

01461 2g.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

**EFFECTO *IN VITRO* DE PROTEINAS EXTRAIDAS DE MATRIZ
DENTINARIA BOVINA EN OSTEOLASTOS**

TESIS QUE PRESENTA

JOSE FRANCISCO GOMEZ CLAVEL

L

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN ODONTOLOGIA.

TUTOR

DR. HIGINIO ARZATE

270329

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1999



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.

EFFECTO *IN VITRO* DE PROTEINAS EXTRAIDAS DE MATRIZ DENTINARIA BOVINA EN OSTEOLASTOS

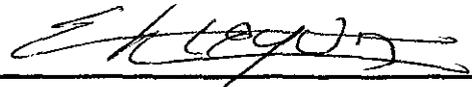
APROBADA POR:

Mtro. Juan Arcadio Molina Guarneros



Asesor

Dra. Elba Rosa Leyva Huerta



Asesor

Dr. Higinio Arzate



Director de tesis

RECONOCIMIENTOS

**CON PROFUNDO AGRADECIMIENTO
A TODAS LAS PERSONAS DE LA ENEP IZTACALA
Y DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNAM
QUE HAN PARTICIPADO EN MI FORMACION
PROFESIONAL, DOCENTE Y CIENTIFICA.**

**DE MANERA ESPECIAL AL DOCTOR HIGINIO ARZATE,
JEFE DEL LABORATORIO DE BIOLOGIA CELULAR DE LA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGIA DE LA UNAM POR
TODAS LAS FACILIDADES PARA REALIZAR ESTE
TRABAJO.**

**AL MTRO. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS, DEL
LABORATORIO DE FARMACOLOGIA CELULAR DE LA
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM POR SU
APRECIABLE AYUDA.**

A ISABEL

INDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCION	3
4. ANTECEDENTES	
Inducción de hueso y cartilago	5
Efectos en la morfogénesis dental	16
Efectos sobre las células de la pulpa dental	23
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
6. JUSTIFICACION	31
7. HIPOTESIS	32
8. OBJETIVO GENERAL	33
9. OBJETIVOS ESPECIFICOS	33
10. MATERIALES Y METODOS	34
11. RESULTADOS	39
12. DISCUSION	47
13. CONCLUSIONES	55
14. PROPUESTAS DE INVESTIGACION	56
15. BIBLIOGRAFIA	57
16. CURRICULUM VITAE	64

RESUMEN

La dentina posee proteínas con actividad inductora de osteogénesis (Kawai y Urist, 1989). La formación de nuevo tejido óseo es un evento importante en situaciones clínicas como el movimiento ortodóncico, la reducción de fracturas y en la regeneración que ocurre como resultado de la terapéutica periodontal. A pesar de que son conocidos los efectos de la matriz dentinaria en poblaciones celulares indiferenciadas, no se han descrito los efectos de las proteínas de ésta matriz en poblaciones de osteoblastos. En este trabajo se determinó el efecto de las proteínas dentinarias extraídas con EDTA 0.5 M y HCIG 4M en: a) la síntesis de fosfatasa alcalina, b) la formación de nódulos mineralizados, c) la proliferación celular y d) quimiotaxis de osteoblastos en cultivo. **RESULTADOS:** Los osteoblastos en cultivo son una población que exhibe una morfología fusiforme, y presenta como una de las principales características fenotípicas la expresión de fosfatasa alcalina. Las proteínas extraídas de matriz dentinaria tuvieron un efecto inhibitor en la producción de fosfatasa alcalina el cual fue concentración-dependiente. Las diferentes concentraciones de las proteínas extraídas de matriz dentinaria no tuvieron un efecto significativo en la proliferación celular de los osteoblastos a los 7 días de cultivo, mientras que al día 14 se observó una disminución del 21.76 % con respecto a los valores del grupo testigo cuando se cultivaron los osteoblastos con 0.5 µg del extracto soluble en HCIG. Otra de las características fenotípicas de los osteoblastos es la producción de nódulos de mineralización. Tanto las proteínas extraídas con EDTA como las solubles en HCIG de dentina bovina aumentaron ligeramente la producción de nódulos de mineralización en los cultivos de osteoblastos de 7 días aunque los valores no fueron estadísticamente significativos. A los 14 días de cultivo sólo el grupo de EDTA mostró un ligero aumento que no fue significativo. Los ensayos de quimiotaxis mostraron que el extracto soluble en EDTA fue positivamente quimioatractivo para los osteoblastos.

Palabras clave : Matriz dentinaria, Osteoblastos. Fosfatasa Alcalina, Nódulos mineralizados, quimiotaxis.

ABSTRACT

Dentin matrix proteins are capable of elicit osteogenesis. Bone induction is a main event in orthodontic movement, repair of bone fractures and periodontal regeneration. The effects of dentin proteins on undifferentiated cells are known but the response of osteoblast *in vitro* are not established. The effect of guanidine 4M soluble dentin matrix proteins and EDTA 0.5 M soluble dentin matrix proteins were evaluated in cultures of alveolar bone derived osteoblasts. Osteoblasts exhibit and elongated spread shape, have high levels of the membrane-bound enzyme alkaline phosphatase. Dentin matrix proteins decrease alkaline phosphatase activity. Celular proliferation was not affected at seven day. On day fourteen 0.5 μ l of guanidine soluble dentin matrix proteins decrease osteoblast proliferation 21.76%. Soluble dentin proteins have no effects on nodule mineralization formation by osteoblast. EDTA 0.5 μ l soluble dentin matrix proteins was positive chemotactic for human alveolar osteoblasts.

Key Words: Dentin matrix, Osteoblasts, Alkaline Phosphatase, Mineralized nodule, Chemotaxis.

INTRODUCCION

El hueso es un tejido dinámico que se remodela y repara así mismo a lo largo de la vida. La estructura, forma y cantidad de los huesos se mantiene a través de un continuo balance entre la formación y la resorción del propio tejido óseo. La aposición y la resorción ósea son procesos realizados, el primero por células formadoras de matriz ósea, los osteoblastos, en tanto que la resorción es llevada al cabo principalmente por células multinucleadas llamadas osteoclastos, y en condiciones fisiológicas la actividad de ambas células es regulada por diferentes sustancias como hormonas, citocinas y factores de crecimiento (Marks y Popoff, 1988).

La formación de nuevo tejido óseo implica la generación de osteoblastos a partir de células osteoprogenitoras, lo que requiere del proceso de inducción, el cual en el adulto se realiza en situaciones como el movimiento ortodóncico (Reitan y Rygh, 1994), la reducción de fracturas y en la regeneración que ocurre como resultado de la terapéutica periodontal (Aukhil y col, 1990).

La inducción, es un mecanismo por el cual un tejido produce una serie de señales para que otro tejido ó célula sufra un proceso de diferenciación y como resultado de éste se especialice en la síntesis de una proteína, lípido o carbohidrato o en la combinación de éstos y en la adquisición de una forma específica.

Las señales que inducen a un tejido a diferenciarse durante el desarrollo embrionario o en la regeneración tisular son al parecer familias de moléculas que se han conservado a lo largo de la evolución de las especies, por ejemplo, una de las más grandes y multifuncionales de estas familias son las proteínas morfogenéticas de hueso, con más de 20 miembros, identificadas en organismos como el erizo de mar, la mosca de la fruta, los roedores y el hombre (Hogan, 1996). La matriz dentinaria también posee proteínas con actividad inductora de

osteogénesis (Kawai y Urist, 1989). Casi el 90 % de la matriz orgánica de la dentina esta constituida de colágena y el 10 % restante de otras proteínas. En general las proteínas no colágenas se encuentran asociadas fuertemente con la fase mineral y son extraíbles con sustancias caotrópicas como la urea o el clorhidrato de guanidina o bien después de la desmineralización del tejido. La presente investigación tiene por objetivo evaluar el efecto de las proteínas no colágenas extraídas de dentina bovina en una población de osteoblastos aislados de hueso alveolar humano.

ANTECEDENTES.

INDUCCION DE HUESO Y CARTILAGO HETEROTOPICO

Experimentos realizados en los años 30, 40 y 50 demostraron que los gérmenes dentarios o partes de éstos poseen la capacidad de crecer y desarrollarse en áreas del cuerpo diferentes de la maxila o la mandíbula y de inducir la formación de hueso en tejidos conectivos que normalmente no se mineralizan. (Huggins y col. 1934, Pinkerton y Boyle, 1935, Fleming, 1953). También se observó que el hueso desmineralizado cuando se coloca en tejido muscular induce la llegada de histiocitos, células gigantes de reacción a cuerpo extraño que exhiben gran actividad colagenolítica y fagocitaria, disolviendo la matriz del implante. El proceso es seguido inmediatamente por la formación de vasos sanguíneos y la aparición de condroblastos dentro y fuera de la matriz descalcificada, para la semana 4 a 6 aparecen células osteoprogenitoras que entre las semanas 8 y 16 forman nuevo tejido óseo reemplazando a los condroblastos, siguiendo una típica osificación endocondral. Los depósitos de hueso nuevo siempre estuvieron limitados a las áreas de resorción de la matriz descalcificada y nunca se extendió mas allá del implante (Urist, 1965). Otros materiales como el hueso desproteínizado o cristales de

hidroxiapatita son reabsorbidos por células del tejido conectivo pero rara vez producen nuevo tejido óseo (Krömer, 1962). En cambio cuando la dentina isogénica fue descalcificada con ácido clorhídrico 0.6 N lavada, esterilizada y almacenada en alcohol al 70 % y colocada en el interior de músculo esquelético como el músculo recto del abdomen, o en el interior de cavidades hechas con fresa en la mandíbula o en alvéolos dentarios de conejos Nueva Zelanda, se observó que los implantes fueron envueltos por una delgada membrana de tejido conectivo muy vascularizada. La dentina descalcificada fue reabsorbida más lentamente que el hueso descalcificado probablemente por tener una estructura más compacta y no presentar canales vasculares o grandes espacios, en las zonas de reabsorción denominadas "cámaras de excavación" es donde ocurre la osteogénesis, y son producidas por la actividad fagocítica de histiocitos y células multinucleadas después del proceso inflamatorio. 4 semanas después de la operación, la superficie de las zonas de reabsorción son cubiertas por cúmulos de células mesenquimatosas hipertrofiadas con un citoplasma basófilo y extensiones citoplásmicas parecidas a axones que corren por los túbulos dentinarios. Estas células produjeron un material cementoide que es depositado entre la matriz implantada y el nuevo hueso. En los implantes recuperados entre la 8 y

