

01483

1
30j.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TESIS

AISLAMIENTO DE CELULAS DE UN FIBROMA CEMENTIFICANTE
DE SER HUMANO QUE PRODUCEN PROTEINAS DEL CEMENTO EN
CULTIVO

POR

C. D. M. O. HIGINIO ARZATE

1992



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

A LA FACULTAD DE ODONTOLOGIA

INDICE

	<i>Página</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>1</i>
<i>ABREVIATURAS USADAS</i>	<i>3</i>
<i>INTRODUCCION</i>	<i>4</i>
<i>MATERIALES Y METODOS</i>	<i>13</i>
<i>RESULTADOS</i>	<i>21</i>
<i>DISCUSION</i>	<i>34</i>
<i>CONCLUSIONES</i>	<i>43</i>
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	<i>44</i>

INDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
<i>1-ACTIVIDAD MITOGENICA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS A TRAVES DE LA HEPARINA-SEFAROSA USANDO EL MEDIO CONDICIONANTE DE LAS CELULAS TUMORALES DEL CEMENTO</i>	<i>40</i>
<i>2-ACCION DE ANTICUERPOS ANTI-PDGF Y ANTI-CGF SOBRE LA ACTIVIDAD MITOGENICA DE LA FRACCION 0.5 M NaCl OBTENIDA DEL PROCESAMIENTO EN LA COLUMNA DE HEPARINA-SEFAROSA PURIFICANDO MEDIO CONDICIONANTE DE LAS CELULAS TUMORALES DEL CEMENTO</i>	<i>41</i>
<i>3-COMPARACION DE LAS PROPIEDADES DE CELULAS DE TUMOR DEL CEMENTO CON FIBROBLASTOS GINGIVALES Y PERIODONTALES</i>	<i>42</i>

RESUMEN

Se cultivaron células provenientes de un fibroma cementificante de ser humano. Las células obtenidas fueron multipolares, formaron estructuras similares a redes y fueron positivas a la fosfatasa alcalina. Con inmunotinción y western blots usando anticuerpos estas células revelaron que producen sialoproteína ósea, colágenas tipos I y V y también mineralizan *in vitro*. El medio condicionante de estas células fue mitogénico para fibroblastos gingivales y los mitógenos presentes fueron separados por medio de afinidad a la heparina y ensayos de inhibición de la actividad mitogénica con anticuerpos, las fracciones obtenidas mostraron que contenían el factor de crecimiento derivado del cemento (CGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs).

Las células del tumor del cemento se inmunotificaron con un anticuerpo monoclonal hecho contra la proteína de adherencia derivada del cemento (CAP), sin embargo los fibroblastos gingivales usados como control no mostraron reacción positiva. La proteína de adherencia derivada del cemento fue separada por medio de inmunoafinidad cromatográfica y los western blots revelaron que la preparación contenía proteínas de 56 y 43 kDa. Las células pulsadas y marcadas con aminoácidos radiactivos contenían una proteína de 43 kDa como principal componente, sin embargo esta proteína estuvo ausente en la caza fría en presencia de ciclohexamida así mismo las especies de 56, 39 y 26 kDa se hicieron prominentes. Estos

datos indican que la proteína de 56 kDa la cual es la principal especie en el cemento es derivada de un precursor de 43 kDa. Los datos presentados muestran que las células cultivadas de un fibroma cementificante de ser humano representan células capaces de sintetizar y secretar proteínas del cemento en condiciones adecuadas de cultivo.

ABREVIATURAS USADAS

CGF: Factor de crecimiento derivado del cemento.

CAP: Proteína de adherencia derivada del cemento.

EGF: Factor de crecimiento epidermal.

a o bFGF: Factores de crecimiento de fibroblastos, ácido y básico.

IL-1: Interleucina 1.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

TGF-B: Factor de crecimiento transformante beta.

TNF-a: Factor de necrosis tumoral alfa.

BSP: Sialoproteína ósea.

IGF-I: Factor de crecimiento parecido a la insulina.

ARNm: Acido ribonucleico mensajero.

NaDodSO4: Dodecil sulfato de sodio

PBS: Amortiguador de fosfatos/cloruro de sodio.

kDa: Kilodaltons.

2SN232: Anticuerpo monoclonal hecho contra el factor de crecimiento derivado de cemento bovino.

DV: Medio de cultivo Dulbecco-Vogt.

FITC: Isotiocianato de fluoresceina.

CPM: Cuentas radioactivas por minuto.

ug/ml: Microgramos sobre mililitro.

uci/ml: Microcuries sobre mililitro.

INTRODUCCION

La enfermedad periodontal es una de las causas más frecuentes de la pérdida de los órganos dentarios en seres humanos. Esto constituye uno de los problemas mayores de salud en todo el mundo. Aproximadamente el 95 % de la población mayor de 65 años sufre algún grado de la enfermedad, tan sólo en Estados Unidos se gastan 1.5 billones de dólares al año en terapéutica periodontal. La enfermedad es causada principalmente por colonización bacteriana en el surco gingival y su extensión apical a lo largo de la superficie radicular. Las bacterias y sus productos interactúan y activan los mecanismos de respuesta del huésped, los cuales incluyen cascadas de coagulación y del complemento, infiltración de leucocitos polimorfonucleares, monocitos, células linfoides y factores inmunes humorales.

Estos procesos causan la conversión del epitelio de unión en epitelio de la bolsa y destrucción de tejidos conectivos del periodonto. La inflamación y daño a los tejidos conectivos periodontales produce pérdida de la inserción fibrosa de la superficie radicular, resorción del hueso alveolar, raíces dentarias y finalmente pérdida del diente (Page y Schroeder, 1976; Narayanan y Page, 1983; Page, 1991).

El objetivo principal de la terapéutica periodontal es la restauración de la inserción de tejido conectivo que ha sido perdida debido a la periodontitis. Sin embargo, la mayor parte de los procedimientos clínicos actualmente disponibles llevan a cabo procesos de reparación y no de regeneración (

Polson, 1986). Alternativas terapéuticas desarrolladas recientemente, muestran que es posible lograr la regeneración de tejido conectivo, cemento y hueso, destruidos como secuelas de la enfermedad periodontal (Karring et al., 1985; Nyman et al., 1982, 1988; Caffesse et al., 1988; Wikesjo et al., 1988; Lynch et al., 1989, 1991). Sin embargo los resultados a largo plazo de estos procedimientos son frecuentemente impredecibles (Nyman et al., 1985; Gottlow et al., 1986; Marks y Metha, 1986).

Los mecanismos celulares básicos y moleculares de la reinserción y regeneración periodontal, no se entienden con claridad en la actualidad y constituyen el mayor vacío en nuestro conocimiento a este respecto. La dilucidación de estos procesos nos conducirá al desarrollo de una terapéutica racional, predecible y utilizable en la práctica clínica rutinaria.

CEMENTO Y REINSENCION PERIODONTAL

El cemento radicular forma la interfase entre la dentina radicular y los tejidos conectivos blandos que lo rodean. El cemento es una estructura calcificada que sin embargo difiere del hueso en que no tiene un aporte sanguíneo directo, drenaje linfático ni inervación, además de que su remodelación a través de la vida es escasa en comparación con hueso (Schluger et al., 1990).

La matriz orgánica del cemento está constituida principalmente por colágena de tipos I (90 %) y III (5 %), pro-

teínas no colágenas y proteoglucanos (Birkedal-Hansen et al., 1977; Christner et al., 1977; Chovelon et al., 1975; Glincher y Lefteriou, 1989; McCurdy et al., 1990; Smith et al., 1976).

La estructura e integridad bioquímica de la superficie radicular determinan si la nueva inserción puede llevarse a cabo. La nueva inserción no ocurre sobre raíces que han estado expuestas a la enfermedad periodontal, los fibroblastos no se adhieren o crecen sobre ellas (Fernyhough y Page, 1983; Wirthlin y Hancock, 1980; Pitaru y Melcher, 1983); Esto se debe a que el cemento expuesto a la enfermedad contiene sustancias tóxicas depositadas por las bacterias, y las células epiteliales se adhieren y crecen más rápidamente sobre estas superficies (Aleo et al., 1975; Cogen et al., 1984; Olson et al., 1985; Terranova y Martin, 1982). El raspado y alisado radicular cuyo objetivo primordial es la remoción de sustancias tóxicas parecen no promover la nueva inserción (Bloemloffe et al., 1987); por esto se han realizado intentos para crear condiciones que favorezcan la nueva inserción, éstos incluyen: desmineralización de las superficies radiculares, aplicación de fibronectina, factores de crecimiento suplementarios y matrices desmineralizadas de hueso (Bogle et al., 1983; Caffesse et al 1988; Crigger et al., 1983; Lynch et al., 1989, 1991). La colocación de una membrana entre la encía y la superficie radicular parece resultar en la formación de hueso nuevo, cemento y fibras del ligamento periodontal. La eficacia de este procedimiento llamado regeneración tisular guiada, se cree es debido a la capacidad de la membrana para excluir las células gingivales epiteliales y permitir la

migración de las células responsables de la regeneración periodontal (Nyman et al., 1982, 1988; Karring et al., 1985; Pitaru et al., 1987).

