

01461

Universidad Nacional Autónoma de México



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN**

**DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN TEMPORAL DE MOLÉCULAS
INVOLUCRADAS EN EL PROCESO DE MINERALIZACIÓN DE CÉLULAS
DERIVADAS DE UN CEMENTOBLASTOMA HUMANO, OSTEÓBLASTOS
Y CÉLULAS DE LIGAMENTO PERIODONTAL *IN VITRO*.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN ODONTOLOGÍA**

P R E S E N T A

C.D. LORENA GARRIDO MARÍN

TUTOR

DR. HIGINIO ARZATE

México, D.F. 2000





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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Cualquier tesis no publicada que avale el grado de Maestría y depositada en la biblioteca de la Universidad y de la Facultad de Odontología, queda abierta para inspección y solo podrá ser usada con la debida autorización. Las referencias bibliográficas pueden ser tomadas, pero copiadas solo con el permiso del autor, el crédito se da posteriormente a la escritura y publicación del trabajo.

Esta tesis ha sido utilizada por las siguientes personas, que firman y aceptan las restricciones señaladas.

La biblioteca que presta esta tesis deberá asegurarse de recoger la firma de cada persona que la utilice.

NOMBRE Y DIRECCIÓN

FECHA

RECONOCIMIENTOS

El hombre por naturaleza ambiciona siempre ser mejor, y el desarrollo profesional para quienes hemos tenido la fortuna de conocer la educación es parte de nuestro crecimiento. Este fue mi primer pensamiento cuando decidí aventurarme a hacer la maestría. Jamás pensé todo lo que sucedería antes de poder culminar esta meta.

Sin embargo, quizá esta sea la mejor manera de demostrar que mientras haya vida cada día es una oportunidad y que el cáncer a veces no sólo es una grave enfermedad que nos aqueja a algunos, sino un mal que nos hace auto limitarnos por distintas causas a todos.

El coraje para salir adelante y demostrar que podía luchar lo adquirí sin saber cuanta falta me iba a hacer de mis padres, pues han sido mi mejor ejemplo de la tenacidad que se necesita en la vida para sobresalir, a ellos en especial gracias por estar siempre a mi lado, por permitirme sentir su amor en todo momento y darme la oportunidad de amarlos.

La paciencia para concluir este proyecto se la debo a mi tía Elba pues aún convaleciente siempre me impulsó para escribir esta tesis y me acompañó en mis momentos de mayor desesperación y dolor. A ella con todo mi cariño.

Uno de los mejores detalles durante este período de mi vida fue aquel obsequio de mi hermano, que tan solo decía te quiero. A Carlos Octavio, yo también te quiero y te deseo lo mejor.

Si alguien jamás me ha abandonado y me ha enseñado que la vida está hecha de momentos felices y difíciles, pero durante ellos siempre a estado a mi lado, para apoyarme, para compartir conmigo mis vivencias, y para rehabilitarme no solo el cuerpo sino también el alma es Boris, a ti con todo mi corazón, gracias por devolverme la fe y por demostrarme a cada instante que crees en mí.

La Universidad siempre me llevó a mis grandes maestros, a quienes debo todo lo que ahora sé, pero con el tiempo me enseñó que también pueden ser mis amigos. En especial a la Dra. Claudia de León, al Dr. Juan Molina y al Dr. Higinio Arzate, en quien además descansé la ardua labor de la tutoría de este trabajo, gracias por todo su apoyo.

A mis compañeros durante la maestría, por los momentos invaluable de lucha y de alegría en especial a Lía, Amelia y Rubén, por sus atenciones gracias.

Por su tiempo y apoyo incondicional para editar y presentar esta tesis, a Marcel y Benjamín.

Finalmente, sé que hay algo o alguien más a quien agradecer, a ti Dios, por darme esta nueva oportunidad de vida y por permitirme creer que mi hermano, mis abuelos y todos mis seres queridos están ahora a tu lado compartiendo mi alegría.

ÍNDICE GENERAL

• Introducción	01
• Resumen	02
• Abstract	03
• Antecedentes	04
• Planteamiento del problema	18
• Justificación	19
• Hipótesis	20
• Operacionalización de variables	21
• Objetivos	22
• Metodología	23
• Recolección de datos análisis de la información y tratamiento estadístico	30
• Resultados	31
• Discusión	48
• Conclusiones	54
• Propuesta de investigación	56
• Referencias	57
• Apéndice	70
• Anexos	72
• Curriculum Vitae	76

INTRODUCCIÓN

En este trabajo se demuestra que el proceso de mineralización *in vitro* es regulado por la manifestación de diferentes moléculas asociadas, y que la expresión de las mismas se lleva a cabo en una secuencia temporal diferente en tres linajes celulares humanos: las células derivadas de un cementoblastoma, los osteoblastos procedentes del área de hueso alveolar y las células provenientes del ligamento periodontal.

La razón principal para haber realizado la investigación en este tema se debió por una parte al interés de profundizar en el conocimiento de la dinámica de la regeneración periodontal y por otra, la finalidad fue abrir luz en el entendimiento del proceso de la cementogénesis *in vitro*.

Este estudio se fundamenta en gran cantidad de hipótesis científicas que se han generado de investigaciones realizadas en roedores, perros y primates no humanos, en las que se ha observado especialmente el proceso regenerativo tanto en el campo de la biología oral como en el aspecto clínico.

Hallazgos anteriores demuestran que el cemento radicular representa un componente primario e indispensable para la regeneración del componente diente-hueso y la reconstitución de la estructura de soporte del diente, sin embargo, existen una gran cantidad de procesos biológicos involucrados aún desconocidos, por lo menos parcialmente, entre ellos el de la cementogénesis.

Este reporte pretende enriquecer nuestro conocimiento al respecto, está organizado en secciones y contiene un resumen inicial, los antecedentes, el planteamiento del problema, la justificación, las hipótesis la operacionalización de variables, los objetivos del trabajo, la metodología con la cual se llevó a cabo la fase experimental, el sistema de recolección de datos mediante el cual se analizó la información y el tratamiento estadístico que fue seleccionado para así obtener los resultados, la discusión y las conclusiones.

RESUMEN

La regeneración periodontal se lleva a cabo en una secuencia temporal y espacial concertada, que es regulada en parte, por la expresión de proteínas no colágenas de matriz extracelular. Estas moléculas juegan un rol crítico en los procesos de diferenciación y mineralización. Con el fin de profundizar en el conocimiento de los mismos, se cultivaron tres linajes celulares humanos: los osteoblastos (OB), las células de ligamento periodontal (CLP) y las células derivadas de un cementoblastoma (CEM). Se cuantificó la producción de matriz mineral mediante el método de Bellows y de histomorfometría de Recker y Frost y se determinó la expresión de sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN), osteonectina (ONC) y proteína de adherencia del cemento (CAP) mediante ensayos de inmunohistoquímica e inmunotransferencia. Los tiempos de observación utilizados (7, 14 y 21 días) son representativos del periodo de iniciación de la cementogénesis. Los resultados indican que la capacidad para producir matriz mineral existe en los tres linajes celulares aunque esta habilidad varía en temporalidad, es menor en las CLP que en los OB y las CEM, mineralizan mas temprana y lentamente. La expresión de BSP se hace manifiesta de forma mas intensa en los OB, a diferencia de la OPN, que presentó inmunoreacciones altamente positivas a los 7 y 14 días en las CLP y las CEM. En cuanto a la ONC, las mayores reacciones se manifestaron en los OB a los tres tiempos de observación y en las CLP y las CEM a los 14 y 21 días. La CAP en cambio inmunoreaccionó mas con las CEM. De lo anterior concluimos que el proceso de mineralización es dependiente no solo de factores extrínsecos como el medio de cultivo, sino también de la expresión temporal y espacial de éstas proteínas no colágenas que varía de un tipo celular a otro.

Palabras clave: Mineralización; proteínas de matriz extracelular; regeneración periodontal; expresión génica; cementogénesis.

ABSTRACT

Periodontal regeneration occur in an specific temporal and spatial sequence, and it's regulated in part through the action of noncollagenous matrix proteins. These molecules play a critical role in cell differentiation and mineralization. In order to delve into the knowledge of these processes, we prepared cell cultures of three different human lineages: osteoblasts (OB), periodontal ligament cells (CLP) and cementoblastoma-derived cells(CEM). We quantify the production of mineral matrix by two methods: Bellows and Recker & Frost histomorphometry and determined the expression of bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), osteonectin (ONC) and cementum adhesion protein (CAP) with immunostaining and immunoblotting assays. The observation at 7,14 and 21 days, are representatives of the initial cementogenesis stage. Our results showed that the capacity to produce mineral matrix was present on the three different cells lineages, although this ability was different in temporality, is minor in CLP in comparison with OB and CEM, and CEM mineralized early and slowly. The BSP immunoexpression results very intense in OB. The OPN immunoreacted highly positive at 7 and 14 days on CLP and CEM. The mayor immunoreactions of ONC were manifested on the OB at three observation times, and on CLP and CEM at 14 and 21 days. At difference the CAP immunoreacted more with CEM. We concluded that the mineralization process depends of extrinsic factors like a culture media, but also is depends too of temporal and spatial expression of these noncollagenous matrix proteins, and differs from one to another cell lineage.

Key Words: Mineralization; noncollagenous matrix proteins(ECM); periodontal regeneration; gene expression; cementogenesis.

ANTECEDENTES

PERIODONTO Y REGENERACIÓN PERIODONTAL

El *periodonto* se encuentra constituido por dos tejidos conectivos blandos (encía y ligamento periodontal) y dos tejidos conectivos mineralizados (cemento y hueso alveolar) (Narayanan y Bartold, 1996).

Este término se utiliza para designar la totalidad de los elementos que permiten el anclaje de los órganos dentarios a los maxilares y que proveen un mecanismo de enlace entre éstos y la mucosa bucal, que queda sellada posterior a la erupción (Stern, 1981).

Gracias a esta particular composición, posee una intrigante y compleja capacidad regenerativa y reparativa, misma que ha sido definida por Aukhil (citado en Schroeder, 1986), como el restablecimiento de los componentes del periodonto en una ubicación e interrelación adecuada.

El interés por el estudio de estos tejidos se ha hecho manifiesto con la finalidad de poder entender cuales son las diferentes formas por las que se lleva a cabo la regeneración periodontal, y como ésta puede efectuarse gracias a la información genética que poseen las células sobre los mecanismos de regulación de los distintos tejidos que componen el periodonto (Boyko *et al.*, 1981).

Sin embargo, para que se desempeñe la regeneración se precisa de un conjunto de procesos tales como proliferación, migración, adherencia, selección y diferenciación de células progenitoras que deben actuar en una secuencia temporal y espacial concertada (McCulloch *et al.*, 1987; Pitaru *et al.*, 1994).

Si se analiza la diversidad de condiciones patológicas, así como la gran variedad de tratamientos que existen, el estudio de la regeneración del periodonto se complica, lo anterior, aunado a que la presencia de placa dentobacteriana es considerada como la causa etiológica principal de la enfermedad periodontal, y como respuesta a la misma se produce un proceso inflamatorio que interfiere con la capacidad regenerativa (Narayanan y Page, 1983).

Asimismo, algunas condiciones fisiológicas como la masticación y el continuo desplazamiento dental van acompañadas de una constante degeneración y regeneración de los tejidos periodontales (Karimbux *et al.*, 1992).

TEJIDOS PERIODONTALES Y MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz extracelular de los tejidos periodontales se encuentra constituida principalmente por las colágenas tipos I, III y XII, proteoglucanos y proteínas no colágenas (Berkovitz, 1990; Dublett *et al.*, 1988; Perera y Tonge, 1981).

Entre las proteínas no colágenas asociadas a la matriz orgánica se encuentran: la fibronectina (FN), la sialoproteína ósea (BSP), la osteopontina (OPN), la osteocalcina (OC), y la osteonectina (ONC) (Bronckers *et al.*, 1994; MacNeil *et al.*, 1995; Reichert *et al.*, 1992).

La FN, la BSP y la OPN se unen ligeramente a las matrices de colágena y presentan propiedades de adherencia celular a través del tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD), que se une a las integrinas (Ecarot-Charrier *et al.*, 1989, Nagata *et al.*, 1991).

Además, la FN se encuentra presente en la vaina epitelial de Hertwig en el estadio de diferenciación de los odontoblastos (Lesot *et al.*, 1981; Meyer *et al.*, 1989; Thesleff *et al.*, 1979, 1981, Thesleff y Hurmerinta, 1981).

Según investigaciones de Bronckers *et al.*, (1994) la OC ha sido detectada en experimentos de inmunohistoquímica de molares de rata, tiñiéndose las fibras intrínsecas del cemento celular, los cementoblastos y los cementocitos relacionados, mientras que las fibras extrínsecas y los cementocitos asociadas al mismo tipo de cemento no se tiñeron.

Asimismo, tanto la OC como la ONC parecen participar en los procesos de mineralización (Doi *et al.*, 1989; Fisher y Termine, 1985; Romberg *et al.*, 1985; Termine *et al.*, 1981).

El estudio de los tejidos del periodonto por separado ha revelado que estas proteínas no colágenas, también se asocian a procesos como la osteogénesis, en donde los osteoblastos las secretan para conformar la matriz extracelular y poder llevar a cabo los procesos de remodelación y deposición mineral (Malaval *et al.*, 1994; McKee *et al.*, 1992).

De igual modo, el estudio del cemento ha concedido introducir el concepto de que los cementoblastos efectúan este proceso de forma similar a como lo hacen los osteoblastos en el hueso (Glimcher *et al.*, 1989; McNeil y Somerman, 1993).

Todo lo anterior, ha permitido establecer que la matriz extracelular juega un papel fundamental en el control de muchos eventos tanto fisiológicos como patológicos (Grobstein, 1975; Terranova y Wikesjo, 1987). Sin embargo, el papel exacto que juega cada uno de los componentes de la misma aun no ha sido dilucidado por completo (McAllister *et al.*, 1990; Miki *et al.*, 1987; Somerman *et al.*, 1987 a, 1987 b, 1989).

PROCESO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

La expresión de moléculas de adhesión (FN, BSP y OPN entre otras), se incrementa o disminuye dependiendo del tipo de célula durante la diferenciación, o bien, como resultado de la misma (Ferreira *et al.*, 1991; Ingontz *et al.*, 1989; Patel y Lodish, 1984; Plantifaber y Hynes, 1989; Pitaru *et al.*, 1994).

Estas moléculas, así como sus receptores en la superficie de la membrana se expresan exclusivamente durante una fase del desarrollo, por lo que existe gran posibilidad de que la secuencia temporal y espacial de las mismas, sea lo que determine el proceso de diferenciación celular (Andujar *et al.*, 1985; Lesot *et al.*, 1981; Slavkin, 1990; Thesleff *et al.*, 1981; Vainio *et al.*, 1989).

Asimismo durante el desarrollo dental, las interacciones entre el epitelio bucal y las células ectomesenquimatosas derivadas de la cresta neural son básicas para que se lleve a cabo la diferenciación celular requerida para la formación de ligamento periodontal, dentina, esmalte y cemento (Ten Cate, 1995).

LIGAMENTO PERIODONTAL: UN SOLO TEJIDO CON DISTINTOS LINAJES CELULARES

El ligamento periodontal se compone de una mezcla de distintos linajes celulares como los fibroblastos, los osteoblastos, los osteoclastos, los cementoblastos, y los precursores de todas estas células en sus diversos estadios de diferenciación (Gould *et al.*, 1977; Melcher, 1986; Piche *et al.*, 1989).

El estudio de células del ligamento periodontal (CLP) obtenidas de roedores y los explantes marcados *in vitro* con timidina tritiada [³H], revelaron que la incorporación del marcador al interior de las mismas puede ser el origen de los progenitores que a su vez se diferencian en los distintos linajes celulares presentes en el ligamento (McCulloch y Melcher, 1983; McCulloch, 1985; McCulloch y Bordin, 1991).

Los análisis fenotípicos de estas poblaciones celulares hacen hincapié en su capacidad de manifestar caracteres fibroblásticos u osteogénicos, dependiendo de las condiciones de cultivo, de tal forma que las CLP expresan fosfatasa alcalina (ALP), responden a la hormona paratiroidea (PTH) y a la Vitamina D (1,25 dihidroxivitamina D₃) incrementando la producción de adenosínmonofosfato cíclico (cAMP) (Groenvelde *et al.* 1995; Nojima *et al.*, 1990).

Por otra parte, las CLP de humano adulto, de bovino y de rata exhiben también capacidad osteogénica, característica que se hace manifiesta con la expresión de OC, ALP, BSP, la formación de nódulos minerales y la elevada capacidad proliferativa *in vitro* en presencia de dexametasona y β-glicerofosfato (Arceo *et al.*, 1991; Cho *et al.*, 1992; Cheng *et al.*, 1994; Ramakrshnan *et al.*, 1995).

De igual modo, la dexametasona incrementa el fenotipo osteogénico en estos cultivos (Nohutcu *et al.*, 1995), asimismo, regula la expresión génica de las células para diferenciarse e induce la afinidad de los receptores blanco de glucocorticoides en el genoma (Green y Chambon, 1986).

Lo anterior, sugiere que los glucocorticoides inducen la proliferación y diferenciación terminal de las células osteogénicas (Rickard *et al.*, 1994).

CEMENTO RADICULAR: UN COMPONENTE BÁSICO DEL PERIODONTO

Estudios recientes indican que el cemento radicular contiene dos moléculas específicas, el factor de crecimiento del cemento (CGF) y la proteína de adherencia del cemento (CAP), cuya función es promover la migración, adherencia y crecimiento de las CLP así como participar en la síntesis de su matriz extracelular (Nakae *et al.*, 1991; Narayanan *et al.*, 1995; Yonemura *et al.*, 1992, 1993).