12 semanas se observaron grandes zonas de reabsorción llenas de células y capilares, algunas presentaban osteoblastos. En superficies diferentes se encontró además de la formación de nuevo hueso, zonas en donde éste era remodelado por actividad osteoclástica. Finalmente la matriz del implante fue totalmente reabsorbida y sustituida por nuevo tejido óseo. El producto final consistió de una estructura delgada de hueso laminar con una cavidad central ocupada por médula ósea hematopoyética. El máximo volumen de estos osículos fue de aproximadamente dos terceras partes del tamaño del implante (Yeomans y Urist, 1967). Los datos anteriores demuestran la capacidad inductora de osteogénesis de la dentina de conejo desmineralizada con ácido clorhídrico cuando es implantada en la misma especie. Otra serie de experimentos se diseñaron para evaluar la acción de diferentes métodos de desmineralización en la dentina de diferentes especies en la capacidad de inducción ósea en receptores alogénicos y xenogénicos. La dentina humana descalcificada con HCl 0.6 N y NaCl 1M sólo indujo osteogénesis en 1 de 18 implantes colocados en músculo de rata, cuando fué descalcificada sólo con HCl 0.6 N y liofilizada a -70°C no produjo osteogénesis en 16 implantes colocados también en músculo de rata. La dentina de rata tratada con EDTA 0.5 M y colocada en músculo

de rata indujo osteogénesis en 9 de 12 implantes, y cuando además fue liofilizada indujo formación de hueso en 11 de 12 implantes. La dentina de rata tratada con HCl perdió su capacidad inductora de osteogénesis en el músculo. En cambio la dentina de conejo cuando fue descalcificada con HCl 0.6 N en 1M de NaCl y colocada en músculo de conejo produjo osteogénesis en 18 de 24 implantes (Bang y Urist,1967). Las observaciones anteriores demostraron que el principio que induce la neoformación ósea es insoluble en ácido y que se encuentra asociada a la matriz remanente después de la descalcificación con EDTA. La fracción insoluble en ácido de la dentina de rata inició rápidamente una serie de reacciones en el mesénquima después de que se colocó en el tejido subcutáneo de receptores alogénicos. La matriz dentinaria indujo una gran actividad de fosfatasa alcalina dentro de las primeras 24 hrs. que alcanzó su máximo a los 7 días, después de los cuales declinó pero siempre con valores mucho más altos que el del tejido muscular. La transformación del conectivo por el implante de matriz dentinaria tratada con ácido clorhídrico 0.5 N durante 2 hrs. fue rápida. En el día primero el implante fue encapsulado por fibroblastos que contenían grandes cantidades de fosfatasa alcalina en su citoplasma; las células formaron una doble hilera, y las nuevas células que se originaron se mezclaron con

la matriz del implante. En el día 5 las células que estaban en contacto con el implante morfológicamente corresponden a condroblastos que han comenzado a secretar matriz. En este cartílago la actividad de fosfatasa alcalina fue tanto intracelular como en la matriz pericapsular. en el día 10 hacen su aparición osteoblastos, en el día 14 se observa médula ósea hematopoyética, para el día 29 los condroblastos han desaparecido, en tanto que el hueso inducido persistió hasta un año (Huggins y Urist, 1970).

Debido a que el principio de inducción ósea es consistentemente demostrado en implantes liofilizados de matriz ósea descalcificada y, su actividad es destruida por el calor, o agentes que desnaturalizan las proteínas se propuso que el "principio de inducción ósea es una o más proteínas insolubles en ácido (Urist y col., 1967). Estas proteínas se hallan asociadas fuertemente a la colágena de los tejidos mineralizados y se les denominó "proteínas morfogenéticas de hueso" (BMP) (Urist y Strates, 1971).

El tratamiento de la dentina desmineralizada con enzimas proteolíticas afectó su capacidad de inducción ósea heterotópica, de 12 implantes tratados con colagenasa durante 8 hrs. solo en tres se observó

neoformación ósea, y cuando se amplió el tiempo de exposición a la colagenasa a 24 hrs. se perdió totalmente la capacidad de inducción ósea, al igual que cuando se trató la dentina desmineralizada con tripsina durante 12 hrs. Al microscopio electrónico muchas de las fibras de la dentina tratada con tripsina conservaron sus estriaciones características, por lo que es probable que el principio de inducción ósea contenido en la matriz dentinaria puede estar en las proteínas no colágenas (Bang y Johannessen, 1972). Después de extraer las proteínas solubles en ácido y, como en estudios anteriores la dentina con los componentes insolubles mostraron actividad de proteínas morfogenéticas de hueso. Posteriormente trataron con colagenasa la matriz descalcificada y obtuvieron tres proteínas no colágenas en las que presumiblemente en una o más de éstas reside la actividad de proteína morfogenética de hueso. Las tres proteínas fueron separadas por cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-celulosa, dos de las proteínas no colágenas fueron ricas en aspartato, glutamato, glicina, serina y alanina y la tercera, su composición era rica en aspartato y serina fosfatada (Butler y col. 1977). Cuando la matriz ósea es convertida en gelatina y colocada en cámaras de difusión y posteriormente insertadas en el interior del músculo abdominal indujo la formación de hueso. La matriz

dentinaria de conejo desmineralizada con 0.6 N de HCl y la matriz gelatinizada (1 hr a 25°C en 1:1 cloroformo-metanol, 1 hr. en HCl 0.6 N a 2°C, 24 hrs. en CaCl₂ 2M a 2°C, 1 hr. en EDTA 0.5 M a PH 7 a 2°C y lavada en H₂O a 55°C durante 1 hr.) se colocaron en el interior de cámaras de difusión (0.45 micras de tamaño de poro y 150 micras de grosor), las cámaras se implantaron en el interior del músculo abdominal por 28 días. Tanto la dentina desmineralizada como la matriz gelatinizada produjeron depósitos de hueso en 7 de 14 y en 3 de 5 de las cámaras, estos depósitos cubrieron el 40% y el 70% de las superficies de la membrana externa, respectivamente (Conover y Urist,1979).

El componente activo de los extractos de hueso con actividad de proteína morfogenética de hueso no había podido asignarse a una sola molécula, y hasta 1988 se realizó la purificación , caracterización y clonación de tres moléculas con actividad de proteína morfogenética de hueso. Las moléculas se denominaron BMP-1, BMP-2 y BMP-3 (Bone Morphogenetic Protein), las tres son capaces de manera independiente de inducir la formación de cartílago *in vivo*. Dos de las proteínas clonadas (BMP-2 y BMP-3) pertenecen a la superfamilia de proteínas de el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), mientras que

BMP-1 es al parecer una proteasa que probablemente active al TGF- β (Wosney y col. 1988).

La proteína morfogenética de hueso extraída de dentina no ha sido caracterizada como la proteína morfogenética de hueso extraída de tejido óseo. Kawai y Urist (1989) extrajeron las proteínas no colágenas de los tejidos dentarios obtenidos de las mandíbulas de becerros de 1 año de edad. Estas proteínas obtenidas de los dientes completos (esmalte, dentina y cemento) se separaron y se probó su actividad osteoinductiva implantándolas en el músculo cuádriceps femoral de ratones. Del 71% al 83% de 41 implantes indujeron la formación ósea. La cantidad de hueso inducido fue mayor con las proteínas obtenidas de dientes sin erupcionar que con los dientes erupcionados. Las proteínas con Mr de 15 a 28 kDa se asociaron con la actividad osteoinductiva. Bessho y col. (1990) extrajeron proteínas morfogenéticas de hueso de la matriz ósea, dentinaria y del tejido de reparación de alvéolos post-extracción de conejos, las proteínas se probaron *in vivo* en músculo de rata. Las proteínas con actividad inductora de hueso fueron diferentes entre si de acuerdo a su corrimiento en geles de poliacrilamida: La Proteína morfogenética de hueso de dentina tuvo un peso de 25 kDa y las de tejido de reparación y de matriz ósea 21.5 kDa. La proteína

morfogenética de hueso extraída de la matriz dentinaria humana tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa de acuerdo a su patrón de corrimiento en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y un pI de 8.8. El análisis de aminoácidos sugirió que la proteína contiene 191 aminoácidos, por lo que la proteína morfogenética de hueso extraída de matriz dentinaria es similar pero no idéntica a la proteína morfogenética de hueso derivada de matriz ósea, a pesar de tener el mismo efecto *in vivo* (Bessho y col. 1991).

Otros tejidos diferentes al músculo también pueden ser estimulados para producir cartílago. Cuando se colocaron rollos de dentina desmineralizada en el músculo, el tejido conectivo subcutáneo, la cavidad medular del fémur y el ligamento periodontal de la misma rata, se observó que la inducción de cartílago fue mas rápida y en mayor cantidad en el tejido muscular (día 7), seguido de el tejido subcutáneo (día 10) y la cavidad medular del fémur (14 días) y de manera muy lenta en el ligamento periodontal (día 21) (Inoue, Deporter y Melcher, 1986). *In vitro* se demostró que la dentina desmineralizada de dientes humanos también es capaz de estimular la formación de cartílago, se utilizó el músculo de la pierna de los fetos de la rata de 20 días de gestación como fuente de células mesenquimatosas, los explantes obtenidos contenían mioblastos

mononucleados y fibroblastos, que se colocaron en la cavidad de un hemcilindro de dentina desmineralizada, mantenidos en condiciones de medio de cultivo, después de 12 días se fijaron los explantes, se cortaron y se tiñeron con azul de toluidina para identificar cartílago, también se realizó inmunohistoquímica para determinar la presencia de colágena tipo I y II. Los condrocitos aparecieron como nódulos dentro de la masa de células parecidas a fibroblastos y en contacto con la superficie de la dentina desmineralizada. La fluorescencia de los anticuerpos contra colágena tipo I se observó en la dentina desmineralizada y en el tejido conectivo que la cubría, En contraste, los anticuerpos dirigidos contra la colágena tipo II se localizaron en las zonas de mayor proliferación celular (Somerman y col. 1987).

Rabinowitz y col. (1990) extrajeron proteínas de dentina humana y bovina desmineralizadas, los extractos crudos y las fracciones produjeron cambios morfológicos en las células mesenquimatosas obtenidas de la extremidad de embriones de pollo, estos cambios se detectaron con azul de toluidina indicando actividad condrogénica, así mismo se determinó la incorporación de SO_4 marcado con ^{35}S y el contenido de ADN. Los resultados indicaron que los extractos estimularon la condrogénesis pero no la proliferación celular. Los patrones

electroforéticos que obtuvieron sugieren que las proteínas extraídas de la dentina humana y bovina son similares. En otro estudio, las proteínas extraídas con clorhidrato de guanidina de la matriz descalcificada de la dentina bovina, indujeron la formación de colonias parecidas a condrocitos a partir de células obtenidas de tejido muscular de ratas de tres semanas cultivadas en un gel de agarosa. Se obtuvieron dos fracciones, la fracción insoluble en agua fue más activa en la formación de cartílago que la fracción soluble. El patrón electroforético de esta fracción reveló que la actividad se encuentra en bandas entre 18 y 30 kDa. De acuerdo a el análisis de "Western Blot" de esta fracción, hay una banda que corresponde al factor de crecimiento transformante beta (Harada y col. 1990). La proteína inductora de actividad condrogénica fue aislada y parcialmente purificada de incisivos de rata, tiene un pI de 5.4-5.5 y un Mr entre 6,000 y 10.000 de acuerdo a patrones de proteínas globulares, con un máximo de actividad en la incorporación de sulfatos a proteoglicanos y producción de colágena tipo II cuando se utiliza a una concentración de 1-10 ng/ml de proteína. La secuencia amino terminal es rica en glicina, prolina, ácido glutámico y alanina, por lo que es diferente del factor de crecimiento transformante beta y de las proteínas morfogenéticas de hueso. (Amar y col. 1991).

