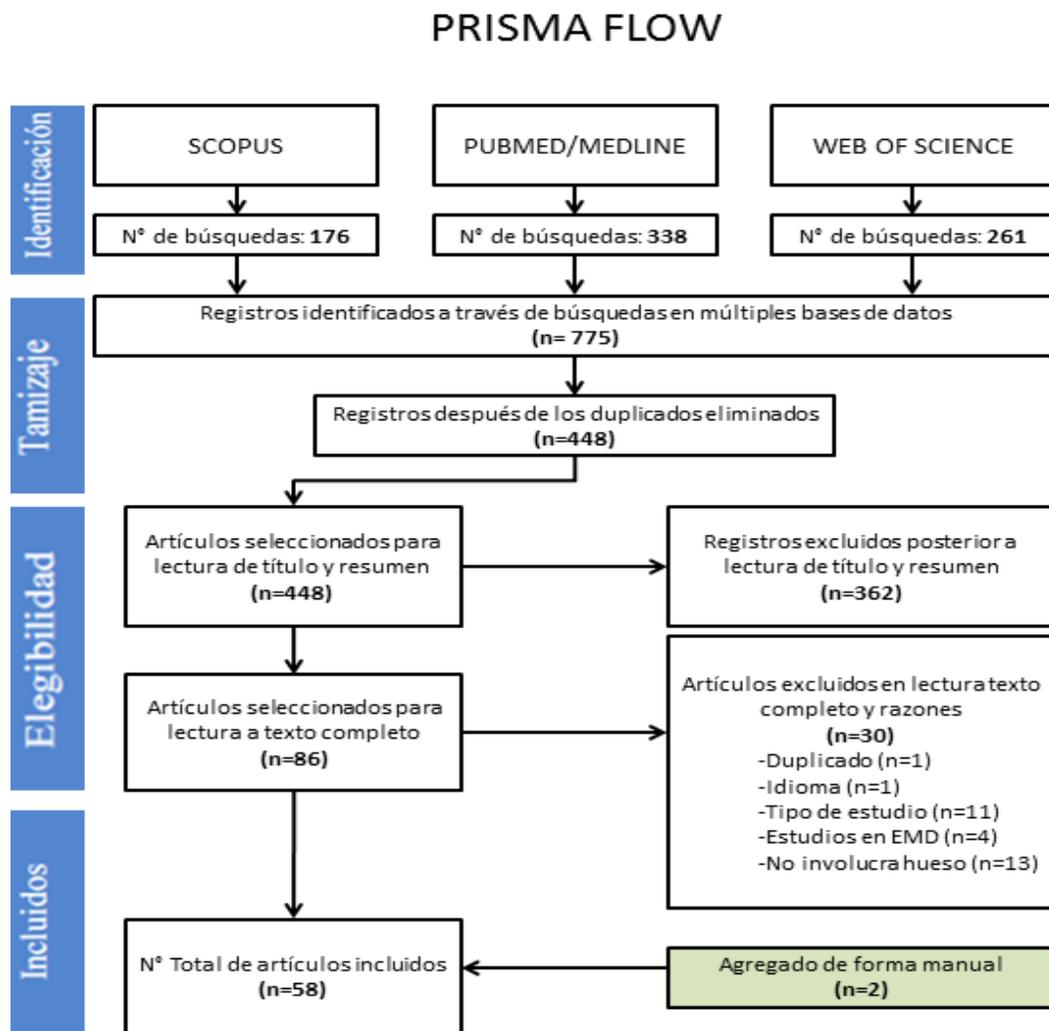


Figura 2. PRISMA FLOW. Resumen del número de artículos obtenidos en cada fase. De los 775 artículos que se obtuvieron en la estrategia de búsqueda principal, 362 fueron excluidos por título y resumen, removiéndose 30 post lectura de texto completo.

5.2. Descripción Metodológica de los artículos incluidos.

Los antecedentes bibliográficos de los artículos incluidos se muestran en la tabla 4, siendo la mayor parte de los artículos publicados en los años 2012 y 2017. Se encontraron diversas metodologías para el estudio de estas proteínas, hallándose experimentos en modelos transgénicos, *in vitro*, *in vivo* y modelos mixtos.

Autor/Año	Título	Modelo	ERP
Takahashi, 2019 (33)	Effects of full-length human amelogenin on the differentiation of dental epithelial cells and osteoblastic cells	<i>In vitro</i>	AMELX
Takeuchi, 2019 (34)	A Human Amelogenin-Derived Oligopeptide Enhances Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells	<i>In vitro</i>	AMELX
Ando, 2018 (35)	Effects of Human Full-length Amelogenin and C-terminal Amelogenin Peptide on the Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue.	<i>In vitro</i>	AMELX
Chaweewannakorn, 2019 (36)	Ameloblastin attenuates RANKL-mediated osteoclastogenesis by suppressing activation of nuclear factor of activated T-cell cytoplasmic 1 (NFATc1)	<i>In vitro</i>	AMBN
Kunimatsu, 2018 (37)	The C-terminus of the amelogenin peptide influences the proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells	<i>In vitro</i>	AMELX
Terada, 2018 (38)	Effect of Amelogenin Coating of a Nano-Modified Titanium Surface on Bioactivity	<i>In vitro</i>	AMELX
		<i>In vivo</i>	AMELX
Ando, 2017 (39)	Ameloblastin induces tumor suppressive phenotype and enhances chemosensitivity to doxorubicin via Src-Stat3 inactivation in osteosarcoma	<i>In vitro</i>	AMBN
		<i>In vivo</i>	AMBN
		Transgénico	AMBN
Awada, 2017 (24)	Effects of C-terminal amelogenin peptides on the metabolism of osteoblasts	<i>In vitro</i>	AMELX
Chaweewannakorn, 2017 (40)	Ameloblastin and enamelin prevent osteoclast formation by suppressing RANKL expression via MAPK signaling pathway	<i>In vitro</i>	AMBN
		<i>In vitro</i>	ENAM
Kitagawa, 2017 (41)	N-terminal region of human ameloblastin synthetic peptide promotes bone formation	<i>In vitro</i>	AMBN
Matsuda, 2017 (42)	Effects of a Chemically Synthesized Leucine-Rich Amelogenin Peptide (csLRAP) on Chondrogenic and Osteogenic Cells	<i>In vitro</i>	AMELX
Stakkestad, 2017 (43)	Ameloblastin Peptides Modulates the Osteogenic Capacity of Human Mesenchymal Stem Cells	<i>In vitro</i>	AMBN
Kunimatsu, 2017 (44)	The C-terminus of amelogenin enhances osteogenic differentiation of human cementoblast lineage cells	<i>In vitro</i>	AMELX
Lu, 2016 a (45)	The ameloblastin extracellular matrix molecule enhances bone fracture resistance and promotes rapid bone fracture healing	<i>In vitro</i>	AMBN
		<i>In vivo</i>	AMBN
		Transgénico	AMBN
Lu, 2016 b (46)	Ameloblastin, an Extracellular Matrix Protein, Affects Long Bone Growth and Mineralization	<i>In vitro</i>	AMBN
		Transgénico	AMBN
Le, 2016 (47)	Amelogenin Exon4 Forms a Novel miRNA That Directs Ameloblast and Osteoblast Differentiation	<i>In vitro</i>	AMELX
Amin, 2016 (48)	Differential effects of tyrosine-rich amelogenin peptide on chondrogenic and osteogenic differentiation of adult chondrocytes	<i>In vitro</i>	AMELX
Imhof, 2015 (49)	Modified Amelogenin Is a New and Versatile Nanomaterial for Biomedical Applications	<i>In vitro</i>	AMELX

Noro, 2015 (50)	Effect of epithelial cells derived from periodontal ligament on osteoblast-like cells in a Transwell membrane coculture system	<i>In vitro</i>	AMELX
Wang, 2015 (51)	Controlled Osteogenic Differentiation of Mouse Mesenchymal Stem Cells by Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation of Amelogenin	<i>In vitro</i>	AMELX
Chan, 2014 (52)	Characterization of periodontal structures of amelogenin-null mice	<i>In vivo</i>	ENAM
		Transgénico	ENAM
Olivares-Navarrete, 2014 (53)	Role of the N-terminal peptide of amelogenin on osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells	<i>In vitro</i>	AMELX
Atsawasuwan, 2013b (12)	Expression and Function of Enamel-related Gene Products in Calvarial Development.	<i>In vitro</i>	AMELX
		<i>In vitro</i>	AMBN
		Transgénico	AMBN
		Transgénico	AMELX
Atsawasuwan, 2013 a (23)	Ameloblastin Inhibits Cranial Suture Closure by Modulating Msx2 Expression and Proliferation	<i>In vitro</i>	AMBN
		<i>In vivo</i>	AMBN
		Transgénico	AMBN
Lu, 2013 (54)	Ameloblastin modulates osteoclastogenesis through the integrin/ERK pathway	<i>In vitro</i>	AMBN
		Transgénico	AMBN
Chan H, 2013 (55)	Bodyweight assessment of amelogenin null mice	Transgénico	ENAM
Tanimoto, 2012 b (56)	Differential Effects of Amelogenin on Mineralization of Cementoblasts and Periodontal Ligament Cells	<i>In vitro</i>	AMELX
Tanimoto, 2012 a (57)	Amelogenin enhances the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow	<i>In vitro</i>	AMELX
Amin, 2012 (58)	Differential effect of amelogenin peptides on osteogenic differentiation <i>in vitro</i> : identification of possible new drugs for bone repair and regeneration	<i>In vitro</i>	AMELX
Coxon, 2012 (59)	Phenotype-genotype correlations in mouse models of amelogenesis cells caused by Amelx and Enam mutations	Transgénico	ENAM
		Transgénico	AMELX
Fuchs, 2012 (60)	Does amelogenin have pleiotropic effects on organs other than the teeth? Lessons from a phenotyping screen of two amelogenin-mutant mouse lines	Transgénico	ENAM
Izumikawa, 2012 (20)	Effects of Amelogenin on Proliferation, Differentiation, and Mineralization of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells <i>In Vitro</i>	<i>In vitro</i>	AMELX
Hu, 2011 (61)	Human amelogenin up-regulates osteogenic gene expression in human bone marrow stroma cells	<i>In vitro</i>	AMELX
Kitagawa, 2011 (62)	Synthetic ameloblastin peptide stimulates differentiation of human periodontal ligament cells	<i>In vitro</i>	AMBN
Iizuka, 2011 (63)	Ameloblastin regulates osteogenic differentiation by inhibiting Src kinase via cross talk between integrin beta1 and CD63	<i>In vitro</i>	AMBN
Chen, 2011 (64)	An amelogenin mutation leads to disruption of the odontogenic apparatus and aberrant expression of Notch I	Transgénico	AMELX

