



Universidad Nacional Autónoma de México

75  
31.

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**ANÁLISIS DE PROTEÍNAS SECRETADAS EN  
MEDIO CONDICIONANTE DE  
CEMENTOBLASTOS Y OSTEÓBLASTOS  
HUMANOS IN VITRO**

**T E S I S A**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**CIRUJANO DENTISTA**

**P R E S E N T A N:**

**FLORES ESQUIVEL REYNA  
MARTINEZ MAYA MIGUEL**

**ASESOR: DR. HIGINIO ARZATE.**



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

MÉXICO, D.F.

1997.

*Reyna Arzate*



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**EMPIEZA POR HACER LO NECESARIO,  
LUEGO LO QUE ES POSIBLE Y DE PRONTO  
TE ENCONTRARAS HACIENDO LO  
IMPOSIBLE.**

**SAN FRANCISCO DE ASIS**

**AGRADECIMIENTOS**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO**

**Y**

**FACULTAD DE ODONTOLOGIA**

**DR. HIGINIO ARZATE**

**DRA. GLORIA GUTIERREZ**

Trabajo realizado para obtener el título de cirujano dentista;  
el trabajo se presentara ante el siguiente jurado:

PRESIDENTE :	Dr. Higinio Arzate.
VOCAL :	MC. Elva Leyva.
SECRETARIO :	MC. Beatriz Aldape.
SUPLENTE :	MC. Luis Gaitan.
SUPLENTE :	Dra. Gloria Gutiérrez.

Sitio donde se realizo el tema:

Laboratorio de biología celular de la división de estudios de postgrado e investigación de la facultad de odontología.

ASESOR:

Dr. Higinio Arzate.

SUSTENTANTES:

FLORES ESQUIVEL REYNA. \_\_\_\_\_.

MARTINEZ MAYA MIGUEL. \_\_\_\_\_.

Esta tesina fue realizada bajo el programa de la vigésima promoción del seminario de titulación en bioquímica bajo la dirección de la Dra. Gloria Gutiérrez.

---

## INDICE

	página
INTRODUCCION.	2
COMPOSICION ORGANICA E INORGANICA DEL CEMENTO.	6
CLASIFICACION DEL CEMENTO.	8
FUNCIONES DEL CEMENTO.	9
CEMENTOGENESIS.	11
MINERALIZACION DEL CEMENTO.	15
CELULAS DEL CEMENTO.	17
PAPEL DEL CEMENTO EN LA REGENERACION PERIODONTAL.	18
METODO EXPERIMENTAL.	21
MATERIALES.	23
ELECTROFORESIS.	25
SDS-PAGE.	30

	página
RESULTADOS.	32
GRAFICAS.	34-35
DISCUSION.	35
BIBLIOGRAFIA.	37

El cemento radicular es el tejido conectivo calcificado, especializado que cubre las superficies radiculares del diente, el cemento forma la interface entre la dentina radicular y los tejidos conectivos blandos del ligamento periodontal.

El cemento es una forma altamente especializada de tejido conectivo calcificado que se asemeja estructuralmente al hueso, aunque difiere de este en varios aspectos funcionales importantes, de los tejidos calcificados del diente, es el más blando y el que tiene menor proporción de sales minerales, es más oscuro que el esmalte dentario y casi del mismo color que la dentina <sup>(1)</sup>

El cemento difiere del hueso en: El cemento es avascular, el cemento no presenta inervaciones, el cemento no sufre remodelación significativa; presenta una formación activa caracterizada por un depósito continuo durante toda la vida.

El cemento contribuye al proceso de reparación de las lesiones de la superficie radicular. <sup>(2)</sup>

Las variaciones en la estructura de la matriz extracelular permiten la clasificación del cemento en fibrilar y afibrilar. Cuando se observa el cemento con el microscopio electrónico. En el cemento fibrilar pueden apreciarse numerosos haces de fibrillas de colágeno con bandas, así como un material de matriz amorfo interfibrilar con granulaciones finas, pero el cemento afibrilar se encuentra libre de fibras colágenas.

El cemento afibrilar acelular consiste en una matriz

mineralizada; la cual parece similar a la matriz interfibrilar de las fibras extrínsecas del cemento acelular, pero ninguno contiene fibras de colágena.

La falta de fibras de colágena indica que este cemento tiene una gran variedad, y no sobre su función de adhesión radicular, el cemento acelular afibrilar puede ser identificado por medio del microscopio electrónico.

Un variado numero de capas las cuales varían de densidad y textura pueden llegar a ser de tipo granular o reticular; y así mismo dar una apariencia multifactorial al mismo cemento.

El cemento afibrilar acelular es depositado en forma de remiendos aislados en áreas menores de esmalte, dentina y pequeñas áreas de la corona; en la unión cemento -esmalte los espolones del cemento se funden en esta misma unión.

Las células responsables para la formación del cemento acelular afibrilar pueden estar determinadas con precisión, esta formación comienza después de la formación y maduración del esmalte y continua por un periodo desconocido. Las células del tejido conectivo son responsables de la formación de este tipo de cemento al ponerse en contacto con la superficie del esmalte.

En experimentos in vitro se dañan las capas calcificadas, las cuales morfológicamente se reemsamblan; estas se encuentran inmersas en suero, suplementadas con fosfatasa alcalina y un origen orgánico semejante al monofosfato éster B-glicerofosfato; sin embargo la enzima de fosfatasa alcalina es recurrida para la mineralización; en la situación in vivo esta enzima en particular es asociada con células del ligamento periodontal que se encuentra entre el hueso y el cemento. <sup>(3)</sup>

El cemento afibrilar se ve con mayor frecuencia en la región cervical, sobre la raíz o la superficie de la corona.