EFFECTOS EN LA MORFOGENESIS DENTAL

El desarrollo de los dientes involucra complejos movimientos morfogenéticos de células epiteliales y mesenquimatosas, que son seguidos por la diferenciación de las células que específicamente secretarán las matrices de los tejidos dentarios. Las interacciones epitelio mesénquima que regulan el inicio de la formación del diente, la adquisición de una forma específica y la diferenciación de los odontoblastos y ameloblastos han sido caracterizadas en estudios de recombinación de tejidos (Kollar y Baird, 1970). Como en muchos órganos, el signo inicial del desarrollo dentario es el engrosamiento del epitelio, subsecuentemente las células epiteliales forman una yema en donde alrededor se condensan las células mesenquimatosas derivadas de la cresta neural. La morfogénesis del diente es acompañada por una progresiva diferenciación celular en donde de manera característica las

células epiteliales y mesenquimatosas adquieren morfotipos altamente especializados para producir las matrices orgánicas del diente. Los ameloblastos elaboran las proteínas del esmalte y los odontoblastos producen la matriz extracelular de la dentina.

Estudios clásicos de recombinación de tejidos, en los cuales los componentes epiteliales y mesenquimatosos del diente en desarrollo y tejidos no dentarios son separados y cultivados en diferentes recombinaciones, han demostrado que las interacciones entre células epiteliales y mesenquimatosas regulan la morfogénesis del diente y la diferenciación de las células formadoras de matriz dental, en estos estudios es evidente que el mesénquima instruye la morfogénesis epitelial, la combinación de trasplantes recíprocos entre los componentes mesenquimatosos y epiteliales de gérmenes de incisivos y molares dieron como resultado que adquirieran la forma de molar o incisivo dependiendo del origen del mesénquima, y también se demostró que el mesénquima dental es capaz de inducir la formación de órganos del esmalte en epitelio no dental como el epitelio de extremidades y que estas células epiteliales se diferenciaron en ameloblastos con secreción de matriz de esmalte (Kollar y Baird, 1970). Estas observaciones han sido

confirmadas en otros estudios, en los que se hicieron recombinaciones recíprocas *in vitro* entre epitelio dental y epitelio gingival con mesénquima de embriones de ratón, y se demostró que el epitelio gingival se diferenció en ameloblastos cuando se combinó con mesénquima dental, mientras que el epitelio dental dio origen a un epitelio queratinizado cuando se combinó con mesénquima gingival (Thesleff y Humerinta, 1981). De manera sorprendente, el mesénquima dental de embriones de ratón es capaz de inducir la diferenciación de ameloblastos a partir del epitelio de una especie que no posee dientes desde hace miles de años de evolución como son las aves (Kollar y Fisher, 1980). Se han propuesto diferentes mecanismos de transmisión de la información morfogénica entre los tejidos que interactúan durante la diferenciación celular, y se han agrupado en tres categorías: (1) interacciones vía contactos célula-célula, en los cuales están involucradas moléculas de adhesión y uniones de tipo nexo (Takeichi, 1987), (2) interacciones a través de las moléculas de la matriz extracelular y receptores de la superficie celular (Adams y watt, 1993), e (3) interacciones mediadas por moléculas difusibles como factores de crecimiento, morfógenos y hormonas (Slack, 1994).

Las interacciones entre la matriz extracelular y la superficie celular median la señalización para la diferenciación terminal tanto de odontoblastos como de los ameloblastos (Ruch, 1987), pero, evidencias recientes indican que además ciertos factores de crecimiento como el factor transformante de crecimiento β -1, las proteínas morfogénicas de hueso 2 y 4, y los factores de crecimiento de hepatocitos y epidérmicos también están involucrados (Begue-Kirn y col., 1992, Vainio y col. 1993, Kronmiller y col. 1991).

La matriz extracelular juega un papel muy importante en las interacciones epitelio-mesénquima. Durante el desarrollo dental estas interacciones dan origen a la citodiferenciación del odontoblasto (Thesleff y Humerinta, 1981). Los mecanismos por los cuales los odontoblastos o sus células precursoras llevan a cabo su diferenciación terminal, se alargan, polarizan y comienzan a secretar predentina no han sido del todo descritos. El tratamiento con EDTA de molares de ratón recién nacidos hizo posible la obtención de matrices dentales libres de células, las cuales estaban compuestas de lámina basal, predentina, dentina y esmalte. Estas matrices libres de células fueron combinadas con papila dental y órganos del esmalte previamente separados con tripsina, las recombinaciones se cultivaron *in vitro*, no observándose la diferenciación

de odontoblastos, en cambio se observaron ameloblastos polarizados (en 4 de los 9 casos se secretó esmalte). También en los órganos del esmalte de 18 días que se combinaron con el lado epitelial de las matrices se observaron ameloblastos (9 de 116). Cuando las matrices fueron tratadas con guanidina-EDTA o ácido acético perdieron su capacidad de inducir la diferenciación de ameloblastos, lo que sugiere que las matrices poseen moléculas con propiedades morfogénéticas (Karcher-Djuricic y col 1985).

Lesot y col (1986), reportaron experimentos en que los órganos del esmalte y las papilas de gérmenes dentarios de embriones de ratón de 18 días se cultivaron sobre filtros de millipore tratados con proteínas no colágenas de la matriz dentinaria de incisivos de conejo 4 días después 2 de las fracciones modificaron la forma de las células epiteliales, en las que se observó una ligero alargamiento del cuerpo celular y el núcleo tomó una posición basal. Cuando la papila dental se cultivo sobre los filtros millipore cubiertos con las fracciones proteicas 2 o 6 , las células mesenquimatosas en contacto con el filtro se alargaron, polarizaron y tuvieron un aumento de su actividad metabólica. Héritier y col (1990) recombinaron la papila dental de fetos de ratón de 15, 16, 17 y 18 días de

gestación y de ratones de 2, 7 y 14 días con la matriz dentinaria de coronas de terceros molares (14 días post-natal) tratadas con hialuronidasa, hipoclorito de sodio y ácido cítrico. Con excepción de las papilas de fetos de 15 días todas las demás formaron odontoblastos con depósitos de dentina tubular. Estos hallazgos indican que las células que dan origen a los odontoblastos no están comprometidas antes del día 16 *in útero*.

La matriz dentinaria posee en pequeñas cantidades diferentes factores de crecimiento entre los cuales se encuentra el factor β de crecimiento transformante (Finkelman y col., 1990). Este factor ha sido inmunolocalizado durante el desarrollo dentario, de manera intensa se expresa en el retículo estrellado y en el mesénquima de la papila dental en la etapa de campana, también de manera marcada se expresó en la capa papilar subyacente a los ameloblastos en la fase de diferenciación y en la fase secretora de la amelogénesis. Durante la formación de los tejidos coronales y en la fase pre-eruptiva también se inmunolocalizó al factor β de crecimiento transformante dentro del folículo dental recubriendo el germen dentario. Estos patrones de expresión

temporoespaciales del factor β de crecimiento transformante se correlacionan con eventos específicos en la morfogénesis, histogénesis y citodiferenciación del desarrollo dentario (D'Souza y col., 1990).

En 1992, Bègue Kim y col. compararon el efecto de las proteínas extraídas de la dentina, del factor β de crecimiento transformante y de la proteína morfogenética de hueso 2 en la diferenciación de odontoblastos *in vitro*. Las proteínas dentinarias obtenidas de incisivos de conejo mediante extracción con EDTA se separaron por cromatografía en DEAE-celulosa y columnas de heparina-agarosa. Mientras que la fracción total de las proteínas solubles en EDTA no tuvieron efecto en las papilas dentales cultivadas, las fracciones retenidas en ambas columnas fueron capaces de iniciar la diferenciación funcional de preodontoblastos. El factor β de crecimiento transformante y la proteína morfogenética de hueso 2 estimularon a las células de la papila dental para secretar matriz. Cuando se combinó el factor β de crecimiento transformante o la proteína morfogenética de hueso con la fracción total de proteínas dentinarias solubles en EDTA estimularon la diferenciación de odontoblastos. Una de las fracciones activas retenidas en DEAE-celulosa perdió la capacidad

inductora después de incubarse con un anticuerpo contra el factor β de crecimiento transformante. Estos resultados demuestran que la molécula del factor β de crecimiento transformante presente en la dentina puede interactuar con algunos componentes para modular su actividad en la iniciación de la diferenciación citológica y funcional de los odontoblastos.

EFEECTO SOBRE LAS CELULAS DE LA PULPA DENTAL

La pulpa dental es un tejido conectivo laxo localizado en un ambiente especial, está rodeada por matrices dentales calcificadas, las cuales le proveen de soporte mecánico y protección. Así mientras ésta barrera mineralizada esta intacta, la pulpa no esta expuesta a las condiciones adversas presentes en el ambiente bucal. y de esta manera permanece en condiciones de funcionalidad normales.

Sin embargo, ciertas condiciones como: Caries, fracturas, y el trauma por procedimientos operatorios, pueden llevar al diente a la pérdida de la integridad de los tejidos mineralizados y lesionar a la pulpa. Esta, puede responder con la formación de un puente dentinario, o bien con inflamación y necrosis. La exposición pulpar es tratada con el procedimiento de recubrimiento pulpar directo, el cual tiene por objetivo la reparación de la lesión mediante la formación de un puente dentinario, éste proceso es llevado al cabo por células de la pulpa que tienen que sufrir un proceso de diferenciación morfológica y funcional para convertirse en células secretoras de matriz mineralizable (Fitzgerald, 1979). Se han propuesto diferentes orígenes para estas células: (1) Células predeterminadas estacionadas en G2 y que por lo tanto no necesitan de síntesis de ADN para diferenciarse en odontoblastos funcionales después de la inducción y (2) células de la pulpa que replican su ADN después de la inducción y antes de diferenciarse en odontoblastos funcionales. La existencia de una población predeterminada de células estacionadas en G2 para reemplazar odontoblastos fue sugerida por Stanley (1962), por la similitud morfológica de las células de la zona rica en células y los odontoblastos maduros. Los trabajos de Torneck y Wagner (1980) apoyan esta teoría, al no encontrar

células marcadas con timidina tritiada en pulpas de molares de rata después de fresar los dientes sin exponer la pulpa dental, lo que sugiere que los odontoblastos destruidos por el fresado fueron reemplazados por células predeterminadas que no replicaron su ADN para responder a la lesión. Si estas células predeterminadas existen, es probable que residan en la zona rica en células de la pulpa (Ruch, 1974).

Otros han propuesto que los nuevos odontoblastos derivan de células mesenquimatosas indiferenciadas de la pulpa que son inducidas a diferenciarse hacia odontoblastos o que se originan de células diferenciadas de la pulpa que son inducidas a desdiferenciarse hacia células indiferenciadas y posteriormente diferenciarse hacia odontoblastos (Fitzgerald, 1979; Yamamura, 1985; Tziafas y Kolokuris, 1990). Este proceso requiere del reclutamiento e inducción de una población celular de la pulpa después del trauma pulpar, uno o más ciclos de replicación de ADN y finalmente la diferenciación de odontoblastos funcionales. Estudios con timidina tritiada en lesiones pulpares sin exposición (Sveen y Hawes, 1968), y en pulpas expuestas (Yamamura, 1985), han demostrado que la replicación del ADN puede ocurrir durante el reemplazo de los odontoblastos perdidos por el trauma. Las células involucradas en el proceso de reparación pueden estar localizadas en

cualquier lugar de la pulpa coronal, como lo sugieren el trabajo de Fitzgerald (1979). Y el tipo celular involucrado puede ser de origen fibroblástico, vascular, o de células mesenquimatosas indiferenciadas (Yamamura, 1985).