A pesar de todo, los factores que inician la proliferación, controlan la migración celular dirigida y regulan la diferenciación del periodonto humano adulto permanecen aún sin respuesta.

Existe muy poca información respecto a la formación radicular, la identificación del fenotipo de los cementoblastos y de todos los procesos que involucra la cementogénesis.

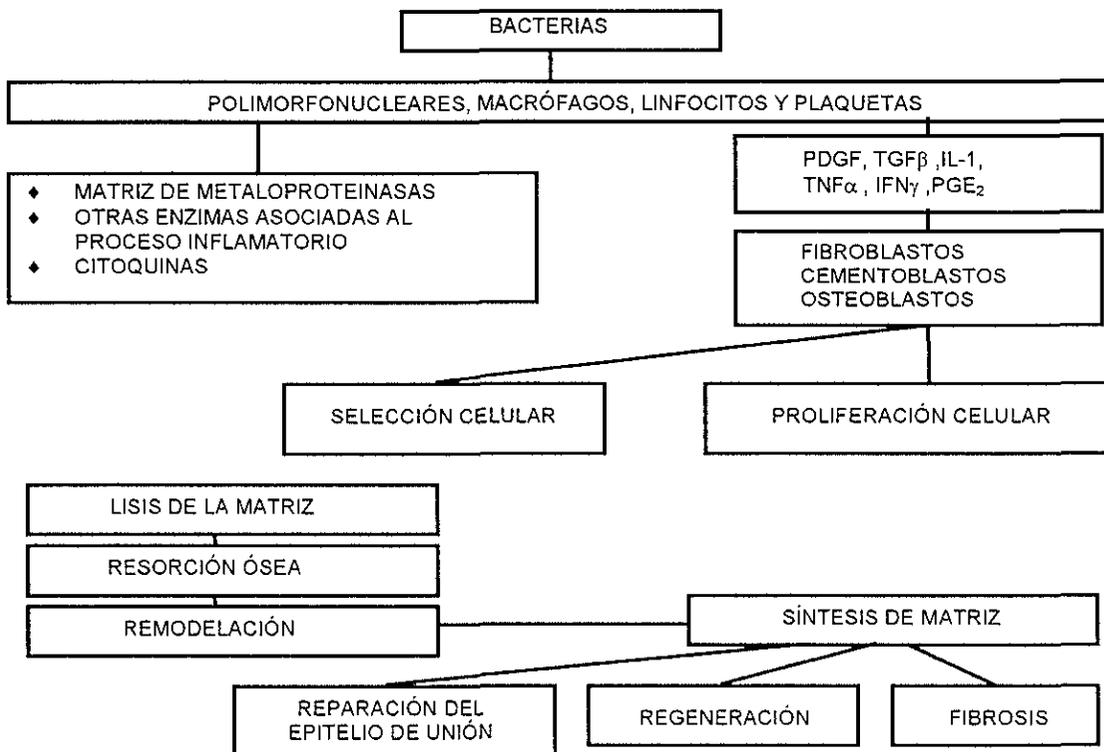
Observaciones recientes, indican que durante el desarrollo, los productos génicos de la vaina epitelial radicular de Hertwig (Slavkin *et al.*, 1988, 1989) y la OPN participan en la diferenciación de cementoblastos y en el depósito de cemento radicular (Arzate, 1994; Arzate *et al.*, 1996; Somerman *et al.*, 1990).

INTERACCIONES CELULARES NECESARIAS PARA LA REGENERACIÓN Y REPARACIÓN

El conjunto de evidencias reportadas, ha dado lugar a la generación de hipótesis sobre las posibles interacciones entre los mediadores polipeptídicos y las células residentes durante el proceso inflamatorio y reparativo producido por la enfermedad periodontal.

Actualmente se piensa que la síntesis de matriz extracelular puede tener como fin la regeneración, la reparación, o bien la fibrosis, y los mecanismos mediante los cuales se supone que estos principios se llevan a efecto fueron descritos por Narayanan y Bartold (1996) y se resumen en la figura 1.

FIGURA 1. POSIBLES INTERACCIONES MEDIADORES-CÉLULAS EN LA REGENERACIÓN PERIODONTAL.



Las metaloproteinasas y otras enzimas hidrolíticas relacionadas con las células inflamatorias, y presumiblemente con los fibroblastos y las células epiteliales, son activadas por sustancias bacterianas ocasionando la degradación de la matriz extracelular.

Las citoquinas, los factores de crecimiento y otras moléculas secretadas por las células inflamatorias, así como los productos de degradación de la matriz afectan la capacidad de crecimiento y síntesis de las células involucradas, lo cual puede dar origen a:

- 1) La selección de los tipos celulares adecuados para llevar a cabo la regeneración de los tejidos afectados.
- 2) La selección de las líneas celulares inadecuadas, lo cual conduce a una reparación del epitelio de unión.
- 3) La selección de líneas celulares inadecuadas lo que produce una fibrosis.

MOLÉCULAS INVOLUCRADAS EN EL PROCESO DE MINERALIZACIÓN

Para poder profundizar en el estudio de los mecanismos específicos de participación de cada una de las moléculas antes mencionadas en el proceso de regeneración y reparación de los tejidos periodontales hay que estudiar sus funciones por separado.

Dado que el presente trabajo se enfoca al esclarecimiento de las propiedades celulares de expresión temporal de moléculas de mineralización, en este apartado se hará mención con mayor especificidad a las proteínas involucradas en el mismo: ALP, OPN, BSP, OC, ONC y CAP.

FOSFATASA ALCALINA (ALP)

Es una enzima de naturaleza glucoprotéica que libera iones fosfato de ésteres de fosfato orgánicos, su peso es de 160 kDa y está conformada por dos subunidades idénticas unidas covalentemente a la membrana plasmática por complejos fosfolipídicos de fosfatidil inositol (Beertsen, 1991).

Ha sido encontrada en osteoblastos, preosteoblastos, osteocitos, células de osteosarcoma y en menores concentraciones en otros linajes celulares (Majeska y Rodan, 1982).

La mayor parte de su actividad se asocia a las áreas relacionadas con la mineralización fundamentalmente en sitios adyacentes a hueso, cartílago calcificado y cemento, lo cual indica que existe una estrecha interrelación entre la producción de iones fosfato en estas superficies y la formación de cemento (Coleman, 1992).

La función de ésta es mayor en el cemento celular que en el cemento acelular y existe una relación entre su actividad y la producción de este último tipo de cemento (Groenveld, 1994).

Con la finalidad de establecer la relación entre la disposición espacial de la ALP Groenveld *et al.* (1995), descubrieron que la distribución de la enzima en CLP es heterogénea, y que existen también diferencias en las concentraciones de los fosfatos en los distintos sitios estudiados.

OSTEOPONTINA (OPN)

Es una proteína sulfatada, glicosilada, rica en ácido siálico, que pesa ~45-75 kDa, y contiene la secuencia RGD, misma que es reconocida por varias integrinas y células que contienen el receptor $\alpha_v\beta_3$, es por ello la que OPN se ha propuesto como un ligando natural de esta integrina (Oldberg *et al.*, 1986; Ruoslahti y Pierschbacher, 1987).

Esta proteína se encuentra en los tejidos epiteliales de los túbulos renales y del útero y se le han otorgado funciones como quimiotáctico y factor de adhesión ya que estimula y conjunta a los macrófagos (Denhart y Guo, 1993), participa como modulador en la resorción de calcio producida por los osteoclastos (Bélanger, 1968), es promotora de la adhesividad y de la regulación de las interacciones matriz-célula (McKee y Nanci, 1994), participa en el control del proceso de mineralización inhibiendo la deposición de cristales de hidroxiapatita, y se halla presente durante la cementogénesis (Boskey, 1995; Heinegard, 1995; Hunter *et al.*, 1994; McNeil, *et al.*, 1995).

SIALOPROTEÍNA ÓSEA (BSP)

Es una molécula de naturaleza glucoprotéica, fosforilada y sulfatada de peso similar a la OPN, que se ha purificado a partir de tejido mineralizado incluyendo dientes humanos (Fisher, 1987; Fujisawa, 1993; Somerman, 1991).

Se ha encontrado en lugares de neoformación de hueso y es la proteína predominante en la matriz ósea antes del depósito de mineral (Schoeder, 1991). Se caracteriza por contener varios fragmentos de ácido poliglutámico en unión con hidroxiapatita, un segmento rico en tirosina en el extremo carboxilo terminal, y una región de adhesión con la secuencia RGD, que se ha identificado como mediadora de la adhesión *in vitro*, y ha mostrado gran especificidad hacia tejido mineralizado (Fisher *et al.*, 1990; Oldberg *et al.*, 1988.; Young *et al.*, 1992).

El receptor de membrana $\alpha_v\beta_3$, asociado a la BSP, es conocido como receptor de vitronectina (Mintz *et al.*, 1993).

En el tejido mineralizado la BSP se considera la proteína reguladora del desarrollo, y está involucrada en el proceso primario de mineralización (Bianco, 1993; Kasagui *et al.*, 1992; Sodek *et al.*, 1992).

De acuerdo a los hallazgos de diversos autores la expresión de BSP en el hueso maduro sufre un decremento, por lo que se ha propuesto que interviene en el proceso de diferenciación celular (Bianco *et al.*, 1991; Chen, 1992; Reedi, 1994).

OSTEOCALCINA (OC)

Es una proteína conjugada de bajo peso molecular (~5-6 kDa), con residuos de ácido gammacarboxiglutámico, que le proporcionan la habilidad para unirse a iones de calcio, promoviendo su absorción hacia la estructura formada por cristales de hidroxiapatita. Se encuentra en forma abundante en las matrices extracelulares de los tejidos mineralizados (Heinegard y Oldberg, 1989; McKee *et al.*, 1992; McNeil, *et al.*, 1994, 1996).

Actúa como quimiotáctico para los monocitos de sangre periférica, células mesenquimatosas y células que participan en el proceso de resorción (Takano-Yamamoto *et al.*, 1994).

Esta proteína puede ser producida por los cementoblastos, responsables de la primera fase de formación tanto del cemento celular como del acelular (Bronckers *et al.*, 1994), pero también es sintetizada por los osteoblastos maduros durante la mineralización (Heinrichs *et al.*, 1995).

OSTEONECTINA (ONC)

Es una proteína que pesa ~35-45 kDa también conocida como SPARC (Secreted sialoprotein acidic rich in cystein domains)(Domenicucci *et al.*, 1988; Engel *et al.*, 1987; Romberg *et al.*, 1985; Termine *et al.*, 1981 a, 1981 b). Originalmente fue aislada de hueso, pero es sintetizada por gran cantidad de células de tejido conectivo (Mason *et al.*, 1986).

Ha sido aislada de las membranas basales, lo cual indica que tiene un rol fundamental en el desarrollo (Mann *et al.*, 1987).

La síntesis de ONC induce la diferenciación del endodermo, y se presenta abundantemente en los tejidos fetales (Nomeura *et al.*, 1988). En los adultos se puede encontrar en hueso, dentina, y en las plaquetas (Stenner *et al.*, 1986), también es producida por los fibroblastos del ligamento periodontal (Tung *et al.*, 1985; Wasi *et al.*, 1984). y ha logrado aislarse del tejido óseo y de la dentina de los incisivos en ratas (Zung *et al.*, 1986).

Presenta afinidad hacia los sitios de enlace con calcio y es capaz de mediar la deposición de hidroxapatita. En asociación con la colágena tipo I ha sido hallada en gran diversidad de tejidos en proceso de morfogénesis o remodelación (Aubin *et al.*, 1993; Gehron *et al.*, 1992; Tremble *et al.*, 1993).

PROTEÍNA DE ADHERENCIA DEL CEMENTO (CAP)

Es una molécula de 55 kDa que parece estar localizada únicamente en el cemento (Arzate *et al.*, 1992), cuya función es promover la migración, adherencia y crecimiento de las CLP y participar en la síntesis de su matriz extracelular (Nakae *et al.*, 1991; Narayanan *et al.*, 1995; Yonemura *et al.*, 1992, 1993), promueve la adherencia de fibroblastos, osteoblastos y células de músculo liso (Olson *et al.*, 1991, Pitaru *et al.*, 1993, 1995).

También ha mostrado capacidad de inducir condrogénesis y mineralización en células mesenquimatosas indiferenciadas de ratón *in vitro* (Arzate *et al.*, 1996).

Recientemente, esta molécula ha sido caracterizada como una proteína que tiene homología con las colágenas tipos I y XII, aunque no presenta reacción cruzada con anticuerpos contra las colágenas tipos I,III,V,XII y XIV o con anticuerpos contra alguna de las proteínas de adherencia conocidas que están presentes en cemento como OPN, FN, BSP y vitronectina (VT) (Wu *et al.*, 1996).

Según reportes de Narayanan *et al.*, (1995), la asociación de CAP y el factor de crecimiento del cemento (CGF) interactúan selectivamente con los diferentes linajes celulares del ligamento periodontal y son capaces de modificar sus actividades biológicas, de tal forma que participan influyendo en la regeneración de los tejidos periodontales.

OTROS FACTORES LOCALES Y SISTÉMICOS

Con lo anteriormente expuesto, queda claro que el metabolismo celular puede ser regulado por una parte por factores locales que son sintetizados por las células como los factores de crecimiento y las prostaglandinas y por otra, por factores sistémicos como esteroides y hormonas (Davies *et al.*, 1984; Saito *et al.*, 1990 a; Samuelsson *et al.*, 1975).

Los factores de crecimiento son polipéptidos que pueden actuar en forma autocrina o paracrina, mientras que las prostaglandinas son solo conocidas como reguladoras locales del remodelado óseo (Needleman *et al.*, 1986; Saito *et al.*, 1990 b).

La actividad biológica principal de estos factores de crecimiento polipeptídicos es funcionar como mediadores químicos naturales, regulando eventos claves en la reparación tisular tales como: proliferación celular, quimiotaxis para producir migración, adherencia, crecimiento y síntesis de la matriz extracelular. Asimismo, pueden participar en la replicación y diferenciación de las células.

De igual modo, son los factores de crecimiento los que proporcionan los enlaces específicos para los receptores en la superficie de las células (Committee on Research Science and Therapy of the American Academy of Periodontology, 1996).

Diversos mediadores como: el factor de crecimiento epidermal (EGF), los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF-I, IGF-II), los factores de crecimiento fibroblástico (FGFa, FGFb), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF β) han sido encontrados asociados a la síntesis de matriz orgánica del cemento radicular (D'Errico *et al.*, 1995; Lynch *et al.*, 1989).

Todas las moléculas mencionadas con anterioridad influyen en las actividades biológicas de células de tejido conectivo, pero no son proteínas específicas del cemento (McAllister *et al.*, 1990; Miki *et al.*, 1987; Somerman *et al.*, 1987 a, 1987 b, 1989, 1991).

En conclusión, tanto el crecimiento como la diferenciación celular son procesos complejos regulados por gran cantidad de factores que se expresan en una secuencia temporal específica y cuya participación en el metabolismo de las células puede modificar la replicación o influir en la diferenciación de las mismas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad se sabe que el proceso de mineralización es efectuado por diversos tipos celulares, fundamentalmente por los osteoblastos y los cementoblastos, sin embargo aún permanecen sin respuesta muchas interrogantes:

¿En qué momento las células derivadas de un cementoblastoma humano expresan las moléculas que inducen la producción de matriz mineral?

¿Las moléculas asociadas a la formación de tejido mineralizado se expresan en una secuencia temporal diferente en los cementoblastos, en los osteoblastos y en las células del ligamento periodontal?

¿Participan estas como moléculas reguladoras del proceso de mineralización?

JUSTIFICACIÓN

Gracias al desarrollo de investigaciones precedentes se ha generado y expandido una línea celular a partir de un cementoblastoma humano.

Los resultados preliminares obtenidos a partir de estas células han demostrado que tienen la capacidad de producir nódulos mineralizados *in vitro* y la formación de éstos se considera el resultado de células diferenciadas con capacidad "osteogénica".

La determinación de moléculas involucradas en el proceso de mineralización abre luz por vez primera en la identificación de las actividades que éstas tienen en las células derivadas de un cementoblastoma, en los osteoblastos y en las células de ligamento periodontal, así como en el tiempo en el que se induce su transcripción para la formación de matriz mineral en cada linaje celular.

Al mismo tiempo, esto facilita la comprensión del proceso de la cementogénesis *in vitro*; y por otra parte, se contribuye al entendimiento de la regeneración y reparación de los tejidos periodontales perdidos por la periodontitis.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

H₁: Las células derivadas de un cementoblastoma humano expresan el fenotipo del cemento radicular, y su proceso de mineralización *in vitro* es regulado por moléculas asociadas *p.ej.* osteopontina (OPN), osteonectina (ONC), sialoproteína ósea (BSP) y proteína de adherencia del cemento (CAP); pero en secuencia temporal diferente a como se lleva a cabo en los osteoblastos y las células de ligamento periodontal *in vitro*.

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES INDEPENDIENTES

- * Línea celular derivada de un cementoblastoma humano (CEM)
- * Línea celular osteoblástica derivada de hueso alveolar humano (OB)
- * Línea celular derivada de ligamento periodontal humano (CLP)

VARIABLES DEPENDIENTES

- * Osteopontina (OPN)
- * Osteonectina (ONC)
- * Sialoproteína ósea (BSP)
- * Proteína de adherencia del cemento (CAP)

ESCALA DE MEDICIÓN DE VARIABLES

Todas las variables dependientes serán medidas en escala nominal, ordinal, de intervalo y de razón.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

* Determinar la presencia de las moléculas reguladoras del proceso de cementogénesis *in vitro*, mediante el estudio de las células derivadas de un cementoblastoma humano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

* Cuantificar la formación de nódulos mineralizados en las células derivadas de un cementoblastoma humano, los osteoblastos y las células de ligamento periodontal *in vitro*.