Datos obtenidos recientemente demuestran que sustancias presentes en el cemento influyeron en la migración, crecimiento y síntesis de proteínas sobre fibroblastos del periodonto, y además que estas moléculas no están presentes en los tejidos que rodean el cemento (Kawai y Urist, 1989; McAllister et al., 1990; Nishimura et al 1989; Miki et al., 1987; Somerman et al., 1987). Estas observaciones indican que los componentes del cemento pueden participar en la regeneración periodontal seleccionando y promoviendo el crecimiento de las poblaciones celulares necesarias; si este es el caso, el bloqueo de las moléculas biológicamente activas del cemento por las endotoxinas, o la eliminación por procedimientos terapéuticos, podrían ser factores por los cuales la nueva inserción no se forma en superficies expuestas a la periodontitis. Observaciones recientes (Lynch et al., 1989, 1991), demuestran que factores de crecimiento como IGF y PDGF inducen la formación de nuevo hueso, cemento y fibras colágenas. Esto apoya las potencialidades de las moléculas presentes en el cemento radicular. Muy poco se conoce acerca de las moléculas presente en el cemento, estudios preliminares mostraron que extractos de cemento promueven la adherencia de fibroblastos gingivales in vitro, y que esta actividad de adherencia no es debida a la fibronectina o laminina(McAllister et al.,1990) Las electroforesis en geles de poliacrilamida revelaron que

las proteínas de 68, 61, 56 y 35 kDa manifestaron actividad de adherencia, mientras las proteínas de 23-24 kDa no lo hicieron. Los western blots revelaron que las proteínas con 61, 56 y 36 kDa no tuvieron reacción cruzada cuando se trataron con un anticuerpo contra BSP, de estas observaciones se concluyó que el cemento contiene BSP y al menos otras tres proteínas con actividad de adherencia, y que la proteína de 56 kDa es la especie más abundante en el cemento (Olson et al., 1991). Las proteínas de adherencia del cemento promueven a las células del músculo liso, endoteliales y fibroblastos para adherirse in vitro, no obstante las células epiteliales no responden a este factor. Los fibroblastos se adhieren con más eficiencia que los otros tipos celulares, así como la reorganización de sus filamentos de actina es más rápida. Estos datos indican que las proteínas de adherencia del cemento no promueven la adherencia de células epiteliales del epitelio de unión, y que las endotoxinas bacterianas inhiben la adherencia de los fibroblastos de una manera no específica, bloqueando los sitios de unión de las proteínas de adherencia del cemento (Olson et al., 1991).

El cemento contiene PDGF y un mitógeno adicional que no ha sido completamente caracterizado (Nakae et al., 1991). Este mitógeno parece ser una nueva proteína de 23 kDa cuya distribución puede ser única y restringida al cemento. La presencia de estas sustancias en el cemento, implica que sus funciones no son estructurales lo que nos obliga a plantearnos diversas interrogantes, por ejemplo: ¿ son estas sustancias producidas por los cementocitos o son obtenidas de teji-

dos diferentes y permanecen secuestradas dentro del cemento?, ¿es su acción paracrina sobre células de tejidos que rodean al cemento o ésta está restringida a células del cemento?. Todavía más importante, estas sustancias están presentes en la matriz en una forma inaccesible, ¿porqué y como pueden ser utilizadas?. Estas son interrogantes que podrían ser resueltas en el futuro inmediato. Con la identificación del CGF y CAP puede ser posible contestar las interrogantes anteriores y así mismo definir la función que el cemento tiene para con el resto de los tejidos periodontales y explicar como estas sustancias modificarían el comportamiento de estos tejidos durante la regeneración periodontal, así mismo explicar la interacción de los tejidos calcificados con los tejidos conectivos blandos.

FACTORES DE CRECIMIENTO POLIPEPTIDOS

Estos son un amplio grupo de moléculas, las cuales incluyen el PDGF, α y β FGFs, TGF- β , EGF, IL-1, gama interferón y TNF- α (Sporn y Roberts, 1990). Estas sustancias tienen un amplio espectro de actividades que afectan el movimiento, proliferación y síntesis proteica de células del tejido conectivo. En estado de salud estas células permanecen latentes y su crecimiento y síntesis se encuentran en estado pasivo. Inmediatamente después de una lesión estas células entran en contacto con sustancias derivadas de la sangre, células inflamatorias y tejido dañado que las activa para dividirse y sintetizar componentes de la matriz intercelular (Clark y

Henson, 1988; Nathan y Sporn, 1991). Entre estas sustancias destacan el PDGF, que promueve el crecimiento celular; TGF- β que estimula la síntesis de matriz; IL-1 que promueve la degradación de la matriz; gama interferón y TNF- α suprimen la síntesis de colágena (Assoian et al., 1987; Ignatz y Krane, 1985; Massague, 1988; Narayanan et al., 1989; Raines et al., 1990; Shimakado et al., 1986; Soliz-Herraza et al., 1988). La acción de estas sustancias puede ser autocrina o paracrina, éstas actúan sobre una gran variedad de células blanco, no obstante su modo de acción es determinado por el tipo celular, el estado de diferenciación y la presencia de sustancias adicionales, por ejemplo el PDGF es mitogénico para fibroblastos y células del músculo liso, pero no para células endoteliales, el TGF- β inhibe el crecimiento celular en presencia de EGF, mientras que tiene un efecto opuesto en presencia del PDGF. El PDGF activa la síntesis de colágena tipo II en células en estado de desarrollo temprano del linaje condroblástico, pero para condroblastos en estado final de desarrollo el PDGF inhibe la síntesis de colágena tipo II (Nathan y Sporn, 1991). Los factores de crecimiento se unen a receptores celulares específicos localizados sobre las membranas de las células blanco e inician diversas reacciones que culminan con la síntesis de ADN y la división celular. (Rozengurt, 1986).

La matriz extracelular desempeña una función clave en el modo en que las células responden a los factores de crecimiento (Ingber y Folkman, 1989; Martin y Sank, 1990). La matriz extracelular puede por sí misma ser mitogénica para

células o promover la producción de factores de crecimiento mediante la diferenciación celular (Grant et al., 1989; Rappaegeer et al., 1991). Las células dentro de la matriz tienen su proliferación y manifiestan funciones diferenciadas, en contraste, con la ausencia de la matriz las células se dividen y su adherencia se ve imposibilitada (Bissel et al., 1982; Martin y Sank, 1990). Así mismo las matrices mineralizadas sirven como sitio de almacenamiento para gran cantidad de factores de crecimiento como FGFs, EGF, IGF, PDGF, TGF- β y proteína morfogénica de hueso (BMP) (Hauschka et al., 1986; Katz y Reddi, 1988; Baird y Bohlen, 1990). La matriz parece proteger a los factores de crecimiento de la degradación proteolítica y sirve como su reservorio para su acción a largo plazo (Flaumenhaft et al., 1989; Sommer et al., 1989).

CELULAS DEL CEMENTO

Evidentemente lo más importante de un tejido son las células que la dan origen, a este respecto poco se sabe de las células progenitoras del cemento y de la función que éstas desempeñan en la homeostasis de los tejidos periodontales y particularmente durante la regeneración periodontal. Dos tipos de células se relacionan con el cemento, los cementoblastos y los cementocitos. Los cementoblastos, se cree, se originan de células mesenquimatosas indiferenciadas y localizadas en los espacios endosteales del hueso alveolar y áreas paravasculares del ligamento periodontal (Melcher et al., 1986; McCulloch et al., 1987; Melcher, 1988), y producen la

matriz del cemento. Los cementocitos, son cementoblastos que han sido atrapados en el espesor del cemento por la matriz que ellos mismos secretan, estas células se encuentran relativamente inactivas y eventualmente degeneradas.

Hasta la fecha no han sido obtenidas células del cemento para ser estudiadas en cultivo, por esta razón no ha sido posible investigar la manera en que se regula la formación del cemento ni los procesos que afectan la selección y diferenciación de las células formadoras del cemento, la identidad de células que sintetizan y secretan el CGF y CAP y otros componentes biológicamente activos del cemento. El desconocimiento a este respecto a estimulado los esfuerzos para entender los mecanismos involucrados en la formación de este tejido y la función que éste desempeña en la restauración de la inserción periodontal que ha sido perdida debido a la enfermedad periodontal.

Esta investigación describe el aislamiento de una línea celular que parece manifestar el fenotipo del cemento radicular en cultivo. Estas células se obtuvieron de un fibroma cementificante de ser humano y fueron propagadas en resiembras. Estas células muestran que sintetizan al menos dos proteínas del cemento, el CGF y una proteína de adherencia de 56 kDa única del cemento.

MATERIALES Y METODOS

El anticuerpo contra sialoproteína ósea (BSP), fue obtenido del Instituto Nacional de Investigación Dental (NIDR), de Bethesda MD (Fisher et al., 1987); los anticuerpos contra colágena humana tipos I y V, hechos en rata (Narayanan et al., 1985); el anti-CGF bovino 2 SN 232 y el anticuerpo H166 anti-CAP fueron producidos en el departamento de patología de la Universidad de Washington en Seattle WA. El anticuerpo monoclonal HHF-35 fue una donación del mismo departamento. este anticuerpo reconoce los filamentos de actina en las células del músculo liso y tiene un peso molecular de 42 kDa (Tsukada et al., 1987). El isitiocianato de fluoresceina (FITC), anticuerpos secundarios, NaDoSO., medio de cultivo dulbecco-vogt, suero fetal bovino, NaCl, EDTA, tripsina, penicilina y esteptomicina, CnBr, juego # 86 para detectar fosfatasa alcalina, tinción de Ponceau, fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. Las membranas inmobilon PVDF se obtuvieron de Millipore Corp. MA. Los aminoácidos radiactivos fueron comprados a Amersham Life Science Products Inc. Arlington Heights IL. Las cámaras Lab-tec fueron obtenidas de Fisher Scientific, Seattle WA. El Ensayo de proteína y equipo de electroforesis se obtuvo de Bio-Rad, Richmond CA. La heparina sefarosa se obtuvo de Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala SW.