El proceso de diferenciación asociado con la iniciación de la formación de dentina reparativa no ha sido dilucidado. Las proteínas de la matriz dentinaria cuando son colocadas en pulpas dentales expuestas tienen la capacidad de inducir una fuerte producción de dentina reparativa en las primeras dos semanas, con la diferenciación de nuevas células con aspecto de odontoblastos cubriendo la superficie del tejido formado (Smith y col. 1990).

Tziafas y Kolokuris (1990) describen el efecto de las matrices desmineralizadas de hueso y dentina en células ectomesenquimatosas de la pulpa dental en un periodo de dos o tres semanas. Obtuvieron la matriz dentinaria y ósea del mismo animal removiendo los primeros molares y la tabla cortical ósea del lado labial del maxilar, 6 días antes de la implantación en dientes erupcionados y en proceso de erupción. Los implantes de dentina colocados en tejido pulpar produjeron una zona atubular de matriz dentinaria seguida de una zona de predentina tubular

con células elongadas parecidas a odontoblastos. Los implantes de hueso descalcificado produjeron una matriz extracelular heterogénea. En la mayor parte de los casos el implante fue rodeado por una matriz de osteodentina con células cúbicas formando la matriz y en algunos sitios se formó una zona de predentina tubular en contacto con la osteodentina con células elongadas y polarizadas. Cuando los implantes de dentina se colocaron en la papila de dientes en erupción todas las matrices de dentina indujeron la formación de un depósito de material parecido a hueso, en cambio los implantes de hueso fueron encapsulados por tejido conectivo.

Cuando se implanta dentina autóloga en dientes de perro a través de cavidades de clase V se observa la diferenciación de células parecidas a odontoblastos en contacto estrecho con la predentina, también cuando el implante es de dentina descalcificada se observan células columnares polarizadas en contacto con la dentina, y además en los implantes de dentina descalcificada se pudo observar células parecidas a odontoblastos en asociación con una zona de matriz secretada después de colocado el implante. La respuesta de las células de la pulpa a la dentina nativa se caracterizó por la elaboración de una matriz en la que se observó dos estratos: uno fibroso y el otro con un depósito de matriz

polarizada antes de la iniciación de la dentinogénesis. (Tziafas y col.1992).

En 1994 Smith y col. aislaron proteínas de la matriz extracelular de la dentina de incisivos de conejos para colocarlas en cavidades de clase V preparadas en caninos de Hurón para observar la reacción de los odontoblastos. Después de 14 días se observa una deposición significativa de dentina de reacción por los odontoblastos de la zona de la cavidad. De los dos extractos obtenidos se obtuvieron diferentes respuestas morfológicas. Con la fracción soluble en EDTA se observa gran producción de dentina de reacción morfológicamente regular, en cambio con la fracción liberada por la colagenasa se observa un patrón muy irregular.

El factor β de crecimiento transformante ha sido implicado tanto en el desarrollo dental como en la reparación tisular, cuando se separa la fracción soluble en EDTA y la fracción liberada por colagenasa se obtienen tres diferentes isotipos del factor β de crecimiento transformante, el isotipo 2 solo es detectado en la fracción liberada por colagenasa de la dentina de conejo, el isotipo 3 fue detectado en la fracción soluble en EDTA y la fracción liberada por colagenasa de

dentina de conejo, el isotipo 1 fue el principal encontrado en todas las muestras extraídas de dentina de conejo y humana (Cassidy y col. 1997).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La regeneración del tejido óseo perdido como resultado de la periodontitis es uno de los objetivos de la terapia periodontal actual. Para este fin se han utilizado diferentes técnicas y materiales, por ejemplo hidroxiapatita, vidrio y sales de calcio, estos materiales a pesar de ser biocompatibles no tiene la capacidad de inducir la formación de tejido óseo, sino simplemente contribuyen a formar una trama por las que las células osteógenas pueden migrar, por lo que a estos materiales se les denominan osteoconductores. Otros materiales tienen en su composición proteínas inductoras capaces de promover la transformación de células osteoprogenitoras en osteoblastos secretores de matriz extracelular mineralizable por lo que reciben el nombre de materiales osteoinductores. El material osteoinductor más utilizado en la actualidad es el hueso descalcificado liofilizado. La dentina posee proteínas con actividad de BMP, así como otros factores de crecimiento como el TGF- β , y proteínas asociadas con la amelogénesis, la cementogénesis y la dentinogénesis, por lo que es probable que las proteínas de la matriz dentinaria puedan promover no solo la regeneración ósea sino también la regeneración de los demás tejidos que forman la unidad periodontal.

JUSTIFICACION

Son conocidos los efectos de la matriz dentinaria en poblaciones celulares indiferenciadas como las células mesenquimatosas presentes en el tejido muscular (Yeoman y Urist 1967), en tejido celular subcutáneo (Huggins y Urist 1970), en células embrionarias (Karcher- Djuricic y col 1985, Lesot y col 1986, Rabinowitz y col. 1990), en células de la pulpa dental (Tziafas y Kolokuris 1990, Tobias y col 1994), pero no conocemos el efecto *in vitro* de las proteínas de ésta matriz en poblaciones de osteoblastos obtenidos de hueso alveolar humano.

HIPOTESIS

Ya que los extractos de matriz dentinaria poseen proteínas que modifican la actividad de células productoras de matriz mineralizable como las células osteoprogenitoras, preodontoblastos y odontoblastos, entonces también producirán cambios en el metabolismo de los osteoblastos humanos, como síntesis de proteínas intracelulares (fosfatasa alcalina), producción de proteínas de matriz extracelular mineralizable, quimiotaxis y mitosis.

OBJETIVO GENERAL

Describir el efecto de dos extractos de proteínas de matriz dentinaria en una población de osteoblastos humanos en cultivo.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar el efecto de las proteínas de matriz dentinaria extraídas con una solución de EDTA 0.5 M en:

- (a) la actividad de fosfatasa alcalina,
- (b) la formación de nódulos mineralizados y,
- (c) la quimiotaxis de osteoblastos en cultivo.

Determinar el efecto de las proteínas de matriz dentinaria extraídas con una solución de clorhidrato de guanidina (HCIG) 4M en:

- (a) la actividad de fosfatasa alcalina,
- (b) la formación de nódulos mineralizados y
- (c) la quimiotaxis de osteoblastos en cultivo.

MATERIALES Y METODOS

Extracción de las proteínas de matriz dentinaria. Se recolectaron incisivos de bovinos de dos años de edad del rastro de Tlalnepantla Edo. de México. se eliminaron los tejidos blandos y el cemento, así como la corona y la pulpa, las raíces se lavaron en solución de PBS a 4°C en agitación, después se colocaron en una solución de hidrocloreuro de guanidina (HCIG) 4 M conteniendo inhibidores de proteasas: 1 mM de Fluoruro de metil –metano-sulfonil y 1mM de N-etilmaleimida , 25 mM de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y 1 µg /ml de leupeptina. El extracto obtenido se dializó contra agua destilada y se liofilizó. Las raíces se sometieron a una segunda extracción, colocándolas en una solución de EDTA 0.5 M a pH 7.4 el extracto se dializó contra agua y se liofilizó. Se obtuvieron 0.07 g del extracto soluble en guanidina y 0.17 g del extracto soluble en EDTA.

Se determinó la concentración de proteínas mediante la técnica de Bradford (1976), utilizando albúmina como estándar.

Cultivo celular. Se sembraron 1×10^4 osteoblastos inmortales obtenidos de hueso alveolar humano por pozo en cajas de cultivo con medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de bovino y 100 UI de penicilina y 100 μg de estreptomina, los cultivos se mantuvieron siempre a 37 °C. Después de 24 hrs. se cambió el medio y se agregó proteína de los extractos solubles en EDTA y HCIG en concentraciones de 0.5 μg , 0.25 μg y 0.125 μg ., como control se utilizó medio con suero, después de 7 y 14 días se cosecharon las células.

Ensayo de actividad de fosfatasa alcalina. Después de 7 y 14 días de cultivo, se lavaron las células con PBS, y se agregó tripsina y se incubaron durante 3 minutos, se inactivó la tripsina con medio suplementado con suero fetal de bovino (SFB), se colocaron las células en tubos Eppendorff, y se centrifugaron a 2 000 RPM 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se adicionó amortiguador de lisis (Tris-HCl 10 mM + Tritón 0.1 %). Las células fueron totalmente lisadas por sonicación a 50 watts, 20 kHz por 30 seg. Se determinó la concentración de proteína mediante la técnica de Bradford. Se tomaron 10 μl del lisado celular y se colocaron en pozos no tratados para cultivo celular, y se agregó amortiguador recién preparado a pH de 9.8 (Tris-HCl 0.1M y NaCl 0.1 M)

al que se le agregó MgCl 0.25mM, dietanolamina 1M, y p-nitrofenol fosfato 10 mM . Se colocó un volumen total de 100 μ l por pozo. Se leyó la absorbancia en un lector de microplacas a 405 nm, inmediatamente se tomó la primera lectura y se incubó 37 °C. posteriormente se tomó la lectura cada 10 minutos durante 2 horas la reacción se detuvo con 50 μ l NaOH 3N.

Ensayo de proliferación celular. Después de 7 y 14 días, a los cultivos expuestos a las proteínas extraídas de dentina y al testigo solo con medio suplementado con SFB, se les agregó 20 μ l de MTT (3-(4,5-dimetiltriazol)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio) disuelto en PBS a 5 mg/ml, durante 3 horas. Se retiró el medio con MTT y se agregó dimetilsulfoxido, posteriormente se leyó la absorbancia en el lector de microplacas a 570 nm.

Ensayo de formación de nódulos de mineralización. Se sembraron osteoblastos en cajas de 96 pozos y se dejaron crecer en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, y 50 μ g de ácido ascórbico,

10 nM de dexametasona y 10 mM de β -glicerofosfato. A los cultivos se les agregó 0.5 μ g de proteína de matriz dentinaria obtenida de los extractos solubles en HClG y EDTA. El medio se cambió cada 48 horas agregándoseles también las proteínas dentinarias, se mantuvieron durante 7 y 14 días, respectivamente se fijaron con alcohol absoluto durante 3 minutos, y se tiñeron con rojo de alizarina al 2 % y pH 4.1-4.3. La evaluación de la formación de nódulos mineralizados que se impregnaron con la tinción se realizó en un densitómetro Alfa Imager 2000 y un programa analizador de imágenes (Documentation and analysis system).

Ensayo de Quimiotaxis. Se evaluó la quimiotaxis de osteoblastos a las proteínas extraídas de matriz dentinaria utilizando un inserto de policarbonato de 10 mm para cultivo de tejidos (Nunc Inp., Naperville, IL USA), con un tamaño de poro de 8.0 μ m. Se utilizaron 0.5 μ g de la proteína extraída con HClG y EDTA, cada una disuelta en 50 μ l de medio sin suero, y se colocó en el fondo del pozo 4×10^4 osteoblastos resuspendidos en 200 μ l de medio sin suero con 15 μ g de seroalbúmina

bovina., y colocados en la superficie superior del inserto, se incubó durante 4 horas a 37 °C . Se retiró el inserto, y se fijaron las células con alcohol etílico al 70 % , con algodón se limpió la superficie superior del inserto y se tiñó con azul de toluidina al 1 % durante 3 minutos. La respuesta quimiotáctica se determinó por el número de células que migraron a la superficie inferior de la membrana del inserto, las cuales se cuantificaron a 400 aumentos, contando 5 campos por inserto. Como control negativo se utilizó en el fondo del pozo medio sin suero, y como control positivo medio con suero. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Los cuatro bioensayos se graficaron con el programa Microsoft Excel 97, y se aplicó la T de Student para saber si existían diferencias significativas entre los diferentes grupos con el grupo testigo con el software Sigma Stat V.2.0 (Jandel Scientific) tomando como límite un α menor de 0.05 y un poder de 0.8.