* Determinar la expresión temporal de las moléculas asociadas a la formación de tejido mineralizado en las células derivadas de un cementoblastoma humano y comparar cómo se lleva a cabo este proceso, entre este linaje celular, las células osteoblásticas y las de ligamento periodontal *in vitro*.

METODOLOGÍA

El equipo, el material y los reactivos utilizados para la realización de esta investigación, fueron obtenidos del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología.

La preparación de las soluciones requeridas en los experimentos se llevó a cabo de acuerdo a las fórmulas que se presentan en la sección de anexos.

Los anticuerpos utilizados para los ensayos de inmunohistoquímica y de inmunotransferencia se mencionan a continuación:

Como primeros anticuerpos se utilizaron IgG de conejo anti-OPN (LF123) y anti-BSP (LF100) generosamente donados por el Dr. Larry Fisher de la Universidad de Harvard en Boston, también fueron utilizados anti-ONC de Sigma Chemical Inc, y el anticuerpo anti-CAP producido en el Laboratorio de Biología celular y molecular.

Como segundos reactivos se utilizaron anticuerpos anti IgG de conejo conjugado con isotiocinato de fluoresceína y anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa, ambos de Sigma Chemical Inc.

METODOLOGÍA DEL CULTIVO CELULAR

Las células derivadas del cementoblastoma humano, así como las células osteoblásticas y las de ligamento periodontal fueron obtenidas de un paciente masculino de 28 años que cursaba con dicha patología y al que le fue realizada la recesión quirúrgica correspondiente.

Los linajes celulares fueron obtenidos cultivando explantes de aproximadamente 1 mm² durante 2 a 3 semanas hasta que llegaron a confluencia, después de lo cual los cultivos fueron tripsinizados con 0.25% de tripsina-EDTA porcina (Gibco BRL) y resembrados.

El medio de cultivo consistió en medio DMEM suplementado con 10% de SFB y una solución de antibióticos que conformada con: penicilina (100UI/ml), estreptomycin (100 µg/ml), 100 mM de aminoácidos no esenciales y 100 mM de piruvato de sodio (Sigma Chemical Inc.).

Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C, en una atmósfera de CO₂ al 5% y humedad al 100%.

METODOLOGÍA DE LA FORMACIÓN DE NÓDULOS MINERALIZADOS

Para llevar a cabo este experimento las células se sembraron en placas para Elisa con 1,800 cél/cm², y al medio de cultivo le fueron adicionados:

* 10 mM de β-glicerofosfato, 50 µg/ml de ácido ascórbico y (10⁻⁷M) de dexametasona.

El grupo control se alimentó con SFB.

Los experimentos fueron realizados por triplicado durante 7, 14 y 21 días, después de los cuales se fijaron con 50µl de formaldehído (3.5 %) y se tiñieron con Alizarina roja S pH 4.1, para finalmente ser contados por medio de microscopía de bajo poder según el método de Bellows (Bellows *et al.*, 1986) y el método de histomorfometría de Recker (Recker y Frost, 1984).

MÉTODO DE BELLOWS

Para obtener los resultados por el método de Bellows *et al.*, (1986) fueron seleccionados con microscopio óptico y la ayuda de una rejilla milimetrada de 10 mm² cinco campos al azar por pozo sembrado, en cada campo seleccionado se contaba el número de nódulos formados, y de esta cuantificación se obtenía un promedio. Como las siembras fueron realizadas por triplicado con los datos arrojados se obtuvo el cuadro 1 que se presenta en el apéndice.

MÉTODO DE HISTOMORFOMETRÍA

Según el método de histomorfometría de Recker y Frost (1984), la superficie de los pozos fue analizada con el mismo microscopio y la rejilla antes mencionada, y en cada caso fueron aplicadas las siguientes fórmulas:

$$\begin{aligned} A_T \times P_T \times d^2 \times 25d^2 \\ L_T \times P_T \times d \times 25d \\ a=d^2 \end{aligned}$$

En donde:

P_T = Número total de puntos de interés

L_T = Longitud total de líneas en (mm)

a = Área asociada con cada punto en (mm²)

A_T = Total del área evaluada en (mm²)

d = Distancia entre los puntos en la superficie del objeto

Con los datos obtenidos se aplicaba la última fórmula:

$$AA_{(X)} \text{ mm}^2 = \sum h_{x(t)} \times d^2$$

En donde:

$AA_{(X)}$ = Área total de tejido examinado en (mm²)

$\sum h_{x(t)}$ = Sumatoria de los nódulos cuantificados en el total de la superficie

d^2 = distancia existente entre los nódulos

METODOLOGÍA DE LA TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Los cultivos fueron alimentados con 10 mM de β -glicerofosfato, 50 μ g/ml de ácido ascórbico y (10^{-7} M) de dexametasona, durante 7, 14 y 21 días, después de los cuales se les retiró el medio, se tripsinizaron de la forma antes descrita y se sembraron en cubreobjetos dentro de cajas de petri de 60X15 mm. 72 horas más tarde las células se fijaron con formaldehído al 3.5% durante 10 minutos y se lavaron con PBS por 5 minutos en agitación continua. Una vez concluido este proceso se retiró el PBS, y se congelaron a -20°C hasta su uso.

Cuando todas las siembras fueron reunidas se realizó la inmunohistoquímica de la siguiente manera:

1) Se descongelaron las muestras y se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS a temperatura ambiente en agitación continua. Se preparó PBS con albúmina al 1% y se agregó a esta solución el primer anticuerpo en una concentración 1:100, esta mezcla fue centrifugada durante 1 minuto a 14,000 rpm e inmediatamente colocada a 4°C .

2) Se retiró el PBS de las cajas y se secó el excedente de las muestras, para posteriormente colocarle a cada una 50 μ l de anticuerpo. Todas las cajas fueron colocadas dentro de una cámara húmeda y de este modo el anticuerpo se incubó durante hora y media a temperatura ambiente.

Cuando este tiempo transcurrió las muestras fueron nuevamente lavadas 3 veces por 5 minutos con PBS.

3) El segundo anticuerpo se preparó con PBS y con FITC conjugado anti IgG de conejo ya que los anticuerpos primarios fueron policlonales y producidos en conejo. La concentración utilizada fue 1:50, y se centrifugó 1 minuto a 14,000 rpm. En este caso en particular, además de ser colocado a 4°C , se protegió de la luz, ya que este anticuerpo es fotosensible.

Nuevamente a las muestras se les retiró el PBS, se les adicionaron 50µl de este segundo anticuerpo y se incubaron durante 1 hora en una cámara húmeda, a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

4) Finalmente fueron lavadas 3 veces por 5 minutos con PBS, 3 veces con PBS y Tritón 20X al 0.1% y 3 veces más con PBS solamente. Se retiró el exceso de amortiguador y cada siembra fue montada en un portaobjetos con 20µl de DABCO.

Las inmunotinciones se observaron a 20X en microscopía de epifluorescencia a una longitud de excitación de 480 nm y a una longitud de emisión de 530 nm (Axiophot- Carl Zeiss).

METODOLOGÍA DE LA INMUNOTRANSFERENCIA

Los cultivos celulares para poder realizar los experimentos de inmunotransferencia se llevaron a cabo en cajas de 75 mm², fueron alimentados con 10 mM de β-glicerofosfato, 50 µg/ml de ácido ascórbico y (10⁻⁷M) de dexametasona, durante 7, 14 y 21 días, después de los cuales se tripsinizaron con 0.25% de tripsina-EDTA porcina (Gibco BRL), se neutralizaron con 0.25% de medio DMEM suplementado y se centrifugaron durante 3 minutos a 1,800 rpm obteniendo así el pellet de células, el cual fue lavado con 5 ml de PBS y centrifugado nuevamente a la misma velocidad, 3 veces durante 5 minutos. Cuando este proceso se completó las muestras de los extractos celulares fueron congeladas a -70°C, hasta su uso.

El resto del procedimiento para llevar a cabo la inmunotransferencia se efectuó en seis pasos:

1) Preparación de la muestra:

Los extractos celulares se resuspendieron en 100 µl de PBS y fueron sonicados durante 30 segundos en un sonicador (Lab line Instruments) para romper la membrana celular y así liberar las proteínas contenidas en las células. A cada muestra le fueron adicionados 100µl de amortiguador de proteínas (SDS) y se congelaron de esta manera a -20°C, hasta su uso.

2) Resolución de la muestra en el gel de electroforesis:

Los geles de poliacrilamida se elaboraron en una concentración del 12.5%, para todos los anticuerpos. Las muestras así como los marcadores de pesos moleculares (Sigma Chemical Inc.) fueron calentados a 100°C durante 5 minutos y se centrifugaron durante el mismo tiempo previamente a su colocación en el gel.

La electroforesis se corrió a 100 V utilizando una fuente de poder (Gibco BRL modelo 125 Life Technologies Co.) hasta que el frente de corrida llegó a la parte inferior del gel.

3) Transferencia de los polipéptidos a la membrana de nitrocelulosa:

La transferencia a la membrana de nitrocelulosa fue llevada a cabo por el método de elución electroforética (Towbin *et al.*, 1979), para lo cual la misma se cortó del tamaño del gel, se remojó en amortiguador de transferencia, y tanto el gel como la membrana fueron colocados como un emparedado entre papeles absorbentes teniendo cuidado de no dejar burbujas. Una vez hecho lo anterior, se colocó el conjunto en una cámara húmeda (Mini Bio-Rad) con el mismo amortiguador, colocando la membrana siempre hacia el polo positivo. Este proceso se llevó a cabo durante una hora a 100 V.

Cuando hubo concluido este tiempo, el gel fue teñido con Coomasie, y la membrana teñida con Ponceau S con la finalidad de revisar la transferencia, para posteriormente ser lavada, eliminando así la tinción.

4) Bloqueo de los sitios no específicos en la membrana:

Debido a que el blot debe ser procesado para la detección de antígenos específicos, es esencial bloquear la membrana con soluciones detergentes para prevenir la adsorción de los reactivos inmunológicos.

La solución de bloqueo (blotto) fue elaborada siguiendo el método de Johnson *et al.*, (1984). El bloqueo se hizo después de que la membrana se lavó varias veces con agua desionizada. La solución de bloqueo fue colocada y se dejó incubar en agitación continua por 1 hora a temperatura ambiente.

5) Adición del anticuerpo:

La detección del antígeno en la membrana se llevó a cabo por el enlace de los anticuerpos a las proteínas inmovilizadas en ésta dentro de bolsas selladas.

Las concentraciones utilizadas para cada anticuerpo fueron de 1:1000. El primer anticuerpo se incubó durante hora y media en agitación continua a temperatura ambiente. Después la membrana fue sacada de la bolsa y lavada con blotto 2 veces durante 15 minutos.

El segundo anticuerpo fue colocado siguiendo el mismo proceso que el primero y en la misma concentración. Este anticuerpo se incubó durante 1 hora en agitación continua a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido este tiempo se lavó la membrana con blotto 2 veces durante 15 minutos, 1 vez durante el mismo tiempo en PBS, y 2 veces por 2 minutos en agua desionizada.

6) Detección

El revelado de las bandas específicas se realizó por la precipitación "*in situ*" de un cromógeno (diaminobencidina 15mM), ante una reacción enzimática entre el anticuerpo conjugado con peroxidasa y el sustrato (H₂O₂ 30mM)). La reacción era detenida con el lavado de la membrana con agua desionizada y PBS.

RECOLECCIÓN DE DATOS, ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Con el fin de poder evaluar la información, la recolección de datos se llevó a cabo en diferentes formatos (que se presentan en el apéndice), elaborados con la finalidad de facilitar el manejo de la misma.

Los datos fueron trabajados con el programa Sigma Stat 2.0, las gráficas fueron realizadas con el programa Sigma Plot 3.0, ambos del paquete estadístico Jandel Scientific.

Para poder determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos celulares y los distintos tratamientos aplicados, se utilizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) de uno y dos factores.

RESULTADOS

CUANTIFICACIÓN DE NÓDULOS MINERALES

El concentrado de datos obtenidos se presenta en el cuadro 2 de la sección de apéndice.

Los resultados obtenidos con cada uno de los tratamientos aplicados en los dos métodos (Bellows y Recker), se presentan en las gráficas que corresponden a las figuras 2 y 3, éstas fueron elaboradas con los valores de las medias aritméticas, y el error estándar.

En cuanto a la capacidad para producir matriz mineral se refiere, el análisis de las gráficas presentadas muestra resultados muy similares tanto de las células derivadas del cementoblastoma humano como de los osteoblastos, y una menor habilidad para mineralizar de las células de ligamento periodontal.

Es importante sin embargo destacar, que con todos los tratamientos casi siempre la línea celular de cemento tuvo la facultad de mineralizar más rápidamente que la línea de osteoblastos, sobre todo entre los días 14 y 21.

En las tres líneas celulares fue determinante la aplicación de los diferentes medios de cultivo para observar diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de matriz mineralizada producida por las células.

En todos los casos se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, a los diferentes tiempos ($P < 0.001$ de acuerdo a ANOVA de uno y dos factores y de $F = 46.928$ según la prueba de Fisher).

Con lo anteriormente expuesto se demuestra que la alimentación de las células con β -glicreofosfato, ácido ascórbico y dexametasona, resulta ser el tratamiento más eficaz, y se sugiere que este medio de cultivo proporciona a las células los elementos necesarios para inducir la síntesis de matriz mineral, facilitando así que este proceso se lleve a cabo.

Una vez más las diferencias fueron altamente significativas en los tres linajes celulares, pero el número de nódulos formados y el área en la que éstos se desarrollaron resultó ser más importante en el linaje celular derivado del cementoblastoma humano.

FORMACIÓN DE NÓDULOS

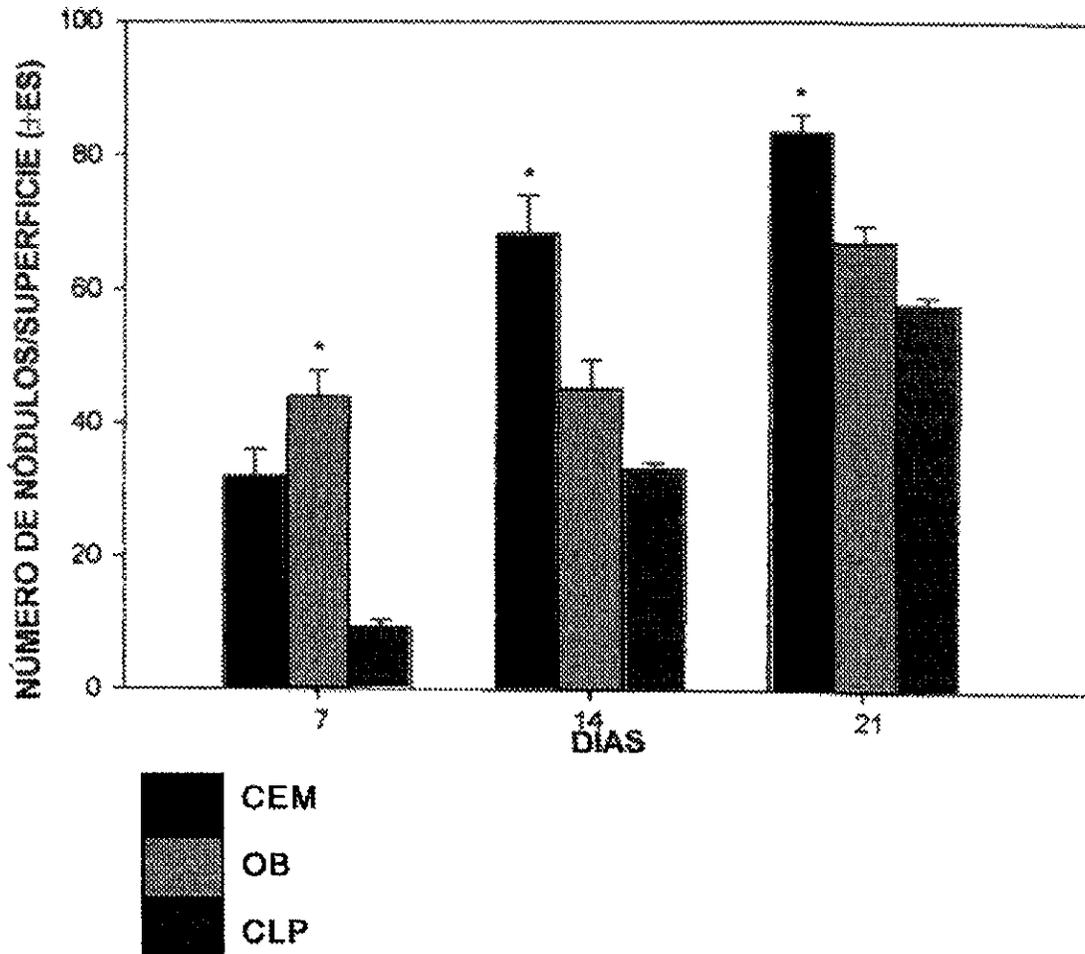
Las células osteoblásticas a los 7 días de cultivo tenían un incremento en la formación de nódulos minerales del $27.2\pm 2.6\%$ con respecto a las células derivadas del cementoblastoma y $78.8\pm 3.8\%$ comparándolas con las CLP.