CELULAS

Se obtuvieron muestras quirúrgicas de la mandíbula de una paciente humano de sexo femenino, de 53 años de edad, con antecedentes de osteogénesis imperfecta relacionada con un fibroma cementificante. El tumor fue dividido en partes de aproximadamente 1 mm^2 y colocado en medio DV, que contenía 10 % de suero fetal bovino y antibióticos (penicilina/estrptomocina), piruvato de sodio 10 mM y aminoácidos no esenciales (Narayanan y Page, 1976); ésto es, después que se observaron células irradiando de los explantes fueron mantenidas hasta que alcanzaron la confluencia, después de lo cual fueron despegadas con tripsina al 0.25 % y transferidas a cajas de cultivo de 75 cm^2 . Las células así obtenidas referidas aquí como células del cemento o células tumorales por simplicidad, fueron mantenidas en medio DV conteniendo 15% de suero fetal bovino y 3% de extracto de pituitaria bovina. Las células fueron resebradas cada tres a cuatro semanas (Transferencia 1:2). Las células entre la cinco y diez transferencia fueron utilizadas para los experimentos descritos aquí. En este estadio las células manifestaron características de osteoblastos (véase después fig. 1 b-d). Los fibroblastos derivados de encía humana sana también se obtuvieron de muestras quirúrgicas. Los fibroblastos que se derivaron del ligamento periodontal se obtuvieron de dientes extraídos por razones ortodónticas. Estas células fueron desarrolladas como se ha descrito previamente (Narayanan y Pa-

ge, 1976).

INMUNOTINCION

Aproximadamente 500-1000 células fueron sembradas en laminillas Lab-tek de ocho compartimientos. Después de 72 h de incubación a una temperatura de 37°C y bajo una atmósfera compuesta de 95 % de Oxígeno y 5 % de CO₂, éstas fueron fijadas con paraformaldehído al 3.5 %, pH 7.5 durante cinco minutos a temperatura ambiente. Después de ésto las células fueron permeabilizadas con acetona / hielo seco a - 20 °C durante 2 minutos y se dejaron secar a temperatura ambiente - (Narayanan y Page, 1985). Las laminillas preparadas con las células y listas para la inmunotinción fueron incubadas con los anticuerpos primarios diluidos 1:1000 en amortiguador de fosfatos/solución salina (PBS), que contenía 1 mg/ml de albúmina de suero bovino, durante una hora a 4°C. Después de esto las células fueron incubadas con FITC conjugado con los anticuerpos secundarios (3 mg/ml de oveja antiratón IgG, oveja anticonejo IgG, conejo antirata IgG para proteína de adherencia derivada del cemento, BSP y anticuerpos para colágena tipos I y V respectivamente), diluidos 1:100 en PBS e incubados durante una hora a 4°C. La inmunotinción fue visualizada por inmunofluorescencia indirecta (Narayanan et al., 1985).

DETECCION DE FOSFATASA ALCALINA

Se sembraron células en una densidad de 500-1000/compartimiento en laminillas Lab-tek de cuatro cáma-

ras e incubadas por 72 h como se describió previamente. Las células fueron teñidas histoquímicamente para detectar la enzima de acuerdo con las instrucciones que el productor especificó. Esto es, que las células fueron fijadas durante 30 segundos y permeabilizadas como se describió previamente, teñidas durante 15 minutos con solución alcalina (evitando la luz), lavadas con agua corriente y teñidas nuevamente con solución de rojo neutro durante dos minutos, después fueron lavadas y secadas a temperatura ambiente y evaluadas cualitativamente por medio de microscopia de luz.

AISLAMIENTO Y SEPARACION DE FACTORES MITOGENOS

Se obtuvo medio condicionante de cultivos confluentes en cajas de 75 cm². Las células fueron lavadas tres veces con PBS y luego incubadas en este mismo amortiguador durante 10 minutos a 37°C. El amortiguador fue desechado y las células incubadas en un medio libre de suero fresco. El medio condicionante se colectó después de 48 horas de incubación con las células. Este medio fue dializado contra un amortiguador de 50mM Tris-HCl pH 7.5 que contenía 1 mM de fenilmetanosulfonilfluoruro y N-etilmaleidamida, 25 mM de EDTA y 1 ug/ml de pepstatina y leupeptina. El medio condicionante fue cargado en una columna de heparina-sefarosa (0.9 x 10 cm) mantenida a 4°C. La columna fue lavada con 5 a 10 volúmenes del amortiguador para remover las proteínas que no se adhirieron con la heparina. Las proteínas que permanecieron unidas fueron eluidas de manera escalonada con 0.5, 1.0 y 2.0 M de NaCl (

Nakae et al., 1991). Previamente a los ensayos de mitogenicidad las eluciones fueron concentradas en membranas Centri-pep YM-10 y dializadas contra medio libre de suero a 4°C.

ENSAYO DE ACTIVIDAD MITOGENICA

Se usaron fibroblastos gingivales humanos entre la cuatro y 12 transferencia. Aproximadamente se sembraron 20000 células en placas para cultivo de tejidos de 24 pozos e incubadas durante toda la noche para permitir su adherencia. Entonces el medio fue cambiado, se añadió medio libre de suero y se incubaron las células durante 48 horas para inactivar su síntesis de ADN. Pasado este tiempo se cambió nuevamente el medio adicionando medio libre de suero fresco que contenía los mitógenos obtenidos de las eluciones que se indicaron antes y las células fueron incubadas durante 22 horas, posteriormente se añadió medio libre de suero fresco conteniendo 5.0 uci/ml de 3H timidina y las células fueron incubadas por seis horas, al final de lo cual se lavaron con PBS para remover el exceso de marca. Finalmente las células fueron despegadas con 1.0 N NaOH y la radiactividad contada (Miki et al., 1987).

PURIFICACION DE PROTEINA DE ADHERENCIA POR MEDIO DE INMUNO-AFINIDAD

El medio condicionante fue obtenido como se describió antes, pero esta vez fue dializado contra PBS. El medio fue cargado en una columna de haparina sefarosa-4B con CnBr activado y acoplada con un anticuerpo (H166), producido contra la

CAP. La columna fue lavada con 20-30 volúmenes de PBS para remover las proteínas no adheridas a la sefarosa-4B. El material unido fue eluido con glicina 0.1 M, pH 2.5. La elución fue inmediatamente neutralizada con 1.0 N NaOH, en un pH de 7.0-7.4. La elución fue concentrada en membranas Centriprep YM-10 y almacenada a -20°C hasta su uso.

ENSAYO DE ADHERENCIA DE FIBROBLASTOS

Se marcaron cultivos confluentes de fibroblastos gingivales humanos con 10 uci/ml de L-35S metionina en RPMI medio libre de metionina durante toda la noche. Las células fueron tripsinizadas y la adherencia celular medida de acuerdo con Mc Allister et al., 1990. Esto es, placas de plástico bacteriológicas que no fueron tratadas para cultivo de tejidos, fueron incubadas en diferentes diluciones de CAP (obtenida como se describió antes), en PBS durante 16 horas a 4°C. Posteriormente, las placas fueron lavadas y tratadas con 2 mg/ml de albúmina de suero bovino en medio libre de suero y durante 1 hora con el objeto de bloquear los sitios de unión no específicos. En seguida las placas fueron incubadas con 1.5×10^4 de fibroblastos marcados, durante una hora. Las células que no se adhirieron durante este tiempo fueron removidas por aspiración y los pozos lavados con PBS. Las células adheridas se solubilizaron en 1 % de NaDodSO₄ y la radiactividad medida en un contador de centelleo líquido Packard 1500. Placas tratadas con 5 ug/ml de colágena tipo I sirvieron como control positivo, mientras que para el control nega-

tivo se usaron placas tratadas con medio libre de suero (Olson et al., 1991).

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Las electroforesis en geles de pliacrilamida-NaDoDSO⁴, se llevaron a cabo en geles planos al 12.5 %, usando un aparato Hoeffer SE 250 para minigeles, según Nakae et al., 1991.

WESTERN BLOT

Después de las electroforesis, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa PVDF, usando una celda transportadora Bio-Rad. Las proteínas fueron visualizadas con tinción de Ponceau. Las membranas fueron lavadas, bloqueadas con blotto al 5 % durante 1 hora y entonces se incubaron a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios diluidos 1:1000 en blotto, durante 1 hora (anti-CAP y anti BSP). Las membranas fueron lavadas durante 30 minutos con blotto y entonces incubadas con el anticuerpo secundario (suero de caballo conjugado con peroxidasa), oveja antiratón u oveja anticonejo IgG respectivamente, diluidos 1:1000 en blotto, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas con PBS, 2 x 15 minutos y finalmente las proteínas fueron visualizadas con diaminobenzidina.