Kemoun, 2011 (65)	The role of cell surface markers and enamel matrix derivatives on human periodontal ligament mesenchymal progenitor responses <i>in vitro</i>	<i>In vitro</i>	AMELX
Kuroda, 2011 (66)	AMELOBLASTIN IS NOT IMPLICATED IN BONE REMODELLING AND REPAIR	<i>In vitro</i>	AMBN
		<i>In vivo</i>	AMBN
		Transgénico	AMBN
Wen, 2011 (67)	The Influence of Leucine-rich Amelogenin Peptide on MSC Fateby Inducing Wnt10b Expression	<i>In vitro</i>	AMELX
Chen, 2011 (64)	An amelogenin mutation leads to disruption of the odontogenic apparatus and aberrant expression of Notch I	Transgénico	AMELX
Huang, 2010 (68)	Effects of human full-length amelogenin on the proliferation of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow	<i>In vitro</i>	AMELX
Nakayama, 2010 (69)	Effects of porcine 25 kDa amelogenin and its proteolytic derivatives on bone sialoprotein expression	<i>In vitro</i>	AMELX
Tamburstuen, 2010 (70)	Ameloblastin promotes bone growth by enhancing proliferation of progenitor cells and by stimulating immunoregulators	<i>In vitro</i>	AMBN
		<i>In vivo</i>	AMBN
Beyeler, 2010 (71)	Identification of a fibronectin interaction site in the extracellular matrix protein Ameloblastin	<i>In vitro</i>	AMBN
		<i>In vitro</i>	ENAM
		<i>In vitro</i>	AMELX
Gruenbaum-Cohen, 2009 (72)	Amelogenin in cranio-facial development: the tooth as a model to study the role of amelogenin during embryogenesis	<i>In vivo</i>	AMELX
Haze, 2009 (73)	Regeneration of bone and periodontal ligament induced by recombinant amelogenin after periodontitis	<i>In vivo</i>	AMELX
Matsuzawa, 2009 (74)	Putative signaling action of amelogenin utilizes the Wnt/ b-catenin pathway	<i>In vitro</i>	AMELX
Warotayanont, 2009 (75)	Leucine-rich amelogenin peptide induces osteogenesis by activation of the Wnt pathway	<i>In vitro</i>	AMELX
Wazen, 2009 (76)	A mouse model expressing a truncated form of ameloblastin exhibits dental and junctional epithelium defects	Transgénico	AMBN
Smith, 2009 (77)	Consequences for enamel development and mineralization resulting from loss of function of ameloblastin or enamelin	Transgénico	ENAM
		Transgénico	AMBN
Saito, 2008 (78)	Amelogenin binds to both 20élulas sulfate and bone morphogenetic protein 2 and pharmacologically suppresses the effect of noggin	<i>In vitro</i>	AMELX
Hu, 2008 b (79)	Distal cis-regulatory elements are required for tissue-specific expression of enamelin (Enam)	Transgénico	ENAM
Hu, 2008 a (2)	Enamel Defects and Ameloblast-specific Expression in EnamKnock-out/lacZKnock-in Mice	Transgénico	ENAM
Warotayanont, 2008 (80)	Leucine-rich amelogenin peptide induces osteogenesis in mouse embryonic stem cells	<i>In vitro</i>	AMELX
Nishiguchi, 2007 (81)	Amelogenin is a negative regulator of osteoclastogenesis via downregulation of RANKL, M-CSF and fibronectin expression in osteoblasts	<i>In vitro</i>	AMELX

Hatakeyama, 2006 (82)	Amelogenin-mediated regulation of osteoclastogenesis, and periodontal cell proliferation and migration	<i>In vitro</i>	AMELX
		Transgénico	AMELX
Lacerda-Pinheiro, 2006 (83)	Amelogenin gene splice products A+4 and A-4 implanted in soft tissue determine the reorientation of CD45-positive cells to an osteo-chondrogenic lineage	<i>In vivo</i>	AMELX
Li, 2006 (84)	Comparison of body weight and gene expression in amelogenin null and wild-type mice	Transgénico	AMELX
Zeichner-David, 2006 (85)	Amelogenin and ameloblastin show growth-factor like activity in periodontal ligament cells	<i>In vitro</i>	AMELX
		<i>In vitro</i>	AMBN

Tabla 4. Información bibliométrica artículos seleccionados. Especificación organizada en relación a año de publicación, desde el más al menos actual, con detalle de tipo de modelo de estudio y ERP analizada. Se observó que un 58,7% (n=34) de los artículos estudió AMELX, un 22,4 % (n=13) a la AMBN, un 8,6% (n=5) a la ENAM y un 10,3% (n=6) estudió más de una ERP. Encontramos diversas metodologías para el estudio de estas proteínas, como modelos de estudio transgénicos (n=9/15,5%), estudios *in vivo* (n=3/5,1%) e *in vitro* (n=35/60,3 %) y una combinación de las metodologías (n=11/19%).

5.3. Rol de las Proteínas Relacionadas al Esmalte en el desarrollo óseo.

Los modelos transgénicos, particularmente los modelos Knock-Out (KO), analizaron el impacto de la ausencia de estas proteínas, tanto a nivel celular como estructural (Tablas 5, 6 y 7), permitiendo dimensionar su importancia en el desarrollo y metabolismo óseo.

5.3.1. Modelos Transgénicos AMELX

Solo un limitado número de modelos transgénicos descritos en la literatura AMELX observaron un eventual alteración del tejido óseo (Tabla 5), la mayoría describiendo solo efectos dentarios y por ende no incluidos en la presente revisión. En general, los mutantes AMELX KO mostraron una disminución significativa de tamaño y peso.

Modelo	Autor	Efecto
AMELX KO	Atsawasuan, 2013 b (12)	Reducción de la longitud y el ancho del cráneo de los ratones AMELX KO. Cierre de suturas craneales tardías.
Subexpresión de AMELX X/Y64H, AMELX Y/ Y64H y AMELX Y64H / Y64H	Coxon, 2012 (59)	Mandíbulas de menor tamaño que el control salvaje.
Ratón transgénico anulado para AMEL (AMEL KO)	Chen, 2011 (64)	Masas de células epiteliales proliferantes a nivel óseo con apariencia similar a la calcificación de un tumor odontogénico epitelial.
Ratón transgénico anulado para AMEL (AMEL KO)	Nishiguchi, 2007 (81)	Los ratones knock-out mostraron una mayor formación de osteoclastos.
Ratón transgénico anulado para AMEL (AMEL KO)	Hatakeyama 2006 (82)	Aumento de la actividad de los osteoclastos (aumento de la expresión de RANKL sin alteración de la expresión de OPG).
Ratón transgénico anulado para AMEL (AMEL KO)	Li, 2006 (84)	Ausencia de Expresión de LRAP. Disminución de tamaño y peso de ratas mutantes.

Tabla 5. Estudios de modelos transgénicos AMELX.

5.3.2. Modelos Transgénicos AMBN.

El estudio de la AMBN también usó el modelo mutante KO y así como modelo de sobreexpresión del gen, siendo este último el más utilizado (Tabla 6). La observación del

hueso de los animales reveló una reducción de la altura del hueso alveolar de los maxilares (76), una menor longitud y grosor del fémur, así como un menor peso, retraso en el crecimiento y cierre de suturas craneales (45). Del mismo modo el animal AMBN KO mostró una reducción significativa en el volumen del hueso trabecular y la masa ósea además de una reducción del grosor del hueso alveolar (54). Por su parte, la sobreexpresión de la actividad de AMBN (x5) significó la expresión de un fenotipo óseo craneal de menor longitud y ancho, con mayor actividad de osteoblastos y osteoclastos (23), produciendo además un retraso y un cierre incompleto en la fusión de la sutura frontal posterior, con cráneos más livianos y huesos más delgados (12). Estos ratones también presentaron una proliferación celular reducida, así como una expresión significativamente reducida de Msx2, de los factores de transcripción osteogénicos Runx2 y Sp7, y de las proteínas de la matriz ósea BSP, Coll, OCN y OPN.

Modelo	Autor	Efecto
Modelo de sobreexpresión de AMBN	Ando, 2017 (39)	AMBN induce el fenotipo supresor de tumores y mejora la quimiosensibilidad de la doxorubicina a través de SRC-STAT3.
Modelo de supresión de AMBN	Ando, 2017 (39)	La supresión AMBN promovió significativamente la proliferación celular, la migración y la formación de colonias, además de la supresión de marcadores osteogénicos (RUNX2, ALP y OCN).
Modelo mutante con deficiencia de AMBN (AMBN Δ 5-6)	Lu, 2016 a (45)	Reducción de la longitud del fémur y la columna.
Ratones TGxAMBN Δ 5-6	Lu, 2016 b (46)	Disminución de la masa ósea del fémur.
Ratón de sobreexpresión de AMBN (AMBNK14Tg), bajo el control de un promotor LacZ	Lu, 2013 (54)	Reducción del grosor del hueso alveolar, volumen del hueso trabecular y disminución general de la masa ósea. Engrosamiento de la membrana periodontal y aumento de la actividad osteoclástica.
Modelo de sobreexpresión de AMBN (x5)	Atsawasuwan , 2013 a (23)	Fusión retardada de la sutura frontal posterior y cierre incompleto de esta. Disminución del peso del cráneo (-13%), adelgazamiento del hueso interfrontal (-35%) y ensanchamiento de la distancia entre los huesos frontales (+ 14%). Disminución de la proliferación y diferenciación de células mesenquimales de la sutura frontal posterior.
Modelos ratones AMBN 5-6	Atsawasuwan , 2013 b (12)	Reducción de la longitud y el ancho del cráneo de los ratones AMBN5-6. Cierre de suturas craneales tardías. Reducción de los niveles de expresión de genes marcadores óseos.
Subexpresión AMBN Δ 5-6	Kuroda, 2011 (66)	No existe remodelación ósea craneofacial bajo estrés mecánico ni reparación de defectos óseos de tamaño no crítico.
Ausencia de AMBN de longitud completa	Wazen, 2009 (76)	Reducción de la altura del hueso alveolar, pérdida de la integridad del epitelio de unión. Ausencia de reacción inflamatoria en tejidos periodontales y alteración a nivel de osteoclastos.

Ratón mutante (AMBND5-6)	Smith, 2009 (77)	No se detectó diferencia en el contenido mineral de hueso de ratón mutado.
--------------------------	------------------	--

Tabla 6. Estudios de modelos transgénicos AMBN.

5.3.3. Modelos Transgénicos ENAM

Para ENAM, el principal modelo utilizado es el KO (Tabla 7), donde los resultados mostraron una disminución de la densidad ósea con un aumento de la actividad osteoclástica (55, 60), disminución de la altura de hueso alveolar y contenido mineral (52).

Modelo	Autor	Efecto
Subexpresión ENAM KO	Chan, 2014 (86)	Disminución de la altura del hueso alveolar, el ancho de la cresta, el volumen del hueso y el contenido mineral. Esta reducción es visible a las 8 semanas y a los 6 meses, pero no a las 3 semanas. Los cambios observados en el hueso interdental en ausencia de ENAM son probablemente consecuencia de alteraciones en la posición de los dientes
Ratón transgénico ENAM KO	Chan, 2013 (55)	Presencia de defectos periodontales asociados al ratón KO. Aumento actividad osteoclástica.
Sobreexpresión de ATE 1 y ATE 2	Fuchs, 2012 (60)	Reducción de densidad ósea, disminución de peso corporal y longitud de cuerpo. Aumento de hueso trabecular.
Subexpresión ENAM Rgsc395 heterocigoto y ENAM Rgsc395 homocigoto	Coxon, 2012 (59)	No altera morfometría ósea.
Ratón transgénico ENAM / LacZ Knock-in	Hu, 2008 a (2)	Sin alteración de hueso, dentina o cualquier otro tejido extradental.
Ratones ATE 1 y ATE 2, con mutaciones puntuales de ENAM	Hu, 2008 b (79)	Ausencia de alteraciones de hueso, dentina o cualquier otro tejido en ratones ENAM KO.

Tabla 7. Estudios de modelos transgénicos ENAM.

5.4. Rol de las Proteínas Relacionadas al Esmalte como moléculas osteoinductoras

El análisis del potencial osteoinductivo de las ERP fue abordado de manera experimental a través de dos modelos principales:

5.4.1. Modelos *In vitro*

La proteína más estudiada *in vitro* fue la AMELX – o sus isoformas – (Tabla 8), siendo analizados varios péptidos, principalmente la proteína de forma completa ya sea en sus formas recombinantes (rhAMEL, rh174, rM179) (35) o nativas (m180, p172). También fueron estudiadas formas de menor peso molecular, destacando los péptidos LRAP o (A-4), TRAP (A+4), así como AMG-CP, NTAP, rh163, rh128. Los estudios revisados confirmaron la capacidad de las formas largas (alto peso molecular) y cortas (bajo peso molecular) para inducir a la proliferación (33), la migración (82), la diferenciación (75) y mineralización de las células expuestas (65), al estimular la expresión de moléculas de la MEC y factores de crecimiento, que funcionaron como marcadores tempranos, intermedios y tardíos de la diferenciación osteogénica.

Sin embargo, la participación de la AMELX en un proceso determinado dependió de la presencia de dominios específicos de la proteína, presentes tanto en el dominio C-terminal (37), así como en el dominio N-terminal (53) o en segmentos específicos como el péptido derivado del Exón 5 (34), efecto que pareció estar relacionado con la concentración o dosis empleada la cual resultó en un efecto en específico (37). Es así como, la concentración de la AMELX (isoformas en general) empleada en los estudios, varió entre 0,001 µg/ml a 100 µg/ml, observando los detalles en relación a dosis en la Tabla 11.