RESULTADOS

Los osteoblastos humanos en cultivo son una población que exhibe una morfología fusiforme, y presenta como una de las principales características fenotípicas la expresión de fosfatasa alcalina. Las proteínas extraídas de matriz dentinaria tuvieron un efecto inhibitorio en la actividad de la fosfatasa alcalina, la cual fue concentración-dependiente. La proteína dentinaria soluble en EDTA (PDsE) en la concentración de 0.5 μg inhibió en un 25.52 % con respecto al testigo la actividad enzimática de FAI a los 7 días de cultivo mientras que a 14 días el porcentaje de inhibición fue de 35.33 %. Por otro lado. Las proteínas dentinarias solubles en HClG (PDsG) también tuvieron un efecto inhibitorio en la producción de fosfatasa alcalina, a la concentración de 0.5 μg tuvo su máximo efecto inhibitorio: en el día 7 de cultivo fue 19.63 % y al 14 días de 21.8 % con respecto al testigo (Figuras 1 y 2) ($p < 0.05$).

Figura 1. Efecto de las proteínas dentinarias extraídas con EDTA 0.5 M en la actividad de fosfatasa alcalina en osteoblastos en cultivo. Los valores son la media y la desviación estándar de tres ensayos realizados por triplicado. La actividad de fosfatasa alcalina es expresada como actividad específica, en unidades King Armstrong (U) por mg de proteína. (* $p < 0.05$)

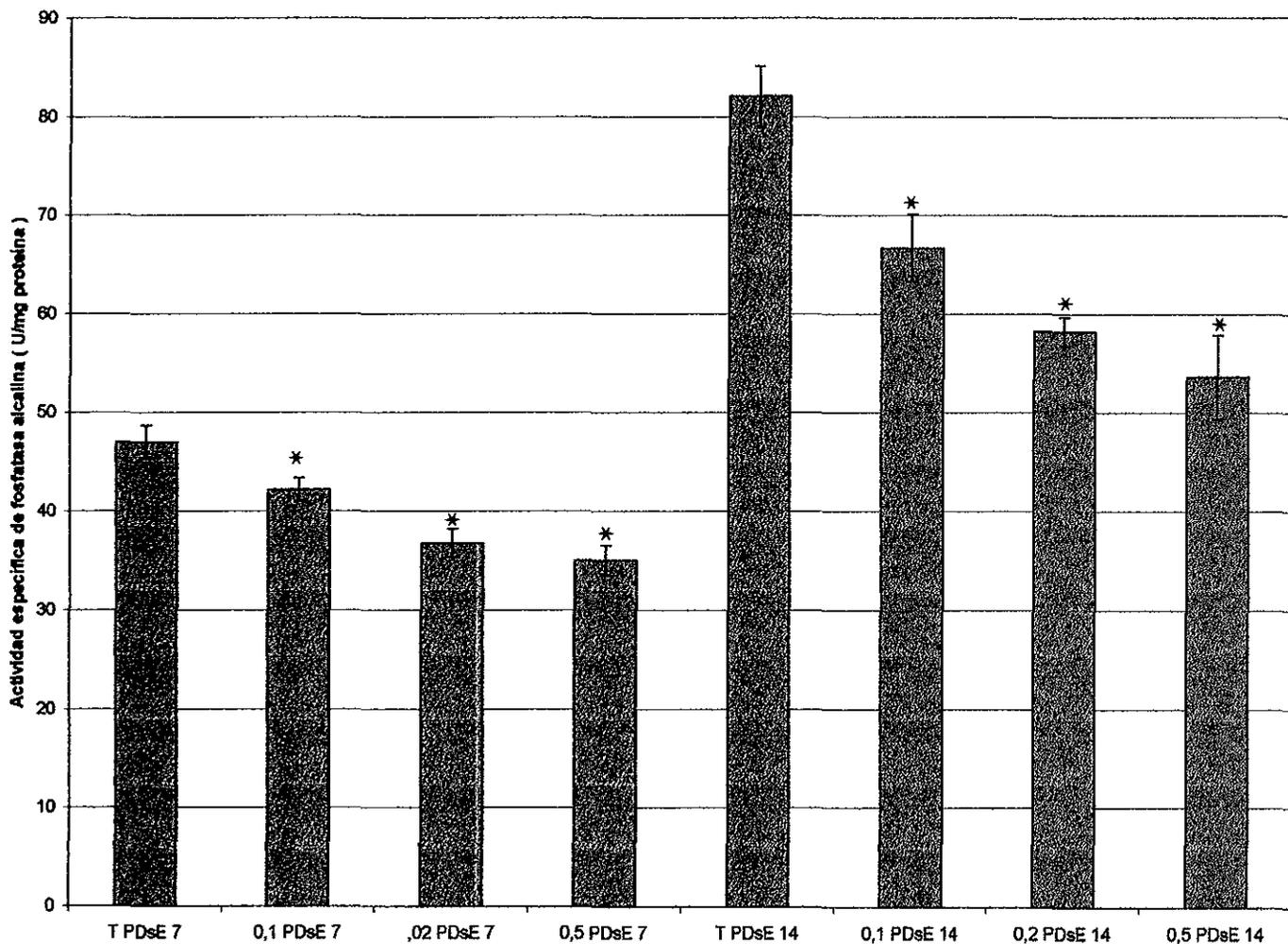
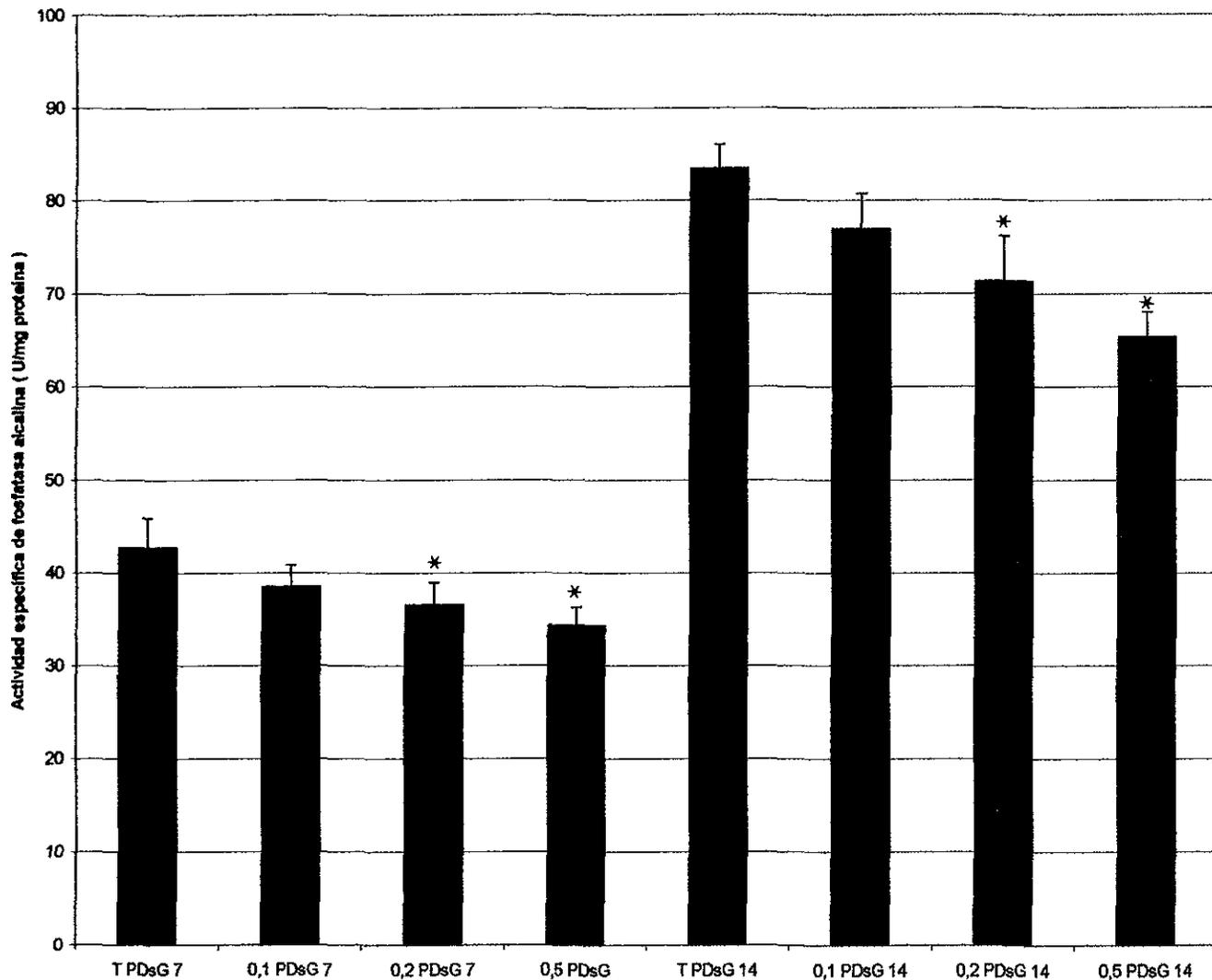


Figura 2. Efecto de las proteínas extraídas con HClG 4M en la actividad de fosfatasa alcalina en osteoblastos en cultivo. Los valores son la media y la desviación estándar de tres ensayos realizados por triplicado. La actividad de fosfatasa alcalina es expresada como actividad específica, en unidades King Armstrong (U) por mg de proteína. (* $p < 0.05$)



Las diferentes concentraciones de las proteínas extraídas de matriz dentinaria no tuvieron un efecto significativo en la proliferación celular de los osteoblastos a los 7 días de cultivo, mientras que en el día 14 se observó una disminución del 21.76 % con respecto a los valores del grupo testigo cuando se cultivaron los osteoblastos con 0.5 μg del extracto soluble en HCIG. Las proteínas solubles en EDTA tuvieron un efecto inhibitor de la proliferación de los osteoblastos en los cultivos de 14 días, este efecto fue dependiente de la concentración, a 0.1 μg tuvo un efecto inhibitor de 11.17 %, a 0.2 μg de 14.42 % y a 0.5 μg de 28.84 % con respecto al testigo (Figuras 3 y 4). ($p < 0.05$).