MARCADO DE LAS CELULAS

Cultivos de células de cemento en estado confluyente fueron preincubadas en medio libre de suero y que además no contenía leucina, glicina y prolina, durante una hora, las célu-

las fueron entonces marcadas y pulsadas durante una hora en medio nuevo que contenía 5 uci/ml de L-4,5-³H-leucina, 2-³H-glicina y L-2,3,4,5-³H-prolina. Después del marcaje y pulso las células fueron tomadas en 0.5 M NH₃, adicionadas al medio y sujetas a inmunoafinidad cromatográfica. Para la caza fría el medio radiactivo fue reemplazado por medio libre de suero fresco que contenía 25 ug/ml de cicloexamida y 10mM de prolina, leucina y glicina no radiactivos.

PROTEINA

Las concentraciones de proteína fueron determinadas con un juego para ensayo de proteína Bio-Rad, por medio del método de Bradford, 1976; usando albúmina de suero bovino como estándar.

RESULTADOS

Se establecieron cultivos de células obtenidas de explantes de un tumor de cemento humano, en un medio de cultivo conteniendo 10 % de suero fetal bovino. Estas células inicialmente manifestaron morfología fibroblástica (fig 1 a). Sin embargo después de 4 a 5 transferencias (transferencia 1:2), asumieron una morfología diferente, especialmente cuando alcanzaron confluencia (fig 1 b). Después de seis a ocho semanas en cultivo las células aparecieron estratificadas (fig 1 c), y se evidenciaron estructuras como redes. En esta etapa su ritmo de crecimiento disminuyó drásticamente por lo cual las células fueron subsecuentemente mantenidas en presencia de suero fetal bovino al 15 % complementado con 3 % de extracto de pituitaria bovina. Las células han sido desarrolladas y mantenidas en este medio y también han sido almacenadas en nitrógeno líquido.

Debido a que las células se obtuvieron de un tumor cementificante se examinó la posibilidad de que manifestaran características de osteoblastos. Se realizaron tres experimentos y se utilizaron fibroblastos gingivales y del ligamento periodontal como controles. En el primer experimento los cultivos fueron examinados histoquímicamente para la producción de fosfatasa alcalina. La tinción estuvo presente alrededor de la membrana celular y núcleo (fig 2 a). En contraste los fibroblastos gingivales no se tificaron con esta enzima (fig 2 b). Las células del ligamento periodontal también fueron positivas, pero la tinción no fue tan intensa como en las células tumorales (dato no mostrado).

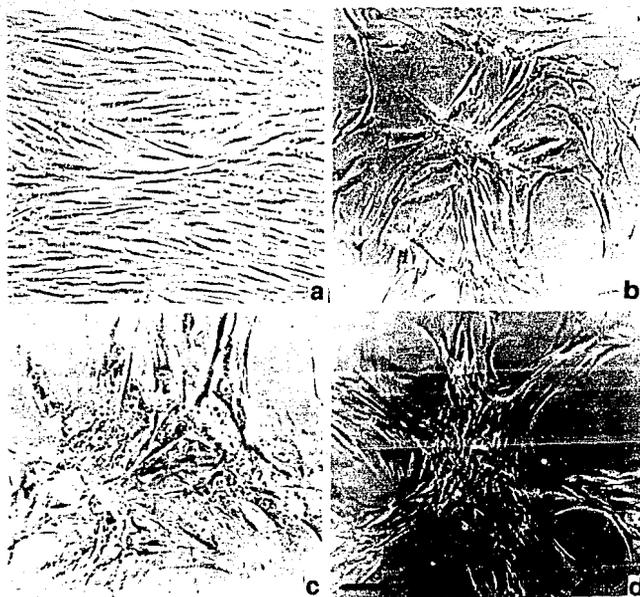


Fig 1. Morfología de las células tumorales del cemento en cultivo. En las transferencias primarias las células exhibieron una morfología fibroblástica (a). Se aprecian multipolares a las transferencias 4 y 5 (b) y estratificadas cuando alcanzaron confluencia (c). También presentaron estructuras como redes (d). Barra = 20 μ m.

En el segundo experimento las células fueron inmunotefidas con un anticuerpo contra BSP, usando fibroblastos gingivales como controles. Las células del cemento mostraron

una intensa tinción con este anticuerpo; la inmunotinción fue detectada sobre la superficie celular (fig 3 a), sin embargo los fibroblastos gingivales fueron negativos (fig 3 b).



Fig 2. Tinción histoquímica para fosfatasa alcalina a) células del cemento. b) fibroblastos gingivales humanos. Barra= 20 um.

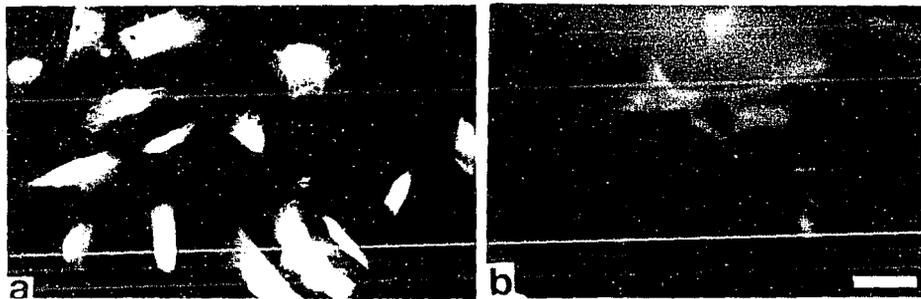


Fig.3. Inmuno tinción de células del cemento (a) y fibroblastos gingivales (b) con un anticuerpo contra sialoproteína ósea (BSP). Barra = 20 um

Western blots revelaron que el medio condicionante completo de células del cemento, pero no el medio de fibroblastos gingivales o periodontales contenian diversas bandas de 110-120, 70-75, 45 y 31 kDa reaccionando con el anticuerpo contra BSP. Las células fueron incubadas también con B-glicerofosfato 10mM, dexometasona a 10 nM y ácido ascórbico a 50 ug/ml durante 30 días (Noff et al., 1989) y los cultivos teñidos con alizarín rojo. En los cultivos de células de cemento se detectaron nódulos de mineralización con resultados negativos en los cultivos de fibroblastos gingivales y periodontales (fig 4)

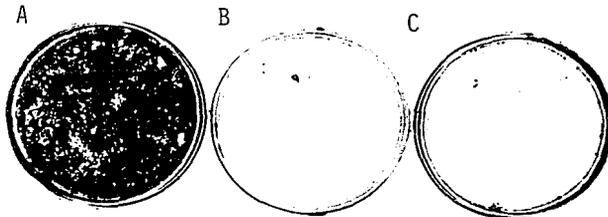


Fig.4. Mineralización de células del cemento, fibroblastos gingivales y del ligamento periodontal. Las células se incubaron en discos de 35 mm como se describió previamente. a)Células del cemento, b)fibroblastos periodontales,

c) fibroblastos gingivales. Barra = 0.5 cm.

Los cultivos de las células del cemento fueron inmunotestados con una batería de anticuerpos para determinar si otro tipo de células se encontraba presente en los cultivos. Los resultados obtenidos con el anticuerpo contra el factor VIII, el cual es específico para células endoteliales (Jaffe et al., 1989) o anticuerpos anticitoqueratinas 4 y 13 (Weiss et al., 1983) fueron negativos. Las células del cemento se tificaron intensamente con anticuerpos para colágenos tipos I y V y reaccionaron positivamente con el anticuerpo HHF-35 específico para células de músculo liso (Tsukada et al., 1987).

Producción del factor de crecimiento derivado del cemento.

Se examinó si las células del cemento producen y secretan el CGF. El medio condicionante de las células fue mitogénico para fibroblastos gingivales humanos y su actividad fue parcialmente inhibida por el 2SN232, un anticuerpo monoclonal producido contra el CGF. Esto indicó la presencia del CGF en el medio condicionante. Después de esto el medio fue sujeto a cromatografía con afinidad por la heparina para separar el CGF y otros mitógenos (Nakae et al., 1991; Hauschka et al., 1986).

Los resultados mostraron que el $29 \pm 3\%$ de la actividad mitogénica estuvo presente en la fracción 0.5 M NaCl y el $21 \pm 6\%$ y $34 \pm 14\%$ en las eluciones de 1.0 M NaCl y 2.0 M NaCl respectivamente (N=4 preparaciones). La actividad remanente estuvo presente en la fracción no unida a la heparina (19

$\pm 8\%$, véase tabla 1).

Las fracciones de 1.0 y 2.0 M NaCl han sido mostradas previamente que representan FGFs ácido y básico respectivamente, por lo cual no fueron procesadas más adelante.

Debido a que el CGF y el PDGF son eluidos por 0.5 M NaCl bajo las condiciones usadas (Nakae et al., 1991), esta fracción fue examinada para detectar su presencia en el medio condicionante de las células del cemento por medio de ensayos de inhibición de la actividad mitogénica usando anticuerpos contra estos factores. Los resultados mostraron que el anticuerpo monoclonal 2SN232 y anticuerpo policlonal contra las cadenas A y B del PDGF removieron el 39 y 35 % de la actividad mitogénica respectivamente. Esto indicó que ambos factores de crecimiento, CGF y PDGF, estuvieron presentes en esa fracción (véase tabla 2).