Respecto a AMBN *in vitro*, mayoritariamente estudiaron el efecto de su actividad osteogénica utilizando formas recombinantes de esta proteína. Se observó que AMBN aumentó la proliferación, adhesión y diferenciación celular, evidenciado por un aumento en la expresión de marcadores de la matriz extracelular (BMP, COL1, OCN) (85). Por otro lado, la sobreexpresión ectópica de AMBN en células Saos-2 dio como resultado una mayor mineralización de la matriz y una mayor expresión de los genes Runx2 y BSP (63). Se demostró también que AMBN retroalimentó positivamente su propia expresión endógena en células madre mesenquimales humanas primarias. La regulación por retroalimentación es un mecanismo bien reconocido para controlar la señalización y la localización celular; por tanto, estas observaciones sugirieron un papel de la proteína AMBN, o sus derivados, en las vías de señalización (54).

AMBN se comportó de manera distinta dependiendo del dominio en específico involucrado, siendo el más estudiado la región N-terminal (Tabla 9), asociándose a un aumento en la diferenciación celular y mineralización (41), no produciéndose efecto en la proliferación o disminuyéndola (62). No se reportó efecto sobre la diferenciación o proliferación con el dominio C-terminal de AMBN. Por el contrario a péptidos como los derivados del exón 5 y Q9NP70 que modularon la proliferación y la mineralización extracelular, todo esto dependiendo de la concentración empleada. Un efecto asociado en mayor proporción a la AMBN fue la adhesión celular, la cual fue proporcional a la dosis administrada, observándose en líneas celulares de osteosarcoma humano (71), células PDL (85), BMMC (54) y MC3T3-E1 (41).

El efecto de la AMBN sobre la osteoclastogénesis, fue estudiado a través del uso de un modelo en el que se cultivaron células de monocitos/macrófagos derivados de médula ósea (BMMC) en presencia de rAMBN; donde la AMBN aumentó significativamente el número de osteoclastos, modulando su diferenciación a través de la regulación de los genes osteoclastogénicos NFATc1 y cFos.

Finalmente, la ENAM ha sido la ERP menos estudiada (Tabla 10), siendo analizado solo el efecto de su forma recombinante (40).

Autor/Año	Isoforma	Célula/ especie	Dosis (*)	Efecto General
Takahashi, 2019 (33)	rh-AMEL	MC3T3-E1/ ratón	0.001, 0.1, 1 y 4 µg/ml	No afecto a la proliferación. Aumentó la diferenciación de ALP, en baja concentración. Aumentó ligeramente la mineralización (rojo de alizarina) a dosis baja y disminuyó a alta concentración.
Takeuchi, 2019 (34)	HAP	PDLSC/ Humanas	0.001, 0.01, 0.1, 1 o 10 µg/ml	Aumentó la proliferación, siendo el mayor efecto a 1 µg/ml. Aumento de diferenciación osteogénica de la expresión de ALP, OCN, RUNX2, ON) y mineralización (rojo de alizarina, deposición de calcio) a 1 µg/ml
Terada, 2018 (38)	Amelx alta concentración	RBM/ratón	4 µg/ml	Aumento en diferenciación osteogénica (Aumento de la expresión de ALP, BMP, OPN) y de la mineralización.
Ando, 2018 (35)	- rh174 - AMG-CP	ADSCs/ Humanas	1 µg/ml	Aumento de la proliferación, particularmente con la forma larga (rh174), y de la migración celular.
Kunimatsu, 2018 (37)	AMG-CP	MSC/ Humanas	0.1 y 1 µg/ml g/ml	Aumento en la proliferación dependiente de la dosis (aumenta a mayor dosis).
Awada, 2017 (24)	Amg-CP	MC3T3-E1/ratón	0.1 y 1 µg/ml	Aumenta la proliferación, en la fase temprana del crecimiento celular, a 0.1 y 1 µg/ml. No hubo efecto en la mineralización (rojo de alizarina) ni la diferenciación (ausencia de cambios en la expresión de ALP y BSP).
Matsuda, 2017 (42)	csLRAP	MC3T3-E1/ ratón	0.5, 1 y 10 µg/ml	Suprime proliferación, aumento de la diferenciación osteogénica (expresión de RUNX2, ALP, Col1α2, BSP y OPN), sin efecto de la expresión de OCN. Aumenta mineralización a 10 µg/ml.
Le, 2016 (47)	-miR-exón4 -AMELX	Osteoblastos de calota/ ratón	Sobreexpresión	miR-exón4 funciona como regulador positivo de Runx2 durante la diferenciación de osteoblastos.
Amin, 2016 (48)	TRAP	HAC	0, 1, 10, 50 y 100 µg / ml	Suprime la diferenciación osteogénica de BSP y reduce la formación de nódulos de mineralización, acompañado de una disminución de ALP en todas las concentraciones.
Imhof, 2015 (49)	rM179	Osteoblastos de calota/ ratón	0,5 µg/ml	Permite la adhesión celular al unirse con bucle RGD en el extremo C terminal
Noro, 2015 (50)	Anticuerpo anti-AMELX	MC3T3-E1	1: 500	Aumento en la mineralización (mayor actividad de ALP)
Wang, 2015 (51)	TetR/Amelx	MSC/ ratón	Sobreexpresión	Aumento en la diferenciación osteogénica OSX, COL1, BSP y OCN, y en la mineralización en etapa temprana (ALP y rojo de alizarina)
Olivares-Navarrete, 2014 (53)	-rh-AMEL -NTAP	MSC/Humana	1 y 10 µg/ml	Aumentan la diferenciación, estimulando la producción de ALP, OCN, TGF-β1, RUNX2, COL1 y OPG dependiente de la dosis. No hubo efecto de rhAMEL en OCN en todas las dosis.
Tanimoto, 2012 b (56)	rh174	PDL/Humano	0.1 y 1 µg/ml	En HPDL no tuvo efectos sobre diferenciación de ALP, OCN y BSP y mineralización (rojo de alizarina) en ambas dosis.
Tanimoto, 2012 a (57)	rh174	MSC/Humana	0.01 y 0.1 µg/ml	Aumenta diferenciación osteogénica (ALP, COL1, OPN y BSP, sin efecto en la expresión de OCN) a 0.1 µg/ml. Aumento en la mineralización (rojo de alizarina) dependiente de la dosis.
Amin, 2012 (58)	-LMW (TRAP) -HMW (LRAP)	PDL/Humano	0.1 µg/ml	Aumento de diferenciación (aumento en la expresión temprana de Runx2, intermedia de OP y tardía de OCN y BSP) y mineralización (ALP) por HMW, disminución con LMW.
Izumikawa, 2012 (20)	25kDa (longitud completa)	BMSC/ ratón	0.01, 0.1 y 1 µg/ml	Ausencia de efecto sobre la proliferación celular a 0.1 µg/ml. Aumento de la diferenciación osteogénica (aumento expresión de OPN, ONC, COL1, OCN y DP1 y mineralización a 0.1 µg/ml.
Hu, 2011 (61)	LV-hAm	hBMSC/Humana	Sobreexpresión	Regulación de la diferenciación osteogénica mediante el aumento de la expresión de BMP-2, BMP-6, OPN y VEGFC
Kemoun, 2011 (65)	rphM180	HPDL/Humana	5 µg/ml	Aumento de la proliferación, migración, diferenciación (expresión de ALP) y mineralización.

Wen, 2011 (67)	LRAP	ST2	0.01 µg/ml	Efecto mínimo en proliferación. Aumento en la diferenciación osteogénica (expresión de RUNX2 y OCN) y de la Mineralización.
Nakayama, 2010 (69)	25kDa (longitud completa) 20kDa, 13kDa, 6kDa	ROS 17 / 2.8/ ratón	0.1 µg/ml	Aumentan diferenciación osteogénica de BSP por AMELX de 25 kDa y sus derivados proteolíticos
Huang, 2010 (68)	rh174	MSC/ Humana	0.001, 0.01, 0.1 y 1 µg/ml	Aumento de la proliferación con todas las dosis empleadas, en mayor proporción con 0.1 µg/ml.
Beyeler, 2010 (71)	rAMEL	-MG63 -SAOS-2 -ROS -IMR-90 -3T3	10 µl	AMELX facilitó la adhesión de todos los tipos de células excepto SAOS-2.
Matsuzawa, 2009 (74)	rM179	ROS17/2.8/ ratón	0.1, 1.0 y 5.0 µg/ml	Osteogénesis en etapa tardía, aumento de la diferenciación de OCN, moderadamente de RANKL, COL1, efecto mínimo en ALP y no tuvo efecto en OPG en todas las dosis.
Warotayanont, 2009 (75)	LRAP	EB (cuerpo embrionario) /ratón	0.01 µg/ml	Aumento en la diferenciación celular (aumento expresión de OSX y BSP) y en la mineralización.
Saito, 2008 (78)	rAMEL	MC3T3-E1/ ratón	10 µg/ml	AMELX recupero la actividad de ALP asociada a BMP.
Nishiguchi, 2007 (81)	rAMEL	Osteoblastos de calota /ratón	1 o 2 µg/ml	En Osteoblastos de calota disminuye osteoclastogénesis y la diferenciación de OCN, ALP y ON
Warotayanont, 2007 (80)	LRAP	ES (células madres embrionarias) /ratón KO	0.01 µg/ml	Aumento en la diferenciación celular (aumento de la expresión de BSP y OSX, más pronunciado de forma tardía) y aumento en la mineralización.
Hatakeyama, 2006 (82)	LRAP P172	BMSC/ ratón	0.001, 0.01 o 0.1 µg/ml	Con LRAP hay disminución de osteoclastogénesis y aumento de proliferación y migración celular dependiente de la dosis. Con la forma entera de la AMELX porcina (p172) no existe alteración en osteoclastogénesis, pero si un aumento de la proliferación y migración celular dependiente de la dosis.
Zeichner-David, 2006 (85)	M179 o mrAMGN	PDL /ratón	0.005, 0.01, 0.015, 0.020 y 0.1 µg/ml	Aumento en la proliferación, adhesión en todas las dosis. Aumento diferenciación de BMP, COL1, OCN y BSP a 0.1 µg/ml

Tabla 8. Modelos *In vitro* de AMELX.

(*) µg/ml

rAMEL: AMELX recombinante de ratón de longitud completa

rh-AMEL: AMELX recombinante humana de longitud completa

NTAP: péptido N-terminal de AMELX porcina

TRAP: Péptido de AMELX rico en tirosina

LRAP o A-4: Péptido de AMELX rico en leucina.

HAP: péptido sintético derivado del exón 5 de AMELX humana

AMG-CP: Extremo C-terminal del péptido de AMELX humana

rh174: AMELX humana de longitud completa

rM179/ mrAMGN: AMELX recombinante de ratón.

csLRAP: LRAP sintetizado químicamente

LV-hAm: Lentivirus inductor de la expresión de AMELX.

HMW (LRAP): Fracción de alto peso molecular del EMDOGAIN.

LMW (TRAP): Fracción de bajo peso molecular del EMDOGAIN.

Rh163: fragmentos de AMELX que carece del extremo C-terminal

rh128: fragmentos de AMELX que carece del extremo N-terminal

Péptido C11: región C-terminal de rh174

miRNA Exon4: micro RNA de exón 4.

Rp(H)M180: AMELX recombinante de ratón etiquetada con poli (His) de 180 aminoácidos

p172: homólogo porcino de M180

Autor/Año	Isoforma	Célula/especie	Dosis (*)	Efecto General
Chawewannakorn, 2019 (36)	rhAMBn comercial	RAW264.7 o BMM estimuladas con RANKL	0.01, 0.05 y 0.1 µg/ml	AMBn inhibe la Osteoclastogénesis dependiente de la dosis. Hubo una disminución en la reabsorción ósea.
Stakkestad, 2017 (43)	-AMBn-WT -DelEx5 -N-terminal -C-terminal -Ex5, -Ex5-18 -Ex5-36 -Ex5 Q9NP70 -Q9NP70. Laboratorio	hMSC/ humana	0,1 y 0,2 µM	Proliferación: se promovió con AMBN-WT y 0,1 DelEx5 µM, no se observó efecto con N-terminal y C-terminal. Se promovió con el exón 5 0,2 µM y se inhibió con Ex5 Q9NP70 y Q9NP70. Diferenciación: expresión de RUNX2 por N-terminal, Ex5, Ex5-18 y Ex5 Q9NP70. Ex5 expresión de OCN. AMBN-WT expresión de RANKL. No hubo efecto en OPG para todas las formas. Mineralización: aumento de nódulos mineralizados (rojo de alizarina) con Ex5, Ex5-18, Ex5-36, Ex5 Q9NP70 y Q9NP70 a 0,2 µM en medio osteogénico.
Kitagawa, 2017 (41)	16N-terminal de AMBN comercial	MC3T3-E1	0.001, 0.01 y 0.1 µg/ml	No hubo diferencias con los controles en la proliferación. Hubo un aumento en la diferenciación (expresión de ALP, BSP, OCN y COL1) dependiente de la dosis y mineralización a 0.01 y 0.1 µg/ml
Chawewannakorn, 2017 (40)	rhAmbn comercial	ST2 ST2 + BMC/ ratón	0.1 µg/ml	Hubo una disminución de la Osteoclastogénesis al suprimir la expresión de RANKL Y OPG. Disminución en la diferenciación de BMC a osteoclastos
Ando, 2017 (39)	plásmido AMBNpcDNA3.1	143B-Luc NOS-1	Sobreexpresión	Disminución de migración celular en células y aumento en la diferenciación (expresión de ALP y OCN) en células 143B-Luc. Induce apoptosis en NOS-1.
Lu, 2013 (54)	rmAMBn	BMMC	5 y 10 µg/ml	Mejóro la adhesión celular dependiente de la dosis. Aumento de la Osteoclastogénesis y reabsorción ósea
Kuroda, 2011 (66)	LV-AMBn	SaOS-2humano MC3T3-E1/ratón	Sobreexpresión	La sobreexpresión de Ambn no tuvo un efecto notable sobre la mineralización (rojo de alizarina) en ambas 29células. La AMBN no es necesaria para la remodelación ósea en el hueso craneofacial bajo estrés mecánico.
Kitagawa, 2011 (62)	N-terminal de AMBN Laboratorio	PDLC/ humano	0.001, 0.01 y 0.1 µg/ml	Hubo una disminución en la proliferación en todas las concentraciones y un aumento en la diferenciación y mineralización.
Iizuka, 2011 (63)	rh/tg AMBN	NOS-1 MC3T3-E1/ ratón	Sobreexpresión	Aumento diferenciación (aumento expresión de ALP y OCN) y mineralización (rojo alizarina)
Tamburstuen, 2010 (70)	hrAmbn rrAbbn comercial	MSC/humano NHO/ humano	10 y 50 µg/ml	Aumento proliferación MSC por rrAbbn y osteoblastos por hrAmbn a 10 µg/ml, así como la diferenciación de células precursoras de osteoclastos a 10 µg/ml, siendo no significativo a 50 µg ml.
Beyeler, 2010 (71)	rAMBn comercial	-MG63 -SAOS-2 -ROS -IMR-90 -3T3	10 µl	AMBn es la única proteína que es capaz de promover la adhesión estable, en todas las 29células estudiadas, en superficies de plástico y titanio
Zeichner-David, 2006 (85)	mrAMBn comercial	PDL/ratón	0.004, 0.01, 0.02 y 0.03 y 0.1 µg/ml	Aumento en la proliferación, adhesión en todas las dosis y diferenciación (aumento expresión de BMP, COL1, OCN) a 0.1 µg/ml

Tabla 9. Modelos *In vitro* de AMBN.

(*) µg/ml

rhAMBn: AMBN recombinante humana de longitud completa

RAW264.7: Célula de ratón modificada

AMBn-WT: AMBN de longitud completa no procesada

Del5x5: AMBN con eliminación del exón 5

Ex5: Péptido relacionado con el exón 5

Ex5-18, Ex5-36 y Ex5 Q9NP70: Péptidos derivado del exón 5

Q9NP70: Péptido derivado del exón 16

hMSC: Células madre mesenquimales humanas

NHO: Osteoblastos primario humano

AMBnpcDNA3.1: Plásmido de AMBN

143B-Luc: Línea celular de osteosarcoma humano

Rh/tg AMBN: AMBN recombinante humana

rrAbbn: Solución recombinante de ameloblastina de rata

Autor/Año	Isoforma	Célula/especie	Dosis (*)	Efecto General
Chaweewannakorn, 2017 (40)	rhEnam comercial	ST2 ST2 + BMC/ ratón	0.1 µg/ml	Hubo una disminución de la Osteoclastogénesis al suprimir la expresión de RANKL Y OPG. Disminución en la diferenciación de BMC a osteoclastos
Beyeler, 2010 (71)	rhENAM comercial	MG63, SAOS-2, ROS, IMR-90 y 3T3	10 µl	ENAM no promovió la adhesión celular, en todas las células estudiadas.

Tabla 10. Modelos *In vitro* de ENAM.

(*) µg/ml

rhENAM: ENAM recombinante humana de longitud completa

ST2: Células estromales bipotenciales de médula ósea

MG63: Célula de osteosarcoma humano

SAOS-2: Célula de osteosarcoma humano

IMR-90: Fibroblastos de pulmón fetal humano

3T3: Fibroblastos embrionarios de ratón

BMC: Células de médula ósea

ROS: Células de osteosarcoma de rata

5.4.2. Modelos *In vivo*

El estudio del potencial de osteoinducción de las ERP, a través de estudios *in vivo* fue más bien excepcional y limitado al modelo de reparación de fracturas de huesos largos o defectos de talla crítica, en animales pequeño (ratón y rata) y mediano (perro). Nuevamente, la ERP más estudiada fue AMELX (Tabla 11), la cual promovió la regeneración ósea (73) aumentando la diferenciación de osteoblastos (83). En modelos AMBN (Tabla 11) se indujo la formación (70) y regeneración ósea casi completa (41). En cuanto a ENAM, no se encontraron estudios que profundicen sobre la capacidad osteogénica de la adición exógena de esta proteína en el tejido óseo. Destacar que las dosis utilizadas en los experimentos *In vivo* fueron más altas en general, que las dosis usadas en experimentos *In Vitro*.

Autor/Año	Isoforma	Tejido/Especie	Dosis (*)	Efecto General
Terada, 2018 (38)	AMELX alta concentración	Fémur de ratón SD	4 µg/ml	Diferenciación ósea inducida por AMELX, mayor formación y volumen óseo (VB) / volumen tisular (TV)
Haze, 2009 (73)	rHAM laboratorio	Hueso alveolar de mandíbula de perro	100 µg/ml	Regeneración del hueso alveolar significativa en etapa tardía de periodontitis crónica experimental, mediante el reclutamiento de células progenitoras mesenquimales CD105 y STRO-1.
Gruenbaum-Cohen, 2009 (72)	rHAM+	Mandíbula de embrión de ratón	1 µg/µl	Aumenta migración celular
Lacerda-Pinheiro, 2006 (83)	AMELX ([A + 4] y [A - 4]) Fabricada	Mucosa de mejilla de ratones C3H/HeN	2 µg	Aumento en la migración de células CD45. Aumento diferenciación (aumento expresión de BSP, particularmente para [A - 4] y OPN) no hubo un aumento en la mineralización (tinción de von Kossa).
Kitagawa, 2017 (41)	16N-AMBN Comercial	Defecto óseo en calota de rata	0.001 µg/ml	Regeneración ósea casi completa.
Tamburstuen, 2010 (70)	rrAMBN comercial	Defecto óseo mandíbula de ratones	0.001 µg	Induce la formación de nuevo hueso, estimulando la curación y la proliferación de células madre mesenquimales y osteoblastos, así como la diferenciación de células precursoras de osteoclastos.

Tabla 11. Modelos *In vivo* de AMELX y AMBN

(*) µg/ml

rHAM: AMELX recombinante humana de longitud completa

A+4: LRAP con exón 4.

LRAP o A-4: Péptido de AMELX rico en leucina.

5.4.3. Las ERP participaron como moléculas de señalización óseas.

A pesar de que un buen número de estudios revelaron la participación de la AMELX en funciones reguladoras y estructurales, así como de estimulación de la osteogénesis, estos no identificaron a un receptor de membrana específico para esta proteína (67, 74, 75), sugiriendo la participación de receptores Proteínquinasa-C (PKC) por medio del alza de TGF- β 1 (53). Por otra parte se reportó que AMELX fue capaz de suprimir la acción de Noggin a través de la formación de complejos con BMP y el sulfato de heparán (78) a nivel de la membrana celular, modulando la vía MAPK-ERK $\frac{1}{2}$ y la vía Wnt/b-catenina (67, 74, 75), dos vías implicadas en la proliferación, en la diferenciación celular y en la osteogénesis (35, 67). (Figura 3).

Para AMBN, se han propuesto muchos mecanismos de señalización, pero tampoco identifican un receptor específico para esta proteína. La literatura examinada muestra que esta molécula modula diferentes vías de señalización celular como STAT 1 y 2 (70), MAPK-ERK (36, 40) y fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) (54), a través de su unión a receptores de superficie tales como como RANK (36), CD44+ (70), CD63 (39, 63) y/o integrina (54). La AMBN aumentó la osteoclastogénesis y la reabsorción de tejido mineralizado al regular la adhesión de células osteoclasticas a través de cascadas de señalización de la matriz extracelular dependientes de integrinas que involucran ERK $\frac{1}{2}$, RhoA, MAPK y la fosforilación de AKT. (Figura 3).

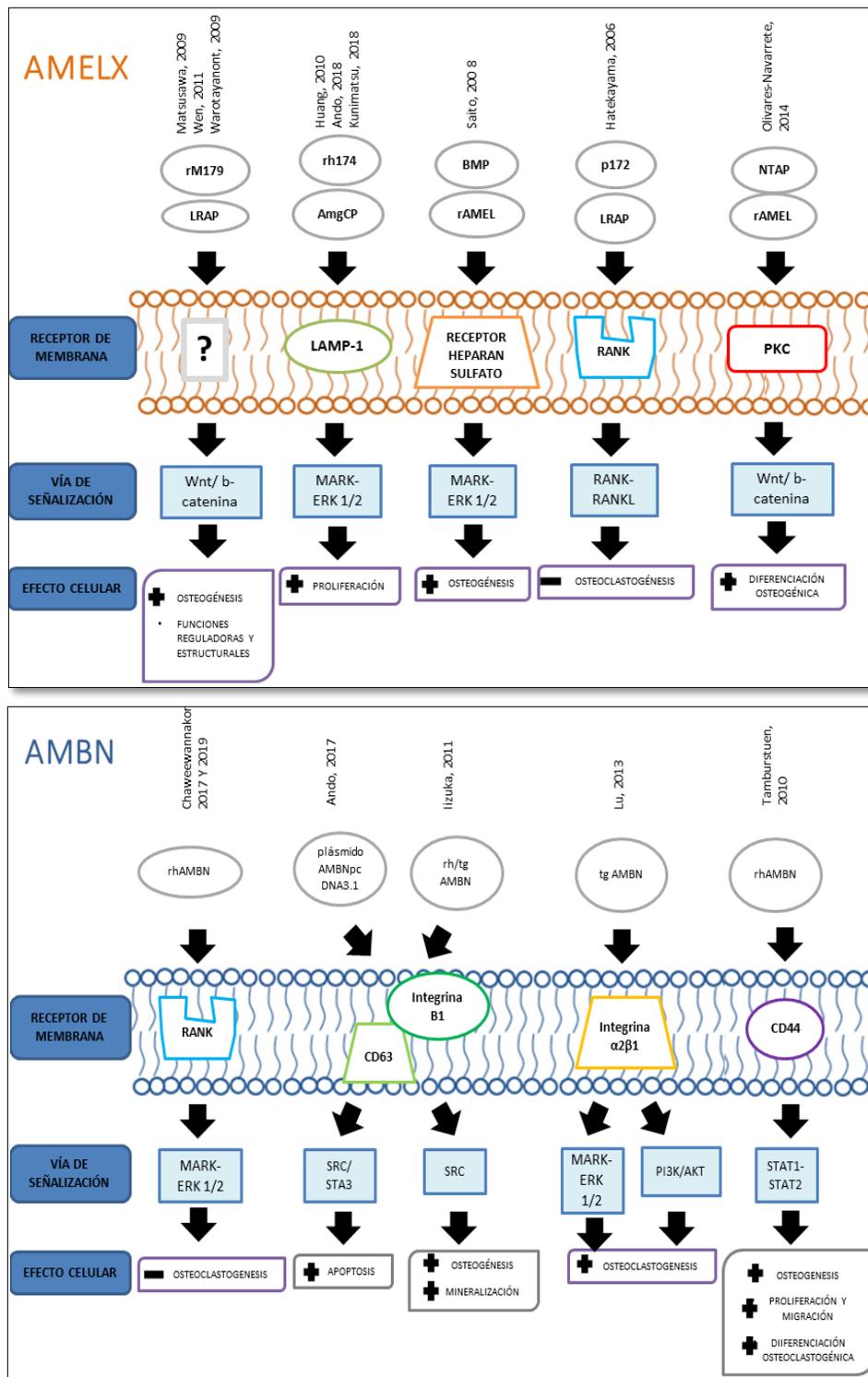


Figura 3. Vías de señalización ósea AMELX y AMBN. Se muestra de superior a inferior: nombre del autor y año que reporta, isoforma de AMELX y AMBN, receptor de membrana, nombre vía de señalización y el efecto celular asociado a cada vía señalada.