El cemento fibrilar posee un sistema de fibras dobles, el colágeno producido por los cementoblastos y orientado al azar o paralelo a la superficie radicular forma el sistema de fibras intrínsecas.

Las fibras extrínsecas son producidas por fibroblastos del ligamento periodontal, inicialmente las fibras de Sharpey están insertadas en el cemento en ángulos aproximadamente rectos con respecto a la superficie del diente.

Ambas formas de cemento experimentan mineralización y pueden poseer líneas de cemento. <sup>(1)</sup>

Existen principalmente dos tipos de cemento radicular: acelular (primario) y celular (secundario), los dos se componen de una matriz interfibrilar calcificada y fibrilas colágenas. <sup>(4,5)</sup>

El cemento acelular suele ser la primera capa depositada; se encuentra, por lo tanto, inmediatamente adyacente a la dentina; el cemento celular cubre las porciones medias y apical de la superficie radicular. Sin embargo no existe una línea divisoria entre estos tipos, y una forma puede encontrarse emparedada entre capas de la otra. Ambas formas pueden presentar una matriz de finas fibrillas colágenas incrustadas en una matriz amorfa o finamente granuladas.

La estructura del cemento celular es similar a la de la forma celular, salvo por la presencia de cementoblastos atrapados y células epiteliales de la vaina radicular. <sup>(3)</sup>

El término de cemento primario suele utilizarse para describir la capa acelular depositada inmediatamente adyacente a la dentina durante la formación radicular y antes de la erupción dentaria. El cemento primario está formado de pequeñas fibrillas de colágena orientadas al azar e incrustadas en una matriz granular.

El cemento secundario incluye a las capas depositadas después de la erupción, generalmente en respuesta a exigencias funcionales. El cemento secundario suele ser celular y contener fibrillas de colágena gruesas orientadas en sentido paralelo a la superficie radicular.

Generalmente el cemento primario está mineralizado en una forma más completa y más uniforme que el cemento secundario y posee menos líneas de desarrollo. <sup>(3)</sup>

El tipo celular (secundario) contiene cementocitos en espacios aislados (lagunas), que se comunican entre sí mediante un sistema de canaliculos anastomosados; el cemento celular está menos calcificado que el acelular, el cemento celular es más común en el tercio apical y en las zonas de furcas. <sup>(4)</sup>

El cemento celular es el que produce el depósito continuo del mismo cemento. <sup>(4)</sup>

El cemento acelular (primario) se forma en conjunción con la formación radicular y erupción dentaria, este no contiene células, se encuentra presente en el tercio coronario de la raíz y se compone de una serie de lámelas que corren paralelas a la dirección de la raíz, se forma con comitante con la formación de la dentina radicular y en presencia de la vaina epitelial de Herwig.<sup>(6,7)</sup>

Las fibras de Sharpey ocupan la mayor parte de la estructura del cemento acelular, que desempeña un papel principal en el sostén del diente, estas se hallan calcificadas por cristales paralelos a las fibrillas tal como lo están en la dentina y el hueso.

### COMPOSICIÓN ORGÁNICA E INORGÁNICA DEL CEMENTO

El contenido orgánico del cemento está constituido principalmente por colágena de los tipos I (90%) y colágena tipo III (5%), proteínas no colágenas, glicoproteínas y proteoglicanos.

Estudios histoquímicos indican que la matriz del cemento contiene un complejo de proteínas y carbohidratos. Hay mucopolisacáridos neutros y ácidos en la matriz, así como en el citoplasma de algunos cementoblastos, el revestimiento de lagunas y líneas de crecimiento y precemento son ricos en polisacáridos ácidos, posiblemente condroitinsulfato B.<sup>(4)</sup>

El contenido inorgánico del cemento asciende del 45% al 50% de hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  y es menor que el hueso

ya que este consta de un 65.9%, el esmalte 95.7%, la dentina 70%; el calcio y la relación magnesio-fósforo son más elevados en áreas apicales que en las cervicales la composición del cemento es similar a la de la dentina pero con un contenido de cenizas ligeramente inferior, aproximadamente un 26% y 13% de fósforo.<sup>(4,6)</sup>

El cemento contiene de 0.5% a 0.9% de magnesio, esta porción es la mitad encontrada en la dentina, en concentraciones de fluoruros contiene el 0.9% de su peso y de 0.1% a 0.3% como constituyente de la matriz orgánica.<sup>(9)</sup>

El espesor del cemento en la mitad coronaria de la raíz varía de 16 a 60 micrones de espesor, aproximadamente el grosor de un cabello, este adquiere su mayor espesor que es de 150 a 200 micrones en el tercio apical y furcas.<sup>(4)</sup>

## CLASIFICACIÓN DEL CEMENTO

Jones (1981) propone una clasificación para el cemento radicular y Schroeder (1986) adopta y modifica la clasificación anterior, está se basa en la presencia de células de acuerdo al origen de las fibras de colágena.<sup>(10)</sup>

CLASIFICACIÓN DEL CEMENTO				
TÉRMINO	ABREVIATURA	COMPONENTES ORGANICOS	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN
1.Cemento afibrilar acelular	AAC	Matriz homogénea no celular, fibras no colágenas	En la unión dentino esmalte	Desconocida
2.Fibras extrínsecas del cemento acelular.	AEFC	Fibras de colágena como las de Sharpey, y fibras no celulares	De cervical a la parte central o media de la raíz.	Anclaje del diente
3.Fibras intrínsecas del cemento celular.	CIFC	Fibras colágenas intrínsecas y cementocitos.	Superficie radicular, interradiculares, apicales y resorcciones, fracturas y lagunas.	Reparación y adaptación.
4.Fibras intrínsecas de cemento acelular.	AIFC	Fibras de colágena y fibras no celulares intrínsecas.	En apical o interradicular.	Adaptación.
5.Cemento mixto estratificado celular(AEFC+CIF C/AIFC).	CMSC	Fibras de colágena intrínsecas, fibras de Sharpey, cementocitos	En apical y superficies interradiculares y radiculares.	Adaptación y anclaje de la raíz.