A los 14 días de cultivo las células derivadas del cementoblastoma mostraron un incremento del $33.6\pm 1.7\%$ y $51.21\pm 1.3\%$ sobre los osteoblastos y las CLP respectivamente. A los 21 días de cultivo las células derivadas del cementoblastoma mantenían un rango más elevado de formación de nódulos en relación a los osteoblastos ($19.52\pm 0.9\%$) y las CLP ($30.67\pm 2.6\%$) (Fig. 2).

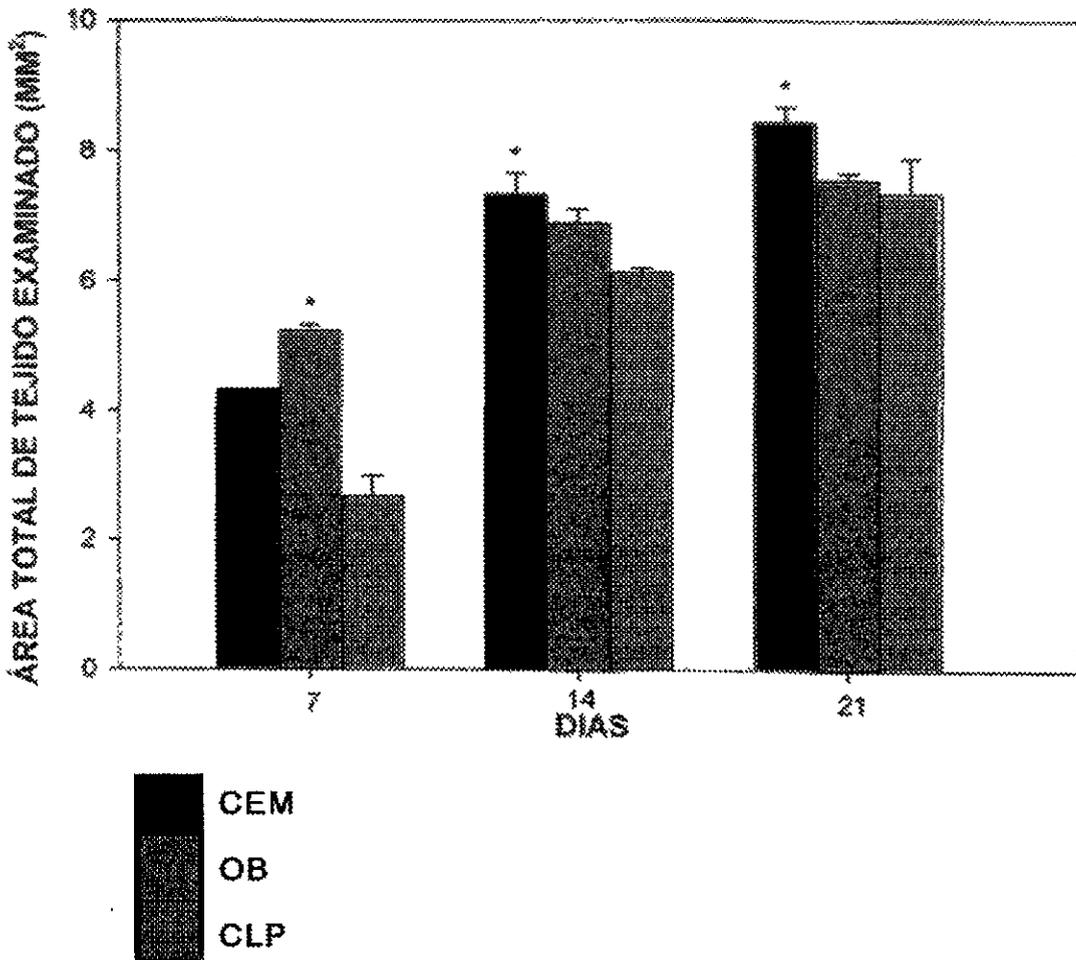
ÁREA TOTAL DE TEJIDO MINERALIZADO

La formación de tejido mineralizado que se encontró a los 7 días de cultivo en los osteoblastos era mayor con $17.04\pm 0.9\%$ y $48.90\pm 1.3\%$ que en las células derivadas del cementoblastoma humano y las CLP respectivamente. A los 14 días de cultivo las células derivadas del cementoblastoma mostraron $6.0\pm 0.3\%$ y $16.29\pm 0.4\%$ de incremento en el área de formación de tejido mineralizado sobre las células osteoblásticas y las CLP respectivamente. A los 21 días de cultivo $10.5\pm 0.2\%$ y $13.1\pm 0.2\%$ de incremento en la formación de matriz mineral fue observada en las células derivadas del cementoblastoma sobre los osteoblastos y las CLP (Fig. 3).

**FIGURA 2:
CUANTIFICACIÓN DE NÓDULOS MINERALES POR EL MÉTODO
DE BELLOWS**



**FIGURA 3:
CUANTIFICACIÓN DE NÓDULOS MINERALES POR EL MÉTODO
DE HISTOMORFOMETRÍA DE RECKER Y FROST.**



INMUNOHISTOQUÍMICA

Los resultados de los experimentos de inmunohistoquímica se presentan en las figuras 4 a 7, éstos fueron obtenidos mediante el análisis de las reacciones antígeno-anticuerpo que se determinaron cuantificando el total de células en cada imagen obtenida del microscopio de epifluorescencia (Axiophot, Carl Zeiss) a 20X, y seleccionando de la misma las células con reacción positiva y negativa. Este proceso se llevó a cabo por triplicado con cada imagen y con éstos datos se obtuvo la media aritmética \pm el error estándar, valores en los que se expresan los resultados. Como control se utilizó suero no-inmune de conejo si el primer anticuerpo era negativo (Fig. 4 D,H y L).

Las células derivadas del cementoblastoma humano a los 7 y 14 días de cultivo presentaron una inmunorreacción altamente positiva al anticuerpo anti-CAP ($94\pm 3\%$ y $98\pm 4\%$ respectivamente). La CAP se encontró distribuida en el citoplasma y en forma de procesos similares a fibrillas (Fig. 4 A y B). A los 21 días de cultivo las células habían formado aglomerados y la reacción antígeno-anticuerpo era más intensa. Estas formaciones se presentan tanto la matriz extracelular como las células (Fig. 4 C).

Muy pocas células de ligamento periodontal a los 7 días de cultivo resultaron inmunoteñidas levemente con el anticuerpo anti-CAP ($3\pm 0.2\%$) y la reacción positiva fue localizada en la membrana celular (Fig. 4 E). A los 14 días de cultivo el número de células que expresaron CAP se incrementó a $4.3\pm 0.2\%$ y algunas células de estas subpoblaciones mostraron una reacción más intensa al anticuerpo anti-CAP (Fig. 4 F). A los 21 días de cultivo las células de CLP mostraron un incremento del $6.8\pm 1.1\%$. Un teñido de moderado a intenso se observó y localizó en la membrana celular y en estructuras similares a fibras (Fig. 4 G).

Las células osteoblásticas a los 7 y a los 14 días de cultivo se tiñieron levemente en algunas subpoblaciones ($1.6\pm 0.2\%$ y $2.5\pm 0.4\%$) (Fig. 4 I y 4 J). A los 21 días de cultivo las células se presentaron en clones que resultaron muy positivos al anticuerpo anti-CAP ($3.1\pm 0.12\%$) (Fig. 4 K).

La expresión de la OPN en las células derivadas del cementoblastoma humano se mostraron fuertemente inmunoteñidas a los 7 y a los 14 días de cultivo, cuando las otras poblaciones celulares se tiñieron levemente o resultaron negativas ($42\pm 4.7\%$ y $46\pm 3.1\%$ respectivamente) (Fig. 5 A y B). La inmunorreacción fue localizada en el citoplasma celular. Una intensidad moderada de la inmunotinción aparentemente se mantuvo a los 21 días de cultivo ($38\pm 2.9\%$) (Fig. 5 C). Pocas CLP se tiñieron intensamente en los cultivos a los 7 y 14 días ($12.1\pm 0.1\%$ y $12.6\pm 0.02\%$ respectivamente) y la tinción fue localizada en el citoplasma (Fig. 5 E y F). A los 21 días había un gran número de células organizadas en estructuras similares a nódulos e intensamente teñidas para la OPN ($26.3\pm 0.3\%$) (Fig. 5 G).

Las células osteoblásticas a los 7 días de cultivo mostraron un teñido más leve que el observado en las CLP y las células derivadas del cementoblastoma humano ($8\pm 0.3\%$) (Fig. 5 I). Sin embargo, a los 14 y 21 días la expresión de OPN se incrementó en las células osteoblásticas (66 ± 3.2 y $82\pm 3.5\%$ respectivamente). La expresión de OPN se localizó tanto en la matriz extracelular como en las células (Fig. 5 J y K). Los controles con suero no-inmune de conejo fueron negativos (Fig. 5 D, H, y L).

La expresión de BSP en las células derivadas del cementoblastoma humano se localizó en el citoplasma celular. Se presentó una tinción moderada en todos los cultivos estudiados. El número de células que inmunorreaccionaron a la BSP se mostró en rangos similares a los 7, 14 y 21 días. ($52\pm 2.6\%$, $56\pm 3.2\%$ y $51\pm 3.6\%$ respectivamente) (Fig. 6 A, B y C).

Las CLP mostraron una inmunotinción de intensidad moderada en pocas células a los 7 y 14 días ($4.5\pm 1.2\%$ y $4.0\pm 0.6\%$ respectivamente) (Fig. 6 D y F). La reacción fue localizada en el citoplasma celular. A los 21 días los cultivos positivos a la BSP se incrementaron en número ($38\pm 2\%$), sin embargo no se encontró evidencia de tinción en la matriz extracelular (Fig. 6 G).

Las células osteoblásticas a los 7 días de cultivo mostraron una intensa inmunotinción a la BSP ($97\pm 3.5\%$), distribuida en el citoplasma celular (Fig. 6 I). A los 14 días de cultivo, las células se organizaron en estructuras similares a nódulos que expresaban BSP con una intensidad de moderada a leve entre las células localizadas en la superficie y algunas ubicadas debajo ($45\pm 3.4\%$) (Fig. 4 J). A los 21 días la masa de células teñidas se encontraba mejor organizada. El número de éstas se incrementó ($68\pm 4.2\%$) y la tinción aunque moderada era mas uniforme. (Fig. 6 K). Los controles con suero no-inmune de conejo fueron negativos (Fig. 6 D,H,y L).

Un bajo número de células derivadas del cementoblastoma expresaron levemente ONC a los 7 días de cultivo ($5.2\pm 0.6\%$) (Fig. 7 A), y la reacción fue localizada en la membrana celular. A los 14 días un patrón similar de teñido fue observado (Fig. 7 B), a los 21 días se presentó un incremento en la intensidad de la inmunorreacción tanto en el número de células positivas a la ONC como en la matriz extracelular depositada por las mismas. ($12.4\pm 1.5\%$) (Fig. 7 C).

Las CLP presentaron una tinción moderada a los 7 días de cultivo ($32.3\pm 2.6\%$) (Fig. 7 E). A los 14 días de cultivo estas células evidenciaron un teñido más intenso que a los 7 días, pero el número celular también se incrementó ($43.6\pm 3.5\%$) (Fig. 7 F).

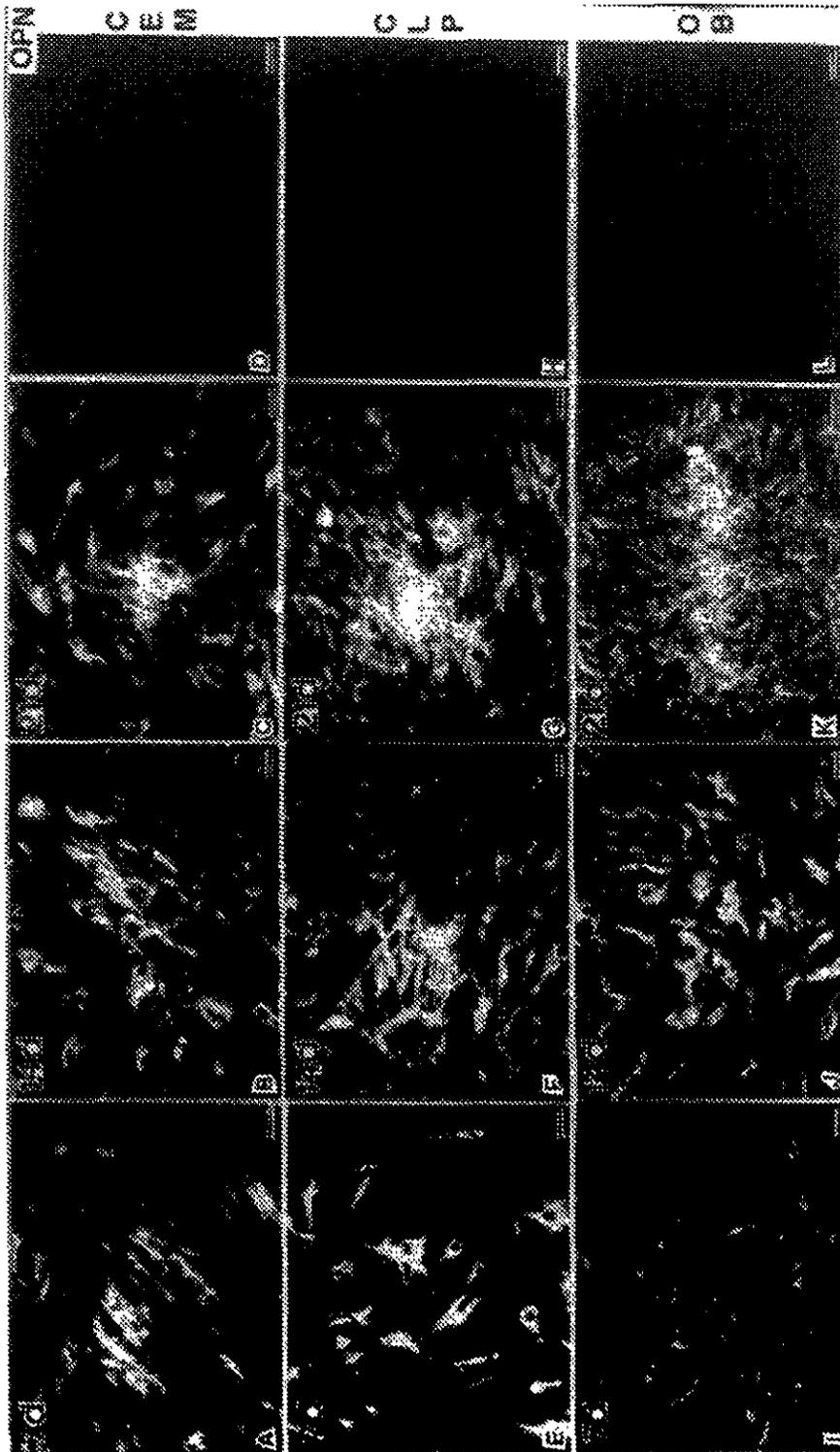


FIGURA 5:

INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA OSTEOPONTINA
(OPN)

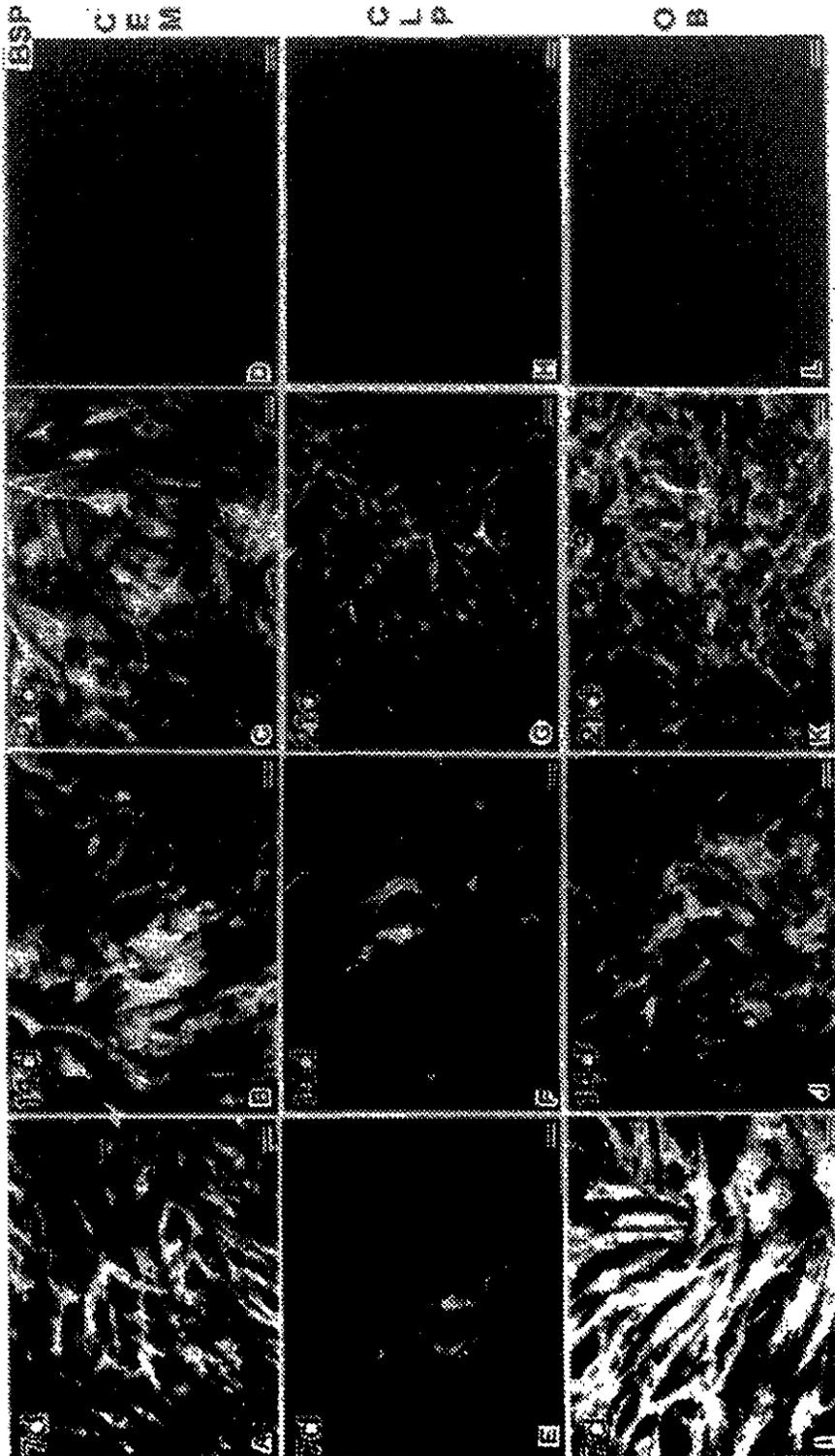


FIGURA 6:

INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA SIALOPROTEÍNA ÓSEA
(BSP)

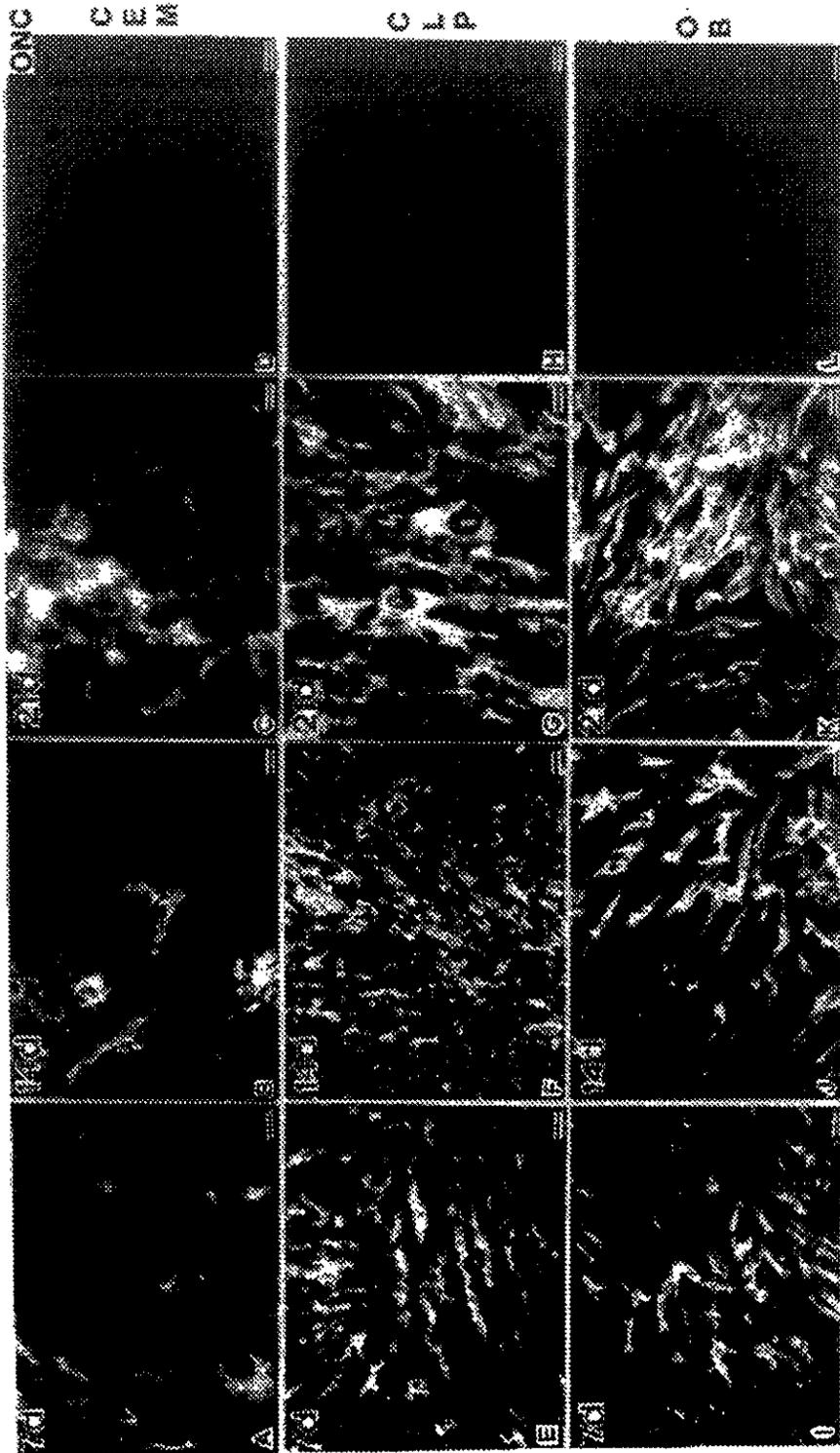


FIGURA 7:

INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA OSTEONECTINA
(ONC)

Las células que reaccionaron a la ONC a los 21 días representaban $39\pm 2.6\%$ de la población celular contada. (Fig. 7 G). La tinción para ONC se presentó en el citoplasma celular, la matriz extracelular y en el núcleo de las células.

Las células osteoblásticas presentaron en todos los cultivos estudiados una fuerte reacción con el anticuerpo anti-ONC. La reacción se localizó en el citoplasma celular y a los 21 días existía un leve tenido de la matriz extracelular depositada por estas células. Estos resultados muestran que algunas subpoblaciones celulares no se tiñieron o reaccionaron en forma positiva ($13.6\pm 2.3\%$, $15.2\pm 1.1\%$, $56.4\pm 2.1\%$ respectivamente para 7, 14 y 21 días de cultivo).

INMUNOTRANSFERENCIA

En lo referente a los experimentos de inmunotransferencia la expresión de las diferentes moléculas involucradas en el proceso de mineralización se evaluó a los 7, 14 y 21 días en los tres linajes celulares humanos.

Los resultados se analizaron de acuerdo a la intensidad del marcaje de color café que indicaba la expresión de cada una de las proteínas estudiadas a los distintos tiempos de observación.

La OPN se identificó con una banda intensamente teñida de 44kDa y una banda más tenue de 55kDa con mayor intensidad tanto en los osteoblastos como en las células derivadas del cementoblastoma en forma mas temprana y hacia los 21 días la expresión de la proteína aumentó. La intensidad de la expresión fue igual en éstos tipos celulares. Las CLP mostraron una banda muy leve de 44kDa identificada en todos los tiempos de cultivo estudiados. (Fig. 8).

En cuanto a la BSP se refiere, aunque fue identificada en los tres linajes celulares en todos los tiempos de observación, la expresión temporal de la misma varió de un linaje celular a otro. En los osteoblastos el marcaje obtenido fue en aumento conforme transcurrieron los días. Se hizo evidente a los 7, 14 y 21 días de cultivo, pero la intensidad se incrementó a los 21 días. Sin embargo, con las células derivadas del cementoblastoma la proteína se expresó en los estados iniciales de mineralización (7 días) y se hizo manifiesta en mayor proporción a los 14 días. A los 21 días de cultivo expresaron más intensamente la BSP (68kDa) y una doble banda de alrededor de 44kDa se hizo evidente. Las CLP mostraron un patrón similar de expresión a los 7 y 14 días, mas intenso que en los osteoblastos, pero la expresión de la proteína decreció a los 21 días. (Fig. 9).

La ONC se expresó en las células derivadas del cementoblastoma a los 7 días de cultivo como una banda bien definida de 44 kDa. A los 14 días se expresó, ligeramente, sin embargo a los 21 días de cultivo casi no se expresó la banda. Los hallazgos en los osteoblastos fueron escasos a los 7 días y similares entre 14 y 21 días. Las CLP expresaron ONC a los 7 y 14 días de cultivo y la intensidad de la banda se incrementó hacia los 21 días. (Fig. 10).

Finalmente la CAP se expresó en todos los tiempos de cultivo en las células derivadas del cementoblastoma y las CLP como bandas de 55 y 50kDa. En las células derivadas del cementoblastoma la expresión era más intensa a los 21 días que a los 7 y 14 días de cultivo. Las CLP mostraron un marcaje mas intenso a los 7 y 14 días y a los 21 días la intensidad de la marca decrecía en intensidad. En los osteoblastos se presentó una banda doble muy tenue a los 7 días de cultivo, a los 14 no se expresó la CAP y a los 21 se presentó se expresó en forma similar que a los 7 días una doble banda escasamente definida de 55 y 50kDa. (Fig. 11).

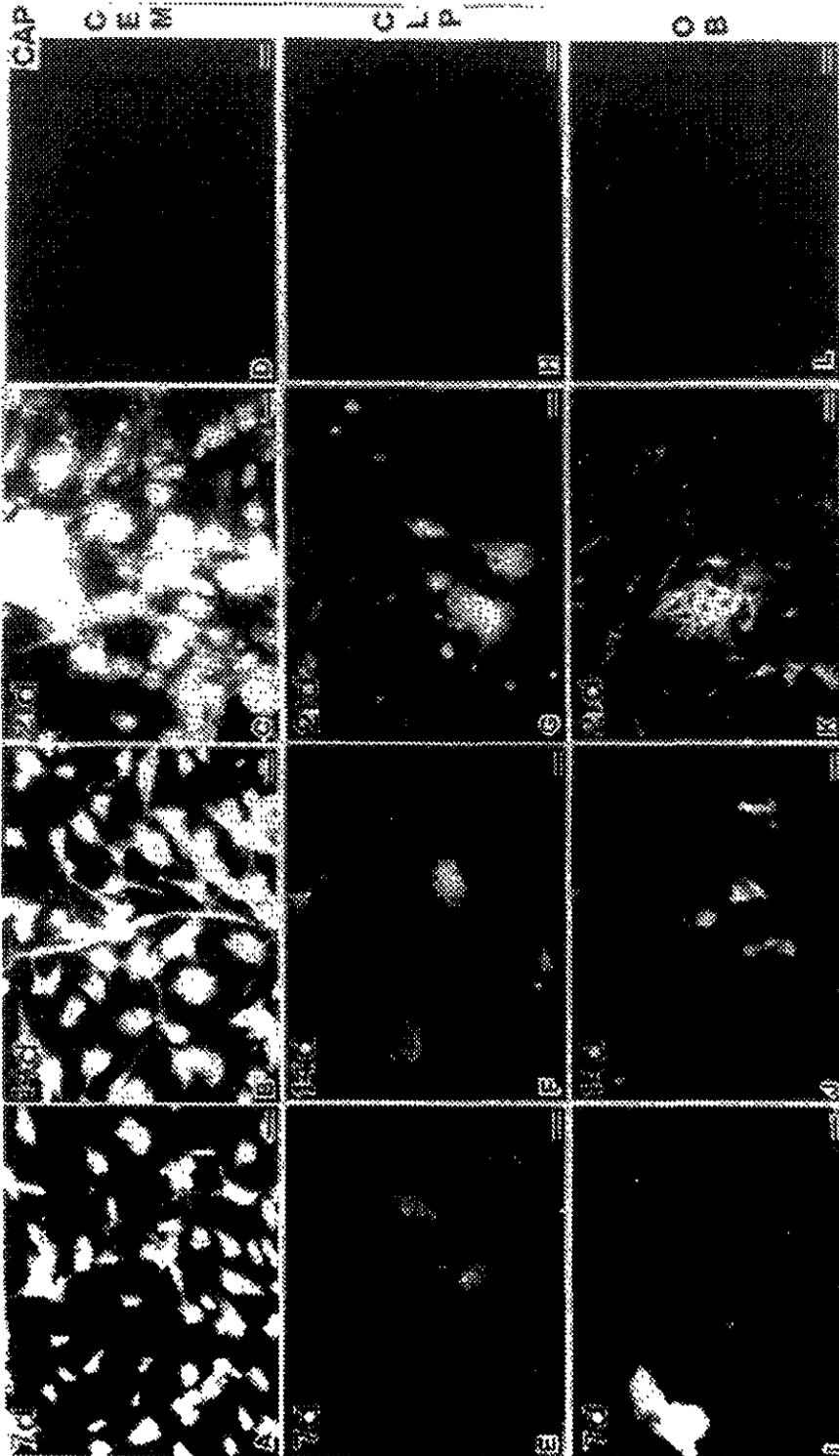
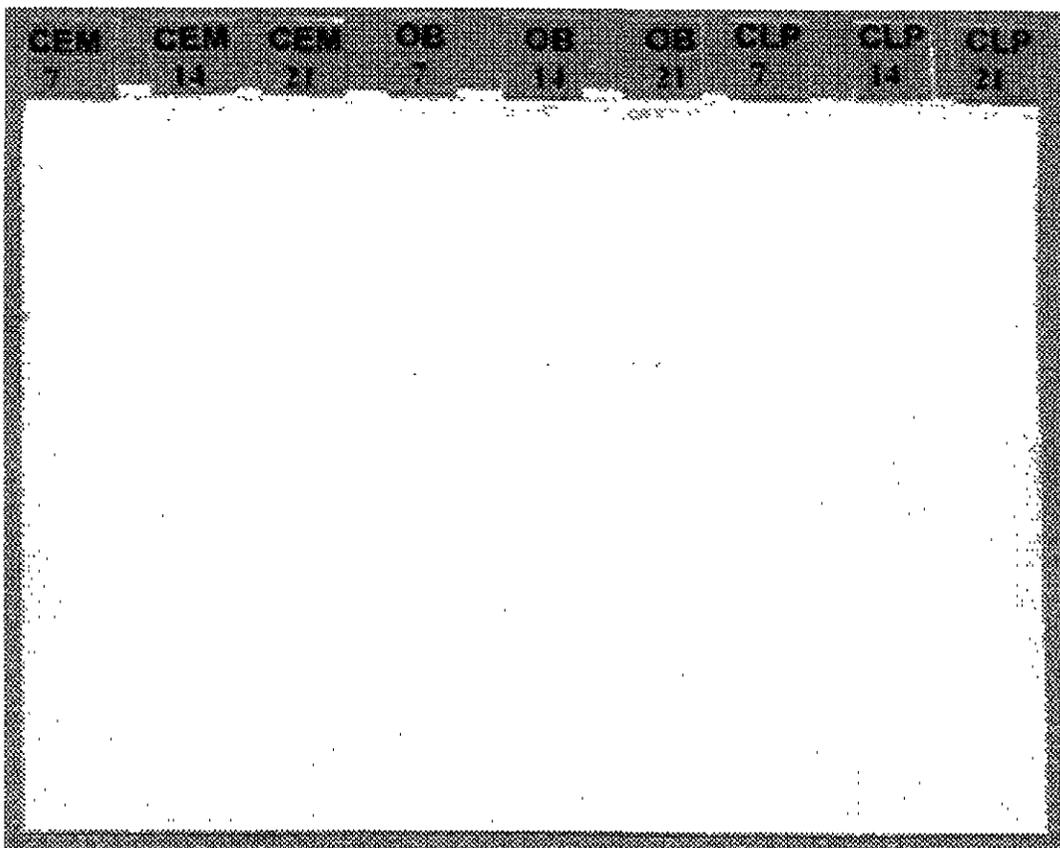
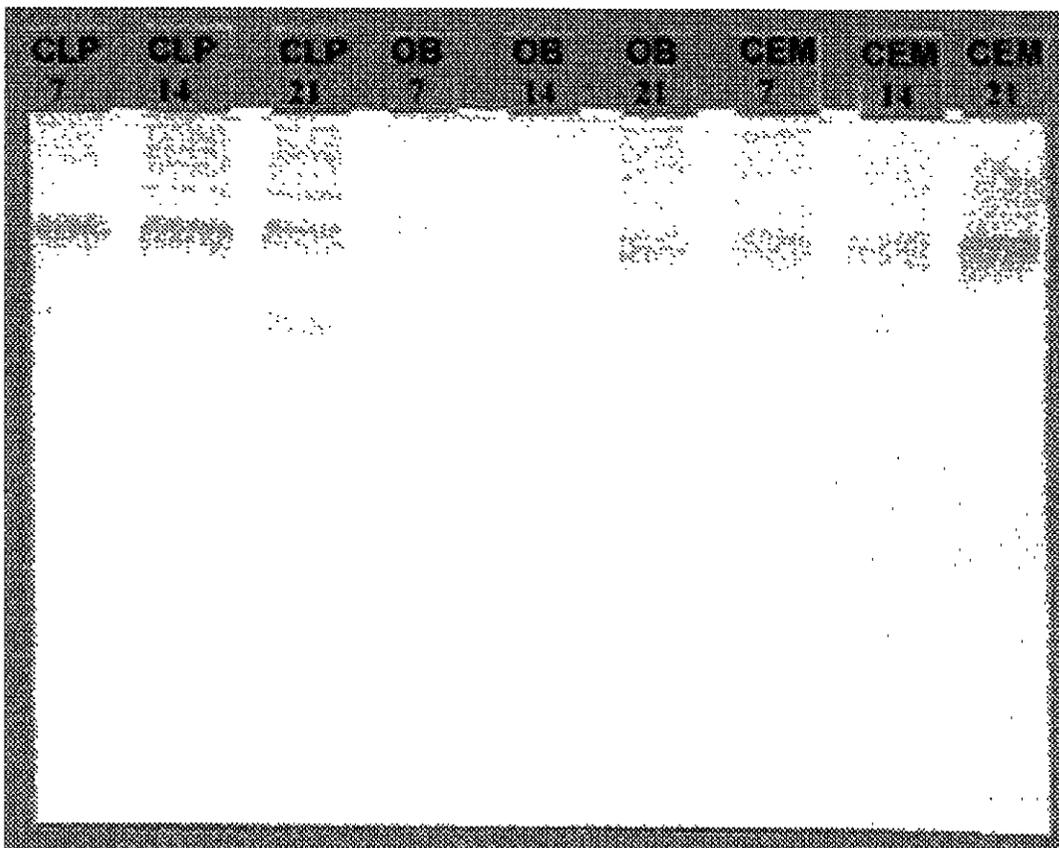