6.1. Análisis de Confiabilidad de los estudios revisados.

De acuerdo al análisis confiabilidad de los estudios seleccionados, el mayor porcentaje de entre ellos fueron clasificados como confiables (Tabla 12). Solo un 6,4% siendo evaluados como no confiables. Los principales problemas observados en cada estudio se representan en la Tabla 13.

Puntuación	Categorización Klimisch	% estudios <i>In vitro</i>	% estudios <i>In vivo</i>	% de estudios Transgénicos	% Total
1	Confiable sin restricciones	66,6%	60%	0	66%
2	Confiable con restricciones	16,6%	20%	0	17%
3	No confiable	4,7%	20%	0	6,4%
4	No asignable (*)	11,9%	0	100%	10,6%

Tabla 12. Análisis de calidad de los estudios.

Artículos categorizados según la clasificación de Klimisch et al. 1997. Se observó una mayor cantidad de estudios confiables sin restricciones, seguido de confiables con restricciones, artículos que por detalle del procedimiento experimental cuentan con categoría numérica completa y cumplen con todos los criterios incluyendo los criterios rojos (Ver Anexo 1). Finalmente, el 10% de los estudios fueron categorizados como “no asignable”, donde principalmente se encuentran los estudios de modelos transgénicos y estudios de sobreexpresión de proteína (*in vitro*), en donde no se especifica la cantidad de veces en que variaron los niveles de expresión habituales de las proteínas, no siendo aplicable la herramienta de evaluación de la confiabilidad.

Autor	Criterio que no cumple	Razón
Terada, 2018 (38)	Grupo I: Identificación de sustancia de prueba	No se identificó la ERP de prueba (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)
Le, 2016 (47)	Grupo III: Descripción del diseño del estudio	No se explicó la frecuencia ni duración de la exposición, no se da número de replicas
Noro, 2015 (50)	Grupo I: Identificación de sustancia de prueba	No se identificó la ERP de prueba, la ERP no estaba aislada, no se proporciona información sobre la fuente/origen de la ERP.
	Grupo II: Caracterización del sistema de prueba	No se proporcionó origen ni edad del sistema de prueba.
	Grupo III: Descripción del diseño de estudio	No especificó dosis, no incluyó control negativo

Chen, 2011 (64)	Grupo III: Descripción del diseño del estudio	No incluyó control negativo
--------------------	---	-----------------------------

Tabla 13. Detalle de estudios no confiables según TorxTool modificado 2020. Se detallan los autores, grupo de criterio no cumplido y la razón final por la cual no clasifica en una categoría más alta en relación a confiabilidad. Se destaca en letra roja el criterio rojo específico no cumplido.

6. DISCUSIÓN

Durante años, el estudio de “Proteínas de la matriz del Esmalte”, se enfocó en su rol como molécula de estructural del esmalte (87). Con la presente revisión bibliográfica logramos explorar, ordenar y sintetizar el rol de las ERP (AMELX, AMBN y ENAM) como moléculas de señalización ósea, así como su participación en procesos de desarrollo y regeneración ósea. Los resultados confirman su participación en el crecimiento, desarrollo y regeneración de los tejidos óseos, reafirmando que la expresión y la acción de AMELX, AMBN y ENAM no se limita al tejido dental ni si a los tejidos mineralizados (10, 11, 88).

Es así como en el mesénquima dental, el nivel de expresión es muy cercano al del órgano del esmalte, siendo las tres proteínas revisadas, detectadas en los huesos maxilares y esqueleto apendicular, a distintas etapas del desarrollo (89, 90). En ese sentido, los estudios analizados basados en modelos transgénicos mostraron que las variaciones de la expresión endógena condujeron a la expresión de anomalías en el desarrollo del tejido óseo, promoviendo cambios en su fenotipo y retraso en el crecimiento de los animales mutados (23, 59, 76, 84, 86). Contrariamente; aunque son menos; algunos estudios reclaman una ausencia de efecto de estas mutaciones a nivel óseo (2, 79), sin alteración en los niveles de calcio, fósforo ni la mineralización de este tejido (66, 77).

Los estudios *in vitro* e *in vivo* seleccionados, dejan menos dudas sobre el potencial osteoinductivo de las ERP, confirmando que la adición exógena de AMELX y AMBN estimulan la proliferación, diferenciación y mineralización de células con potencial osteogénico. Ciertos estudios señalan que AMELX (A+4 y A-4) puede comportarse como molécula osteoinductora, estimulando la expresión de Sox9 y Runx2 en fibroblastos *in vitro* e induciendo la proliferación celular, la diferenciación osteogénica, la vascularización y la mineralización *in vivo* (91, 92). Además, destacar que la implantación de péptidos de ERP en los tejidos blandos, dirige a las células CD45+ hacia la vía osteocondrogénica, expresando RP59, SOX9 y BSP (83) y confirmando la capacidad de las ERP para inducir la diferenciación de las células óseas mediante la activación de la vía Runx2 (80).

Una de las razones que explica la heterogeneidad de los estudios, es la gran variedad de isoformas existentes para cada ERP, especialmente para la AMELX, así como el progreso gradual del conocimiento de sus propiedades. De este modo, las opciones a investigar en la búsqueda de la mejor candidata a una posible aplicación clínica, son variadas. La comparación entre las formas enteras y las de bajo peso molecular, sugieren que los fragmentos de una proteína de isoformas de bajo peso molecular, podrían ser más eficaces que la forma completa (43), lo que podría estar relacionado a una biodisponibilidad superior y/o una conformación estructural más favorable.

Sin embargo, parece ser que aun cuando estudiemos una misma isoforma de alguna de las ERP analizadas, la concentración determina la magnitud del efecto biológico. Es así que ciertos estudios especifican que la proliferación celular no es promovida a bajas concentraciones (33), pero sí a concentraciones mayores (20). Es por esta razón que varios de los estudios analizados realizaron una primera etapa de calibración, buscando la dosis óptima para una respuesta celular dada (36), siendo estas dosis reproducidas en estudios posteriores (56, 57).

La variación en la respuesta celular podría deberse a la capacidad de las moléculas a reaccionar con un tipo celular determinado y a la presencia de receptores adecuados en estas células. Es así que, si bien es cierto, hay una cierta unanimidad en los estudios seleccionados respecto al efecto de estas proteínas en las células con potencial osteogénico, el tipo de célula efectora involucrada tiene un rol importante en algunas variaciones observadas. Esto queda demostrado en ciertos estudios que analizan el efecto osteoinductor del LRAP en los que observamos que, a la misma concentración, este péptido promueve la proliferación de forma positiva (82), mientras que según otros estudios este efecto fue mínimo o nulo (67, 42). En este sentido, un buen número de estudios utilizan líneas celulares inmortalizadas derivadas de sarcomas humanos para el estudio de estas proteínas (66, 71) que sin embargo, a pesar de su utilidad y su fácil manipulación, éstas presentan ciertas desventajas, pudiendo responder exageradamente y no fisiológicamente, frente a diferentes estímulos, como la exposición experimental a las ERP (39, 93). Un salto importante es utilizar cultivos primarios de células de origen humano (óseas, periodontales

o adiposas), las cuales poseen una actividad osteogénica comprobables con células madre identificadas por marcadores celulares específicos.

Otro de los factores a considerar a la hora de planificar un estudio futuro, particularmente *in vivo* parece ser la edad de los animales empleados, el cual parece ser un factor importante en la magnitud del efecto. Donde la literatura muestra que las ERP inducen (AMELX) y estimulan (AMBN) el compromiso osteogénico de las células mesenquimales en etapas muy tempranas de cepas y/o progenitores (23, 92).

Desafortunadamente, a pesar de la evidencia aportada por la presente revisión respecto de la existencia de un factor osteogénico asociado con ERP (70, 73, 92), la aparición en el corto plazo de un producto derivado de las ERP que mejore la formación ósea, parece aún lejano. Es así, que pudimos encontrar un número limitado de artículos *in vivo* publicados, donde ninguno de ellos ha sido realizado en humanos. Felizmente, estudios de fracciones aisladas de EMD han comenzado a enfocarse en el análisis de la actividad de fracciones específicas (94). En ese sentido, estos péptidos activos podrían tener una actividad osteogénica mayor y más predecible que aquella mostrada por los EMD, dado que estos derivados contienen no solo ERP, sino también proteasas que pueden contribuir a modificar la bioactividad (95). Es así, como tanto la forma, como el modo de aplicación de estos productos puede requerir algunos ajustes, siendo esperable alguna de las secuencias de aminoácidos de AMELX y/o AMBN identificadas como sintetizadas y comercializadas bajo la forma de un pequeño péptido sintético capaz de reorientar el perfil embriológico de huesos, activando su potencial de formación primordial.

Estudios anteriores no realizan una búsqueda sistemática de la información ni buscan analizar la confiabilidad de los estudios incluidos, enfocándose principalmente al estudio de los derivados de la matriz del esmalte y no al efecto de las ERP como moléculas independientes. Con la presente revisión mostramos que a pesar de la gran heterogeneidad de las metodologías de los estudios observados, la mayoría de ellos fueron clasificados como confiables, y por lo tanto, útiles para el propósito del estudio. Esta falta de

homogenización en las metodologías, resulta en una gran gama de resultados dependientes de isoforma estudiada para cada ERP, como en su concentración, así como el tipo celular, especie analizada y la edad de los ejemplares.

CONCLUSIONES

Las Proteínas Relacionadas al Esmalte, especialmente Amelogenina y Ameloblastina poseen potencial como moléculas inductoras del desarrollo óseo, siendo buenas candidatas a transformarse en un producto destinado a estimular la regeneración ósea.

Se necesita más investigación *in vitro*, utilizando cultivos primarios de células humanas, además de experimentos *in vivo* que consideren factores como la edad del organismo de prueba y los niveles fisiológicos de estas proteínas, los que permitan calcular el nivel óptimo de algún péptido activo específico capaz de inducir la osteogénesis.

7. REFERENCIAS

1. Isaac J, Lignon G, Jacques J, Berdal A. Ameloblastin as Biomarker of Bone. In: Preedy VR, editor. *Biomarkers in Bone Disease*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2016. p. 1-34.
2. Hu JC, Hu Y, Smith CE, McKee MD, Wright JT, Yamakoshi Y, et al. Enamel defects and ameloblast-specific expression in Enam knock-out/lacZ knock-in mice. *J Biol Chem*. 2008;283(16):10858-71. doi: 10.1074/jbc.M710565200.
3. Papagerakis P, Hu Y, Ye L, Feng JQ, Simmer JP, Hu JC. Identifying promoter elements necessary for enamelin tissue-specific expression. *Cells Tissues Organs*. 2009;189(1-4):98-104. doi: 10.1159/000151429.
4. Iacob S, Veis A. Identification of temporal and spatial expression patterns of amelogenin isoforms during mouse molar development. *European journal of oral sciences*. 2006;114 Suppl 1:194-200; discussion 1. doi: 10.1111/j.1600-0722.2006.00287.x.
5. Jacques J, Hotton D, De la Dure-Molla M, Petit S, Asselin A, Kulkarni AB, et al. Tracking Endogenous Amelogenin and Ameloblastin In Vivo. *Plos One*. 2014;9(6). doi: 10.1371/journal.pone.0099626.
6. Oida S, Nagano T, Yamakoshi Y, Ando H, Yamada M, Fukae M. Amelogenin gene expression in porcine odontoblasts. *J Dent Res*. 2002;81(2):103-8.
7. Hu CC, Simmer JP, Bartlett JD, Qian Q, Zhang C, Ryu OH, et al. Murine Enamelin: CDNA and Derived Protein Sequences. *Connective Tissue Research*. 1998;39(1-3):47-61. doi: 10.3109/03008209809023911.
8. Hammarström L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*. 1997;24(9 Pt 2):658-68. doi: 10.1111/j.1600-051x.1997.tb00247.x.

9. Nunez J, Sanz M, Hoz-Rodriguez L, Zeichner-David M, Arzate H. Human cementoblasts express enamel-associated molecules in vitro and in vivo. *Journal of Periodontal Research*. 2010;45(6):809-14. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01291.x.
10. Spahr A, Lyngstadaas SP, Slaby I, Pezeshki G. Ameloblastin expression during craniofacial bone formation in rats. *European Journal of Oral Sciences*. 2006;114(6):504-11. doi: 10.1111/j.1600-0722.2006.00403.x.
11. Haze A, Taylor AL, Blumenfeld A, Rosenfeld E, Leiser Y, Dafni L, et al. Amelogenin expression in long bone and cartilage cells and in bone marrow progenitor cells. *Anatomical record (Hoboken, NJ : 2007)*. 2007;290(5):455-60. doi: 10.1002/ar.20520.
12. Atsawasuwan P, Lu X, Ito Y, Chen Y, Gopinathan G, Evans CA, et al. Expression and Function of Enamel-related Gene Products in Calvarial Development. *Journal of Dental Research*. 2013;92(7):622-8. doi: 10.1177/0022034513487906.
13. Jacques J, Hotton D, Asselin A, De la Dure-Molla M, Coudert AE, Isaac J, et al. Ameloblastin as a putative marker of specific bone compartments. *Connective Tissue Research*. 2014;55:117-20. doi: 10.3109/03008207.2014.923849.
14. Urban I, Jovanovic S, Lozada J. Vertical Ridge Augmentation Using Guided Bone Regeneration (GBR) in Three Clinical Scenarios Prior to Implant Placement: A Retrospective Study of 35 Patients 12 to 72 Months After Loading. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 2009;24:502-10.
15. Khoury F, Antoun H, Missika P. *Bone augmentation in oral implantology*: Quintessence London; 2007.
16. Heijl L. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *J Clin Periodontol*. 1997;24(9 Pt 2):693-6. doi: 10.1034/j.1600-051x.1997.00693.x.

17. Heijl L, Heden G, Svärdröm G, Ostgren A. Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Clin Periodontol*. 1997;24(9 Pt 2):705-14. doi: 10.1111/j.1600-051x.1997.tb00253.x.
18. Hoang AM, Klebe RJ, Steffensen B, Ryu OH, Simmer JP, Cochran DL. Amelogenin is a cell adhesion protein. *J Dent Res*. 2002;81(7):497-500. doi: 10.1177/154405910208100713.
19. Almqvist S, Kleinman HK, Werthén M, Thomsen P, Agren MS. Effects of amelogenins on angiogenesis-associated processes of endothelial cells. *Journal of wound care*. 2011;20(2):68, 70-5. doi: 10.12968/jowc.2011.20.2.68.
20. Izumikawa M, Hayashi K, Polan MAA, Tang J, Saito T. Effects of Amelogenin on Proliferation, Differentiation, and Mineralization of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells *In Vitro*. *The Scientific World Journal*. 2012;2012:879731. doi: 10.1100/2012/879731.
21. Nebgen DR, Inoue H, Sabsay B, Wei K, Ho CS, Veis A. Identification of the chondrogenic-inducing activity from bovine dentin (bCIA) as a low-molecular-mass amelogenin polypeptide. *J Dent Res*. 1999;78(9):1484-94. doi: 10.1177/00220345990780090201.
22. Maycock J, Wood SR, Brookes SJ, Shore RC, Robinson C, Kirkham J. Characterization of a porcine amelogenin preparation, EMDOGAIN, a biological treatment for periodontal disease. *Connective tissue research*. 2002;43(2-3):472-6. doi: 10.1080/03008200290000880.
23. Atsawasuwan P, Lu X, Ito Y, Zhang Y, Evans CA, Luan X. Ameloblastin inhibits cranial suture closure by modulating MSX2 expression and proliferation. *PLoS One*. 2013;8(4):e52800. doi: 10.1371/journal.pone.0052800.

24. Awada T, Kunimatsu R, Yoshimi Y, Hirose N, Mitsuyoshi T, Sumi K, et al. Effects of C-terminal amelogenin peptides on the metabolism of osteoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;482(4):1154-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.003.
25. Ferrari R. Writing narrative style literature reviews. *Medical Writing*. 2015;24:230-5. doi: 10.1179/2047480615Z.000000000329.
26. Chong CH, Carnes DL, Moritz AJ, Oates T, Ryu OH, Simmer J, et al. Human periodontal fibroblast response to enamel matrix derivative, amelogenin, and platelet-derived growth factor-BB. *Journal of Periodontology*. 2006;77(7):1242-52. doi: 10.1902/jop.2006.050147.
27. Tricco AC, Lillie E, Zarin W, O'Brien KK, Colquhoun H, Levac D, et al. PRISMA Extension for Scoping Reviews (PRISMA-ScR): Checklist and Explanation. *Annals of Internal Medicine*. 2018;169(7):467-73. doi: 10.7326/M18-0850.
28. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PG. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLOS Medicine*. 2009;6(7):e1000097. doi: 10.1371/journal.pmed.1000097.
29. CERDA L J, VILLARROEL DEL P L. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Revista chilena de pediatría*. 2008;79:54-8.
30. Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews. *Systematic Reviews*. 2016;5(1):210. doi: 10.1186/s13643-016-0384-4.
31. Peters MD, Godfrey CM, Khalil H, McInerney P, Parker D, Soares CB. Guidance for conducting systematic scoping reviews. *Int J Evid Based Healthc*. 2015;13(3):141-6. doi: 10.1097/xeb.0000000000000050.

32. Schneider K, Schwarz M, Burkholder I, Kopp-Schneider A, Edler L, Kinsner-Ovaskainen A, et al. "ToxRTool", a new tool to assess the reliability of toxicological data. *Toxicology Letters*. 2009;189(2):138-44. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.05.013>.
33. Takahashi A, Morita T, Murata K, Minowa E, Jahan A, Saito M, et al. Effects of full-length human amelogenin on the differentiation of dental epithelial cells and osteoblastic cells. *Arch Oral Biol*. 2019;107:104479. doi: [10.1016/j.archoralbio.2019.07.004](https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.07.004).
34. Takeuchi T, Masuno K, Kato H, Taguchi Y, Umeda M, Okusa N, et al. A Human Amelogenin-Derived Oligopeptide Enhances Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells. *Journal of Hard Tissue Biology*. 2019;28:251-8. doi: [10.2485/jhtb.28.251](https://doi.org/10.2485/jhtb.28.251).
35. Ando K, Kunimatsu R, Awada T, Yoshimi Y, Tsuka Y, Sumi K, et al. Effects of Human Full-length Amelogenin and C-terminal Amelogenin Peptide on the Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue. *Curr Pharm Des*. 2018;24(25):2993-3001. doi: [10.2174/1381612824666180816093227](https://doi.org/10.2174/1381612824666180816093227).
36. Chaweewannakorn W, Ariyoshi W, Okinaga T, Fujita Y, Maki K, Nishihara T. Ameloblastin attenuates RANKL-mediated osteoclastogenesis by suppressing activation of nuclear factor of activated T-cell cytoplasmic 1 (NFATc1). *Journal of Cellular Physiology*. 2019;234(2):1745-57. doi: [10.1002/jcp.27045](https://doi.org/10.1002/jcp.27045).
37. Kunimatsu R, Awada T, Yoshimi Y, Ando K, Hirose N, Tanne Y, et al. The C-terminus of the amelogenin peptide influences the proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol*. 2018;89(4):496-505. doi: [10.1002/jper.17-0087](https://doi.org/10.1002/jper.17-0087).
38. Terada C, Komasa S. Effect of Amelogenin Coating of a Nano-Modified Titanium Surface on Bioactivity. 2018;19(5). doi: [10.3390/ijms19051274](https://doi.org/10.3390/ijms19051274).

39. Ando T, Kudo Y, Iizuka S, Tsunematsu T, Umehara H, Shrestha M, et al. Ameloblastin induces tumor suppressive phenotype and enhances chemosensitivity to doxorubicin via Src-Stat3 inactivation in osteosarcoma. *Scientific Reports*. 2017;7(1):40187. doi: 10.1038/srep40187.
40. Chaweewannakorn W, Ariyoshi W, Okinaga T, Morikawa K, Saeki K, Maki K, et al. Ameloblastin and enamel prevent osteoclast formation by suppressing RANKL expression via MAPK signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;485(3):621-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.181.
41. Kitagawa M, Ando T, Subarnbhesaj A, Uchida T, Miyauchi M, Takata T. N-terminal region of human ameloblastin synthetic peptide promotes bone formation. *Odontology*. 2017;105(1):116-21. doi: 10.1007/s10266-016-0243-8.
42. Matsuda Y, Hatakeyama Y, Nakashima K, Kamogashira N, Hatakeyama J, Sachio T, et al. Effects of a Chemically Synthesized Leucine-Rich Amelogenin Peptide (csLRAP) on Chondrogenic and Osteogenic Cells. *Journal of Hard Tissue Biology*. 2017;26:51-60. doi: 10.2485/jhtb.26.51.
43. Stakkestad Ø, Lyngstadaas SP, Vondrasek J, Gordeladze JO, Reseland JE. Ameloblastin Peptides Modulates the Osteogenic Capacity of Human Mesenchymal Stem Cells. *Frontiers in Physiology*. 2017;8(58). doi: 10.3389/fphys.2017.00058.
44. Kunimatsu R, Yoshimi Y, Hirose N, Awada T, Miyauchi M, Takata T, et al. The C-terminus of amelogenin enhances osteogenic differentiation of human cementoblast lineage cells. *J Periodontal Res*. 2017;52(2):218-24. doi: 10.1111/jre.12384.
45. Lu X, Li W, Fukumoto S, Yamada Y, Evans CA, Diekwisch T, et al. The ameloblastin extracellular matrix molecule enhances bone fracture resistance and promotes rapid bone fracture healing. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2016;52-54:113-26. doi: 10.1016/j.matbio.2016.02.007.

46. Lu X, Fukumoto S, Yamada Y, Evans CA, Diekwisch TG, Luan X. Ameloblastin, an Extracellular Matrix Protein, Affects Long Bone Growth and Mineralization. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2016;31(6):1235-46. doi: 10.1002/jbmr.2788.
47. Le MH, Warotayanont R, Stahl J, Den Besten PK, Nakano Y. Amelogenin Exon4 Forms a Novel miRNA That Directs Ameloblast and Osteoblast Differentiation. *J Dent Res*. 2016;95(4):423-9. doi: 10.1177/0022034515622443.
48. Amin HD, Ethier CR. Differential effects of tyrosine-rich amelogenin peptide on chondrogenic and osteogenic differentiation of adult chondrocytes. *Cell and Tissue Research*. 2016;364(1):219-24. doi: 10.1007/s00441-015-2292-7.
49. Imhof T, Gruenewald N, Schwarz G, Noack M, Koch M. Modified amelogenin is a new and versatile nanomaterial for biomedical applications: Osteoblast Binding to RGD-Modified Amelogenin. *Biotechnology and Bioengineering*. 2015;112. doi: 10.1002/bit.25576.
50. Noro D, Kurashige Y, Shudo K, Takahashi A, Abiko Y, Saitoh M. Effect of epithelial cells derived from periodontal ligament on osteoblast-like cells in a Transwell membrane coculture system. *Archives of Oral Biology*. 2015;60(7):1007-12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.02.016>.
51. Wang F, Okawa H, Kamano Y, Niibe K, Kayashima H, Osathanon T, et al. Controlled Osteogenic Differentiation of Mouse Mesenchymal Stem Cells by Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation of Amelogenin. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145677. doi: 10.1371/journal.pone.0145677.
52. Chan H-L, Giannobile WV, Eber RM, Simmer JP, Hu JC. Characterization of Periodontal Structures of Enamelin-Null Mice. *Journal of Periodontology*. 2014;85(1):195-203. doi: 10.1902/jop.2013.120651.

53. Olivares-Navarrete R, Vesper K, Hyzy SL, Almaguer-Flores A, Boyan BD, Schwartz Z. Role of the N-terminal peptide of amelogenin on osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater.* 2014;28:1-10; discussion doi: 10.22203/ecm.v028a01.
54. Lu X, Ito Y, Atsawasuwan P, Dangaria S, Yan X, Wu T, et al. Ameloblastin modulates osteoclastogenesis through the integrin/ERK pathway. *Bone.* 2013;54(1):157-68. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.01.041>.
55. Chan AHL, Lertlam R, Simmer JP, Wang C-N, Hu JCC. Bodyweight assessment of enamel null mice. *BioMed research international.* 2013;2013:246861-. doi: 10.1155/2013/246861.
56. Tanimoto K, Kunimatsu R, Tanne Y, Huang YC, Michida M, Yoshimi Y, et al. Differential effects of amelogenin on mineralization of cementoblasts and periodontal ligament cells. *J Periodontol.* 2012;83(5):672-9. doi: 10.1902/jop.2011.110408.
57. Tanimoto K, Huang YC, Tanne Y, Kunimatsu R, Michida M, Yoshioka M, et al. Amelogenin enhances the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 2012;196(5):411-9. doi: 10.1159/000335912.
58. Amin HD, Olsen I, Knowles JC, Donos N. Differential effect of amelogenin peptides on osteogenic differentiation in vitro: identification of possible new drugs for bone repair and regeneration. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(11-12):1193-202. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0375.
59. Coxon TL, Brook AH, Barron MJ, Smith RN. Phenotype-genotype correlations in mouse models of amelogenesis imperfecta caused by Amelx and Enam mutations. *Cells Tissues Organs.* 2012;196(5):420-30. doi: 10.1159/000336440.
60. Fuchs H, Sabrautzki S, Seedorf H, Rathkolb B, Rozman J, Hans W, et al. Does enamel have pleiotropic effects on organs other than the teeth? Lessons from a

phenotyping screen of two enamelin-mutant mouse lines. *European Journal of Oral Sciences*. 2012;120(4):269-77. doi: 10.1111/j.1600-0722.2012.00966.x.

61. Jingchao H, Rong S, Zhongchen S, Lan C. Human amelogenin up-regulates osteogenic gene expression in human bone marrow stroma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011;408(3):437-41. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.042>.

62. Kitagawa M, Kitagawa S, Nagasaki A, Miyauchi M, Uchida T, Takata T. Synthetic ameloblastin peptide stimulates differentiation of human periodontal ligament cells. *Archives of Oral Biology*. 2011;56(4):374-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.10.012>.

63. Iizuka S, Kudo Y, Yoshida M, Tsunematsu T, Yoshiko Y, Uchida T, et al. Ameloblastin Regulates Osteogenic Differentiation by Inhibiting Src Kinase via Cross Talk between Integrin β 1 and CD63. *Molecular and Cellular Biology*. 2011;31(4):783. doi: 10.1128/MCB.00912-10.

64. Chen X, Li Y, Alawi F, Bouchard JR, Kulkarni AB, Gibson CW. An amelogenin mutation leads to disruption of the odontogenic apparatus and aberrant expression of Notch1. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2011;40(3):235-42. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00940.x.

65. Kémoun P, Gronthos S, Snead ML, Rue J, Courtois B, Vaysse F, et al. The role of cell surface markers and enamel matrix derivatives on human periodontal ligament mesenchymal progenitor responses in vitro. *Biomaterials*. 2011;32(30):7375-88. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.06.043>.

66. Kuroda S, Wazen R, Sellin K, Tanaka E, Moffatt P, Nanci A. Ameloblastin is not implicated in bone remodelling and repair. *Eur Cell Mater*. 2011;22:56-66; discussion -7. doi: 10.1371/journal.pone.0099626

10.22203/ecm.v022a05.

67. Wen X, Cawthorn WP, MacDougald OA, Stupp SI, Snead ML, Zhou Y. The influence of Leucine-rich amelogenin peptide on MSC fate by inducing Wnt10b expression. *Biomaterials*. 2011;32(27):6478-86. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.045>.
68. Huang Y-C, Tanimoto K, Tanne Y, Kamiya T, Kunimatsu R, Michida M, et al. Effects of human full-length amelogenin on the proliferation of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *Cell and Tissue Research*. 2010;342(2):205-12. doi: [10.1007/s00441-010-1064-7](https://doi.org/10.1007/s00441-010-1064-7).
69. Nakayama Y, Yang L, Mezawa M, Araki S, Li Z, Wang Z, et al. Effects of porcine 25 kDa amelogenin and its proteolytic derivatives on bone sialoprotein expression. *Journal of Periodontal Research*. 2010;45(5):602-11. doi: [10.1111/j.1600-0765.2010.01272.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2010.01272.x).
70. Tamburstuen MV, Reppe S, Spahr A, Sabetrasekh R, Kvalheim G, Slaby I, et al. Ameloblastin promotes bone growth by enhancing proliferation of progenitor cells and by stimulating immunoregulators. *European Journal of Oral Sciences*. 2010;118(5):451-9. doi: [10.1111/j.1600-0722.2010.00760.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2010.00760.x).
71. Beyeler M, Schild C, Lutz R, Chiquet M, Trueb B. Identification of a fibronectin interaction site in the extracellular matrix protein ameloblastin. *Experimental Cell Research*. 2010;316(7):1202-12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.12.019>.
72. Gruenbaum-Cohen Y, Tucker AS, Haze A, Shilo D, Taylor AL, Shay B, et al. Amelogenin in cranio-facial development: the tooth as a model to study the role of amelogenin during embryogenesis. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 2009;312B(5):445-57. doi: [10.1002/jez.b.21255](https://doi.org/10.1002/jez.b.21255).

73. Haze A, Taylor AL, Haegewald S, Leiser Y, Shay B, Rosenfeld E, et al. Regeneration of bone and periodontal ligament induced by recombinant amelogenin after periodontitis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2009;13(6):1110-24. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00700.x.
74. Matsuzawa M, Sheu T-j, Lee YJ, Chen M, Li TF, Huang C, et al. Putative signaling action of amelogenin utilizes the Wnt/ β -catenin pathway. *Journal of Periodontal Research - J PERIOD RES*. 2009;44:289-96. doi: 10.1111/j.1600-0765.2008.01091.x.
75. Warotayanont R, Frenkel B, Snead ML, Zhou Y. Leucine-rich amelogenin peptide induces osteogenesis by activation of the Wnt pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;387(3):558-63. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.07.058>.
76. Wazen RM, Moffatt P, Zalzal SF, Yamada Y, Nanci A. A mouse model expressing a truncated form of ameloblastin exhibits dental and junctional epithelium defects. *Matrix Biology*. 2009;28(5):292-303. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.04.004>.
77. Smith CE, Wazen R, Hu Y, Zalzal SF, Nanci A, Simmer JP, et al. Consequences for enamel development and mineralization resulting from loss of function of ameloblastin or enamelin. *European journal of oral sciences*. 2009;117(5):485-97. doi: 10.1111/j.1600-0722.2009.00666.x.
78. Saito K, Konishi I, Nishiguchi M, Hoshino T, Fujiwara T. Amelogenin binds to both heparan sulfate and bone morphogenetic protein 2 and pharmacologically suppresses the effect of noggin. *Bone*. 2008;43(2):371-6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.03.029>.
79. Hu Y, Papagerakis P, Ye L, Feng JQ, Simmer JP, Hu JC. Distal cis-regulatory elements are required for tissue-specific expression of enamelin (Enam). *Eur J Oral Sci*. 2008;116(2):113-23. doi: 10.1111/j.1600-0722.2007.00519.x.

80. Warotayanont R, Zhu D, Snead ML, Zhou Y. Leucine-rich amelogenin peptide induces osteogenesis in mouse embryonic stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;367(1):1-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.12.048.
81. Nishiguchi M, Yuasa K, Saito K, Fukumoto E, Yamada A, Hasegawa T, et al. Amelogenin is a negative regulator of osteoclastogenesis via downregulation of RANKL, M-CSF and fibronectin expression in osteoblasts. *Archives of Oral Biology*. 2007;52(3):237-43. doi: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.09.016>.
82. Hatakeyama J, Philp D, Hatakeyama Y, Haruyama N, Shum L, Aragon MA, et al. Amelogenin-mediated regulation of osteoclastogenesis, and periodontal cell proliferation and migration. *J Dent Res*. 2006;85(2):144-9. doi: 10.1177/154405910608500206.
83. Lacerda-Pinheiro S, Septier D, Tompkins K, Veis A, Goldberg M, Chardin H. Amelogenin gene splice products A+4 and A-4 implanted in soft tissue determine the reorientation of CD45-positive cells to an osteo-chondrogenic lineage. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2006;79A(4):1015-22. doi: 10.1002/jbm.a.30912.
84. Li Y, Yuan Z-A, Aragon MA, Kulkarni AB, Gibson CW. Comparison of body weight and gene expression in amelogenin null and wild-type mice. *European Journal of Oral Sciences*. 2006;114(s1):190-3. doi: 10.1111/j.1600-0722.2006.00286.x.
85. Zeichner-David M, Chen L-S, Hsu Z, Reyna J, Caton J, Bringas P. Amelogenin and ameloblastin show growth-factor like activity in periodontal ligament cells. *European Journal of Oral Sciences*. 2006;114(s1):244-53. doi: 10.1111/j.1600-0722.2006.00322.x.
86. Chan HL, Giannobile WV, Eber RM, Simmer JP, Hu JC. Characterization of periodontal structures of enamelin-null mice. *J Periodontol*. 2014;85(1):195-203. doi: 10.1902/jop.2013.120651.
87. Moradian-Oldak J. Amelogenins: assembly, processing and control of crystal morphology. *Matrix Biol*. 2001;20(5-6):293-305. doi: 10.1016/s0945-053x(01)00154-8.

88. Tamburstuen MV, Reseland JE, Spahr A, Brookes SJ, Kvalheim G, Slaby I, et al. Ameloblastin expression and putative autoregulation in mesenchymal cells suggest a role in early bone formation and repair. *Bone*. 2011;48(2):406-13. doi: 10.1016/j.bone.2010.09.007.
89. Jacques J, Hotton D, Asselin A, De la Dure-Molla M, Coudert AE, Isaac J, et al. Ameloblastin as a putative marker of specific bone compartments. *Connect Tissue Res*. 2014;55 Suppl 1:117-20. doi: 10.3109/03008207.2014.923849.
90. Jacques J, Hotton D, De la Dure-Molla M, Petit S, Asselin A, Kulkarni AB, et al. Tracking endogenous amelogenin and ameloblastin in vivo. *PLoS One*. 2014;9(6):e99626. doi: 10.1111/jcpe.12218
10.1371/journal.pone.0099626.
91. Veis A. Amelogenin gene splice products: potential signaling molecules. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60(1):38-55. doi: 10.1007/s000180300003.
92. Veis A, Tompkins K, Alvares K, Wei K, Wang L, Wang XS, et al. Specific amelogenin gene splice products have signaling effects on cells in culture and in implants in vivo. *J Biol Chem*. 2000;275(52):41263-72. doi: 10.1074/jbc.M002308200.
93. Hu JC-C, Lertlam R, Richardson AS, Smith CE, McKee MD, Simmer JP. Cell proliferation and apoptosis in enamel null mice. *European Journal of Oral Sciences*. 2011;119(s1):329-37. doi: 10.1111/j.1600-0722.2011.00860.x.
94. Mumulidu A, Hildebrand B, Fabi B, Hammarström L, Cochran DL, Dard M, et al. Purification and analysis of a 5kDa component of enamel matrix derivative. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;857(2):210-8. doi: 10.1016/j.jchromb.2007.07.017.
95. Maycock J, Wood SR, Brookes SJ, Shore RC, Robinson C, Kirkham J. Characterization of a porcine amelogenin preparation, EMDOGAIN, a biological treatment

for periodontal disease. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2-3):472-6. doi:
10.1080/03008200290000880.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO 1. TorxTool Modificado 2020.

Explicaciones de ToxRTool Modificado 2020.				
Objetivo: ToxRTool está diseñado para evaluar la calidad inherente, también llamada confiabilidad, de artículos científicos experimentales (in vivo/in vitro) .				
Esta herramienta esencialmente comprende una lista de criterios de evaluación. Los criterios se subdividen en cinco grupos: I: Identificación de la sustancia de prueba, II: Caracterización del sistema de prueba, III: Descripción del diseño del estudio, IV: Documentación de resultados del estudio, V: Posibilidad de diseño y datos del estudio.				
Por criterio se puede asignar un punto ('1') o ningún punto ('0'). Si se cumple un criterio, asigne '1', si no, asigne '0'. Elija de la lista desplegable correspondiente. ¡Todos los criterios deben ser respondidos!				
Se pueden asignar en total 21 puntos para estudios in vivo, 18 puntos para estudios in vitro. A continuación se proporciona una categorización de confiabilidad basada en el número total de puntos. Los criterios escritos en rojo tienen especial importancia: los puntos para cada uno de los criterios rojos son necesarios para alcanzar la categoría de confiabilidad 1 o 2. ¡Evalúe con especial cuidado!				
La entrada de datos se solicita en (y también se limita a) los campos sombreados en verde.				
Clasificación de la Confiabilidad (definición de categorías según Klimisch et al. 1997)				(Propuesta) Consecuencia.
	in vivo	in vitro		
1	18-21	15-18	Confiable sin restricciones	Útil, verifique la relevancia para el propósito previsto
2	13-17	11-14	Confiable con restricciones	Potencialmente útil, verifique la relevancia para el propósito previsto
3	<13 o no se cumplieron todos los criterios rojos	<11 o no se cumplieron todos los criterios rojos	No confiable	Generalmente no debe usarse como estudio clave, pero dependiendo de las deficiencias del estudio aún puede ser útil en enfoques de peso de la evidencia o como información de apoyo
4			No asignable: documentación insuficiente (revisiones, manuales, otras fuentes secundarias)	Generalmente no debe usarse como estudio clave, pero dependiendo de las deficiencias del estudio, aún puede ser útil en enfoques de peso de la evidencia o como información de apoyo. (¡Esta categoría no es el resultado de esta herramienta de evaluación!)
Además de los criterios para evaluar la fiabilidad de los datos, en la parte inferior de las hojas de trabajo hay algunas preguntas que deben responderse opcionalmente ("Documentación opcional de observaciones con importancia para la relevancia"). Estas preguntas permiten documentar observaciones de una manera no formalizada, lo que puede ser importante para el uso posterior de la información para fines regulatorios u otros.				

Evaluación de confiabilidad de estudios de ERP in vivo		
Estudio bajo evaluación		
Autor:		
Título:		
Centro de pruebas, año, patrocinador, estudio no. o referencia bibliográfica:		
Las explicaciones están disponibles para la mayoría de los criterios y se muestran cuando el cursor se mueve sobre el campo de criterios. ¡Por favor lea cuidadosamente! Criterios rojos: la puntuación máxima es necesaria para que estos criterios alcancen la categoría de confiabilidad 1 o 2 (vea la hoja de trabajo Explicaciones): ¡Evalúe con especial cuidado!		
Criterios		
No.	Criterio Grupo I: Identificación de la sustancia de prueba	Score
1	¿Se identificó la ERP de prueba?	
2	¿Se da información sobre la pureza o integridad de la ERP (proteína/gen)?	
3	¿Se proporciona información sobre la fuente / origen de la ERP analizada?	
4	¿Se proporciona toda la información sobre la naturaleza y / o las propiedades fisicoquímicas del ERP u otro elemento que usted considera indispensable para juzgar los datos (consulte la explicación para ver ejemplos)?	
		0
Criterio Grupo II: Caracterización del organismo de prueba.		
5	¿Se brinda información de la especie?	
6	¿Se brinda información del sexo del organismo de prueba?	
7	¿Se proporciona información sobre la cepa de los animales de prueba, si se considera necesario para juzgar el estudio, u otras especificaciones (ver explicación para ejemplos)?	
8	¿Se informa de la edad o el peso corporal de los organismos de prueba al comienzo del estudio?	
9	<u>Solo para estudios a dosis repetidas (precise si es otro tipo de estudio): ¿Se brinda información sobre las condiciones de alojamiento o alimentación?</u>	
		0
Criterio Grupo III: Descripción del diseño del estudio		
10	¿Se informa sobre el modo de administración (ruta o vía) de administración?	
11	¿Se informa sobre dosis administradas o de las concentraciones utilizadas en los medios de aplicación?	
12	¿Se explican la frecuencia y duración de la exposición, así como los momentos de las observaciones?	
13	¿Se incluyeron controles negativos (donde se requirieron) y positivos (cuando se requirieron)? Indique también, cuando está ausente pero no es obligatorio (vea las explicaciones para los tipos de estudio y sus respectivos requisitos sobre controles)	
14	¿Se da el número de animales (en caso de estudios experimentales en humanos: número de personas) por grupo?	

15	¿Se brindan suficientes detalles acerca del esquema de administración para juzgar el estudio (ver explicación para ejemplos)?	
16	SOLO PARA ESTUDIOS DE INHALACIÓN (de un punto para otro tipo de estudios): ¿Las concentraciones finales fueron analíticamente verificadas o la estabilidad de la sustancia de prueba fue asegurada o hecha plausible?	
		0
	Criterio Grupo IV: Documentación de los resultados del estudio	
17	¿Se describen claramente los resultados, o eventos, esperados del estudio y sus métodos de determinación?	
18	¿La descripción de los resultados del estudio para todos los resultados, o eventos, esperados investigados es transparente y completa?	
19	¿Los métodos estadísticos aplicados para el análisis de datos se dan y aplican de manera transparente (indique también, si no es necesario / aplicable, vea las explicaciones)?	
		0
	Criterio Grupo V: Plausibilidad de diseño y datos del estudio	
20	¿El diseño del estudio elegido es apropiado para obtener los datos específicos de la sustancia destinados (ver explicaciones para más detalles)?	
21	¿Son confiables los resultados del estudio cuantitativo (ver explicaciones para los argumentos)?	
		0
		0
	A El resultado numérico conduce a la categoría inicial:	3
	B La comprobación de las puntuaciones rojas lleva a la Categoría revisada:	3
	C Propuesta del evaluador: Categoría:	
	D Justificación en caso de que el evaluador se desvíe de B:	
	Documentación opcional de observaciones con importancia para la relevancia (no forma parte de la evaluación de confiabilidad)	
	Durante el curso de la evaluación de calidad se pueden hacer observaciones que son importantes para discutir la relevancia de los datos para propósitos específicos. La posibilidad opcional se proporciona aquí para documentar estas observaciones para uso futuro.	
	¿Cuál es el propósito de esta evaluación de calidad (documentación de datos para uso bajo REACH, actividad de clasificación bajo GHS, actividades de validación ECVAM, otros)?	
	¿Estudio realizado según las recientes directrices de la OCDE o la UE (u otras, por ejemplo, directrices nacionales)? En caso afirmativo, ¿cuáles? ¿Estudio realizado en condiciones de GPL?	

	(Si no es un estudio de pauta): ¿Existe una pauta para los puntos resultados o eventos esperados del estudio bajo investigación?	
	¿Está al tanto de las desviaciones relevantes de las guías del estudio evaluado? ¿Si, cuál?	
	¿Hizo observaciones con importancia para el uso reglamentario de los datos? (ejemplo 1: el evaluador puede insinuar que se realizó un estudio de inhalación de todo el cuerpo con una sustancia, para la cual se espera o conoce una absorción percutánea profunda, lo que lleva a una absorción percutánea sustancial además de la absorción por inhalación; ejemplo 2: se realizó un ensayo de reversión de Ames con cepas capaces de identificar mutaciones de cambio de marco solo o sin activación metabólica externa; ejemplo 3: ¿el evaluador posee evidencia positiva de que los resultados obtenidos con el estudio in vitro bajo evaluación, junto con datos toxicocinéticos conocidos, son útiles para evaluar la nefrotoxicidad de la sustancia en humanos?	
	¿Desea hacer otros comentarios generales sobre la usabilidad de los datos?	

Evaluación de confiabilidad de estudios ERP in vitro

Estudio bajo evaluación

Autor:

Título:

Centro de pruebas, año, patrocinador, estudio no. o referencia bibliográfica:

Las explicaciones están disponibles para la mayoría de los criterios y se muestran cuando el cursor se mueve sobre el campo de criterios. ¡Por favor lea cuidadosamente!

Criterios rojos: la puntuación máxima es necesaria para que estos criterios alcancen la categoría de confiabilidad 1 o 2 (vea la hoja de trabajo Explicaciones): ¡Evalúe con especial cuidado!

Criterios

No.	Criterio Grupo I: Identificación de la sustancia de prueba	Score
1	¿Se identificó la ERP de prueba?	
2	¿La ERP está aislada?	
3	¿Se proporciona información sobre la fuente / origen de la ERP?	
4	¿Se proporciona toda la información sobre la naturaleza y / o las propiedades fisicoquímicas de LA ERP, que usted considera indispensable para juzgar los datos (consulte la explicación para ver ejemplos)?	
		0
	Criterio Grupo II: Caracterización del sistema de prueba.	
5	¿Se describe el sistema de prueba?	
6	¿Se proporciona información sobre la fuente / origen del sistema de prueba?	
7	¿Se proporciona información necesaria sobre las propiedades del sistema de prueba y sobre las condiciones de cultivo y mantenimiento?	
		0
	Criterio Grupo III: Descripción del diseño del estudio	
8	¿Se da el método de administración (ver explicaciones para más detalles)?	
9	¿Se administran dosis o concentraciones en los medios de aplicación?	
10	¿Se explican la frecuencia y duración de la exposición, así como los puntos temporales de las observaciones?	
11	¿Se incluyeron controles negativos (indique también, si no es necesario, vea las explicaciones)?	
12	¿Se incluyeron controles positivos (indique también, si no es necesario, vea las explicaciones)?	
13	¿Se da el número de réplicas (o repeticiones completas del experimento)?	
		0

	Criterio Grupo IV: Documentación de los resultados del estudio	
14	¿Se describen claramente los resultados, o eventos, esperados del estudio y sus métodos de determinación?	
15	¿La descripción de los resultados del estudio para todos los resultados, o eventos, esperados investigados es transparente y completa?	
16	¿Los métodos estadísticos para el análisis de datos se dan y aplican de manera transparente (indique también, si no es necesario / aplicable, vea las explicaciones)?	
		0
	Criterio Grupo V: Plausibilidad de diseño y datos del estudio	
17	¿El diseño del estudio elegido es apropiado para obtener los datos específicos de la sustancia destinados (ver explicaciones para más detalles)?	
18	¿Son confiables los resultados del estudio cuantitativo (ver explicaciones para los argumentos)?	
		0
		0
	A El resultado numérico conduce a la categoría inicial:	3
	B La comprobación de las puntuaciones rojas lleva a la Categoría revisada:	3
	C Propuesta del evaluador: Categoría:	
	D Justificación en caso de que el evaluador se desvíe de B:	
	Documentación opcional de observaciones con importancia para la relevancia (no forma parte de la evaluación de confiabilidad)	
	Durante el curso de la evaluación de calidad se pueden hacer observaciones que son importantes para discutir la relevancia de los datos para propósitos específicos. La posibilidad opcional se proporciona aquí para documentar estas observaciones para uso futuro.	
	¿Cuál es el propósito de esta evaluación de calidad (documentación de datos para uso bajo REACH, actividad de clasificación bajo GHS, actividades de validación ECVAM, otros)?	
	¿Estudio realizado según las recientes directrices de la OCDE o la UE (u otras, por ejemplo, directrices nacionales)? En caso afirmativo, ¿cuáles? ¿Estudio realizado en condiciones de GPL?	

	(Si no es un estudio de pauta): ¿Existe una pauta para los puntos resultados o eventos esperados del estudio bajo investigación?	
	¿Está al tanto de las desviaciones relevantes de las guías del estudio evaluado? ¿Si sí, cuál?	
	¿Hizo observaciones con importancia para el uso reglamentario de los datos (ejemplo 1: el evaluador puede insinuar que se realizó un estudio de inhalación de todo el cuerpo con una sustancia, para la cual se espera o conoce una absorción percutánea profunda, lo que lleva a una absorción percutánea sustancial además de absorción por inhalación; ejemplo 2: se realizó un ensayo de reversión de Ames con cepas capaces de identificar mutaciones de cambio de marco solo o sin activación metabólica externa; ejemplo 3: ¿el evaluador posee evidencia positiva de que los resultados obtenidos con el estudio in vitro bajo evaluación, junto con datos toxicocinéticos conocidos, son útiles para evaluar la nefrotoxicidad de la sustancia en humanos?	
	¿Desea hacer otros comentarios generales sobre la usabilidad de los datos?	