## **FUNCIONES DEL CEMENTO**

La principal función del cemento es la de mantener la salud del ligamento periodontal así como de las fibras de la superficie de la raíz; este contribuye al proceso de reparación de la enfermedad periodontal.

La regeneración clínica del periodonto (formación de hueso, nuevo cemento y tejido conectivo de adhesión) incluyen tratamientos directos a la estimulación y aumento de la formación del cemento.<sup>(5)</sup>

El cemento cumple dos funciones específicas, la primera es proporcionar fijación a las fibras del ligamento periodontal a medida que el diente se mueve ya sea en erupción o en el movimiento fisiológico, grupos de fibras se desprenden del cemento y degeneran.

Continuamente se forman nuevas fibras para sustituir las anteriores y se hace una nueva fijación a la capa del cemento secundario que se está depositando en ese momento.

Una segunda función es proteger la raíz de un diente cuando se aplica una fuerza anormal. La presión de una raíz sobre el hueso alveolar conduce principalmente a la resorción del hueso y no del cemento, pero a esto sigue la reparación y la mayor parte del moldeado se lleva entonces a cabo en el hueso alveolar; si fuera de otra forma, el tratamiento ortodóncico causase la resorción de la raíz más que el movimiento del diente.

El crecimiento del cemento puede ser muy pronunciado en la región apical del diente. En efecto, alarga la raíz y puede compensar la pérdida del esmalte de la atrición.

El cemento no depende de la dentina o de la pulpa para su nutrición, y por lo tanto, continúa funcionando aun si la pulpa muere. Esta es la razón de que se retenga un diente carente de pulpa, porque sus membranas periodontales están insertadas en el cemento todavía vital.<sup>(6)</sup>

## CEMENTOGENESIS

La formación del cemento tiene un origen mesenquimatoso, y comienza al igual que el hueso y la dentina, con la mineralización de la trama de las fibrillas colágenas dispuestas irregularmente, dispersas en la sustancia fundamental interfibrilar o matriz denominada precemento o cementoide.

Su espesor aumenta por aposición de la matriz efectuada por los cementoblastos, cuando está alcanza un espesor de 3 a 5 micras se cubre con una sustancia a manera de matriz amorfa y subsecuentemente se mineraliza.

Al progresar la mineralización las células epiteliales de la vaina radicular comienzan a separarse entre sí, y de la superficie de la dentina emigran hacia el tejido conectivo periodontal, al mismo tiempo la lámina basal que separa las células epiteliales de la dentina en desarrollo; se vuelve difusa y es remplazada por una capa de fibrillas de colágena finas, orientadas al azar, estas se extienden entre las células epiteliales de separación pero no hacia la dentina en desarrollo.

La formación del cemento comienza al igual que el hueso y la dentina, con la mineralización de las fibras colágenas dispersas irregularmente, dispersas en las sustancias interfibrilar o matriz, denominada precemento o cementoide.

A medida que las células residuales de la vaina radicular de Herwig se separan de la dentina recién formada, se deposita una matriz cementoide alrededor de las células que tienen el aspecto de fibroblastos ubicados cerca de la superficie dentinaria en el

extremo apical que está calcificando, desplazándose una breve distancia a lo largo de la superficie radicular, estas células toman la forma común de los cementoblastos y se inicia la calcificación del material cementoide.

Generalmente la capa inicial del cemento es acelular, pero durante la cementogénesis los cementoblastos pueden quedar atrapados en el cemento recién formado; los cementoblastos parecen ser fibroblastos especializados que extienden prolongaciones citoplasmáticas entre las fibrillas colágenas al interior de la capa cementoide o precemento. Estas células son electrodensas y contienen sisternas endoplasmáticas llenas de un material denso. Tiene un aparato de Golgi bien desarrollado y numerosas mitocondrias, esta es una característica de que las células están sintetizando proteínas.<sup>(11)</sup>

En algunas zonas, sólo persisten una o dos capas de células epiteliales, las células de tejido conectivo sobre la vaina epitelial se diferencian tomando dentina en desarrollo.

Esta capa forma el precemento o cementoide, se acumula en la matriz amorfa y se calcifica al mismo tiempo, al progresar la calcificación del cemento se desplazan de la superficie y suelen no incorporarse. Así la capa primaria de cemento que cubre la raíz recientemente formada suele ser acelular, sin embargo los cementoblastos como las células epiteliales de la vaina de Herwig pueden verse atrapadas dando lugar al cemento celular.

Los cementoblastos difieren de otras células del tejido conectivo en que están localizados cerca del cemento y se encuentran polarizados, ya que extienden sus prolongaciones citoplasmáticas entre las fibrillas colágenas y el precemento.

El resultado final de la cementogénesis es la formación de una delgada capa de material extracelular calcificado al nivel de la interfase de la dentina y el tejido conectivo no calcificado que sirve como sitio de inserción para las fibras colágenas del tejido conectivo periodontal.

Las células residuales de la vaina epitelial radicular forman una red dentro del ligamento periodontal, a esto se le denomina restos celulares.<sup>(1)</sup>

El espesor del cemento aumenta por aposición de su matriz, está es efectuada por cementoblastos, la mineralización progresiva de la matriz comienza en la unión dentino-cementaria y avanza en dirección de los cementoblastos, primero se depositan cristales de hidroxapatita dentro de las fibras y en la superficie de ellas, después de la sustancia fundamental los cementoblastos separados inicialmente por cementoide no calcificado, en ocasiones quedaran incluidos en la matriz, una vez encerrados se les denomina cementocitos y quedan viables de manera similar a los osteocitos; el proceso continuo de la formación del cemento es más lento que la del hueso y la dentina.<sup>(4)</sup>

**La formación del cemento puede ser subdividida en prefuncional y funcional.**

La etapa de desarrollo prefuncional del cemento esta formada durante el desarrollo radicular, el desarrollo prefuncional del cemento, es un proceso largo y duradero, ya que este abarca un periodo de 3.75 a 7.75 años(formación de la raíz).

El desarrollo funcional del cemento sobre otros tejidos, comienza cuando el diente esta cerca de extenderse a nivel oclusal, este es asociado con la adhesión de la raíz con la superficie del hueso.<sup>(9)</sup>

## **MINERALIZACIÓN DEL CEMENTO RADICULAR**

La mineralización del cemento comienza en la hendidura del precemento, los finos cristales de hidroxapatita son depositados primero entre la hendidura y posteriormente dentro de las fibras de colágena, aparentemente esta identificado como un tejido óseo mineralizado.

Zander y Hürzeler examinaron la densidad del cemento humano de dientes extraídos a varios individuos de diferentes edades; los depósitos de cemento que fueron encontrados en los dientes se observó un desarrollo de 3 micrómetros por año, pero se encontraron variables, de acuerdo al tipo de diente, tipo de cemento formado y de acuerdo al área de la superficie radicular.

Un porcentaje similar esta formado por fibras de cemento extrínseco acelular en dientes humanos jóvenes y se podrá encontrar en premolares, dientes impactados y dientes jóvenes no funcionales (dientes fuera de oclusión).

El cemento forma un porcentaje muy alto de los dientes desiguos de la macaca fascicularis monkey, esta presenta un desarrollo de 0.1 micrómetros por día de fibras de cemento intrínseco celular, y presumiblemente esto puede ocurrir a otros animales.

La anchura de los lagos del precemento humano es de 3 a 5 micrómetros, los cristales de mineral se alargan de manera similar a los del hueso y la dentina dentro de 1 a 4 micrómetros de calcificación frontal, aparecen dentro de los procesos de estabilización apropiados con las condiciones para la

**cristalización, con un aumento por aposición de cristales; se lleva a cabo en meses de una forma lenta.**

**La distribución mineral dentro de la maduración de los tejidos muestran una gran parte de variabilidad, estudios hechos por microradiólogos usan una técnica que básicamente refleja la distribución de calcio en los tejidos, nos muestra unas células de cemento mixtas extratificadas, generalmente tienen un bajo contenido de minerales y se encuentran en las fibras del cemento extrínseco acelular. La diferencia puede en parte ser acontecida por medio de las estructuras no mineralizadas de las fibras del cemento no celular; en esta se incluyen lagunas de cementocitos.**

**Las fibras de cemento estratificado y las fibras de Sharpey generalmente tienen un centro mineralizado. La última característica es un contraste a las fibras intrínsecas y a las fibras de Sharpey en fibras de cemento intrínseco acelular el cual exhibe un grado mayor de mineralización.<sup>(9)</sup>**

## **CELULAS DEL CEMENTO RADICULAR**

En la formación del cemento actúan dos células específicas importantes que son: los cementoblastos y los cementocitos; los cementoblastos son metabólicamente activos, y estos sintetizan la matriz cementoide; estos se originan de células mesenquimatosas.

Los cementocitos son cementoblastos que han sido atrapados en el espesor del cemento que ellos mismos secretan y se encuentran relativamente inactivos, y en ocasiones degenerados, estos pueden tener diferentes formas y tamaños, algunos son planos, redondos u ovalados y varían en tamaño de 8 a 15 micras.

La deposición de fibras intrínsecas de cemento celular está caracterizada por el atrapamiento de cementoblastos, ya que llegan a rodearse por la matriz que ellos mismos forman.

Aparecen tantos números de células que llegan a ser incorporadas proporcionalmente al depósito de cemento, la densidad de la célula del cemento intrínseco celular de los dientes humanos es mucho más bajo que los tejidos del hueso.

El sistema de interconexión que es por medio de canáliculos tiene un gran poder para mantenerse nutricionalmente activos; los cementocitos cierran la superficie del cemento sobre los cementoblastos, sin embargo el aporte del citoplasma es reducido y contiene menor retículo endoplasmico.<sup>(9)</sup>

Estas observaciones indican que el cambio de metabolitos en las fibras intrínsecas de cemento celular están limitados y sumergidos en los lagos del mismo.<sup>(9)</sup>

## **PAPEL DEL CEMENTO EN LA REGENERACION PERIODONTAL**

La enfermedad periodontal es una de las causas más frecuentes en la pérdida de los órganos dentarios en los seres humanos; esto constituye uno de los problemas mayores de la salud en todo el mundo, aproximadamente el 95% de la población mayor de 65 años sufre algún grado de la enfermedad, 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 de complemento, La 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 la destrucción del tejido conectivo 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 y de raíces dentarias y finalmente pérdida del diente.

El objetivo principal de la terapéutica periodontal es la restauración de la inserción del tejido conectivo que ha sido perdido 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.

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.

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; esto se sabe, 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, el raspado y alisado radicular, cuyo objetivo primordial es la remoción de sustancias tóxicas parece no promover la nueva inserción, por esto se han realizado intentos para crear condiciones que favorezcan la nueva inserción, estos incluyen desmineralización de las superficies radiculares, aplicación de fibronectina, factores de crecimiento suplementarios y matrices desmineralizadas de hueso. <sup>(6)</sup>

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 que es debido a la capacidad de la membrana para incluir las células gingivales epiteliales y permitir la migración de las células responsables de la regeneración periodontal.

Datos obtenidos recientemente demuestran que sustancias presentes en el cemento influyeron en la migración, crecimiento y síntesis de proteínas sobre fibroblastos del periodonto, además que estas moléculas no están presentes en los tejidos que rodean al cemento. 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 las superficies expuestas a la periodontitis.<sup>(8)</sup>

## METODO EXPERIMENTAL

Se recolecto medio condicionante de células derivadas de un cementoblastoma humano y células osteoblásticas derivadas de hueso alveolar humano del mismo paciente. Estas células cuando estuvieron en etapa de confluencia, fueron lavadas con amortiguador de fosatos, (10 ml tres veces) y posteriormente se colocó medio libre de suero  $\alpha$ -MEM suplementado con antibióticos, Penicilina 100 UI/ml y estreptomina, 100  $\mu$ g/ml. y las células se cultivaron durante 48 hrs y el medio recolectado se dializo en bolsas de diálisis de corte 30,000 daltons contra H<sub>2</sub>O doblemente destilada. Posteriormente se liofilizó. A estos extractos se les determinó la concentración de proteína de acuerdo al método de Bradford, utilizando albúmina sérica bovina como patrón. Una vez determinada se procedió a conocer el patrón de proteínas de estos extractos por medio de geles de poliacrilamida-SDS (dodecil sulfato de sodio), en geles al 12.5 %, con patrón de pesos moleculares.

### GEL INFERIOR

Acrilamida	6.25	ml
tris ph 8.8	3.75	ml
SDS 10%	300	microlitros
DDH2O	5.15	ml
TEMED	5	microlitros
APS	25	microlitros

### GEL SUPERIOR

Acrilamida	1.25	ml
tris ph 6.8	1.875	ml
SDS 10%	75	microlitros
DDH2O	4.445	ml
TEMED	7.5	microlitros
APS	50	microlitros

## MATERIALES

- Medio condicionante de cementoblastos.
- Medio condicionante de osteoblastos.
- Micropipetas 20 microlitros.  
200 microlitros.  
1000 microlitros.
- Fuente de poder 40 mA.
- Cámara de electroforesis.
- Marcador de peso molecular de proteínas.
- Espectrofotómetro.
- Colorante de Bradford.
- Cubetas para espectrofotómetro.
- vibradores electrónicos.
- Balanza electrónica.
- Papel milímetro.

Una vez obtenidas las muestras de cementoblastos y osteoblastos se procedió a medir la concentración de proteínas por medio de una curva de albúmina sérico bovina (gráfica 1), utilizando la técnica de Bradford y un espectofotometro la cual nos dio como resultado 1.64 mg de osteoblastos en 1.0 ml y 0.8278 mg de proteínas de cementoblastos en 1.0 ml.

Habiendo realizado y calculado la concentración de proteínas se procede a colocar las proteínas en ebullición durante 5 min. para desnaturalizar su estructura cuaternaria.

Ya obtenidos los datos anteriores se procedió a la preparación de la técnica para calcular los pesos moléculares de las proteínas encontradas en los cementoblastos y osteoblastos por medio de electroforesis.

## ELECTROFORESIS

La electroforesis es un método por el cual moléculas cargadas en solución, proteínas y ácidos nucleicos migran en dirección a un filtro eléctrico de acuerdo al peso molecular y la permeabilidad de estas en el transcurso al recorrer un gel.

La electroforesis en gel se halla entre los métodos resolutivos y convenientes más empleados en la separación macromolecular, la poliacrilamida posee poros de dimensiones moleculares, cuyos tamaños pueden especificarse. La separaciones moleculares se basan, por tanto, sobre la filtración en gel así como en las movilidades electroforéticas de las moléculas que se están separando.<sup>(12)</sup>

En la electroforesis los geles retrasan las moléculas grandes con respecto a las menores; el movimiento de las moléculas de tamaño mayor se halla impedido, con relación al de las moléculas menores al emigrar las moléculas a través del gel.

En la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), se confeccionan los geles por la polimerización inducida por radicales libres de acrilamida y de N,N'-metilénbisacrilamida.

En la forma más sencilla de PAGE, se suspende verticalmente un tubo de 3 a 10 cm de longitud, en el que se ha polimerizado el gel entre un recipiente superior y otro inferior; puede confeccionarse también el gel en forma de lámina

rectangular delgada, en la que pueden analizarse varias muestras simultáneamente colocándolas en paralelo. El tampón, que es el mismo en ambos recipientes y en el gel, es de un PH al que las macromoléculas tienen carga neta negativa y, por tanto, emigran hacia el ánodo situado en el recipiente inferior, cada muestra puede contener cantidades tan pequeñas como 10 microgramos de material macromolecular ;en los geles en forma de lámina, las muestras se aplican en ranuras o muescas preformadas en la parte superior del gel.

Se hace atravesar una corriente de 300 v por el gel durante un intervalo de tiempo suficiente para separar los componentes macromoleculares en la serie de bandas discretas ( 30-90 min). Se separa el gel del recipiente que lo contiene y se ponen de manifiesto las bandas por un método apropiado, utilizando esta técnica puede resolverse una mezcla de proteínas de 0.1 0.2 mg en hasta 20 bandas discretas.<sup>(13)</sup>

El gel separador, en el que tiene lugar la separación, se prepara tal como se describió con anterioridad y a continuación se deposita sobre él una capa corta (1cm) de gel espaciador o gel concentrador de poro grande. El tampón del recipiente inferior y del gel separador es el descrito anteriormente, mientras que el de la disolución de la muestra y el del gel concentrador tiene un ph que es de unas dos unidades inferior al del recipiente inferior. El ph del tampón situado en el recipiente superior, que debe contener un ácido débil se ajusta al ph próximo al del recipiente inferior, cuando se hace pasar la corriente, los iones del tampón del recipiente superior emigran al gel concentrador, a medida que los iones de este último emigran fuera de él. En esta situación los iones del tampón del recipiente superior hallan un ph que es

mucho menor que su  $pK$ , adoptan por tanto, su forma sin carga y se convierten en inmóviles electroforéticamente.

Este hecho origina una deficiencia de portadores de carga; es decir, una resistencia eléctrica  $R$ , en esta región que, debido a la necesidad de una corriente constante  $I$  a través del circuito eléctrico da como resultado de acuerdo con la ley de ohm ( $E=IR$ ), un incremento muy localizado en el campo eléctrico,  $E$ .

En respuesta a este incremento en el campo eléctrico, los aniones moleculares emigran rápidamente hasta que alcanzan la región del gel concentrador que contienen los iones, en la que su movimiento se hace más lento debido a que en este punto no existe deficiencia iónica.

Este efecto provoca que los iones macromoleculares se aproximen al gel separador como bandas apiladas muy estrechas o discos, que están ordenados de acuerdo con sus movilidades y se sitúan entre los iones emigrantes del recipiente superior y los del gel concentrador.<sup>(13)</sup>

A medida que los iones macromoleculares penetran en el gel separador, su movimiento se hacen más lento como consecuencia de los efectos de la filtración por el gel. Esto permite a los iones del recipiente superior alcanzar a las bandas macromoleculares y, como el gel separador posee un  $pH$  más elevado, y asume, su forma cargada plenamente cuando igualmente penetran en el gel.

La deficiencia de carga que existía desaparece, según lo

expuesto y desde este punto la separación electroforética transcurre normalmente. Sin embargo, La compacidad de las bandas macromoleculares que penetran en el gel separador aumenta mucho la resolución de las separaciones macromoleculares.

Las bandas de un gel pueden detectarse por tñido o mediante cuenta radioactiva, las bandas resultantes de una separación por electroforesis en gel pueden localizarse por varias técnicas, las proteínas se ponen de manifiesto por tñido, el tinte o colorante empleado con mayor profusión es el Coomassie brilliant blue (azul brillante de Coomassie), que se aplica mojando en gel en una disolución alcohólica, ácida, que contiene el colorante; éste se fija a la proteína en el gel, desnaturalizándola y formando un complejo con ella.

El exceso de colorante se elimina por un lavado prolongado del gel con una disolución ácida o por un destñido electroforético, de este modo pueden detectarse proteínas en fracciones de microgramos.

Las bandas de gel que contienen cantidades de proteínas menores que las antes mencionada pueden hacerse visibles por tñido con plata, que es más sensible, pero algo más difícil de aplicar.

La fluorescamina, un tipo alternativo de tinte para proteínas, es un molécula no fluorescente que reacciona con las aminas primarias, como la lisina, y rinde un producto de adición que es muy fluorescente bajo la radiación UV.<sup>(13)</sup>

Si la muestra es radioactiva, puede desecarse el gel en vacío para obtener un material como celofana, o también recurrir

el gel con una cubierta de plástico y luego adherirlo a una hoja de película de rayos X. Después de transcurrido un tiempo (desde unos pocos minutos a muchas semanas según la intensidad de la radiación) se desarrolla el filme y la autorradiografía resultante muestra las posiciones de los componentes radiactivos por el ennegrecimiento de la película.

Pueden obtenerse secciones del gel, en toda su longitud, obteniendo muchas secciones y el nivel de cada sección puede determinarse mediante un cortador de escintilaciones; este último método proporciona resultados más exactos que la autorradiografía.<sup>(12)</sup>

Los jabones y los detergentes son moléculas anfipáticas, que se comportan como agentes desnaturalizantes potentes de las proteínas, por las razones explicadas anteriormente.

El dodecil sulfato de sodio (SDS), es un detergente que se emplea frecuentemente en las preparaciones bioquímicas, se une muy tenazmente a las proteínas induciéndolas adoptar una forma cilíndrica.

La mayor parte de las proteínas se unen al SDS en la misma proporción, 1.4 g SDS /g de proteína (aproximadamente 1 molécula de SDS por cada 2 restos de aminoácido).

La gran carga negativa que imparte el SDS enmascara la carga intrínseca de la proteína de modo que las proteínas tratadas con SDS tienen a exhibir idénticas relaciones carga-masa y formas semejantes.

La electroforesis de proteínas en un gel que contenga SDS la separa de acuerdo con sus masas moleculares, debido a los efectos de la filtración en el gel.

Las masas moleculares de las proteínas normales se determinan rutinariamente con una exactitud del 5% al 10%, mediante el método SDS-PAGE. Las movilidades relativas de las proteínas en este tipo de geles varían linealmente, con el logaritmo de sus masas moleculares.

En la práctica, la masa molecular de una proteína se determina sometiendo a una electroforesis conjunta a la proteína problema con varios marcadores; estas son proteínas con masa molecular conocida, lo que permite interpolar la masa molecular de la proteína que interesa.

El tratamiento con SDS anula las interacciones no covalentes entre estas sub-unidades, por dicha razón, el método SDS - PAGE proporciona las masas moleculares de las sub-unidades en lugar de la masa molecular de la proteína intacta, a menos que las sub-unidades se hallen unidas por puentes de disulfuro; sin embargo, se añade mercaptoetanol a los geles, habitualmente, en el método SDS - PAGE, a fin de reducir los enlaces de los puentes disulfuro. <sup>(13)</sup>

## RESULTADOS

Se utilizó un marcador de proteínas el cual nos indica los siguientes niveles y pesos moleculares, encontrándose algunas diferencias entre proteínas de los medios condicionantes de cementoblastos y osteoblastos; se encontró mayor concentración de proteínas en el medio condicionante de cementoblastos, pero proteínas de mayor peso molecular en el medio condicionante de osteoblastos, la diferencia más notable entre las proteínas de ambos medios fueron proteínas que no encontraron en ambos medios, las cuales se muestran en la siguiente tabla.

### DIFERENCIAS DEL PESO MOLECULAR DE LAS PROTEINAS DEL MEDIO CONDICIONANTE DE CEMENTOBLASTOS Y OSTEOBLASTOS.

#### CEMENTOBLASTOS

93 kDa.  
54 kDa.  
45 kDa.  
39 kDa.

#### OSTEOBLASTOS

75 kDa.  
65 kDa.  
62 kDa.  
58 kDa.

Esto se obtuvo como resultado de la electroforesis y habiéndose comparado los resultados de los dos medios condicionantes, así como después se procedió a graficar los

resultados de ambos medios.(gráfica 2 y 3)

### MARCADOR DE PROTEINAS

-	.6 cm	que equivalen a	180	kDa.
-	.9 cm	que equivalen a	116	kDa.
-	2 cm	que equivalen a	84	kDa.
-	3.2 cm	que equivalen a	58	kDa.
-	4.9 cm	que equivalen a	48.5	kDa.

## PESOS MOLECULARES DE LAS PROTEINAS DEL MEDIO CONDICIONANTE DE OSTEObLASTOS

- 1- 0.7 cm equivalentes a 137 kDa.
- 2- 1 cm equivalentes a 110 kDa.
- 3- 2.1 cm equivalentes a 80 kDa.
- 4- 2.3 cm equivalentes a 75 kDa.
- 5- 2.5 cm equivalentes a 71 kDa.
- 6- 2.7 cm equivalentes a 67 kDa.
- 7- 2.8 cm equivalentes a 65 kDa.
- 8- 3 cm equivalentes a 62 kDa.
- 9- 3.8 cm equivalentes a 48 kDa.
- 10- 4.8 cm equivalentes a 38 kDa.

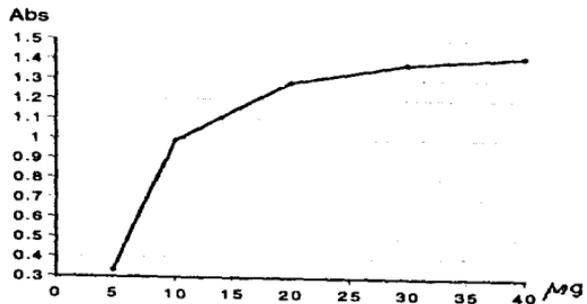
## PESOS MOLECULARES DE LAS PROTEINAS DEL MEDIO CONDICIONANTE DE CEMENTObLASTOS

- 1- 0.7 cm equivalentes a 137 kDa.
- 2- 1 cm equivalentes a 110 kDa.
- 3- 1.6 cm equivalentes a 93 kDa.
- 4- 2.1 cm equivalentes a 80 kDa.
- 5- 2.5 cm equivalentes a 71 kDa.
- 6- 2.7 cm equivalentes a 67 kDa.
- 7- 3.4 cm equivalentes a 54 kDa.
- 8- 3.8 cm equivalentes a 48 kDa.
- 9- 4.1 cm equivalentes a 45 kDa.
- 10- 4.7 cm equivalentes a 39 kDa.
- 11- 4.8 cm equivalentes a 38 kDa.

# Curva de albumina sérico bovina

## Gráfica nº 1

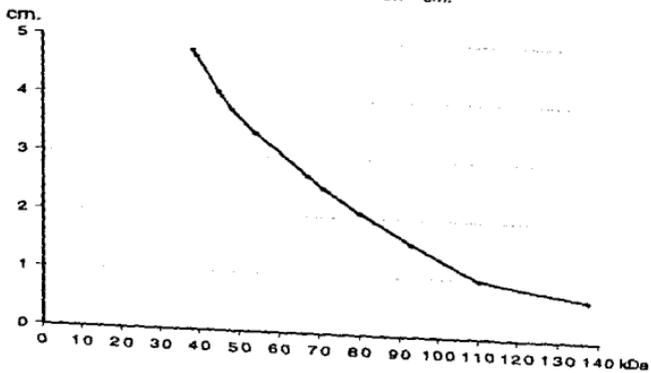
40	1.4171
30	1.3814
20	1.2898
10	0.9902
5	0.3316



**Peso molecular de proteínas en un medio  
condicionante de cementoblastos.**

**Gráfica nº 2**

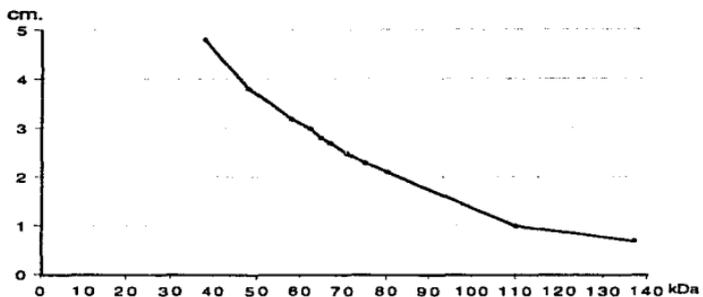
38 kDa	4.8 cm.
39 kDa	4.7 cm.
45 kDa	4.1 cm.
48 kDa	3.8 cm.
54 kDa	3.4 cm.
67 kDa	2.7 cm.
71 kDa	2.5 cm.
80 kDa	2.1 cm.
93 kDa	1.6 cm.
110 kDa	1 cm.
137 kDa	0.7 cm.



## Peso Molecular de proteínas en un medio condicionante de osteoblastos.

Gráfica nº 3

38 kDa	4.8 cm.
48 kDa	3.8 cm.
58 kDa	3.2 cm.
62 kDa	3 cm.
65 kDa	2.8 cm.
67 kDa	2.7 cm.
71 kDa	2.5 cm.
75 kDa	2.3 cm.
80 kDa	2.1 cm.
110 kDa	1 cm.
137 kDa	0.7 cm.



## DISCUSIÓN

El cemento es el tejido conectivo calcificado que se asemeja estructuralmente al hueso; este contribuye a un proceso de reparación de las lesiones de la superficie radicular.

El cemento contiene dos variaciones estructurales que son: el cemento fibrilar y el cemento afibrilar; en el primero se observan en el microscopio electrónico numerosos haces de fibrillas de colágena; el cemento afibrilar contiene una matriz mineralizada.

Existen dos tipos de cemento radicular que son el cemento acelular y el cemento celular; el cemento acelular se encuentra desde la porción coronaria hasta la porción media radicular; y el cemento celular se encuentra en la porción apical y en la zona de furcas.

El cemento tiene una composición inorgánica de colágena tipo I y tipo III, proteínas no colágenas y proteoglicanos, y en su porción orgánica esta compuesto por hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ .

El cemento se encuentra asociado por dos tipos de células: los cementoblastos y los cementocitos. Solo los cementoblastos son metabólicamente activos, ellos son los responsables de sintetizar la matriz cementoide, mientras que los cementocitos son relativamente inactivos. Los cementoblastos se originan de células precursoras que se encuentran en los espacios endoteliales del hueso alveolar, estas migran hacia la matriz dentinaria y se diferencian en cementoblastos al contacto con la dentina.

El cemento radicular se clasifica en base a la presencia de células de acuerdo al origen de las fibras de colágena: cemento afibrilar acelular AAC, fibras extrínsecas de cemento acelular AEFC, fibras intrínsecas del cemento celular CIFC, fibras intrínsecas del cemento acelular AIFC, cemento mixto estratificado celular CMSC.

Una vez realizada la electroforesis se obtuvo como resultado que existe una variante entre las proteínas de los medios condicionantes de cementoblastos y osteoblastos, entre las principales diferencias se encontraron proteínas de diferente peso molecular; y las diferencias son:

En el medio condicionante de cementoblastos se encontraron proteínas de 93 kDa, 54 kDa, 45kDa, 39 kDa; así como en el medio condicionante de osteoblastos se encontraron proteínas de 75 kDa, 65 kDa, 62 kDa, 58 kDa; se llegó a la conclusión de que existe un mayor número de proteínas en los cementoblastos así como también proteínas de menor peso molecular.

## BIBLIOGRAFIA

- 1-Schulger S, Yuodelis R.A., Page RC. Enfermedad periodontal 1984: 59-63. edit. continental.
- 2-Bartold PM, Miki Y, Mc Allister B, Narayanan AS, Page RC. Glycosaminoglycans of human cementum. J periodont Res 1988: 23:13-17.
- 3-Dieter DB, Knut AS. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. Periodontology 2000 1997: 13:41-75.
- 4-Glickman. Periodontologia clinica de Glickman. 1983: 43-53. Nueva editorial interamericana.
- 5-Mac Neil RL, Somerman MJ. Molecular factors regulating development and regeneration of cementum 1993, J Periodont Res: 28: 550-559.
- 6-Jenkins GN. Fisiología y bioquímica bucal 1983: 206-209. edit. Limusa.
- 7-Lindhe J. Periodontología clínica 1986: 51-53. edit. Medica panamericana.
- 8-Arzate H. Aislamiento de células de un fibroma cementificante de ser humano que producen proteínas del cemento en cultivo. 1992: 4-12.
- 9- Rodríguez. Periodoncia 1988: 37-42. editor Francisco Mendez Oteo.

- 10-Schroeder HE. Biological problems of regenerative cementogenesis:Synthesis and attachment of collagenous matrices on growing and established root surfaces 1993:142:1-25.
- 11-Ramfjord SP, Ash MM: Periodontología y periodoncia 1982: 52-58.edit. Medica panamericana.
- 12-Voet. Bioquímica 1992:102-105.ediciones Omega.
- 13-Esponda VR. Anatomía dental 1994: 83-85.edit. UNAM.
- 14-Arzate H: OLson WS, Page RC, Narayanan AS. Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in culture 1992. Bone and Mineral: 13 num.2:1-3.
- 15-Grant DA,Stern IB. Periodoncia 1983: 70-76.edit. Mundi.