Figura 3. Efecto de las proteínas dentinarias extraídas con EDTA 0.5 M en la proliferación celular de osteoblastos en cultivo. Los valores representan la media y la desviación estándar de tres ensayos realizados. (* $p < 0.05$)

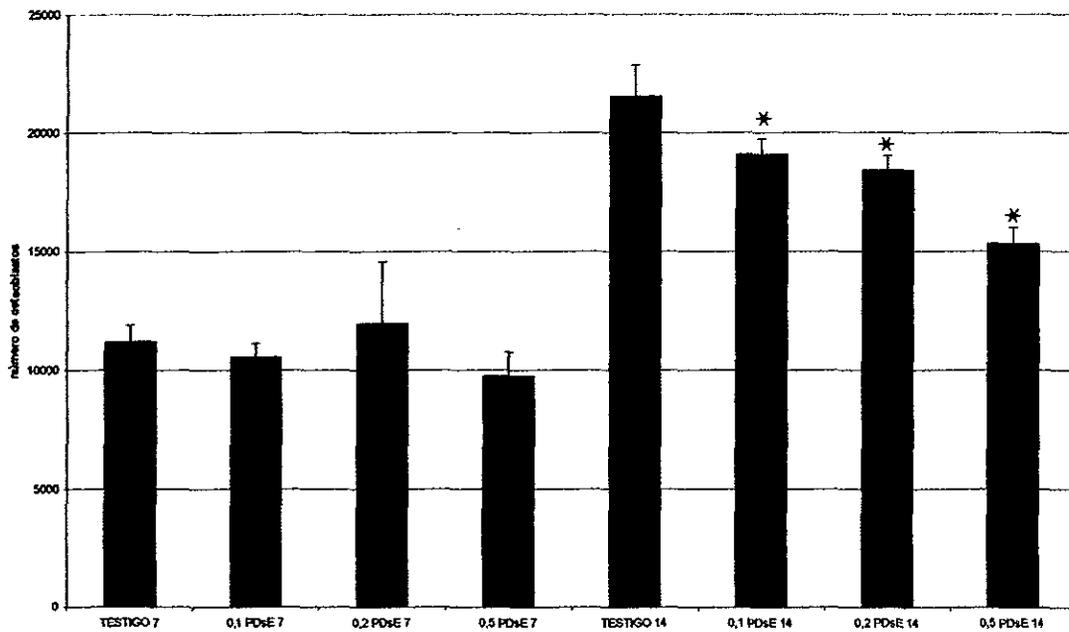
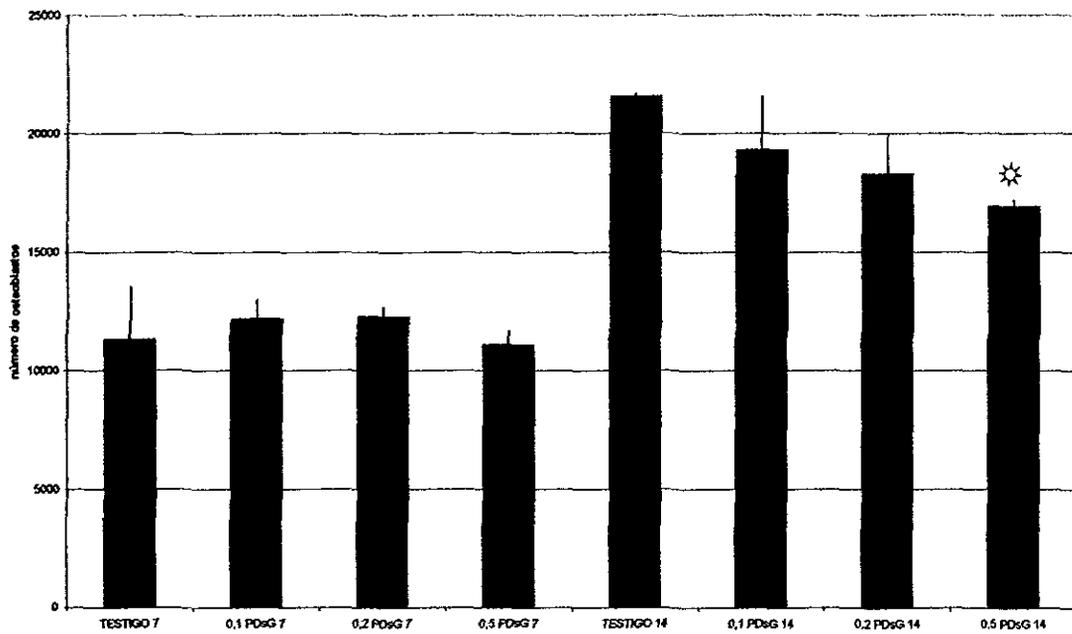
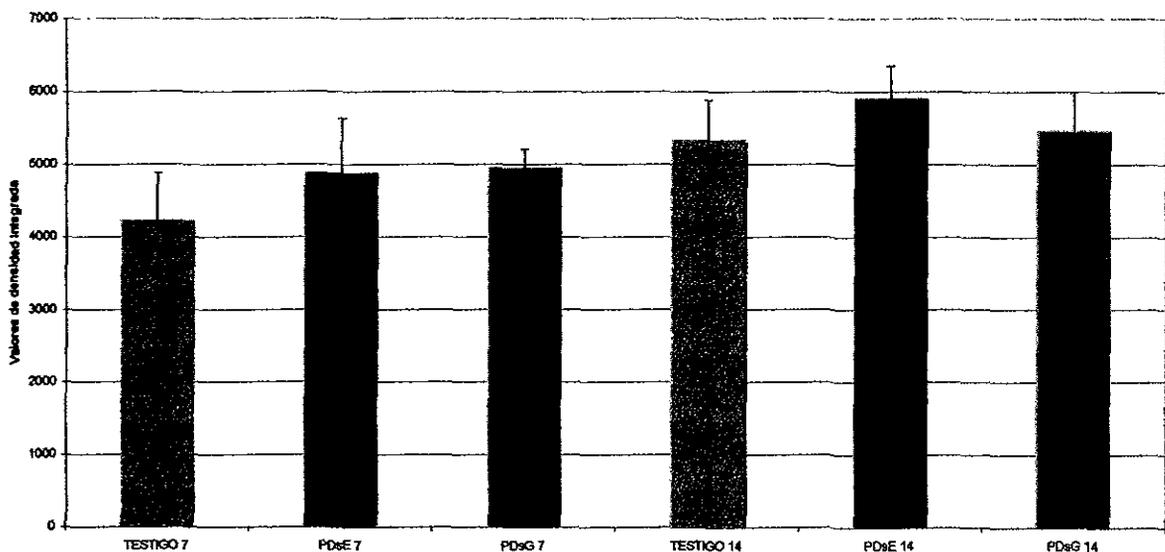


Figura 4. Efecto de las proteínas dentinarias extraídas con HCIG 4M en la proliferación celular de osteoblastos en cultivo. Los valores representan la media y la desviación estándar de tres ensayos. (* $p < 0.05$)



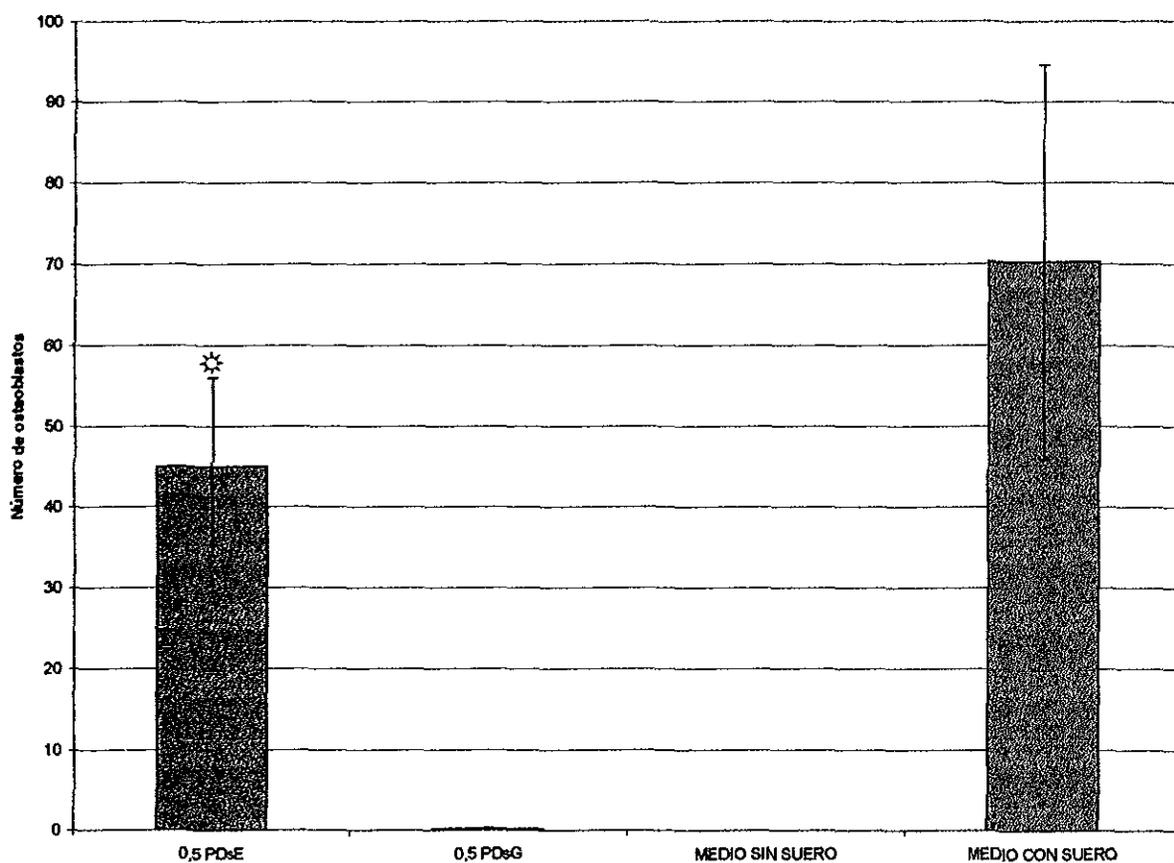
Otra de las características fenotípicas de los osteoblastos es la producción de nódulos de mineralización. Tanto las proteínas extraídas con EDTA como las solubles en HCIG de dentina bovina aumentaron ligeramente la producción de nódulos de mineralización en los cultivos de osteoblastos de 7 días aunque los valores no fueron estadísticamente significativos. A los 14 días de cultivo sólo el grupo de EDTA mostró un ligero aumento que no fue significativo (figura 5).

Figura 5. Efecto de las proteínas dentinarias en la formación de nódulos de mineralización. Los valores son la media y la desviación estándar de tres ensayos y están expresados en Valores Integrados de Densidad.



Los ensayos de quimiotaxis mostraron que el extracto soluble en EDTA fue positivamente quimioatrayente para los osteoblastos, mientras que el extracto soluble en HClG no promovió la migración de los osteoblastos a través de la membrana del inserto (figura 6) ($p < 0.05$).

Figura 6. Efecto de las proteínas dentinarias en la migración de osteoblastos (* $p < 0.05$)



DISCUSION

Las proteínas no colágenas de la dentina forman un porcentaje relativamente pequeño del peso total del diente, aunque como ha sido demostrado por diferentes autores juegan un papel muy importante en la morfogénesis del órgano dentario, en la reparación dentinaria y en el proceso de mineralización de la dentina, su efecto sobre una línea celular diferenciada como son los osteoblastos no ha sido reportada, y de acuerdo a nuestros resultados no promovieron una mayor expresión de proteínas asociadas a la mineralización como es el caso de la fosfatasa alcalina, sino al contrario tuvieron un ligero efecto inhibitor. La actividad de fosfatasa alcalina ha sido usada como un indicador importante de la formación de hueso, ya que aumenta marcadamente con la mineralización de los tejidos duros (Leonard y Provenza, 1973). La presencia de diferentes factores de crecimiento en las proteínas extraídas de matriz dentinaria pudieron disparar mecanismos de maduración de las células óseas cultivadas. Sell y col (1998) demostraron que la actividad de fosfatasa alcalina fue mucho mayor en osteoblastos humanos obtenidos de sitios de osificación heterotópica que la de los osteoblastos obtenidos de la esponjosa del fémur (osteoblastos

ortotópicos), mientras que, la expresión de osteocalcina fue mayor en los osteoblastos ortotópicos. La diferencia en el comportamiento de estas dos poblaciones la atribuyen a que los osteoblastos obtenidos de sitios de osificación heterotópica son relativamente más jóvenes, ya que provienen de células osteoprogenitoras que se han diferenciado a osteoblastos solo tres meses antes de haberse aislado. Giannobile y col. (1997) reportan disminución de la actividad de la fosfatasa alcalina en osteoblastos obtenidos de hueso fetal bovino, cuando se cultivaron en presencia de TGF- β Factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB o del factor b de crecimiento fibroblástico. Matsumaya y col (1990) sugieren que la heterogeneidad de muchas de las poblaciones utilizadas en los diferentes ensayos en diferentes estados de maduración de las líneas celulares utilizadas puede ser la razón de el comportamiento diferente de las células óseas a los diferentes factores de crecimiento. Breen y col (1994) demuestran que los cultivos de osteoblastos obtenidos del cráneo de ratas tienen un comportamiento difásico cuando son expuestos a TGF- β de manera crónica o si se administra este factor de crecimiento en fases específicas como la fase proliferativa, de maduración de la matriz o en la etapa de mineralización. concluyendo que el TGF- β 1 a concentración de 0.1ng/ml ejerce efectos irreversibles en estados

específicos del desarrollo del fenotipo de los osteoblastos, inhibiendo fuertemente la diferenciación de los osteoblastos.

La presencia de diferentes factores de crecimiento en las proteínas no colágenas en la matriz dentinaria pueden explicar los diferentes efectos que tiene la matriz dentinaria sobre diferentes poblaciones celulares. Por ejemplo el TGF- β ha sido asociado a la organogénesis dental (D'Souza y col 1990) y está presente en la dentina humana en su isoforma (1) y en la dentina de conejo se encuentran las isoformas 1, 2 y 3. Los factores de crecimiento transformante β y las BMPs asociadas al TGF- β , son factores de crecimiento que experimentalmente han demostrado que juegan un papel importante en el metabolismo óseo (Antoz y col 1989). Muchos estudios *in vivo* han demostrado que el TGF- β 1 promueve la proliferación de preosteoblastos perióísticos y la formación de hueso trabecular (Joyce y col 1990). Sin embargo estudios *in vitro* de células aisladas del cráneo de rata han demostrado que el tratamiento con TGF- β 1 puede inhibir la organización tisular de las células óseas (Laschinger y col. 1991). El efecto del TGF- β 1 en otros parámetros relacionados con el desarrollo de osteoblastos maduros han sido variables. Por ejemplo, en los cultivos de osteoblastos obtenidos del cráneo de ratas, dosis altas de

TGF- β 1 (10-15 ng/ml) pueden aumentar la producción de colágena (Centrella y col. 1987, 1992), mientras que dosis bajas del TGF- β (1 ng/ml) han disminuido la síntesis de colágena pero no la síntesis de proteínas no colágenas (Guenther y col. 1988). Se ha reportado que el TGF- β 1 disminuye la expresión del ARNm de la fosfatasa alcalina (Noda y Rodan 1987) y de la osteocalcina (Canalis y Lian, 1988), y a su vez un aumento de la fosfoproteína osteopontina (Wrana y col. 1988). Esos últimos resultados concuerdan con los obtenidos por nosotros en los ensayos de actividad de fosfatasa alcalina expresada por osteoblastos humanos obtenidos de cresta alveolar a los que se les administraron proteínas obtenidas de matriz dentinaria. Las proteínas obtenidas de la segunda extracción (Proteínas solubles de EDTA) probablemente contengan TGF- β 1, Cassidy y col (1997) reportan la presencia del TGF- β en las fracciones solubles en EDTA de dentina humana y de conejo.

En lo que respecta al efecto de las proteínas ensayadas sobre la actividad mitogénica también se observó un efecto inhibitor de la proliferación de los osteoblastos con el extracto de EDTA a los 14 días en todas las concentraciones probadas. Las proteínas solubles en guanidina solo en la concentración de 0.5 μ g inhibieron la proliferación

celular a los 14 días. Sell y col. (1998) encontraron que los osteoblastos obtenidos de sitios de osificación heterótópica requieren menos tiempo calculado desde el inicio de la migración hasta que alcanzan la confluencia en el cultivo comparados con los osteoblastos ortotópicos obtenidos de fémur. La fracción de células mitóticamente activas probadas en ensayos de clonación fue mayor en los osteoblastos heterotópicos. En estos estudios *in vitro* de proliferación celular y la eficiencia para formar colonias de células osteogénicas indican que con el aumento de la diferenciación y la edad relativa, las células óseas se vuelven más dependientes de factores de crecimiento en el medio en la etapa post-mitótica del ciclo celular. El efecto inhibitorio de la proliferación celular en los cultivo de osteoblastos a los 14 días puede ser asociado a la presencia en la fracción soluble en EDTA del TGF- β . Los mecanismos por los que el TGF- β 1, un importante mediador del crecimiento celular y la diferenciación bloquea la diferenciación de osteoblastos *in vitro* no son del todo comprendidos, Se ha establecido que la incapacidad de los pre-osteoblastos para diferenciarse esta asociada a cambios en la expresión de los genes que regulan el crecimiento, la diferenciación y la formación de matriz, estos incluyen genes de histona, de *jun-B*, *C-fos*, colágena,

fibronectina, osteocalcina, osteopontina y fosfatasa alcalina (Breen y col. 1994, Mc Cabe y col 1966).

Las células derivadas de tejidos óseos obtenidas mediante digestión enzimática como las células que hemos trabajado, normalmente exhiben una sucesión de eventos característicos. Las células proliferan y depositan una extensa matriz extracelular, esta matriz permite les permite formar una estructura tridimensional en la que se depositan sales de calcio, formándose así los nódulos de mineralización, el medio que permite la expresión de una matriz mineralizada contiene β -glicerol fosfato como fuente de minerales, ácido cítrico para promover la hidroxilación de las moléculas de procolágena y dexametasona para inhibir la síntesis de prostaglandinas y permitir la expresión de moléculas relacionadas con el proceso de mineralización. Los ensayos de mineralización que realizamos con células óseas obtenidas de hueso alveolar mediante digestión enzimática mostraron un ligero aumento en la formación de nódulos , y tomando en cuenta el ensayo de proliferación, existe un menor número de osteoblastos en los cultivos expuestos a las proteínas solubles en EDTA, por lo que es probable que estas proteínas participen en el mecanismo de formación de matriz mineralizable, y que esta promoción de la mineralización sea

independiente de la expresión de la enzima intracelular fosfatasa alcalina, por lo que el efecto puede ser debido al aumento de la expresión de proteínas de matriz extracelular, que se detectó indirectamente por el mayor tiempo al se tenían que incubar con tripsina los cultivos de osteoblastos expuestos al extracto soluble en EDTA para poderlos desprender de su sustrato. Los cultivos tratados con las proteínas solubles en guanidina no aumentaron la síntesis de matriz extracelular. El efecto en la formación de nódulos de mineralización encontrado en los cultivos tratados con proteínas solubles en EDTA no puede ser explicado en su totalidad por el efecto de el TGF- β . La disminución de nódulos óseos y la disminución de la mineralización en cultivos de osteoblastos tratados con TGF- β 1 se acompaña de cambios en la morfología de las células en cultivo.

En este estudio se demostró que las proteínas solubles en EDTA fueron quimiotácticas para osteoblastos a diferencia de las proteínas extraídas con clorhidrato de guanidina. Somerman y col. (1983) y Padley y col. (1991) reportaron que un extracto de matriz ósea exhibió actividad quimiotáctica para células parecidas a osteoblastos; Ellos extrajeron el factor de hueso desmineralizado. Ogata y col (1994) obtienen factores quimiotácticos de cemento y hueso, los cuales también estimularon la

migración de osteoblastos, aunque las fracciones que contuvieron la actividad quimiotáctica las extrajeron con guanidina 4 M sin desmineralización. Hughes (1998) reporta que las BMPs son quimiotácticas para células óseas pero no para fibroblastos. En nuestro estudio el efecto que mostró el extracto de EDTA en el ensayo de quimiotaxis demuestra que los osteoblastos migran hacia las proteínas dentinarias, que son solubles después de un proceso de desmineralización dentinaria como puede ocurrir durante el procedimiento clínico de acondicionamiento radicular utilizado en la terapia de regeneración periodontal. La modificación bioquímica de la superficie radicular ha permitido aprovechar el potencial terapéutico de las proteínas dentinarias y cementarias asociadas a la colágena tipo I, al ser expuestas después de la desmineralización con ácido cítrico, hidrocloreuro de tetraciclina o EDTA, promoviendo la diferenciación y migración de células para restaurar los tejidos perdidos durante la enfermedad inflamatoria periodontal (Nyman y col. 1982). Los datos obtenidos en nuestro ensayo de quimiotaxis permiten sustentar las bases teóricas de el procedimiento clínico de acondicionamiento radicular.

CONCLUSIONES

Las proteínas solubles en EDTA poseen efectos inhibidores de la expresión de la fosfatasa alcalina en células obtenidas de hueso alveolar humano, este efecto puede ser asociado a la presencia del factor β de crecimiento transformante, y está disociado del efecto en la proliferación celular y de la producción de matriz mineralizable. La quimiotaxis ejercida por las proteínas asociadas a la fase mineralizada de la matriz dentinaria que fueron extraídas por la solución de EDTA 0.5 M sobre los osteoblastos, permite sustentar la práctica de la técnica de acondicionamiento radicular asociada a procesos de regeneración guiada de tejidos en el tratamiento de los defectos óseos resultantes de la enfermedad periodontal.

PROPUESTAS DE INVESTIGACION.

El trabajo desarrollado probó el efecto de dos extractos crudos obtenidos de dentina bovina en una población de osteoblastos humanos, evaluándose sólo algunos parámetros.

El trabajo futuro deberá explorar el efecto de fracciones purificadas de los extractos en poblaciones de osteoblastos de diferente origen y compararlos con el efecto de factores de crecimiento obtenidos comercialmente, así como valorar la expresión de otras moléculas asociadas a la fisiología de las células óseas.

Otra línea paralela exploraría la obtención de proteínas de matriz dentinaria humana para evaluar el efecto de los factores de crecimiento de esta matriz en poblaciones de células que elaboran matriz mineralizable.

BIBLIOGRAFIA

- Adams JC, Watt F (1993). Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* **117**: 1183-1198.
- Amar S, Sires B, Sabsay B, Clohisy J, Veis A (1991). The isolation and partial characterization of a rat incisor dentin matrix polypeptide with *in vitro* chondrogenic activity. *J Biol Chem* **266**: 8609- 8618.
- Antoz ME, Bellows CG, Aubin JE (1989). Effects of transforming growth factor beta and epidermal growth factor on cell proliferation and the formation of bone nodules in isolated fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol* **140**: 386-395.
- Aukhil I, Nishimura K, Fernyhough W (1990). Experimental regeneration of the periodontium. *Crit Rev Oral Biol Med* **1**: 101-115.
- Bang G, Urist MR (1967). Bone induction in excavation chambers in matrix of decalcified dentin . *Arch Surg* **94**: 781-789.
- Bang G, Johannessen JV (1972). The effect of proteolytic enzymes on the induction of heterotopic bone formation by demineralized dentin in guinea pigs. *J Oral Path* **1**: 221-230.
- Beesho K, Toshirou T, Murata M (1990). Purification of rabbit bone morphogenetic protein derived from bone, dentin, and wound tissue after tooth extraction. *J Oral Maxillofac Surg* **48**: 162-169.
- Beesho K, Tanaka N, Matsumoto J, Tagawa T, Murata M (1991). Human dentin-matrix-derived bone morphogenetic protein. *J Dent Res* **70**: 171-175.
- Bègue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, Wosney JM, Purchio A, Hartmann D, Lesot H (1992). Effects of dentin proteins, transforming growth factor β -1 (TGF β -1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast *in vitro*. *Int J Dev Biol* **36**: 491-503.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Breen EC, Ignatz RA, McCabe L, Stein JL, Stein GS, Lian JB (1994). TGF- β alters growth and differentiation related gene expression in proliferating osteoblasts *in vitro*, preventing development of the mature bone phenotype. *J Cell Physiol* **160**: 323-335.

Butler WT, Mikulski A, Urist MR (1977). Noncollagenous proteins of a rat dentin matrix possessing bone morphogenetic activity. *J Dent Res* **56**: 228-232.

Canalis E, Lian JB (1988). Effects of bone associated growth factors on DNA, Collagen and osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvaria. *Bone* **9**: 243-246.

Centrella M, McCarthy TL, Canalis E (1987). Transforming growth factor β is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblasts-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem* **262**: 2869-2874.

Centrella M, Casinghino S, Ignatz R, McCarthy TL (1992). Multiple regulatory effects by transforming growth factor- β on type I collagen levels in osteoblasts-enriched cultures from fetal rat bone. *Endocrinology* **131**: 2863-2872.

Cassidy N, Fahey M, Prime SS, Smith AJ (1997). Comparative analysis of transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. *Arch Oral Biol* **42**: 219-223.

Conover MA, Urist MR (1979). Transmembrane bone morphogenesis by implants of dentin matrix. *J Dent Res* **58**: 1911.

D'Souza RN, Happonen RP, Ritter NM, Butler WT (1990). Temporal and spatial patterns of transforming growth factor- β 1 expression in developing rat molars. *Arch Oral Biol* **35**: 9578-965.

Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ (1990). Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF -II, and TGF- β in human dentin. *J Bone Miner Res* 5: 717-723.

Fitzgerald M (1979). Cellular mechanics of dentinal bridge repair using ^3H -thymidine*. *J Dent Res* 58: 2198-2206.

Fleming HS (1952). Homologous and heterologous intraocular growth of transplanted tooth germs. *J Dent Res* 31: 166-188.

Giannobile WV, Whitson SW, Lynch SE (1997). Non-coordinated control of bone formation displayed by growth factors combinations with IGF-I. *J Dent Res* 76: 1569-1578.

Guenther HL, Cecchini MG, Elford PR, Fleisch H (1988). Effects of transforming growth type beta upon bone cell populations grown either in monolayer or semisolid medium. *J Bone Min Res* 3: 269-278.

Harada K, Oida S, Sasaki S, Enomoto S (1990). Chondrocyte-like colony formation of mesenchymal cells by dentin extracts in agarose gel culture. *J Dent Res* 69: 1155-1159.

Héritier M, Dangleterre M, Bailliez Y (1990). Differentiation of odontoblast in mouse dental papillae recombined with normal or chemically-treated dentinal matrices. *Arch Oral Biol* 35: 917-924.

Hogan BLM (1996). Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes & Development* 10: 1580-1594.

Huggins CB, McCarroll HR, Dahlberg AA (1934). Transplantation of tooth germ elements and the experimental heterotopic formation of dentine and enamel. *J Exp Med* 60: 199-210.

Huggins CB, Urist MR (1970). Dentin Matrix transformation: Rapid induction of alkaline phosphatase and cartilage. *Science* 167: 896-897.

Inoue T, Deporter DA, Melcher AH (1986). Induction of chondrogenesis in muscle, skin, bone marrow, and periodontal ligament by demineralized dentin and bone matrix. *J Dent Res* 65: 12-22.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME (1990). Transforming growth factor- β and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* **110**: 2195-2207.
- Karcher-Djurisic V, Staubli A, Meyer JM, Ruch JV (1985). Acellular dental matrices promote functional differentiation of ameloblasts. *Differentiation* **29**: 169-175.
- Kawai T, Urist MR (1989). Bovine Tooth-derived bone morphogenetic protein. *J Dent Res* **68**: 1069-1074.
- Kollar EJ, Baird GR (1970). Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs: The inductive role of dental papilla. *J Embriol Exp Morph* **24**: 173-186.
- Kollar EJ, Fisher C (1980). Tooth induction in chick epithelium: expression of quiescent genes for enamel synthesis. *Science* **207**: 993-995.
- Krömer H (1962). Implantation of bone homografts in periodontal pockets. En: *Tissue Regeneration and Transplantation*, pp. 471-483. Saunders. Philadelphia. Citado por Yeomans y Urist (1967).
- Kronmiller JE, Upholt WB, Kollar EJ (1991). EGF antisense oligonucleotides block murine odontogenesis in vitro. *Dev Biol* **147**: 485-488.
- Leonard EP, Provenza DV (1973). Alkaline phosphatase activity in sequential mouse molar tooth development an electron microscopic study. *Histochemie* **34**: 343-354.
- Lesot H, Smith AJ, Meyer JM, Staubli A, Ruch JV (1986). Cell-matrix interactions: influence of noncollagenous proteins from dentin on cultured dental cells. *J Embryol Exp Morph* **96**: 195-209.

- Matsumaya T, Lau KH, Wergedal JE (1990). Monolayer cultures of normal human bone cells contains multiple subpopulations of alkaline phosphatase positive cells. *Calcifit Tissue Int* **47**: 276-283.
- Marks SC, Popoff SN (1988). Bone Cell Biology: The Regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat* **183**: 1-44.
- Noda M, Rodan G (1987). Type β Transforming growth factor (TGF- β) regulation of alkaline phosphatase expression and other phenotype-related mRNAs in osteoblastic rat osteosarcoma cells. *J Cell Physiol* **133**: 426-437.
- Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H (1982). New Attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol* **9**: 290-296.
- Ogata Y, Yokota Y, Niisato N, Furuyama S, Sugiya H (1994). Presence of endogenous chemotactic factors for periodontal ligament cells in bovine cementum and bone. *Archs Oral Biol* **39**: 529-533.
- Padley RA, Cobb CM, Killoy WJ, Newhouse NL, Boyan BD (1991). *In vitro* chemotactic respose of osteoblast-like osteosarcoma cells to a partially purified protein extract of demineralized bone matrix. *J Periodontol* **62**: 15-20.
- Pinkerton H, Boyle PE, (1935). Cultivation in vitro of tissues removed from the enamel organ and dental pulp. *J Dent Res* **15**: 221.
- Rabinowitz T, Syftestad GT, Caplan I (1990). Chondrogenic stimulation of embryonic chick limb mesenchymal cells by factors in bovine and human dentin extracts. *Archs Oral Biol* **35**: 49-54.
- Reitan K, Rygh P (1998). *Ortodoncia, Principios Generales y técnicas*. (Editado por Graber TM y Vanarsdall RL) Cap 2 , pp 91-181. Interamericana. Buenos Aires.
- Ruch JV (1984). *Dentin and dentinogenesis, Volume I* (edited by A.Linde) Chap 3, pp 47-79. CRC Press. Boca Raton, FL.

Sell S, Gaissmaier C, Fritz J, Esenwein S, K uswetter W, Volkmann R, Wittkowsky KM, Rodeman HP (1998). Different behavior of human osteoblast-like cell isolated from normal and heterotopic bone in vitro. *Calcif Tissue Int* **62**: 51-59.

Slack JMW (1994). Inducing factors in *Xenopus* early embryos. *Curr Biol* **4**: 116-126.

Smith AJ, Tobias RS, Cassidy N, Plant CG, Browne NM, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H (1994). Odontoblast stimulation in ferrets by dentin matrix components. *Arhs Oral Biol* **39**: 13-22.

Somerman MJ, Nathanson MA, Sauk JJ, Manson B (1987). Human dentin matrix induces cartilage formation *in vitro* by mesenchymal cells derived from embryonic muscle. *J Dent Res* **66**: 1551-1558.

Stanley HR (1962). The cells of dental pulp. *Oral Surg* **15**: 849-848.

Sveen OB, Hawes RR (1968). Differentiation of new odontoblast and dentine bridge formation in rat molar teeth after tooth grinding. *Archs Oral Biol* **13**: 1399-1412.

Takeichi M (1987). Cadherins: A molecular family essential for selective cell- cell adhesion and animal morphogenesis. *Trends Genet* **3**: 213-217.

Thesleff I, Humerinta K (1981). Tissue interaction in tooth development. *Differentiation* **18**: 75-88.

Torneck CD, Wagner D (1980). The effect of a calcium hydroxide cavity liner on early cell division in the pulp subsequent to cavity preparation and restoration. *J Endod* **6**: 719-723.

Tziafas D, Kolokuris I (1990). Inductive influences of demineralized dentin and bone matrix on pulp cells: an approach of secondary dentinogenesis. *J Dent Res* **69**: 75-81.

Tziafas D, Kolokuris A, Alvanou A, Kaidoglou K (1992). Short-term dentinogenic response of dog dental pulp tissue after its induction by

demineralized or native dentine, or prdentine. *Archs Oral Biol* **37**: 119-128.

Urist MR (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science* **150**: 893-899.

Uris RM, Strates BS (1971). *J Dent Res* **50** (suppl. 6): 1392,

Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM (1967). The bone induction principle*. *Clin Orthop Rel Res* **53**: 243-283.

Vainio S, Karanova I, Jowett, Thesleff I (1993). Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* **75**: 45-58.

Wosney JM, Rozen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewwick RM, Wang EA (1988). Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* **242**: 1528-1534.

Wosney JM (1998). The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur J Oral Sci* **106** (suppl 1): 160-166.

Yamamura T (1985). differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J Dent Res* : **64** (spec Iss): 530-540.

Yeomans JD, Urist MR (1967). Bone induction by decalcified dentine implanted into oral, osseous and muscle tissues. *Arch Oral Biol* **12**: 999-1008.

CURRICULUM VITAE

NOMBRE: JOSE FRANCISCO GOMEZ CLAVEL
FECHA DE NACIMIENTO: 19 DE NOVIEMBRE DE 1958
LUGAR DE NACIMIENTO: MEXICO D.F.
NACIONALIDAD: MEXICANA
ESTADO CIVIL: CASADO
NOMBRE DE LOS PADRES: MA. DEL CARMEN CLAVEL BAÑOS
JOSE GOMEZ BUTRON
DOMICILIO PERMANENTE: CENTENARIO 74-29
COL. EL RECREO
DEL. AZCAPOTZALCO
C.P 02070

ESTUDIOS PROFESIONALES

LICENCIATURA: CIRUJANO DENTISTA
E. N. E. P. IZTACALA U. N. A. M.
1977-1980
ESPECIALIDAD: EN ORTODONCIA
I. D. A. P. S.E.P.
1989-1990
MAESTRIA: EN ODONTOLOGIA
DIVISION DE ESTUDIOS DE
DE POSGRADO
FO, U. N. A. M.