FIGURA 4:
INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA DE ADHERENCIA DEL CEMENTO
(CAP)

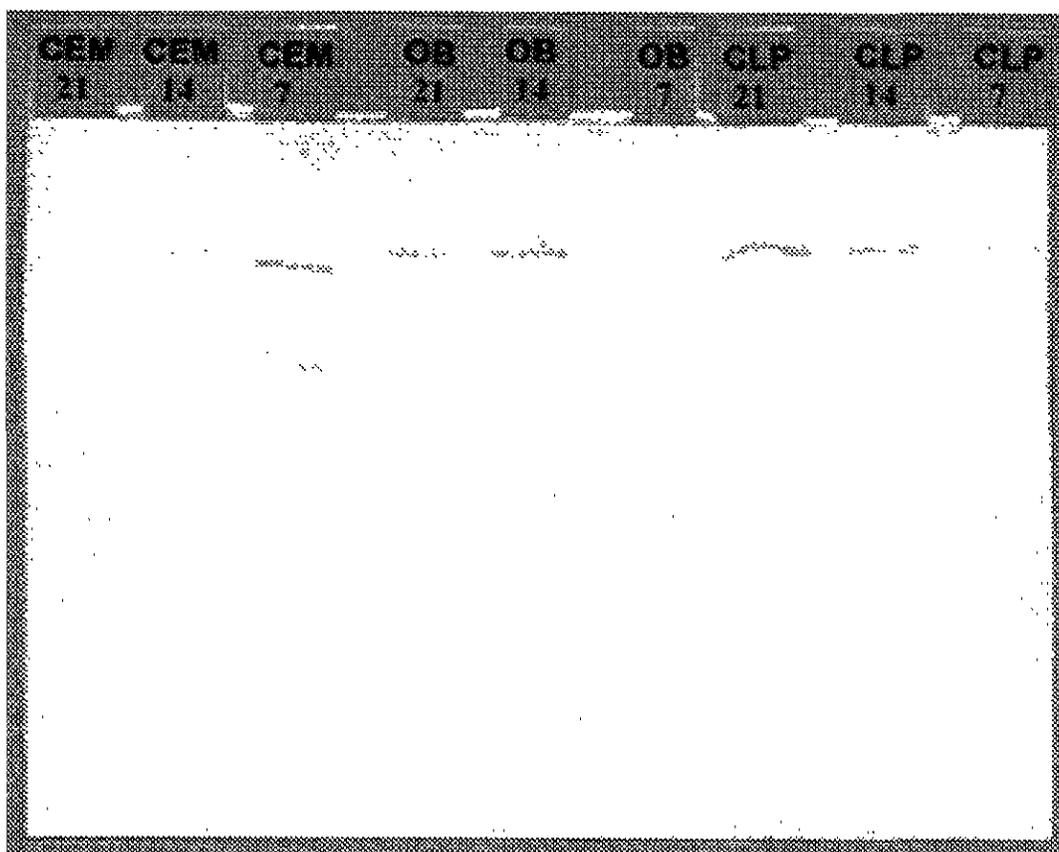
**FIGURA 8:
INMUNOTRANSFERENCIA DE LA OSTEOPONTINA
(OPN)**



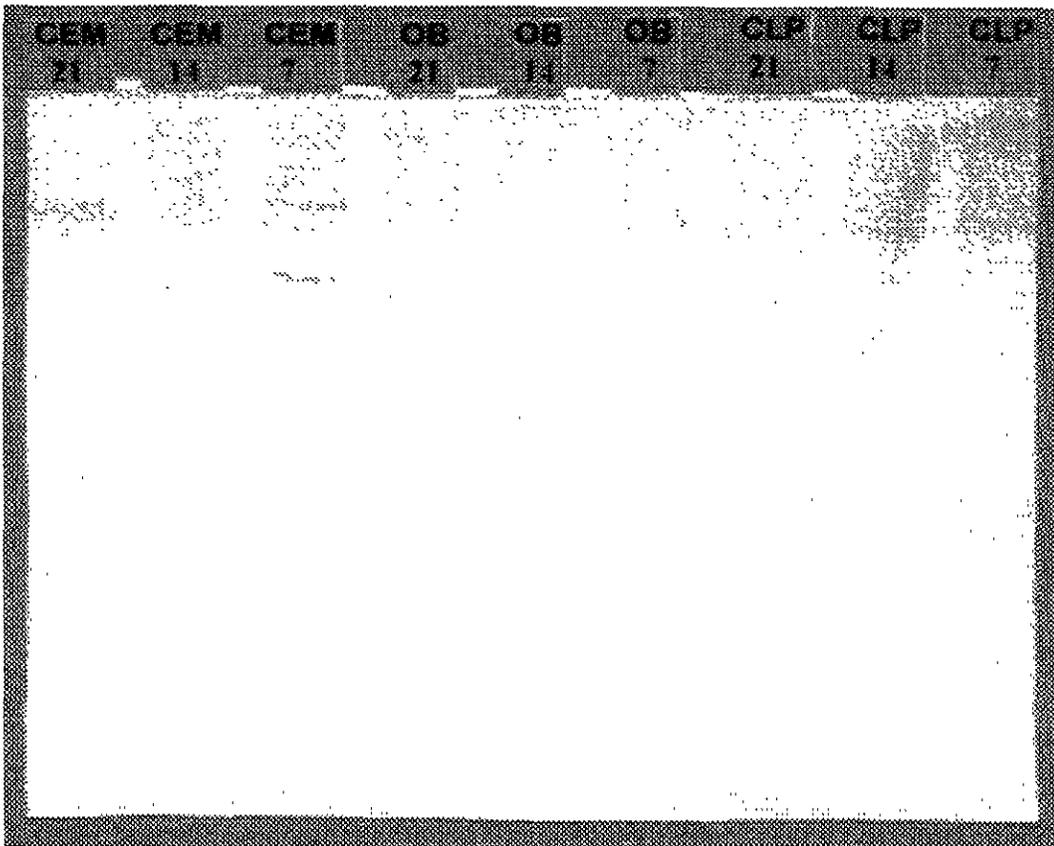
**FIGURA 9:
INMUNOTRANSFERENCIA DE LA SIALOPROTEÍNA ÓSEA
(BSP)**



**FIGURA 10:
INMUNOTRANSFERENCIA DE LA OSTEONECTINA
(ONC)**



**FIGURA 11:
INMUNOTRANSFERENCIA DE LA PROTEÍNA DE ADHERENCIA
DEL CEMENTO (CAP)**



DISCUSIÓN

En este estudio se observó la expresión temporal de moléculas que se considera tienen importancia en el proceso de mineralización en tres linajes celulares humanos (las células derivadas de un cementoblastoma, los osteoblastos y las células provenientes del ligamento periodontal). Los hallazgos principales de los ensayos de mineralización demuestran que la capacidad para producir matriz mineral existe en todos los linajes celulares estudiados, aunque esta habilidad varía en temporalidad por lo menos durante los tiempos observados (7, 14 y 21 días), y es menor en las células del ligamento periodontal que en los osteoblastos y en las células derivadas del cementoblastoma, las cuales mineralizan más tempranamente.

Los resultados indican que el medio de cultivo adicionado con β -glicerofosfato y dexametasona proporciona a las células los elementos necesarios para inducir la síntesis de matriz mineral más rápidamente. Autores como Bellows (1986) y Maniatopoulos (1988), concluyeron en sus investigaciones con ratas que el β -glicerofosfato probablemente proporciona a las células la cantidad de fosfatos necesarios para iniciar la mineralización, mientras que la dexametasona parece influir en la diferenciación celular, y esta acción parece ser la misma en las células humanas estudiadas por nosotros.

Las diferencias observadas en estos experimentos nos permitieron suponer que debía existir variabilidad en la presencia o ausencia de las proteínas involucradas en el proceso de mineralización, ya que se ha observado que el cemento maduro de humano contiene numerosas proteínas similares a las que se encuentran en hueso, incluyendo fibrinectina, BSP, OPN, OC y colágena tipo I (Hauschka *et al.*, 1989; Heinegard *et al.*, 1989).

Estudios subsecuentes han deducido la expresión espacial y temporal de proteínas asociadas a hueso incluyendo BSP, OPN y OC durante la cementogénesis en ratas y ratones (Chen *et al.*, 1992; Lekic *et al.*, 1996; Takano-Yamamoto *et al.*, 1994). Se ha demostrado que la OPN y la BSP son los componentes mayoritarios del cemento y que estas proteínas son secretadas por los cementoblastos de la periferia del tejido ya mineralizado (Sodek *et al.*, 1992).

Aplicando la técnica de hibridación *in situ* se identificaron mRNAs de BSP, OPN y OC en células de la superficie radicular durante la cementogénesis (Chen *et al.*, 1992); además la expresión de mRNAs ha demostrado correspondencia con la localización de proteínas en cemento en tiempos específicos de su desarrollo (Chen *et al.*, 1992; Takano-Yamamoto *et al.*, 1994).

Pero es hasta el presente estudio que para determinar la expresión temporal de algunas proteínas asociadas con los cementoblastos y distinguir el patrón de manifestación del presentado en hueso y en el ligamento periodontal, se buscaron proteínas descritas como específicas del cemento (OPN, CAP) (Arzate *et al.*, 1992; Arzate, 1996; Wu *et al.*, 1996), otras descritas en el proceso de mineralización de hueso (BSP, ONC) (Fisher, 1987; Fujisawa, 1993; Schoeder, 1991; Somerman, 1991), y esta última (ONC) que es producida también por los fibroblastos del ligamento periodontal (Tung *et al.*, 1985; Wasi *et al.*, 1984).

Los resultados de los experimentos de inmunohistoquímica así como de inmunotransferencia realizados en este estudio se relacionaron, ya que las variaciones en cuanto a la presencia o ausencia de expresión así como en cuanto a la concentración aparente (apreciación visual únicamente) son de gran interés.

Existe evidencia que sugiere que la BSP participa en la etapa inicial de la mineralización (Bianco *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1992; Hunter, Kyle y Golgberg, 1994; Sodek *et al.*, 1992), por lo que se considera un marcador de la biomineralización. Los experimentos de inmunohistoquímica de este estudio para BSP resultaron moderadamente positivos para las células derivadas del cementoblastoma, así como para las células provenientes de ligamento periodontal a los tres tiempos observados, sin embargo, la inmunoreacción resultó ser muy intensa para los osteoblastos a los 7 días, moderada a los 14 y leve a los 21.

A diferencia de lo anterior, la inmunotransferencia de la BSP para los osteoblastos y las células derivadas del cementoblastoma se hizo manifiesta como una banda más teñida conforme el tiempo transcurrió, lo cual apoya la hipótesis de McNeil y colaboradores (1995), en lo que se refiere a la participación de la BSP en la adhesión de osteoblastos, y probablemente de acuerdo a nuestro reporte también de cementoblastos.

La función que se ha deducido para la OPN en la mineralización incluye el control de la migración y la adhesión de los osteoblastos y osteoclastos, además de la regulación del crecimiento de los cristales de hidroxapatita (Arzate *et al.*, 1992; Fisher *et al.*, 1985; Hunter, Kyle y Golgberg, 1994; Nishimura *et al.*, 1989; Sodek *et al.*, 1992). Nuestros resultados mostraron inmunotinciones de leves a moderadas en los osteoblastos en todos los tiempos de observación, y reacciones altamente positivas tanto en las células derivadas del cementoblastoma como en células de ligamento periodontal a los 7 y 14 días, pero solo en este último linaje celular la tinción se mantuvo muy intensa a los 21 días. En cuanto a la inmunotransferencia se hicieron manifiestas bandas de 44 kDa en todos los linajes celulares y en todos los tiempos, aunque la intensidad del marcaje disminuyó hacia los 21 días.

Al parecer la expresión tanto de BSP como de OPN se efectúa en periodos de tiempo similares, ya que participan en forma conjunta para la adhesión celular de osteoblastos y osteoclastos, pero su presencia en las células derivadas del cementoblastoma es de llamar la atención, ya que en contraste con el hueso, el cemento no se remodela tan significativamente (McNeil R.L y Somerman M.J., 1993).

En cuanto a la ONC se refiere, la inmunohistoquímica mostró reacciones intensas en los osteoblastos en todos los tiempos de observación y en las células de ligamento a los 14 y 21 días al igual que en los resultados de Tung y colaboradores (1985) y de Wasi y colaboradores (1984), mientras que las células derivadas del cementoblastoma reaccionaron con menor intensidad.

La inmunotransferencia resultó ser de mayor importancia en las células de ligamento periodontal, aunque a los 21 días la intensidad de la banda disminuyó, mientras que en los osteoblastos y en las células derivadas del cementoblastoma la banda mas intensa se presentó a los 21 días, por lo que es posible que esta proteína aparezca también en otra etapa mas avanzada de desarrollo que no observamos aquí, ya que presenta afinidad hacia los sitios de enlace con calcio y es capaz de mediar la deposición de hidroxapatita (Aubin *et al.*, 1993; Gehron *et al.*, 1992; Tremble *et al.*, 1993).

Finalmente, la expresión de CAP fué altamente positiva en la inmunohistoquímica de las células derivadas del cementoblastoma a los 7,14 y 21 días y se hizo manifiesta con la aparición de bandas de 55kDa en la inmunotransferencia lo cual era de esperarse ya que parece estar localizada únicamente en el cemento (Arzate *et al.*, 1992). Las inmunoreacciones para las células de ligamento periodontal podrían justificarse si se piensa que la CAP promueve la adherencia de fibroblastos (Olson *et al.*, 1991; Pitaru *et al.*, 1995).

El hecho de que las moléculas estudiadas (BSP, OPN, ONC y CAP) se hallan hechas manifiestas en distintos periodos de temporalidad, parece apoyar las sugerencias de otros autores en cuanto a que éstas tienen un rol crítico en el proceso de diferenciación celular (Slavkin, 1990; Somerman *et al.*, 1990), pero al mismo tiempo sugieren que las proteínas poseen diferentes roles biológicos dependiendo del tiempo y sitio de expresión.

A pesar de que los factores inductores de la diferenciación celular de las células progenitoras de los cementoblastos, los osteoblastos y las células del ligamento periodontal aún son desconocidos, nuestros resultados parecen sugerir que entre los candidatos potenciales para promover este evento se incluyen las proteínas de matriz extracelular, particularmente las que tienen que ver con el proceso de adhesión. Estos hallazgos son apoyados en parte por los de Somerman y colaboradores, (1990), quienes afirman la íntima asociación de la OPN y la fibronectina al cemento, además de que concluyen de su estudio que uno de los eventos requeridos para el inicio de la regeneración periodontal es la adhesión de los tejidos conectivos a la superficie radicular, lo cual en teoría sólo puede llevarse a cabo una vez que las células hubiesen expresado éstas proteínas.

Aparentemente el proceso de activación de la mineralización es dependiente no sólo del medio de cultivo en el que se encuentren las células (factores extrínsecos), sino también de la expresión temporal y espacial de estas proteínas no colágenas (BSP, OPN, ONC y CAP), por lo menos en los diferentes tipos celulares estudiados aquí (factores intrínsecos), lo cual nos sugiere, que la expresión de estas moléculas en distintos periodos de tiempo podría también ser indicativo del grado de diferenciación de las células.

En estudios subsecuentes, se podría evaluar si estas proteínas pudiesen ser potencialmente útiles no solo en la terapéutica de regeneración periodontal, sino también en tratamientos de reconstrucción dentoalveolar.

Ante la importancia de este hecho, existe la necesidad de determinar las características ultraestructurales de estos tipos celulares, para poder conocer a mayor profundidad su rol dentro de la biología oral.

CONCLUSIONES

- Las células derivadas de un cementoblastoma humano, expresan el fenotipo de los cementoblastos, y parecen ser una línea celular homogénea y clonal.
- Los resultados presentados en este estudio demuestran la posibilidad de cultivar células de ligamento periodontal y células derivadas de un cementoblastoma utilizando ensayos que solo se consideraban adecuados para cultivar células de fenotipo osteoblástico.
- El medio de cultivo adicionado con β -glicerofosfato y dexametasona proporciona a las células los elementos necesarios para inducir la síntesis de matriz mineral e incrementa su capacidad proliferativa.
- Los hallazgos de los ensayos de mineralización demuestran que la capacidad para producir nódulos minerales existe en todos los linajes celulares estudiados, aunque esta habilidad varía en temporalidad por lo menos durante los tiempos observados (7, 14 y 21 días).
- La capacidad para mineralizar se manifiesta primero en las células derivadas del cementoblastoma, pero el proceso transcurre en éstos en forma más lenta, al menos durante los tiempos de observación utilizados, que son representativos del periodo de iniciación de la cementogénesis.

- El proceso de activación de la mineralización *in vitro* es influido tanto por factores extrínsecos como el medio de cultivo, como por factores intrínsecos, uno de los cuales es la expresión de las proteínas no colágenas (BSP, OPN, ONC y CAP).
- El proceso de mineralización *in vitro* es regulado por la manifestación de diferentes proteínas asociadas y la expresión de las mismas se lleva a cabo en una secuencia temporal diferente en los tres linajes celulares humanos estudiados.
- El hecho de que la BSP, la OPN, la ONC y la CAP se manifiesten en los distintos linajes celulares parece sugerir, que las células de ligamento periodontal, los osteoblastos y los cementoblastos poseen caracteres génicos similares que se expresan en diferentes períodos de tiempo.
- De lo anterior se deduce que los tres distintos linajes celulares humanos estudiados pudieran tener una célula progenitora en común.

PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

El conocimiento del periodonto humano se ha llevado a cabo gracias a la realización de investigaciones encaminadas básicamente al ensayo del potencial regenerativo de los diferentes tejidos que lo conforman. A cada uno de éstos tejidos se le ha dedicado un estudio más específico, pero aún existe una gran cantidad de procesos que se desconocen, entre ellos en el de la cementogénesis. La importancia de su conocimiento radica en que el cemento radicular es un componente primario e indispensable para la regeneración del componente diente - hueso y la reconstitución de la estructura de soporte del diente.

La caracterización ultraestructural de los cementoblastos *in vitro* permitirá obtener la información de la función que este linaje celular tiene sobre los osteoblastos, las células de ligamento periodontal y probablemente su participación con los fibroblastos gingivales.

De esta manera podría facilitarse el entendimiento del proceso global de la mineralización, y a partir de ello podrían desarrollarse nuevas terapias para la regeneración de los tejidos periodontales.

REFERENCIAS

Narayanan A.S., Bartold P.M. Biochemistry of periodontal connective tissues and their regeneration: A current perspective. *Connective Tissue Res.* **3**: 191-201, 1996.

Stern I.B. Current concepts of the dentogingival junction: The epithelial and connective tissue attachments to the tooth. *J. Periodontol.* **52**: 465-469, 1981.

Schoeder H.E. The periodontum. In: Handbook of microscopic anatomy. Vol **V/5**. Springer Heidelberg New York. pp. 23-129, 1986.

Boyco G.A., Melcher A.H., Brunette D.M. Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro. *J. Period. Res.* **16**: 73-88, 1981.

McCulloch C.A.G. Nemeth H.E., Lowenberg B., Melcher A.H. Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament in cells population. *Anat. Rec.* **21**: 592-612, 1987.

Pitaru S., Mc Culloch C.A.G., Narayanan S.A. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J. Periodont. Res.* **29**: 81-94, 1994.

Narayanan A.S., Page R.C. Biosynthesis and regulation of type V collagen in diploid human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **258**: 11694-11699, 1983.

Karimbaux N., Rosenblum N.D., Nishimura I. Site-specific expression of collagen I and XII mRNAs in the rat periodontal ligament at two developmental stages. *J. Dent. Res.* **71**: 1355-1362, 1992.

Berkovitz B.K.B. The structure of the periodontal ligament: an update. *Eur. J. Orthodont.* **12**: 51-57, 1990.

Dublett B. Dixon E., De Miguel E., Van der Rest M. Bovine type XII collagen: amino acid sequence of a 10 kDa pepsin fragment from periodontal ligament reveals a high degree of homology with the chicken α_1 (XII), sequence. *FEBS. Lett.* **233**: 177-181, 1988.

Perera K.A.S., Tonge C.H. Fibroblasts cell population kinetics in the mouse molar periodontal ligament and tooth eruption. *J. Anat.* **133**: 281-300, 1981.

Bronckers A.L.J.J., Farach Carson M.C., Van Waveren E., Butler W.T. Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin and dentin sialoprotein during dental root formation and early cementogenesis in rat. *J. Bone Miner. Res.* **9**: 883-841, 1994.

MacNeil R.L., Berry J., D'Errico J., Strayhorn C., Sommerman M.J. Localization and expression of osteopontin in mineralized tissues of the periodontium. *Ann. New York Acad. Sci.* **760**: 166-176 1995.

Reichert T., Storkel S., Becker K., Fisher L.W. The role of osteonectin in human tooth development: An immunohistological study. *Calc. Tissue Int.* **50**: 468-472, 1992.

Ecarot-Charrier B., Bouchard F., Delloye C. Bone sialoprotein II synthesized by cultured osteoblasts contains tyrosine sulfate. *J. Biol. Chem.* **264**: 20049-20053, 1989.

Nagata T., Goldberg H.A., Zhang Q., Domenicucci C., Sodek J. Biosynthesis of bone proteins by fetal porcine calvariae in vitro. Rapid association of sulfated sialoproteins (secreted phosphoprotein-1 and bone sialoprotein) and chondroitin sulfate proteoglycan (CS-PGIII) with bone mineral. *Matrix* **11**: 86-100, 1991.

Lesot H., Osman M., Ruch J.V. Immunofluorescent localization of collagens, fibronectin and laminin during terminal differentiation of odontoblasts. *Dev. Biol.* **82**: 371-381, 1981.

Meyer J.M., Lesot H., Staubli A., Ruch J.V. Immunoperoxidase localization of fibronectin during odontoblast differentiation. An ultrastructural study. *Biol. Struct. Morphogen.* **2**: 19-24, 1989.

Thesleff I., Stenman S., Vaheri A., Timpl R. Changes in the matrix proteins, fibronectin and collagen, during differentiation of mouse tooth germ. *Dev. Biol.* **70**: 116-126, 1979.

Thesleff I., Barrach H.F., Foidart J.M., Vaheri A., Pratt R.M., Martin G.R. Changes in the distribution of type IV collagen, laminin, proteoglycan and fibronectin during mouse tooth development. *Dev. Biol.* **81**: 182-192, 1981.

Thesleff I., Hurmerinta K. Tissue interactions in tooth development. *Differentiation* **18**: 75-88, 1981.

- Doi I., Okuda R., Takezawa Y., Shibata S., Moriwaki Y., Wakamatsu N., Shimizu N., Moriyama K., Shimokawa H. Osteonectin inhibiting de novo formation of apatite in the presence of collagen. *Calcif. Tissue Int.* **44**: 200-208, 1989.
- Fisher L.W., Termine J.D. Noncollagenous proteins influencing the local mechanisms of calcification. *Clin. Orthop. Related Res.* **200**: 362-385, 1985.
- Romberg R.W., Werness P.G., Lollar P., Riggs B.L., Mann K.G. Isolation and characterization of native adult osteonectin *J. Biol. Chem.* **260**: 2728-2736, 1985.
- Termine J.D., Belcourt A.B., Conn K.M., Kleinman H.K. Mineral and collagen-binding proteins of fetal calf bone. *J. Bio. Chem.* **256**: 10403-10408, 1981 a.
- Malaval L., Modrowski D., Gupta A.K., Aubin J.E. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J. Cel. Physiol.* **158**: 555-572, 1994.
- McKee M.D., Glimcher M.J., Nanci A. High-resolution immunolocalization of osteopontin and osteocalcin in bone and cartilage during endochondral ossification in the chicken tibia. *Anat. Rec.* **234**: 479-492, 1992.
- Glimcher M.J. Mechanisms of calcification: role of collagen fibrils and collagen phosphoprotein complexes in vitro and in vivo. *Anat. Rec.* **224**: 139-153, 1989.
- MacNeil R.L., Somerman M.J. Molecular factors regulating development and regeneration of cementum. *J. Periodont. Res.* **28**: 550-559, 1993.
- Grobstein C. Inductive tissue interactions in development. In: Extracellular matrix influences on gene expression New York Academic Press. pp: 9-16 1975.
- Terranova V.P., Wikesjo U.M.E. Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontum. *J. Periodontol.* **58**: 371-378, 1987.
- McAllister B., Narayanan A.S., Miki I. Page R.C. Isolation of a fibroblasts attachment protein from cementum. *J. Periodont. Res.* **25**: 99-105, 1990.
- Miki I., Narayanan A.S., Page R.C. Mitogenic activity of cementum components to gingival fibroblasts. *J. Dent. Res.* **66**: 1399-1403, 1987.

Somerman M.J., Archer S.Y., Shteyer A., Foster R.A. Protein production by human gingival fibroblasts is enhanced by guanidine extracts from cementum. *J. Periodont. Res.* **22**: 75-77, 1987 a.

Somerman M.J., Archer S.Y., Hassel T.M., Shteyer A., Foster R.A. Enhancement by extracts of mineralized tissues of protein production by human gingival fibroblasts in vitro. *Arch. Oral Biol.* **12**: 879-883, 1987 b.

Somerman M.J., Foster R.A., Imm G.M., Sauk J.J., Archer S.Y. Periodontal ligament cells and gingival fibroblasts respond differently to attachment factors in vitro. *J. Periodontol.* **60**: 73-77, 1989.

Ferreira O.C., Valinsky J.E., Sheridan K., Wayner E.A., Bianco C., García-Pardo A. Phorbol ester-induced differentiation of U937 cells enhances attachment to fibronectin and distally modulates the $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_4\beta_1$ fibronectin receptors. *Exp. Cell. Res.* **193**: 20-26, 1991.

Ingontz R., Heino J., Massague J. Regulation of vitronectin receptor and LFA-1. *J. Biol. Chem.* **264**: 389-392, 1989.

Patel V.P., Lodish H.F. Loss of adhesion of murine erythroleukemia cells to fibronectin during erythroid differentiation. *Science* **224**: 996-998, 1984.

Plantifaber L.C., Hynes R.U. Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. *Cell* **56**: 281-290, 1989.

Andujar M.B., Magloire H., Hartman D.J., Ville G., Grimaud J.A. Early mouse molar root development: Cellular changes and distribution of fibronectin, laminin and type IV collagen. *Differentiation* **30**: 111-122, 1985.

Slavkin H.C. Molecular determinants of tooth development: A review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **1**: 1-16, 1990.

Vainio S., Jalkanen M., Thesleff I. Syndecan and tenascin expression is induced by epithelial-mesenchymal interactions in embryonic tooth mesenchyme. *J. Cell Biol.* **108**: 1945-1954, 1989.

Ten Cate A.R. The experimental investigation of odontogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **39**: 5-11, 1995.

Gould T.R., Melcher A.H., Brunette D.M. Migration and division of progenitor cell populations in the periodontal ligament after wounding. *Anat. Rec.* **188**: 133-143, 1977.

Melcher A.H., Cheong T., Cox J., Nemeth E., Shiga A. Synthesis of cementum-like tissue *in vitro* by cells cultured from bone: A light and electron microscopic study. *J. Periodont. Res.* **21**: 592-612, 1986.

Piche J.E., Carnes D.L. Graves D.T. Initial characterization of cells derived from human periodontum. *J. Dent. Res.* **68**: 761-767, 1989.

McCulloch C.A.G., Melcher A.H. Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice. *Am. J. Anat.* **167**: 443-58, 1983.

McCulloch C.A.G. Progenitor cells populations in the periodontal ligament of mice. *Anat. Rec.* **21**: 258-262, 1985.

McCulloch C.A.G., Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodont Res* **26**: 144-153, 1991.

Groenveld M.C., Everts V., Beertsen W., Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingiva of the rat molar: its relation to cementum formation. *J. Dent. Res.* **74**: 1374-1381, 1995.

Nojima N., Kobayashi M., Shinome M., Takayashi N., Suda T., Haseguwa K. Fibroblastic cells derived from bovine periodontal ligaments have the phenotypes of osteoblasts. *J. Periodont. Res.* **25**: 179-185, 1990.

Arceo N., Sauk J.J., Moehring J., Foster R.A., Somerman M.J. Human periodontal cells initiate mineral-like nodules *in vitro*. *J. Periodontol.* **62**: 500-503, 1991.

Cho M.I., Matsuda N., Lin W.L., Moshier A., Ramakrishnan P.R. *In vitro* formation of mineralized nodules by periodontal ligament cells from the rat. *Calcif. Tissue Int.* **50**: 459-467, 1992.

Cheng S.L., Yang J.W., Rifas L., Zhang S.F., Avioli L.V. Differentiation of human bone marrow osteogenesis stromal cells *in vitro*: Induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* **134**: 277-286, 1994.

Ramakrshnan P.R., Lin W.L., Sodek J., Cho I.L. Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro. *J. Periodont. Res.* **30**: 52-59, 1995.

Nohutcu R.M., Somerman M.J., Mc Cauley L.K. Dexamethasone enhances the effect of parathyroid hormone on human periodontal ligament cells in vitro. *Calcif. Tissue Int.* **56**: 571-577, 1995.

Green S., Chambon P. A superfamily of potentially oncogenic hormone receptors. *Nature* **324**: 615-617, 1986.

Rickard D.J., Sullivan T.A., Shenker B.J., Leboy P.S., Kazhdan I. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev. Biol.* **161**: 218-228, 1994.

Nakae H., Narayanan A.S., Raines E., Page R.C. Isolation and partial characterization of mitogenic factors from cementum. *Biochem.* **30**: 7047-7052, 1991.

Narayanan A.S., Ikezawa K., Wu D., Pitaru S. Cementum specific components which influence periodontal connective tissue cells. *Conn. Tissue Res.* **33**: 1-3, 1995.

Yonemura K., Narayanan A.S., Miki I., Page R.C., Okada H. Isolation and partial characterization of a growth factor from human cementum. *Bone and Mineral* **18**: 187-198, 1992.

Yonemura K., Raines E.W., Ahn N.G., Narayanan A.S. Mitogenic signalling mechanisms of human cementum-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* **35**: 26120-26126, 1993.

Slavkin H.C., Bringas P., Bessam C., Santos V., Nakamura M., Hsu M-Y., Snead M.L., Zeichner-David M., Fincham A.G. Hertwig's epithelial root sheath differentiation and initial cementum formation during long-term organ culture of mouse mandibular first molars using serumless, chemically-defined medium. *J. Periodont. Res.* **23**: 28-40, 1988.

Slavkin H.C., Bessern C., Fincham A.G., Bringas P., Santos V., Nakamura M., Snead M.L., Zeichner-David M. Human and mouse cementum proteins immunologically related to enamel proteins. *Biochemica et Biophysica Acta* **991**: 12-18, 1989.

Arzate H. Preliminary characterization of epithelial root sheath cells in vitro. *Bol. Est. Med. Biol. Mex.* **42**: 27-30, 1994.

Arzate H., Chimal-Monroy J., Hernandez Lagunas L., Díaz de León L. Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *J. Periodont. Res.* **31**:144-148, 1996.

Somerman M.J., Shroff B., Agraves W.S. et al. Expression of attachment proteins during cementogenesis. *J. Biol. Buccale* **18**: 207-214, 1990.

Beertsen W., Van den Bos T. Alkaline phosphatase induces the deposition of calcified layers in relation to dentin: An in vitro study to mimic the formation of afibrillar acellular cementum. *J. Dent. Res.* **70**: 176-181, 1991.

Majeska R.J., Rodan G.A. The effect of 1,25 (OH)₂D₃ on alkaline phosphatase in osteoblastic osteosarcoma cells. *J. Biol. Chem.* **257**: 3362-3365, 1982.

Coleman J.E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**: 441-483, 1992.

Groenveld M.C., Everts V., Beertsen W. Formation of afibrillar acellular cementum-like layers induced by alkaline phosphatase activity from periodontal ligament explants maintained in vitro. *J. Dent. Res.* **73**: 1588-1592, 1994.

Oldberg A. Franzen A. Heinegard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 8819-8823, 1986.

Rouslahti E., Pierschbacher M.D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **238**: 491-497, 1987.

Denhart D.T., Guo X. Osteopontin: A protein with diverse functions. *FASEB J.* **7**: 1475-1482, 1993.

Bélanger L.F. Resorption of cementum by cementocyte activity (cementolysis). *Calcif. Tissue Int.* **2**: 229-232, 1968.

McKee M.D., Nanci A., Osteopontin antigenicity in cementum. An immunocytochemical and developmental study. *J. Dent. Res.* **73**: 377-382, 1994.

Boskey A.L. Osteopontin and related phosphorylated sialoproteins: Effects on mineralization. *Ann. New York Acad. Sci.* **760**: 249-256, 1995.

Heinegard D. Andersson G., Reinholt F.P. Roles of osteopontin in bone remodeling. *Ann. New York Acad. Sci.* **760**: 213-222, 1995.

Hunter G.K., Kyle C.L., Goldberg H.A. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem. J.* **300**: 723-728, 1994.

Fisher L.W., Hawkin G.R., Tuross N., Termine J.D. Purification and partial characterization of small proteoglycans I y II, bone sialoproteins I y II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J. Biol. Chem.* **262**: 9702-9708, 1987.

Fujisawa R., Butler W.T., Brunn J.C. Zhou H.Y., Kuboki I. Differences in composition of cell attachment sialoproteins between dentin and bone. *J. Dent. Res.* **72**: 1222-1226, 1993.

Somerman M.J., Argraves W.S., Foster R.A. Dickerson K., Norris K., Sauk J.J. Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum. *J. Periodont. Res.* **26**: 10-16, 1991.

Schoeder H.E. Cementogenesis and radicular cementum. In : Schoerder H.E. Oral Structural Biology. George Thieme Verlag, Stuttgart Germany, pp.144-170, 1991.

Fisher L.W. McBride O.W., Termine J.D., Young M.F. Human bone sialoprotein: Deduced protein sequence and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.* **265**: 2347-2351, 1990.

Oldberg A., Franzen A., Heinegard D. Primary structure of bone sialoprotein *J. Biol. Chem.* **263**: 19430-19432, 1988.

Young M.F., Kerr J.M., Ibaraki K., Heegaard A.M., Robey P.G. Structure, expression and regulation of the major non-collagenous matrix proteins of bone. *Clin. Orthop.* **281**: 275-294, 1992.

Mintz K.P., Grzesik W.J., Midura R.J., Robey G., Termine J.D., Fisher L.W. Purification and fragmentation of nondenatured bone sialoprotein: Evidence for a cryptic , RGD-resistant cell attachment domain. *J. Bone Miner. Res.* **8**: 985-995, 1993.