Para confirmar la presencia del CGF en la fracción 0.5 M NaCl, ésta se cargó en una membrana de nitrocelulosa PVDF tratada con el anticuerpo monoclonal 2SN232 y el anticuerpo secundario conejo anti ratón (IgM+IgG), marcado radioactivamente con ^{125}I . La fluorografía reveló que solamente la fracción 0.5 M NaCl contenía el CGF (fig 5).

Producción de proteína de adherencia.

El medio condicionante de las células del cemento, también fue examinado para verificar la presencia y producción de una proteína de adherencia para fibroblastos que previamente ha sido aislada e identificada en el cemento radicular

(McAllister et al., 1990), la CAP es una molécula de 56 kDa, y un anticuerpo monoclonal contra esta proteína inmunotifera cemento pero no otros tejidos. Se realizaron dos experimentos, en el primero se examinó la inmunotinción por el anticuerpo contra CAP sobre las células tumorales del cemento, fibroblastos gingivales y periodontales. Las células del cemento se inmunotifieron positivamente, la tinción estuvo presente principalmente sobre la superficie celular (fig 6 a). En contraste los fibroblastos gingivales y periodontales fueron negativos (fig 6 b).

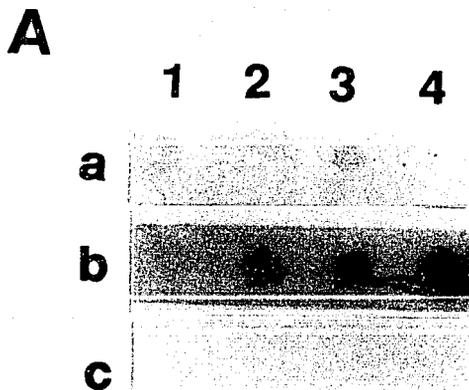


Fig 5 Ensayo en dot-blot de las fracciones de heparina del medio condicionante de células tumorales del cemento para detectar el CGF. Las proteínas sobre la nitrocelulosa fueron

incubadas primero con el anticuerpo 25N232 y después con el anticuerpo secundario 125I conejo anti ratón IgM+IgG y visualizado por medio de fluorografía. a,1) fracción no unida a,2) 0.2 M elución. a,3) 0.5 M NaCl fracción. a,4) elución 2.0 M NaCl. b) concentraciones incrementadas de verdadero CGF. b,1) 20 ng , b,2) 30 ng , b,3) 40 ng , b,4) 50 ng. c,1) PBS , c,2) 50 ul de suero fetal bovino al 10% , c,3) 200 ng de PDGF , c,4) 200 ng de EGF.

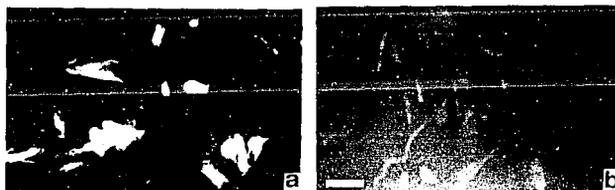


Fig 6 Inmunotinción de las células del cemento (a) y fibroblastos gingivales humanos (b) con el anticuerpo contra la proteína de adherencia derivada del cemento. Barra=20 um.

En el segundo experimento, el medio condicionante obtenido de las células del cemento fue sujeto a cromatografía de inmunoafinidad usando el anticuerpo acoplado a la sefarosa 4B como se describe en los métodos. Las proteínas unidas a la heparina sefarosa permitieron la adherencia de los fibroblastos de un modo dependiente de la dosis, o ensayo do-

sis/respuesta (fig 7).

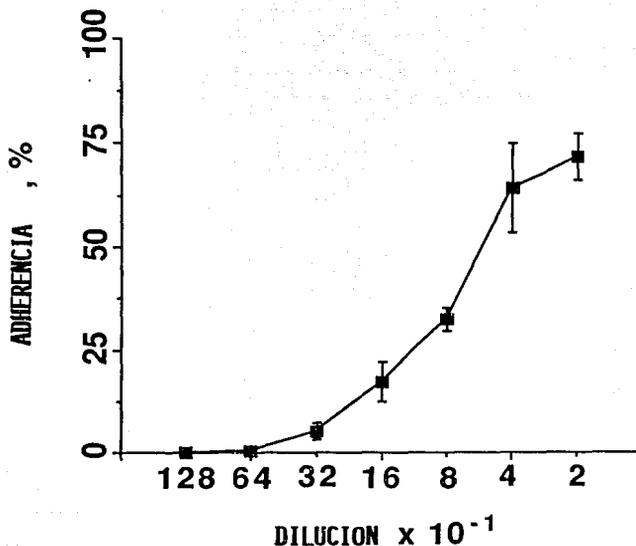


Fig 7 Adherencia de fibroblastos usando medio condicionante e inmunopurificado de las células del cemento. Se usaron 100 ml de medio para la purificación y la actividad de adherencia a diferentes diluciones es mostrada.

Las electroforesis en geles de poliacrilamida revelaron que la fracción unida a la heparina sefarosa 4B acoplada al anticuerpo contra la CAP contenía muy poco material que se detectaba muy débilmente con coomassie azul (fig 8 a). Sin embargo los western blots revelaron que esta fracción contenía bandas

de 56 y 43 kDa como los principales componentes (fig 8 b línea 1), también fueron visibles bandas adicionales de 39 y 26 kDa aunque como especies menores. El suero humano también fue procesado por inmunoafinidad pero con resultados negativos (fig 8 b línea 3). El suero fetal bovino y el medio condici-
nante de fibroblastos gingivales fueron igualmente procesados no obstante, no mostraron alguna reacción en el western blot. Asimismo, para establecer si las bandas que aparecieron en el western blot (fig 8 b línea 1) eran sialoproteína ósea, se usó esta fracción cruzándola con anticuerpo contra BSP. Los resultados fueron negativos (fig 8 b línea 2).

Se llevaron a cabo experimentos para determinar si las bandas de proteína detectadas en los western blots estaban relacionadas entre sí. Las células del cemento fueron pulsa-
das y marcadas con aminoácidos radioactivos, como se descri-
bió en los métodos. Las proteínas fueron separadas por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida. La fluorografía de los geles reveló que las células pulsadas y marcadas mos-
traban una banda de proteína cerca del origen del gel y otra de 43 kDa como componente principal. En adición a esto bandas de 56, 31 y 26 kDa también se evidenciaron, pero como compo-
nentes menores (fig 9 línea a). Aún así, después de la caza fría en presencia de ciclohexamida, la banda de 43 kDa estu-
vo ausente, y la especie de 56 kDa se evidenció como la ban-
da más prominente. La banda de 26 kDa se intensificó, y apa-
reció una nueva proteína de 39 kDa. La proteína en el origen

del gel y la de 31 kDa permanecieron sin afectarse. La banda cerca del origen del gel parece haber sido retenida de una manera no específica por la columna que contiene el anticuerpo, debido a que extractos inmunopurificados del cemento contienen una banda cerca del origen del gel, proteína que reacciona con suero de ratón no inmunizado.

Las propiedades de las células tumorales del cemento, fibroblastos gingivales y periodontales se sumarizan en la table 3.

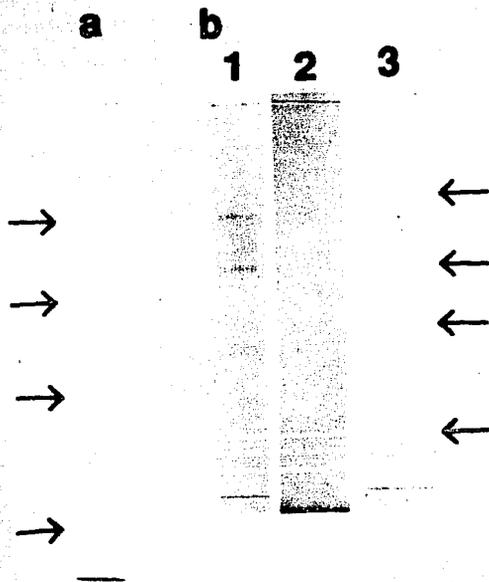


Fig 8 Electroforesis en geles de poliacrilamida de la fracción inmunopurificada del medio condicionante. a) Proteína de adherencia teñida con coomassie azul. b) Western blots.

línea 1) con anticuerpo contra la CAP. línea 2) usando anticuerpo contra BSP. línea 3) suero humano contra anticuerpo anti-CAP. Las flechas de superior a inferior indican la migración de proteínas de 68 , 44 , 22 y 14.5 kDa.

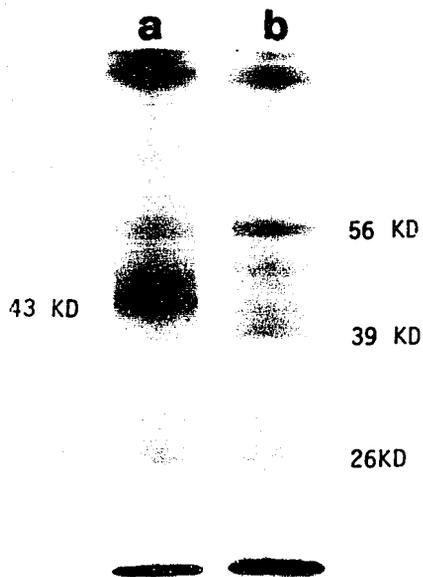


Fig 9 Fluorografía de proteínas marcadas metabólicamente obtenidas de las células del cemento. a) después de dos horas de pulso. Cultivos confluentes fueron marcados con 3H de leucina , prolina y glicina como se describe en los métodos. b) después de la caza fría en presencia de ciclohexamida y aminoácidos sin marca radioactiva durante una hora. Células y

medio fueron sujetos a cromatografía por inmunoafinidad y geles de poliacrilamida.

DISCUSION

El cemento está asociado con dos tipos de células, los cementoblastos y cementocitos. Sólo los cementoblastos son metabólicamente activos, ellos son los responsables de sintetizar la matriz cementoide, mientras que los cementocitos son relativamente inactivos. Se cree que los cementoblastos se originan de células precursoras presentes en los espacios endosteales del hueso alveolar, estas células parecen migrar hacia la matriz dentinaria y diferenciarse en cementoblastos una vez que entran en contacto con este último tejido (Melcher et al., 1986; McCulloch et al., 1987; Melcher, 1988; Cho y Garant, 1989). Aún cuando células de hueso han mostrado que forman tejido similar al cemento in vitro (Melcher et al., 1986; Melcher, 1988), hasta ahora no ha sido posible cultivar y estudiar los cementoblastos in vitro. Nosotros hemos cultivado y propagado células obtenidas de un fibroma cementificante de ser humano. Estas células no son endoteliales o epiteliales, basados en la inmunotinción con anticuerpos específicos para estos tipos celulares. Aunque las células del cemento se tifieron positivamente con HHF-35 un anticuerpo específico para células de músculo liso, éstas pueden no ser células de músculo liso ya que el anticuerpo tife otras células mesenquimatosas en cultivo incluyendo los fibroblastos (Christner et al., 1977; Gown A.M., comunicación personal). Las células exhibieron una morfología aplanada y estratificada con formación de estructuras similares a redes típicas de células óseas humanas (Auf'mkolk et al., 1985). Las células produjeron colágenas de tipos I y V de forma similar a los

fibroblastos, sin embargo sus otras propiedades indican que no son fibroblastos. Por ejemplo, a diferencia de los fibroblastos gingivales, estas células son positivas a la fosfatasa alcalina y sialoproteína ósea (BSP), la cual sintetizan y además estas células mineralizan in vitro, lo cual es altamente sugestivo de la naturaleza osteoblástica o similar a osteoblastos de las células del cemento. Más aún, cultivos de fibroblastos del ligamento periodontal contienen células que son positivas a la fosfatasa alcalina (Nojima et al., 1990; Somerman et al., 1988), pero evidentemente, a diferencia de las células del fibroma cementificante aquellas son típicamente fibroblastos por su morfología y otras propiedades. Mientras los datos que aquí se presentan sugerirían que las células del cemento manifiestan características similares a los osteoblastos no las caracterizamos como tales. Esto obedece a que nuestro objetivo principal fue determinar si éstas expresaban el fenotipo del cemento. Es de interés notar que durante las primeras transferencia en cultivo de estas células su morfología fue característica de los fibroblastos. Ahora bien, si el cambio de morfología es debido a la transformación del fenotipo celular durante las transferencias o es debida al crecimiento selectivo de células similares a osteoblastos, es algo que al momento no puede ser aclarado. Más importante, las células del cemento en cultivo producen dos proteínas derivadas del cemento el CGF y CAP. El CGF es una proteína de 23 kDa, la cual parece estar localizada únicamente en el cemento y no es detectable en encía, ligamento pe-

riodontal ni en hueso alveolar (Miki et al., 1987; Nakae et al., 1991). El CGF producido por las células que aquí se describen, fue caracterizado por sus propiedades cromatográficas y por su reacción con el anticuerpo anti-CGF bovino. En adición a esta proteína las células del cemento también producen PDGF, a y b FGFs y probablemente otros factores de crecimiento, sus proporciones en el medio condicionante hacen pensar más en las propiedades del hueso alveolar que del cemento (Hauschka et al., 1986). Por ejemplo, el PDGF no es detectable en el cemento radicular y los FGFs son componentes menores. En hueso el PDGF y FGFs son los componentes más abundantes. Sin embargo la producción de cantidades significativas de CGF por las células del cemento indican que éstas manifiestan ambos fenotipos tanto de cemento como de hueso en cultivo. Varias explicaciones se desprenden de estos resultados. Por ejemplo, estas células fueron derivadas de un tumor, y las células tumorales como es conocido producen diversos factores de crecimiento. Así mismo el cultivo puede contener una mezcla de células que representen al cemento así como otros fenotipos. Alternativamente estas células pueden manifestar características de células progenitoras del cemento, las cuales se presume residen en hueso alveolar. Notablemente la síntesis y secreción de CGF y CAP, proteínas que parecen estar localizadas exclusivamente en el cemento indican que hemos cultivado células putativas de este tejido capaces de sintetizar proteínas del cemento.

Los western blots revelaron diversas bandas de proteína reaccionando con el anticuerpo contra la proteína de adheren-

cia derivada del cemento. Los componentes de 56 y 43 kDa fueron las especies más abundantes, mientras que bandas de 39 y 26 kDa también estuvieron presentes aunque debilmente visibles. Basados en la reacción cruzada con anticuerpos, previamente observamos que estas proteínas no reaccionan con anticuerpo contra osteopontina de rata (McAllister et al., 1990), o sialoproteína ósea (Olson et al., 1991). La proteína purificada por inmunoafinidad y obtenida de extractos de cemento humano también fue negativa en western blot usando anticuerpo policlonal contra osteopontina porcina, la cual tiene reacción cruzada con las especies humanas (Sodek.J. comunicación personal). En estudios de pulso y caza se indica que estas proteínas son posiblemente derivadas de un precursor común de 43 kDa, posiblemente por uno o más mecanismos post-transcripcionales tales como, glucosilación, sulfatación, fosforilación o proteólisis. Aunque la osteopontina es sintetizada en 44 y 55 kDa y posiblemente otros pesos moleculares (Nagata et al., 1991; Kasugai et al., 1991), la proteína de 43 kDa producida por las células tumorales del cemento no parece ser osteopontina, debido a que cuando es digerida con trombina no genera péptidos de 26 kDa, derivados de las proteínas de 43 a 56 kDa, y mientras la osteopontina esta presente en la mayor parte de las estructuras calcificadas, la proteína de adherencia derivada del cemento está restringida a este último tejido (Arzate et al., manuscrito sometido a revisión). Es de interes notar que mientras las bandas de 43 y 56 kDa son las principales especies detectadas en western

blots, las bandas detectadas por fluorografía eran las especies menores debilmente visibles. La razón de esto es desconocida, sin embargo mientras estos datos indican que la CAP y la osteopontina son proteínas diferentes, existe la posibilidad de que la CAP sea una variante de la osteopontina formada por aposición de sus ARNm y/o diferencias en los procesamientos post-translacionales, como glucosilación, fosforilación o sulfatación.

De esta manera, independientemente de su origen y fenotipo, creemos que las células cultivadas del fibroma cementificante de ser humano serán útiles para al menos tres propósitos: 1) Estas células podrían ser utilizadas para obtener del cemento cantidades suficientes de sustancias biológicamente activas, lo cual hasta ahora ha sido un procedimiento arduo y laborioso de disección en dientes humanos y limita las capacidades para el estudio bioquímico de este tejido. 2) estas células podrían ser utilizadas para estudiar la biosíntesis y procesamiento de la CAP y otras proteínas presentes en este tejido. 3) la cementogénesis en sus estadios tempranos involucra el depósito de matriz extracelular, producida por las células de la vaina radicular epitelial de Hertwig sobre la dentina, así mismo comprende la disrupción de esta vaina, migración y adherencia de células ectomesenquimatosas del folículo dental sobre la matriz, su diferenciación en cementoblastos y la secreción y depósito de cemento (Slavkin et al., 1988). Estudios recientes han mostrado que los productos del gene de las células de la vaina radicular epitelial de Hertwig pueden inducir la cementogénesis, y que estas células

sintetizan proteínas intermedias de 72 y 76 kDa y posiblemente osteopontina (Slavkin et al., 1988; Somerman et al., 1990).

En el cemento del adulto la maduración de cementoblastos involucra la migración directa de células progenitoras del cemento, su adhesión a la matriz y posterior diferenciación (Melcher, 1988; Cho y Garant, 1989). Las células descritas aquí pueden servir como modelo in vitro para estudiar estos procesos y dilucidar como es regulada la formación y diferenciación del cemento.

TABLA 1

ACTIVIDAD MITOGENICA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS A TRAVES DE LA HEPARINA-SEFAROSA USANDO EL MEDIO CONDICIONANTE DE LAS CELULAS TUMORALES DEL CEMENTO

FRACCION	ACTIVIDAD CPM x 10 ⁻³ (a)	MITOGENICA TOTAL
No unida	13.4±4.6	25.3
0.5 M NaCl	13.7±3.6	26.0
1.0 M NaCl	11.7±4.1	20.9
2.0 M NaCl	15.7±4.9	31.0

(a) 3H incorporación de timidina X 10⁻³ CPM del medio libre de suero usado como control fueron 3.3±1.1 X 10⁻³.

Los datos presentados son los resultados obtenidos de 4 diferentes preparaciones y analizadas estadísticamente por medio de desviación estándar.

TABLA 2

ACCION DE ANTICUERPOS ANTI-PDGF Y ANTI-CGF SOBRE LA ACTIVIDAD MITOGENICA DE LA FRACCION 0.5 M NaCl OBTENIDA DEL PROCESAMIENTO EN LA COLUMNA DE HEPARINA-SEFAROSA PURIFICANDO MEDIO CONDICIONANTE DE LAS CELULAS TUMORALES DEL CEMENTO.

MITOGENO	ANTICUERPO	CPM X 10 ⁻³ (A)	PORCENTAJE
NINGUNO	-	3.4±0.2	-
0.5 M NaCl	-	33.0±4.4	100
0.5 M NaCl	ANTI-PDGF	22.5±2.7	65
0.5 M NaCl	ANTI-CGF(b)	21.5±4.7	61
10% SFB	-	49.8±26.5	-

(a) Desviación estándar de triplicados.

(b) 2SN232.

TABLA 3
 COMPARACION DE LAS PROPIEDADES DE CELULAS DE TUMOR
 DEL CEMENTO CON FIBROBLASTOS GINGIVALES Y PERIODONTALES

PROPIEDAD	CELULA DEL CEMENTO	FIBROBLASTO GINGIVAL	FIBROBLASTO PERIODONTAL
MORFOLOGIA	OSEA ^a	FIBROBLASTO	FIBROBLASTO
BSP	+	-	+
COLAGENAS ^b	+	+	+
CITOQUERATINAS	-	-	-
FACTOR VIII	-	-	NH
SM-ACTINA ^c	+	-	NH
CGF	+	NH	NH
CAP	+	-	-

a Fibroblástica durante las transferencias primarias

b Tipos I y V

c Por inmunotinción con el anticuerpo HHF-35

NH No realizado

CONCLUSIONES

A la fecha actual no se han logrado aislar cementoblastos para su estudio en cultivo, sin embargo se ha cultivado y propagado una línea celular que parece expresar el fenotipo del cemento, esto basados principalmente en la inmunotinción y reconocimiento de proteínas aparentemente restringidas al cemento como el CGF y CAP.

Es importante considerar que estas células también expresan el fenotipo de los osteoblastos, lo que preliminarmente apoya la tesis de que pudieran representar células mesenquimatosas indiferenciadas, las cuales a su vez se cree son las células progenitoras de los osteoblastos, cementoblastos y del ligamento periodontal. Sin embargo, los experimentos de pulso y caza para determinar la síntesis de la CAP, nos revelaron que estas células sintetizan y secretan la proteína de adherencia de 56 kDa que ha sido detectada en el cemento radicular. Estas células han mostrado que esta proteína es derivada de un precursor de 43 kDa. Así mismo ellas mostraron que sintetizan el CGF y adicionalmente PDGF. Esta línea celular será en el futuro de gran ayuda para estudiar la cementogénesis, la síntesis de proteínas del cemento (por procesos al momento desconocidos), y como estas moléculas podrían actuar en la regeneración periodontal y en la formación de cemento in vitro.

BIBLIOGRAFIA

Aleo, J.A., DeRenziz, F., and Farber, P. In vitro attachment of human gingival fibroblast to root surfaces. *J. of Periodontol.* 46:639, 1975.

Assoian, R.K., Fleurdelys, B.E., Stevenson, H.D., Miller, P.J. *Proceedings of the national academy of sciences of the U.S.A.* 84:6020, 1987.

Auf'mkolk, B., Hauschka, P.V., Schwartz, E.R. Characterization of human bone cells in culture. *Calcif. Tissue Int.* 37:228, 1985

Baird, A., and Bohlen, E. Peptide growth factors and their receptors. In *clinical and experimental approaches to dermal and epidermal repair*. Sporn, M.B. and Roberts, A.B., ed. p.p. 298-345, Springer-Verlag, Ed. 1990.

Bartold, P.M., Reinboth, B., Nakae, H., Narayanan, A.S. and Page, R.C. *Proteoglycans of the bovine cementum: Isolation and characterization.* *Matrix*, 10:10, 1990.

Bartold, P.M., Miki, Y., McAllister, B., Narayanan, A.S., and Page, R.C. *Glycosaminoglycans of human cementum.* *J. of Periodont. Res.* 23:13, 1987.

Birkedal-Hansen, H., Butler, W.T., Taylor, R.C. *Proteins of*

the periodontum: Characterization of the insoluble collagens of bovine dental cementum. *Calcif. Tissue Res.* 23:39, 1977.

Blomlof, L., Lindskog, S., Appelgen, R., Johnson, B., Weintraub, A., Hammarstrom, L. New attachment in monkeys with experimental periodontitis, with and without removal of cementum. *J. of Clin. Periodontol.* 14:136, 1987.

Bogle, G., Garret, S., Crigger, M., and Egelberg, J. New connective tissue attachment in beagles with advanced natural periodontitis. *J. of Periodont. Res.* 18:220, 1983.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal. Biochem.* 72:248, 1976.

Caffesse, R.G., Kerry, G.J., Chaves, E.S., McLean, T.N., Mossison, E.C. Clinical evaluation of the use of citric acid and autologous fibronectin in periodontal surgery. *J. of Periodontol.* 59:565, 1988.

Cho, M-I., and Garant, P.R. Radioautographic study of ³H mannose utilization during cementoblast differentiation formation of acellular cementum and development of periodontal ligament principal fibers. *Anat. Rec.* 223:209, 1989.

Christner, P., Robinson, P., Clark, C.C. A preliminary cha-

racterization of human cementum collagen. *Calcif. Tissue Res.* 23:147, 1977.

Clark, R.A.F., and Henson, P.M. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair.* ed. p.p. 106-223. Plenum Press, NY and London, 1988.

Cogen, R.B., Garrison, D.C., and Weatherford, T.W. Effect of various root surface treatments on the viability and attachment of human gingival fibroblasts. *J. of Periodontol.* 54:277, 1983.

Crigger, M., Bogle, G., Nilveus, G., Egelberg, J., and Selvig, K.A. The effect of topical citric acid application on the healing of experimental furcation defects in dogs. *J. of Periodont. Res.* 13:358, 1978.

Fernyhough, W., and Page, R.C. Attachment growth and synthesis by human gingival fibroblasts on demineralized or fibronectin treated normal and diseased roots. *J. of Periodontol.* 54:133, 1983.

Fisher, L.W., Hawkins, G.R., Tuross, N., Termine, J.D. Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II bone sialoproteins I and II and osteocalcin from the mineral compartment of developing human bone. *J. of Biol. Chem.* 262:9702, 1987.

Glimcher, M.J., Lefteriou, B. Soluble glycosylated phosphoproteins of cementum. *Calcif. Tissue Int.* 45:165, 1982.

Gottlow, T.R.L., Nyman, S., Karring, T., and Lindhe, J. Treatment of localized gingival recessions with coronally displaced flaps and citric acid: an experimental study in the dog. *J. of Clin. Periodontol.* 13:57, 1986.

Grant, C.S., Tashiro, K-I., Batrolameo, S-R., Yamada, Y., Martin, G.R., and Kleinman, H.K. Extracellular matrix and indirect function during cell growth. *Cell.* 58:933, 1989.

Hauschka, P.V., Mavrakos, A.E., Iafraffi, M.D., Doleman, S.E., and Klagsbrun, M. Growth factors in bone matrix: Isolation of multiple types by affinity chromatography on Heparin-Sepharose. *J. of Biol. Chem.* 261:12665, 1986.

Ignotz, R.A., and Massague, J. Transforming growth factor-B stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. of Biol. Chem.* 261:4337, 1986.

Ignotz, R.A., Endo, T., and Massague, J. Cell attachment and long-term growth on derivatizable polyacrilamide surfaces. *J. of Biol. Chem.* 262:6443, 1987.

Ingber, D.E., and Folkman, J. How does extracellular matrix

control capillary morphogenesis?. *Cell*. 58:803, 1989.

Jaffe, E.A.L., Hoyer, W., Nachman, R.L. Synthesis of antihe-
mophilic factor antigen by cultured human endothelial cells.
J. of Clin. Invest. 52:2757, 1973.

Karring, T., Nyman, S., and Lindhe, J. New attachment forma-
tion on teeth with a reduced but healthy periodontal liga-
ment. *J. of Clin. Periodontol.* 12:51, 1985.

Kasugai, S., Zhang, Q., Overall, C.M., Wrana, J.L., Butler,
W.T., Sodek, J. Differential regulation of the 55 and 44 kDa
forms of secreted phosphoprotein I (SPP-I, osteopontin), in
normal and transformed rat bone cells by osteotropic hormones
growth factors and tumor promoter. *Bone and Mineral*, 13:235,
1991.

Lynch, S.E., Williams, R.C., Polson, A.M., Howell, T.H.,
Reddy, M.S., Zappa, U.E., Antoniades, H.N. A combination of
platelet-derived and insulin-like growth factors enhances pe-
riodontal regeneration. *J. of Clin. Periodontol.* 16:545.
1989.

Lynch, S.E., Ruiz de Castilla, G., Williams, R.C., Kiritsy,
C.P., Howell, T.H., Reddy, M.S., Antoniades, H.N. The ef-
fects of short-term application of a combination of platelet
-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound
healing. *J. of Periodontol.* 62:458, 1991.

Marks, S.C., Jr. and Metha, N.R. Lack of effect of citric acid treatment on the formation of new connective tissue attachment. *J. of Clin. Periodontol.* 13:109, 1986.

Martin, G.R., and Sank, A.C. Basic principles of soft tissue repair and the potential role of endogenous polypeptide growth factors. in: *Peptide growth factors and their receptors*. Sporn and Roberts, ed. p.p. 463-467, Springer Verlag, Ed. Vol. II, Berlin, 1988.

McAllister, B., Narayanan, A.S., and Page, R.C. Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum. *J. of Periodont. Res.* 25:99, 1990.

McCulloch, C.A.G., Nemeth, H.E., Lowenberg, B., Melcher, A.H. Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *Anat. Rec.* 219:233, 1987.

McCurdy, S.P., Clarkson, B.H., Speirs, R.L., Feagin, F.F. Phosphoprotein extraction from the dentine/cementum complex of human tooth roots. *Arch. Oral Biol.* 35:347, 1990.

Melcher, A.H. On the repair potential of the periodontal tissues. *J. of Periodontol.* 47:256, 1976.

Melcher, A.H., Cheong, T., Cox, J., Nemeth, E., Shiga, A.
Synthesis of cementum-like tissue in vitro by cells cultured from bone: A light and electron microscope study. J. of Periodont. Res. 21:592, 1986.

Melcher, A.H. Does the development origin of cementum periodontal ligament and bone predetermine their behavior in adults?. In: Guggenheim B. ed. *Periodontology today*. Ed. S. Krager AG. Basel, pp 6-14, 1988.

Miki, Y., Narayanan, A.S., Page, R.C. Mitogenic activity of cementum components to gingival fibroblasts. *J. Dent. Res. 66:1399, 1987.*

Nagata, T., Bellows, C.G., Kasugai, S., Butler, W.T., Sodek, J. Biosynthesis of bone proteins, SPP-I (secreted phosphoprotein-I, osteopontin), BSP (bone sialoprotein), and SPARC (osteonectin) in association with mineralized tissue formation by fetal rat calvarial cells in culture. *Biochem. J. 274:513, 1991.*

Nakae, H., Narayanan, A.S., Raines, E., Page, R.C. Isolation and partial characterization of mitogenic factors from cementum. *Biochemistry, 30:7047, 1991.*

Narayanan, A.S., Page, R.C. Connective tissues of the periodontum: A summary of current work. *Collagen Rel. Res. 3:33, 1983.*

Narayanan, A.S., Claget, J.A., Page, R.C. Effect of inflammation on the distribution of collagen types I, III, IV and V and type I trimer and fibronectin in human gingivae. *J. Dent. Res.* 64:1111, 1985.

Narayanan, A.S., Page, R.C. Synthesis of type V collagen by fibroblasts derived from normal, inflamed and hyperplastic human connective tissues. *Collagen Rel. Res.* 5:297, 1985.

Narayanan, A.S., Page, R.C. Biochemical characterization of collagens synthesized by fibroblasts derived from normal and diseased human gingiva. *J. of Biol. Chem.* 251:5464, 1976.

Narayanan, A.S., Page, R.C., and Swanson, J. Collagen synthesis by human fibroblasts: Regulation by transforming growth factor- β in the presence of other inflammatory mediators. *Biochem. J.* 260:463, 1983.

Nishimura, K., Hayashi, M., Matsuda, K., Shigeyama, Y., Yamasaki, A., and Yamaoka, A.J. The chemoattractive potency of periodontal ligament cementum and dentin for human gingival fibroblasts. *J. of Periodont. Res.* 24:146, 1989.

Noff, D., Pitaru, S., Savion, N. Basic fibroblast growth factor enhances the capacity of bone marrow cells to form bone like nodules in vitro. *FEBS Letters*, 250:619, 1989.

Nojima, M., Kobayashi, M., Shionome, M., Takahashi, N., Suda, T., Hasegawa, K. Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligament have the phenotypes of osteoblasts. *J. of Periodont. Res.* 25:179, 1990.

Nyman, S., Houston, F., Sarhed, G., Lindhe, J., Karring, T. Healing following reimplantation of teeth subjected to root planing and citric acid treatment. *J. of Clin. Periodontol.* 12:294, 1985.

Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T., Lindhe, J. The regenerative potential of the periodontal ligament: An experimental study in the monkey. *J. of Clin. Periodontol.* 9:257, 1982.

Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T., Rylander, H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J. of Clin. Periodontol.* 9:290, 1982.

Olson, S., Arzate, H., Narayanan, A.S., Page, R.C. Cell attachment activity of cementum proteins and mechanism of endotoxin inhibition. *J. of Dent. Res.* 70:1272, 1991.

Page, R.C. and Schroeder, H.E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab. Invest.* 33:235, 1976.

Page, R.C. The role of inflammatory mediators on periodontal

disease. *J. of Periodont. Res.* 26:598, 1991.

Pitaru, S., Melcher, A.H. Orientation of gingival fibroblasts and newly synthesized collagen fibers in vitro: Resemblance of transeptal and dentogingival fibers. *J. of Periodont. Res.* 18:433, 1983.

Pitaru, S., Tal, H., Soldinger, M., and Noff, D. Collagen membranes prevent apical migration of epithelium and support new connective tissue attachment during periodontal wound healing in dogs. *J. of Periodont. Res.* 24:247, 1989.

Polson, A.M. The root surface and regeneration :Present therapeutic limitations and future biological potentials. *J. of Clin. Periodontol*, 13:995, 1986.

Raines, E.W., Bowen-Pope, D.F., and Ross, R. Growth factors in vivo, analysis by mRNA phenotyping, in: *Peptide growth factors and their receptors*. Sporn and Roberts. ed. pp 173-262, Springer-Verlag Ed. New York, 1990.

Rapraeger, A.C., Krufka, A., Olwin, B.B. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science*, 252:1705, 1991.

Rozengurt, E. Early signals in the mitogenic response. *Science*, 234:161, 1986.

Schluger, S., Yuodelis, R., Page, R.C., Johnson, R.H.
Periodontal Diseases, pp. 53-71. Lea & Febiger Ed. Philadelphia and London, 1990.

Shimokado, K., Raines, E.W., Madtes, D.K., Barret, T.B., Benditt, E.P., and Ross, R. A significant part of macrophage derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell*, 43:277, 1985.

Slavkin, H., Bringas, P., Bessem, B.C., Santos, V., Nakamura, M., Hsu, M.Y., Snead, M.L., Zeicher-David, M., Fincham, A.G. Hertwig's epithelial root sheath differentiation and initial cementum and bone formation during long term organ culture of mouse mandibular first molars using serum less chemically defined medium. *J. of Periodont. Res.* 23:28, 1988.

Smith, A.J., Leaver, A.G., Smith, G. The amino acid composition of the non collagenous organic matrix of human cementum. *Arch. Oral Biol.* 28:1047, 1983.

Soliz-Herruzo, J.A., Brenner, D.A., Chojkier, M. Tumor necrosis factor- α inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts. *J. of Biol. Chem.* 263:5841, 1988.

Somerman, M.J., Archer, S.Y., Shteyer, A., Foster, R.A. Protein production by human gingival fibroblasts is enhanced

by guanidine EDTA extracts of cementum. *J. of Periodont. Res.* 22:75, 1987.

Somerman, M.J., Foster, R.A., Imm, G.M., Sauk, J.J., Archer, S.Y. Periodontal ligament cells and gingival fibroblasts respond differently to attachment factors in vitro. *J. of Periodontol.* 60:73, 1989.

Somerman, M.J., Sauk, J.J., Foster, R.A., Dickerson, K., Norris, K., Argraves, W.S. Cell attachment activity of cementum: Bone sialoprotein II identified in cementum. *J. of Periodont. Res.* 26:10, 1991.

Somerman, M.J., Archer, S.Y., Imm, G.R., Foster, R.A. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J. of Dent. Res.* 67:66, 1988.

Somerman, M.J., Peres-mera, M., Merkhofer, R.M., Foster, R.A. In vitro evaluation of extracts of mineralized tissues for their application in attachment fibrous tissue. *J. of Periodontol.* 58:349, 1987.

Somerman, M.J., Shroff, B., Argraves, W.S., Morrison, G., Craig, A.M., Denhardt, D.T., Foster, R.A., Sauk, J.J. Expression of attachment protein during cementogenesis. *J. Biol. Buccale.* 18:207, 1990.

Tsukada, T., Tippens, D., Gordon, D., Ross, R., Gown, A.M.

HHF-35 a muscle actin specific monoclonal antibody. I: Immunocytochemical and biochemical characterization. *Am. J. of Pathol.* 126:51, 1987.

Weiss, R.A., Guillet, G.Y.A., Freedberg, I.M., Farmer, E.R., Small, E.A., Weiss, M.M., Sun, T-T. The use of monoclonal antibody to keratin in human epidermal disease: Alterations in immunocytochemical staining pattern. *J. of Inv. Dermatol.* 81:224, 1983.

Wikesjo, J.M.E., Claffey, N., Christenson, L.A., Franzetti, L.C., Genco, R.J., Terranova, V.P., and Egelberg, J. Repair of periodontal furcations defects in beagle dogs following reconstructive surgery including root surface demineralization with tetracycline hydrochloride and topical fibronectin application. *J. of Clin. Periodontol.* 15:73, 1988.

Wirthlin, M.R., and Hancock, E.B. Biologic preparation of diseased root surfaces. *J. of Periodontol.* 51:291, 1980.