- Bianco P., Riminucci M., Bonucci E., Termine J.D., Gheron-Robey P. Bone sialoprotein (BSP) secretion and osteoblasts differentiation: Relationship to bromodeoxyuridine incorporation, alkaline phosphatase, and matrix deposition. *J. Histochem. Cytochem.* **41**: 183-191, 1993.
- Kasagai S., Nagata T., Sodek J. Temporal studies on the tissue compartmentalization of bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN) and SPARC protein during bone formation in vitro. *J. Cell. Physiol.* **152**: 467-477, 1992.
- Sodek J., Chen J., Kasugai S., Nagata T., Zhang Q., Mc Kee M.D., Nanci A. Elucidating the functions of bone sialoprotein and osteopontin in bone formation. In: *Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*. pp. 297-307, 1992.
- Bianco P., Fisher L.W., Young M.F., Termine J.D. Gheron-Robey P. Expression of bone sialoprotein in human developing tissues. *Calcif. Tissue Int.* **49**: 421-426, 1991.
- Chen J.K., Shapiro H.S., Sodek J. Developmental expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. *J. Bone Miner. Res.* **7**: 987-997, 1992.
- Reddi A.H. Bone and cartilage differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**: 737-744, 1994.
- Heinegard D., Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J.* **3**: 2042-2051, 1989.
- McKee M.D., Glimcher M.J. Nancy A. A light resolution immunolocalization of osteopontin of osteopontin and osteocalcin in bone and cartilage during endochondral ossification in the chicken tibia. *Anat. Res.* **234**: 479-492, 1992.
- MacNeil R.L., Sheng N., Strayhorn C., Fisher L.W. Somerman M.J. Bone sialoprotein is localized to the root surface during cementogenesis. *J. Bone and Mineral Res.* **10**: 1597-1606, 1994.
- MacNeil R.L., Berry J., Strayhorn C. Somerman M.J. Expression of bone sialoprotein mRNA by cells lining the mouse tooth root during cementogenesis. *Archs. Oral Biol.* **41**: 827-835, 1996.

- Takano-Yamamoto T., Takemura T., Kitamura I., Nomura S. Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteocalcin and osteopontin revealed by in situ hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. *J. Histochem Cytochem.* **42**: 885-896, 1994.
- Heinrichs A.A.J., Bortell R., Bourke M., Lian J.B., Stein G.S., Stein J.L. Proximal promoter binding protein contributes to developmental, tissue-restricted expression of the rat osteocalcin gene. *J. Cell. Biochem.* **57**: 90-100, 1995.
- Domenicucci C., Goldberg H.A., Hofmann T., Isenman D., Wasi S., Sodek J. Characterization of porcine osteonectin extracted from fetal calvariae. *Biochem. J.* **253**: 139-151, 1988.
- Engel J., Taylor W., Paulsson M., Sage H., Hogan B. Calcium binding domains and calcium-induced conformational transition of SPARC/BM-40/osteonectin, an extracellular glycoprotein expressed in mineralized and non-mineralized tissues. *Biochemistry* **26**: 6958-6965, 1987.
- Termine J.D., Kleinman H.K., Whitson S.W., Conn K.M., McGarvey M.L., Martin G.R. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen *Cell* **26**: 99-105, 1981 b.
- Mason I.J., Taylor A., Williams J.G., Sage H., Hogan B.L.M. Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryo parietal endoderm, is related to an endothelial cell "culture shock" protein. *EMBO J.* **5**: 1465-1471, 1986.
- Mann K., Deutzmann R., Paulsson M., Timpl R. Solubilization of protein BM-40 from a basement membrane tumor with chelating agents and evidence for its identity with osteonectin and SPARC. *FEBS* **218**: 167-172, 1987.
- Nomura S., Willis A.J., Edwards D.R., Heath J.K., Hogan B.L.M. Developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by in situ hybridization. *J. Cell. Biol.* **106**: 441-450, 1988.
- Stenner D.D., Tracy R.P., Riggs L.B., Mann K.G. Human platelets contain and secrete osteonectin, a major protein of mineralized bone. *Proc. Natn. Acad. Sci.* **83**: 6892-6896, 1986.
- Tung P.S., Domenicucci C., Wasi S., Sodek J. Localization of osteonectin and collagen types I and III in fetal and adult porcine dental tissues. *J. Histochem Cytochem* **33**: 531-540, 1985.

Wasi S., Otsuka K., Yao K-L., Tung P.S., Aubin J.E., Sodek J., Termine J.D. An osteonectin-like protein in porcine periodontal ligament and its synthesis by periodontal ligament fibroblasts. *Can. J. Biochem. Cell. Biol* **62**: 470-478, 1984.

Zung P., Domenicucci C., Wasi S., Kuwata F., Sodek J. Osteonectin is a minor component of mineralized connective tissues in rat. *Biochem. Cell. Biol.* **64**: 356-362, 1986.

Aubin J.E., Turksen K., Heersche J. Osteoblastic cell lineage In: Cellular and molecular biology of bone. Academic Press New York pp. 1-45, 1993.

Gehron R.P., Bianco P., Termine J.D. The cellular biology and molecular biochemistry of bone formation. In: Disorders of bone and mineral metabolism. Raven Press L.T.D. Philadelphia, pp. 241-263, 1992.

Tremble P.M., Lane T.F., Sage E.H. Werb Z. SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *J. Cell. Biol.* **121**: 1433-1444, 1993.

Arzate H., Olson S.W., Page R.C., Gown A.M. Sampath A. Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J.* **6**: 2990-2995, 1992.

Olson S., Arzate H., Narayanan A.S., Page R.C. Attachment activity of cementum protein and mechanism of endotoxin inhibition. *J. Dent. Res.* **70**: 1262-1277, 1991.

Pitaru S., Savion N., Hekemati H., Olson S., Narayanan A.S. Molecular and cellular interaction of a cementum attachment protein with periodontal cells and cementum matrix components. *J. Periodont. Res.* **28**: 560-562, 1993.

Pitaru S., Narayanan S.A., Olson S., Savion N., Hekmati H., Alt Y., Metzger Z. Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces. *J. Periodont. Res.* **30**: 360-368, 1995.

Wu D., Ikezawa K., Parker T., Saito M., Narayanan A.S. Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein *J. Bone Min. Res.* **11**: 686-692, 1996.

Davies P., Bailey P.J., Goldenberg M.M., Ford-Hutchinson A.W. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* **2**: 335-357, 1984.

Saito S., Ngan P., Saiton K.K., Lanese R., Shanfel J., Davidovitch Z. Effects of citokines on prostalngin E and AMPc levels in human periodontal ligament fibroblast in vitro. *Archs. Oral Biol.* **70**: 27-33, 1990 a.

Samuelsson B., Granstrom E., Green K., Hamberg M., Hammarstrom S. Prostaglandins. *Annu. Rev. Biochem.* **44**: 669-695, 1975.

Needleman P., Turk J., Jakschik B.A., Morrison A.R., Lefkowitz J.B. Arachidonic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 69-102, 1986.

Saito S., Saito M., Ngan P., Lanese R., Shanfeld J., Davidovitch Z. Effects of parathyroid hormone and cytokines on prostaglandin E. Synthesis and bone resorption by human periodontal ligament- fibroblast. *Archs. Oral Biol.* **35**: 845-855, 1990 b.

Committee on Research Science and Therapy of the American Academy of Periodontology. Position Paper. The potencial role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. *J. Periodontol.* **67**: 545-553, 1996.

D'Errico J.A., Sank J.J., Prince C.W., Somerman M.J. Osteopontin adhesion receptors on gingival fibroblasts. *J. Periodont. Res.* **30**: 34-41, 1995.

Lynch S.E., Colvin R.B., Antoniades H.N. Growth factors in wound healing. *J. Clin. Invest.* **84**: 640-660, 1989.

Bellows C.G., Aubin J.E., Heersche J.N.M., Antosz M.E. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif. Tissue Int.* **38**: 143-154, 1986.

Recker R.R., Frost H.M. Bone histomorphometry: Choice of marking agent and labeling schedule. In: Bone histomorphometry: Techniques and interpretation. *CRC press* Chapter 4 pp:37-52, 1984.

Towbin H.T., Staehelin T., Gordon J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 4350-4354, 1979.

Johnson D.A., Gautsch J.W., Sportsman J.R., Elder J.H. Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal. Tech.* **1**: 3-8, 1984.

Maniatopoulos G., Sodek J., Melcher A. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* **254**:317-330, 1988.

Hauschka P.V., Wians FR Jr. Osteocalcin–hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone. *Anat Rec* **224**:180-188, 1989.

Lekic P., Sodek J., McCulloch C. Osteopontin and bone sialoprotein expression in regenerating rat periodontal ligament and alveolar bone. *Anat Rec.* **244**:50-56, 1996.

Nishimura K., Hayashi M., Matsuda K., Shigeyama Y., Yamasaki A., Yamaoka A. The chemoattractive potency of periodontal ligament, cementum and dentin for human gingival fibroblast. *J Periodont. Res.* **24**: 146-151, 1989.

APÉNDICE

CUADRO 1.

TABLA DE VALORES PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NÓDULOS MINERALES POR EL MÉTODO DE BELLOWS.

CEM	SFB	BGP	DX	BGP+DX
7 días	39	25	23	25
	47	26	39	32
	48	33	33	39
14 días	46	58	57	72
	42	56	44	57
	53	54	48	76
21 días	61	46	76	79
	47	67	85	84
	33	61	63	88
OB	SFB	BGP	DX	BGP+DX
7 días	21	41	36	52
	17	50	34	41
	29	43	22	39
14 días	26	31	19	37
	35	39	21	48
	37	37	36	51
21 días	52	61	49	71
	53	57	47	63
	39	56	51	68
CLP	SFB	BGP	DX	BGP+DX
7 días	5	8	10	10
	4	6	12	8
	4	6	12	10
14 días	9	13	20	32
	8	16	21	35
	9	14	20	33
21 días	32	40	44	60
	32	38	42	58
	30	40	41	56

CUADRO 2.

TABLA DE VALORES PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NÓDULOS MINERALES POR EL MÉTODO DE HISTOMORFOMETRÍA DE RECKER.

CEM	SFB	BGP	DX	BGP+DX
7 días	5.66	3.66	4.00	4.33
	4.66	4.00	4.33	4.33
	4.66	4.00	4.33	4.33
14 días	5.66	6.33	4.66	6.66
	5.66	7.00	7.66	7.66
	5.66	7.00	7.66	7.66
21 días	5.00	6.33	6.33	8.00
	6.00	6.00	6.33	8.66
	6.00	6.00	6.33	8.66
OB	SFB	BGP	DX	BGP+DX
7 días	3.00	2.66	4.33	5.00
	4.33	3.00	4.66	5.33
	4.33	3.00	4.66	5.33
14 días	5.66	5.33	4.33	7.33
	4.66	5.00	5.00	6.66
	4.66	5.00	5.00	6.66
21 días	6.66	6.33	6.33	7.33
	5.66	7.00	6.66	7.66
	5.66	7.00	6.66	7.66
CLP	SFB	BGP	DX	BGP+DX
7 días	0.33	1.00	1.33	2.00
	0.66	0.66	2.00	3.00
	0.33	1.00	2.66	3.00
14 días	2.33	4.00	5.33	6.20
	2.00	4.00	6.33	6.20
	3.33	3.33	6.66	6.20
21 días	4.60	3.80	4.40	6.60
	3.80	4.40	5.00	7.00
	3.20	3.60	6.00	8.40

ANEXOS

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Amortiguador salino de fosfato (PBS)

8 gr. NaCl

0.2 gr KCl

1.44 gr. Na₂HPO₄

0.24 gr. KH₂PO₄

Aforado en 800 ml. de H₂O milli Q.

pH 7.4

Acrilamida/Bis

29.2 gr. Acrilamida

0.8 gr. bis-acrilamida

Aforado en 100 ml. H₂O milli Q., filtrado y mantenido a 4°C protegido de la luz.

Tris 1.5 M

36.33 gr. Tris

Aforado en 200 ml. de H₂O Milli Q.

pH 8.8.

Tris 0.5 M

12.11 gr. Tris

Aforado en 200 ml. de H₂O Milli Q.

pH 6.8

10% SDS

20 gr. SDS

Aforado en 200 ml. de H₂O Milli Q.

10% APS

100 mg. APS

Aforado en 1 ml. H₂O Milli Q.

Urea 6M

72.07 gr. NH₂CONH₂

Aforado en 200 ml. de H₂O Milli Q.

Amortiguador para muestras (Sample buffer)

10 ml. Tris 0.5M pH 6.8

8.33 ml. Urea 6M

10 ml. Glicerina bidestilada 1,23 C₃H₈O₃

10.67 ml. H₂O Milli Q.

1 ml. Azul de bromofenol (BPB) 0.19

10 ml. SDS 10%

Tinción de Coomasie

0.05% Coomasie

50% CH₃OH

10% CH₃-COOH

40% H₂O Milli Q.

Solución para desteñir geles

50%	CH ₃ OH
40%	H ₂ O Milli Q.
10%	CH ₃ -COOH

Amortiguador de corrida para electroforesis (SDS Page buffer)

4.8 gr.	Tris
23 gr.	Glicina
16 ml.	SDS 10%
48 gr.	NH ₂ CONH ₂

Llevar a 1.6 lt. con H₂O Milli Q.

Amortiguador de transferencia (Blot Buffer)

8.46 gr.	Tris
40.32 gr.	Glicina
600 ml.	CH ₃ OH

Llevar a 3 lt. con H₂O Milli Q.

Amortiguador de bloqueo (Blotto)

1.21 gr.	Tris
8.76 gr.	NaCl
50 gr.	Leche descremada en polvo

Llevar a 1 lt. con H₂O Milli Q.

Solución de desarrollo (revelado)

40 ml.	PBS
6 µl.	H ₂ O ₂
250µl.	DAB

Formaldehido 3.5%

3.5%	Formaldehido
96.5%	H ₂ O Milli Q

Alizarina roja S

100 ml.	H ₂ O Milli Q
---------	--------------------------

Alizarina roja S la necesaria hasta alcanzar punto de saturación

pH 4.1

Dabco

2 gr.	1,2 diazobicyclo (2,2,2) octano
-------	---------------------------------

10 ml.	PBS
--------	-----

90 ml.	Glicerol
--------	----------

**C
U
R
R
I
C
U
L
U
M**

**V
I
T
A
E**

LORENA GARRIDO MARÍN

Datos personales:

Lugar de nacimiento México D.F.
Nombre de los padres Modesto Garrido Cuevas
Consuelo Marín Andrade
Domicilio particular Av. Universidad 1923 c-204
Conjunto Residencial Torres de Chimalistac
04319 México D.F.
Domicilio consultorio Cadiz N° 100
Insurgentes Mixcoac
03920 México D.F.

Estudios Profesionales:

Licenciatura Cirujano Dentista
Universidad Latinoamericana
1984-1988
Examen profesional aprobado por unanimidad
con mención honorífica.
Especialidad Ortodoncia
UNAM
1990-1992
Examen profesional aprobado por unanimidad.
Maestría En Odontología
UNAM
1997-1998

Lenguas extranjeras:

Inglés
Francés

Ejercicio profesional: Práctica privada de junio de 1988 la fecha.

Becas otorgadas:

Durante la licenciatura beca otorgada por la AAPAUNAM.
Durante la especialidad beca otorgada por la Dirección de Becas de Posgrado de la UNAM.
Durante la especialidad beca otorgada por el Departamento de Ortodoncia y Dentaurum Co. para el Annual Convention of American Association of Orthodontists St. Louis Missouri U.S.A.
Durante la maestría beca otorgada por la Dirección de Becas de Posgrado de la UNAM.

Docencia:

Ayudante meritorio del C.D.M.O. José Luis Cortés Basurto profesor titular
Facultad de Odontología de la UNAM.
Ayudante meritorio del Dr. David Lezama del Valle profesor titular
Facultad de Odontología de la UNAM.

Participación académica sobresaliente:

V Congreso Latinoamericano de Alumnos de Posgrado de Odontología

Tema: Relación entre edad dental, esquelética y concentración hormonal de HGH, T₁ y T₂ en pacientes de 8 a 18 años adscritos al Departamento de Ortodoncia de la División de Estudios de Posgrado de la U.N.A.M.

Julio de 1992

Oaxaca de Juárez, Oaxaca

Se obtuvo primer premio en investigación científica.

Annual Convention of American Dental Research

Tema: Relation between hormonal concentration, dental & esquelética age in puberal patients.

Mayo de 1993

Chicago Illinois, U.S.A.

IMSS

Tema: Parodontopatías

Abril de 1994

San Luis Potosí, S.L.P.

Se obtuvo reconocimiento como miembro honorario de la Academia de Medicina.

IMSS

Tema: Salud bucal durante la pubertad, el embarazo y la menopausia

Septiembre de 1995

Se obtuvo reconocimiento como miembro honorario de la Asociación de Ginecología y Obstetricia.

Colegio de Ortodontistas de S.L.P.

Tema: Etiología de las maloclusiones

Julio de 1996

San Luis Potosí, S.L.P.

Se obtuvo reconocimiento como miembro honorario del Colegio de Cirujanos Dentistas de S.L.P.

Miembro de Asociaciones Profesionales:

Fellow del World Federation of Orthodontists

Consejo Nacional de Ortodoncia A.C.

Colegio de Ortodontistas de S.L.P.

Colegio Nacional de Cirujanos Dentistas

Colaboración para otras instituciones e industria farmacéutica:

INER

Glaxo Wellcome

Rhône Poulenc

Boehringer Ingelheim – Promeco

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA