

302



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

EFFECTO DE LOS MEDIOS CONDICIONANTES DE  
CELULAS DERIVADAS DE UN CEMENTOBLASTOMA  
HUMANO, DEL HUESO ALVEOLAR Y DEL  
LIGAMENTO PERIODONTAL EN  
CEMENTOBLASTOS, OSTEOLASTOS Y  
FIBROBLASTOS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL  
*IN VITRO.*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A :

LOUSTALOT ANGULO VIRIDIANA

295728

TUTOR: DR. HIGINIO ARZATE



MEXICO, D. F. C.U.

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

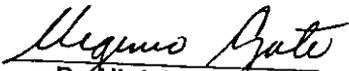
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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.

Esta tesis se desarrolló en el  
Laboratorio de Biología Celular  
y Molecular de la  
División de Estudios de Posgrado e Investigación.  
Facultad de Odontología, UNAM.

TUTOR:

  
Dr. Higinio Arzate.

# AGRADECIMIENTOS

## **A MIS PADRES:**

Por que el concepto de padres perfectos resulta pobre cuando se trata de describir a Dulce y Arturo. Mil gracias por todo.

## **A MIS HERMANOS:**

Ale, Arturin y Jonathan, por su amor y por haber demostrado siempre que cuando una persona ama lo que hace, no importa lo que esto sea, el éxito es inherente.

## **A MIS ABUELOS:**

Pancho, Tere y Adolfo, la amalgama perfecta entre amor y sabiduría.

**A MIS TÍOS:**

Por que son un gran ejemplo a seguir.

**A MIS PRIMOS:**

Ya que buena parte de los mejores momentos de mi vida han sido posibles gracias a su presencia.

**A MIS SOBRINOS:**

A Jonathan Alexander por brindarme la sonrisa mas pura, inocente y sincera.  
A mi sobrino (a) que viene en camino por la dulzura que provoca aun antes de nacer.

**A MI CACHORRITO:**

Gracias Rodrigo por ser el hombre ideal.

**A MIS AMIGOS:**

Aunque no son muchos. Son realmente los mejores.

**Al Dr. HIGINIO ARZATE:**

Por la paciencia que haz tenido en las innumerables ocasiones que me he equivocado y por darme la gran oportunidad de colaborar en un mismo equipo.

**A LA FAMILIA ANGULO:**

Un enorme reconocimiento a  
Don Pancho, Inés, Rafa, Luis, Marce,  
Rosi y Benja por su extraordinaria nobleza,  
que ha marcado innegablemente mi  
desarrollo como ser humano.

# Indice.

Pag.

## I. GLOSARIO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2-25
2.1. ENCÍA	23
2.2. LIGAMENTO PERIODONTAL	3-9
2.2.1. DESARROLLO	3
2.2.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES	4-6
2.2.3. BIOQUÍMICA	6-9
2.3. HUESO ALVEOLAR	9-13
2.3.1. DESARROLLO	9-10
2.3.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES	10-12
2.3.3. BIOQUÍMICA	12-13
2.4. CEMENTO RADICULAR	14-19
2.4.1. DESARROLLO	14-15
2.4.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES	15-17
2.4.3. BIOQUÍMICA	17-19
2.5. REGERACIÓN PERIODONTAL	19-25

<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>26</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>27</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b>	<b>28</b>
<b>6. OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
6.1. OBJETIVO GENERAL	29
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>30-37</b>
7.1. CULTIVO CELULAR	30-32
7.1.1. CÉLULAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL	30
7.1.2. CÉLULAS CEMENTOBLÁSTICAS	31
7.1.3. CÉLULAS OSTEOBLÁSTICAS	32
7.2. OBTENCIÓN DE MEDIOS CONDICIONANTES	32-33
7.3. ENSAYOS DE MINERALIZACIÓN	33
7.4. ENSAYOS DE ACTIVIDAD	
ESPECÍFICA DE FOSFATASA ALCALINA	34-35

**7.5. EXPRESIÓN DE SIALOPROTEÍNA ÓSEA (BSP)**

**Y PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO**

**RADICULAR (CAP)-----35-37**

**8. RESULTADOS-----38-67**

**8.1. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE FOSFATASA ALCALINA-----38-47**

**8.1.1. CÉLULAS CEMENTOBLÁSTICAS-----38-41**

**8.1.1.1. CON MEDIO CONDICIONANTE DE OSTEÓBLASTOS.**

**8.1.1.2. CON MEDIO CONDICIONANTE DE CÉLULAS DEL LIGAMENTO  
PERIODONTAL.**

**8.1.2. CÉLULAS OSTEÓBLÁSTICAS-----41-43**

**8.1.2.1. CON MEDIO CONDICIONANTE DE CEMENTOBLASTOS.**

**8.1.2.2. CON MEDIO CONDICIONANTE DE CÉLULAS DEL LIGAMENTO  
PERIODONTAL.**

**8.1.3. CÉLULAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL-----44-46**

**8.1.3.1 CON MEDIO CONDICIONANTE DE CEMENTOBLASTOS.**

**8.1.3.2. CON MEDIO CONDICIONANTE DE OSTEÓBLASTOS.**

**8.2. PORCENTAJE DE TEJIDO MINERALIZADO-----47-52**

**8.2.1. CÉLULAS CEMENTOBLÁSTICAS-----47-49**

**8.2.1.1. CON MEDIO CONDICIONANTE DE OSTEÓBLASTOS.**

**8.2.1.2. CON MEDIO CONDICIONANTE DE CÉLULAS DEL LIGAMENTO  
PERIODONTAL.**

8.2.2. CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS-----	50-52
8.2.2.1. CON MEDIO CONDICIONANTE DE CEMENTOBLASTOS.	
8.2.2.2. CON MEDIO CONDICIONANTE DE CÉLULAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL	
8.2.3. CÉLULAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL-----	53-55
8.2.3.1. CON MEDIO CONDICIONANTE DE CEMENTOBLASTOS.	
8.2.3.2. CON MEDIO CONDICIONANTE DE OSTEABLASTOS.	
8.3. EXPRESIÓN DE SIALOPROTEÍNA ÓSEA (BSP) Y PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO RADICULAR (CAP)-----	56-67
8.3.1 CÉLULAS CEMENTOBLÁSTICAS-----	56-59
8.3.1.1. EXPRESIÓN DE CAP-----	56-57
8.3.1.1.1. CON MEDIO CONDICIONANTE DE OSTEABLASTOS.	
8.3.1.1.2. CON MEDIO CONDICIONANTE DE CÉLULAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL.	
8.3.1.2. EXPRESIÓN DE BSP-----	58-59
8.3.1.2.1. CON MEDIO CONDICIONANTE DE OSTEABLASTOS.	
8.3.1.2.2. CON MEDIO CONDICIONANTE DE CÉLULAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL.	
8.3.2. CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS-----	60-63
8.3.2.1. EXPRESIÓN DE CAP-----	60-61
8.3.2.1.1. CON MEDIO CONDICIONANTE DE CEMENTOBLASTOS.	
8.3.2.1.2. CON MEDIO CONDICIONANTE DE CÉLULAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL.	

8.3.2.2. EXPRESIÓN DE BSP	62-63
8.3.2.2.1. CON MEDIO CONDICIONANTE DE CEMENTOBLASTOS.	
8.3.2.2.2. CON MEDIO CONDICIONANTE DE CÉLULAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL.	
8.3.3. CÉLULAS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL	64-67
8.3.3.1. EXPRESIÓN DE CAP	64-65
8.3.3.1.1. CON MEDIO CONDICIONANTE DE CEMENTOBLASTOS.	
8.3.3.1.2. CON MEDIO CONDICIONANTE DE OSTEÓBLASTOS.	
8.3.3.2. EXPRESIÓN DE BSP	66-67
8.3.3.2.1. CON MEDIO CONDICIONANTE DE CEMENTOBLASTOS.	
8.3.3.2.2. CON MEDIO CONDICIONANTE DE OSTEÓBLASTOS.	
9. DISCUSIÓN	68-71
10. CONCLUSIONES	72
11. REFERENCIAS	73-78

## I. Glosario.

\* =  $p < 0.05$  - significancia estadística.

**ALP** - Fosfatasa Alcalina.

**BMPs** - Proteínas morfogenéticas de hueso.

**BSP** - Sialoproteína ósea.

**CAP** - Proteína de Adherencia del Cemento radicular.

**DAB** - Diaminobenzidina.

**DMEM** - Dulbecco's Modified Eagle Medium.

**EME** - Error medio estándar.

**FGFa** - Factor de crecimiento derivado de fibroblastos (ácido).

**FGFb** - Factor de crecimiento derivado de fibroblastos (básico).

**GAGs** - Glucosaminoglucanos.

**IGF-1** - Factor de crecimiento similar a insulina.

**MC-CEM** - Medio Condicionante de Cementoblastos.

**MC-OST** - Medio Condicionante de Osteoblastos.

**MC-PLC** - Medio Condicionante de Células del Ligamento Periodontal.

**Me-OH** - Metanol.

**OCN** - Osteocalcina.

**OPN** - Osteopontina.

**PBS** - Solución amortiguadora de fosfatos.

**PDGF** - Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

**PNP** - Para-nitrofenilfosfato disódico.

**Secuencia RGD** - Secuencia con residuos de arginina, glicina y ácido aspártico.

**SFB** - Suero Fetal Bovino.

**TGF- $\beta$**  - Factor de crecimiento transformante beta.

# **1. Introducción.**

El periodonto es un conjunto de tejidos dinámicos que como principal función tiene la de dar soporte a los dientes dentro de su alvéolo, así como proteger la raíz dental. Este se encuentra constituido por 4 tejidos, comúnmente divididos para fines didácticos en dos tejidos blandos, encía y ligamento periodontal, y dos tejidos mineralizados, hueso alveolar y cemento radicular.

A pesar de estos conocimientos, los mecanismos que mantienen el equilibrio homeostático entre los tejidos periodontales, así como aquellos que regulan las funciones de las poblaciones celulares que dan origen a cada uno de estos tejidos y el de expresar un fenotipo definido no han sido claramente elucidados en la actualidad.

En este estudio se realizaron ensayos basados principalmente en los procesos de diferenciación celular y elaboración de matriz mineralizada en células constitutivas de cemento, hueso alveolar y células del ligamento periodontal, con el fin de establecer los mecanismos por los cuales se logra alcanzar el equilibrio entre estos tejidos periodontales.

Dichos estudios se diseñaron para determinar la expresión de fosfatasa alcalina (ALP), sialoproteína ósea (BSP) y proteína de adhesión del cemento radicular (CAP), así como la formación de tejido mineralizado in vitro

## **2. Marco teórico.**

### **2.1. ENCÍA.**

Este tejido será revisado de manera somera, debido a que sus células constitutivas no fueron utilizadas para los experimentos realizados en este trabajo, dejando claro, que no con ello se resta importancia a sus funciones, simplemente es necesario poner mayor énfasis en los tejidos que serán mencionados continuamente a lo largo de este trabajo.

La encía provee la unión entre la mucosa oral y los tejidos duros del periodonto, además de que protege los tejidos de la invasión por bacterias presentes en la cavidad oral. En condiciones de salud la encía presenta una apariencia firme con un puntilleo característico (de cáscara de naranja). El epitelio gingival cubre al tejido conectivo y esta constituido por diferentes estratos. El epitelio oral se extiende desde la unión mucogingival hasta la cresta gingival. El epitelio del surco se extiende desde la cresta gingival hasta la porción mas coronal del epitelio de unión, a su vez este se extiende desde la base del surco gingival hasta un punto arbitrario aproximadamente a 2.0 mm coronalmente de la cresta alveolar y se encuentra adaptado a la superficie del diente dando la unión entre este y la encía. Estos tres epitelios difieren estructuralmente (Schroeder y Listgarten, 1997). La encía también posee tejido conectivo que recubre al epitelio

gingival, así la encía puede dividirse en encía libre y encía adherida. La encía libre es la porción más coronal de la encía e incluye la papila interdental. El surco gingival es el espacio comprendido entre la encía y el diente, este surco tiene una profundidad de 2 - 4 mm en personas sanas. La encía adherida se encuentra unida al hueso, es queratinizada y también recibe el nombre de mucosa masticatoria porque es la que se encuentra expuesta directamente a las fuerzas de la masticación (Williams, 1992).

## **2.2. LIGAMENTO PERIODONTAL**

### **2.2.1. DESARROLLO.**

La formación del ligamento periodontal tiene lugar después que las células de la vaina epitelial de Hertwig se han separado, lo cual permite que las células del folículo dentario emigren hacia la superficie externa de la dentina radicular recién formada. Estas células foliculares migratorias se diferencian luego en cementoblastos y depositan cemento sobre la superficie de la dentina. (Cho y Garant; 2000). Otras células del folículo dentario se diferencian en fibroblastos, los cuales sintetizan las fibras y la sustancia fundamental del ligamento periodontal. Las fibras recién formadas quedan atrapadas en el cemento y el hueso alveolar (fibras de Sharpey) y al erupcionar el diente se orientan de manera característica.

## 2.2.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES.

El ligamento periodontal es el tejido conectivo que rodea la raíz para unirla con el hueso y comunica con los espacios medulares a través de los canales vasculares del hueso alveolar.

Fibras periodontales.

Uno de los más importantes elementos del ligamento periodontal son las fibras principales, sus porciones terminales, las llamadas fibras de Sharpey se insertan en el cemento y hueso. Este grupo de fibras consiste en fibras individuales que se anastomosan formando una red entre el hueso y el diente (Holmstrup, 1996). Las fibras principales están compuestas en su mayoría por colágena tipo I. Esta proteína es sintetizada por fibroblastos, condroblastos, osteoblastos, y odontoblastos. La configuración molecular de las fibras de colágena confiere gran fuerza tensil, combinando flexibilidad y fuerza. Las fibras principales del ligamento periodontal son agrupadas en seis clases (Sicher, 1954):

- 1). **Fibras transeptales**, las cuales se extienden interproximalmente a través de la cresta alveolar y penetran en el cemento del diente adyacente.
- 2). **Fibras de la cresta alveolar**. Estas fibras se extienden oblicuamente desde el cemento hasta la cresta alveolar y previenen la extrusión de los dientes, al mismo tiempo que les confieren resistencia a los movimientos laterales.

- 3). **Fibras horizontales.** Las fibras horizontales se extienden a lo largo de la raíz dental, perpendiculares al eje mayor del diente y terminan en el hueso alveolar.
- 4). **Fibras oblicuas.** Las fibras que forman a este grupo son las más largas de todas las fibras del ligamento periodontal y se extienden desde el cemento en dirección coronal, oblicua hasta el hueso.
- 5). **Fibras apicales.** Las fibras apicales se encuentran en posición radial al ápice del diente.
- 6). **Fibras interradiculares.** Estas fibras se encuentran en las áreas de bi y trifurcación de los dientes multirradiculares.

Localizadas entre y a lo largo de las fibras principales tenemos el grupo de las fibras secundarias. Estas se encuentran aleatoriamente orientadas y se cree que podrían representar nuevas fibras colágenas que aún no se han incorporado a los haces principales. Las fibras secundarias en ocasiones aparecen transversas al espacio del ligamento periodontal coronoapicalmente, y se encuentran asociadas con vasos sanguíneos y haces nerviosos. (Hassel, 1993).

#### **Elementos Celulares.**

Cuatro tipos de células han sido identificados en el ligamento periodontal: células del tejido conectivo, células de restos epiteliales, células de defensa y células asociadas a elementos neurovasculares.

Células del tejido conectivo.

Entre los elementos celulares del periodonto se encuentran incluidos: fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos, células endoteliales y células epiteliales conformadas como restos epiteliales de Malassez. Los fibroblastos son las células más comunes en el ligamento periodontal y aparecen como células elongadas orientadas a lo largo de las fibras principales. Estas células sintetizan colágena, proteínas no colágenas y proteoglicanos en este tejido (Ramakrishnan *et al.*, 1995). Los osteoblastos y cementoblastos, así como osteoclastos y cementoclastos pueden ser vistos en el ligamento periodontal cercano a las superficies cementarias y óseas. Las células endoteliales forman un componente importante del periodonto dado que este es uno de los tejidos más vascularizados del organismo humano y de allí su alto recambio metabólico.

Los restos epiteliales de Malassez son vestigios de la vaina epitelial de Hertwig y se encuentran distribuidos cerca del cemento a lo largo del ligamento periodontal de la mayoría de los dientes y son más numerosos en áreas apicales, sin embargo, a la fecha no se conoce exactamente cual es su función, aunque se ha sospechado que podrían regular la diferenciación del linaje cementoblástico (Nylen, 1969).

### **2.2.3. BIOQUÍMICA.**

La función de anclaje del ligamento periodontal se realiza gracias a fibras colágenas, de las cuales se ha hecho referencia anteriormente.

Al igual que en el tejido conectivo gingival, la mayor parte de la colágena en la matriz extracelular del ligamento periodontal es del tipo I, aunque también se encuentran presentes los tipos III, IV, V, VI, XII y XIV. Mientras que la colágena III es predominantemente localizada en las fibras mayores, la colágena tipo IV ha sido localizada en la membrana basal de los restos epiteliales de Malassez, vasos sanguíneos y nervios. La colágena tipo VI esta presente en el ligamento periodontal en forma de microfibrillas interconectando los entrecruzamientos de fibras, sin embargo esta colágena y la colágena tipo V, la cual es localizada pericelularmente, no forman parte de las fibras de Sharpey. La colágena tipo XII es la de más reciente descubrimiento y se piensa que tiene influencia directa en la organización tridimensional de la matriz extracelular, esta colágena se expresa en tejidos maduros, así como en los movimientos dentarios, sin embargo esta no se expresa durante el desarrollo del ligamento periodontal. Por último la colágena tipo XIV la encontramos asociada con las fibras colágenas mayores, pero no con microfibras (Mariotti 1993).

El ligamento periodontal contiene fibronectina y pequeñas cantidades de muchas otras proteínas no colágenas. La fibronectina es ampliamente

distribuida entre las fibras colágenas y en la matriz de elementos vasculares (Pitaru *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1993). La tenascina esta presente en el ligamento periodontal y esta se localiza entre los paquetes densos de fibras colágenas distribuidos en las zonas cercanas al cemento y superficies óseas (Zhang *et al.*, 1993). La elastina está presente en el ligamento periodontal como una red que forma una malla elástica, la cual consiste en fibras de esta proteína rodeadas por microfibrillas, una pequeña cantidad de estas fibras se incorporan dentro de las paredes de vasos sanguíneos (Jonhson y Pylypas 1992).

Además de las proteínas mencionadas anteriormente el ligamento periodontal tiene también osteonectina y otros componentes no propios de su matriz extracelular como la vitronectina y la osteopontina, esta última es producida durante la regeneración en el ligamento periodontal y el hueso alveolar. El ligamento periodontal también expresa subunidades de integrinas que incluyen las  $\alpha_5$ ,  $\alpha_v$  y  $\beta_1$ . Los componentes glucosaminoglucanos (GAGs) que se encuentran en el ligamento periodontal incluyen hialuronato, heparán sulfato, dermatán sulfato y condroitín sulfato, de estos el más abundante es el dermatán sulfato (Gibson y Pearson 1992).

La principal célula en el ligamento periodontal es el fibroblasto, el cual se encarga de la producción de colágena, proteínas no colágenas y proteoglucanos en este tejido. Una característica importante de los fibroblastos

presentes en el ligamento periodontal y que los hace diferentes de los que podemos encontrar en otros tejidos conectivos es la presencia de subtipos con un diferente fenotipo. Uno de estos subtipos, es el más común en tejidos conectivos blandos, como lo es la dermis y la encía, el segundo subtipo es caracterizado por su apariencia osteoblástica con alto contenido de fosfatasa alcalina, el último subtipo es aquél que puede formar tejido mineralizado en cultivo. Los fibroblastos con tipo osteoblásticos tienen gran importancia ya que se cree pueden diferenciarse en cementoblastos y producir fibras de Sharpey que se insertan en el cemento (Pitaru *et al.*, 1994; Schroeder 1992).

## **2.3. HUESO ALVEOLAR.**

### **2.3.1. DESARROLLO.**

El hueso alveolar es formado durante el desarrollo de la raíz por células mesenquimatosas derivadas del folículo dental que dan origen a los osteoblastos. El desarrollo del hueso alveolar es independiente del desarrollo de la mandíbula y del maxilar ya que éste está íntimamente relacionado con la presencia y desarrollo de los dientes, así como del subsecuente desarrollo del aparato de unión de éstos. Inicialmente los dientes permanentes se encuentran localizados dentro del la

misma cavidad ósea que los dientes deciduos, sin embargo cuando estos erupcionan, el hueso alveolar es depositado alrededor de las raíces, con lo cual se logra separar la raíz perteneciente al diente erupcionado, de la corona del diente permanente (Cho y Garant 2000).

Con la pérdida de los dientes primarios, los dientes permanentes se mueven hacia el área vacante y solo en este momento el nuevo hueso alveolar es depositado alrededor del diente permanente, acomodándose así este último en una nueva posición. Durante la erupción del diente permanente las paredes de la cripta ósea son reabsorbidas. (Eskici 1994) y tanto en la mandíbula como en el maxilar se presenta remodelación, dándose en consecuencia un crecimiento de la talla facial.

### **2.3.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES.**

El proceso alveolar es una estructura dependiente de los dientes, en el cual estos se encuentran alojados en criptas óseas rodeadas por el hueso alveolar propiamente dicho (Schroeder 1986), este consiste en una fina laminilla de hueso que permite la unión de las fibras principales del ligamento periodontal, alrededor de este hueso encontramos al hueso esponjoso, que es el segundo componente del hueso alveolar, el cual a su vez se encuentra limitado por un tercer componente que es el hueso compacto formado por dos tablas o láminas óseas. Las láminas o tablas corticales son extensiones de hueso compacto del maxilar y de la

mandíbula, el ancho de estas láminas es variable dependiendo del diente que se trate y por consiguiente del lugar donde se encuentre situado, sin embargo resulta aun más determinante para este grosor la posición que el diente tenga (mesial, distal, lingual, bucal, intruído, extruído, etc.). Existen además septos interdientales e interradiculares los cuales separan a un diente de su diente adyacente y forman compartimentos más pequeños dentro de un alvéolo principal para los dientes multirradiculares. La importancia de estos septos es que se encuentran formados por una lámina ósea cribiforme, por la cual pasan conductos nutricios que contienen vasos sanguíneos, venas, linfáticos y nervios.

La estructura y morfología del proceso alveolar es única debido a su labilidad y dependencia hacia el diente. La cresta ósea alveolar marginal normalmente tiene un contorno cercano a la unión amelocementaria o bien de 2 – 3 mm por debajo de esta línea, es decir en sentido apical. En el maxilar, existen numerosos canales de Volkmann cerca de la superficie vestibular, a través de estos canales cursan los vasos sanguíneos, fibras nerviosas y elementos linfáticos dentro del hueso (Hassel 1993).

La naturaleza dinámica del proceso alveolar es evidente debido a su capacidad de remodelación, en respuesta a demandas funcionales. La remodelación ósea consiste en una ordenada secuencia de reabsorción seguida por formación de nuevo hueso. La iniciación de la secuencia de remodelación

incluye el reclutamiento de progenitores de osteoclastos en el sitio de remodelación, estas células se diferencian y se convierten en osteoclastos maduros. Las superficies óseas sujetas a fuerzas compresivas (como la pared mesial del alvéolo) se encuentran con una constante actividad osteoclástica, es decir de reabsorción, mientras que las superficies sujetas a fuerzas tensionales (pared distal del alvéolo) comúnmente cuentan con actividad osteoblástica. (Hassell 1993). La conservación del hueso alveolar depende directamente de la presencia del diente dentro de su alvéolo, ya que una vez que se pierde el órgano dental, el alvéolo sufre una reabsorción que tiene como consecuencia la disminución de la dimensión que originalmente tenía el hueso (Sodek y McKee 2000).

### 2.3.3. BIOQUÍMICA .

El mayor constituyente orgánico de la matriz extracelular del hueso alveolar es la colágena tipo I, la cual al igual que en el ligamento periodontal forma las fibras de Sharpey. En estas fibras, la colágena tipo I esta en conjunto con colágena tipo III. La colágena tipo I es principalmente expresada por osteoblastos y osteocitos en áreas de remodelación del hueso alveolar. Las capas periósticas y endoósticas expresan fibronectina y tenascina (Pitaru *et al.*, 1987). El hueso alveolar también contiene otro tipo de proteínas no colágenas como osteocalcina y sialoproteína ósea, además de componentes no específicos como osteopontina y osteonectina.

Dentro de la matriz extracelular del hueso alveolar se encuentran gran cantidad de moléculas de adhesión celular como la fibronectina, sialoproteína ósea y osteopontina, además de factores de crecimiento FGFa, FGFb, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-I), factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y proteínas morfogenéticas de hueso (BMP's) (Nakae *et al.*, 1991) . Encontramos además integrinas en el hueso alveolar, por ejemplo se ha encontrado que el osteoclasto parece expresar las subunidades  $\alpha_5$ ,  $\alpha_v$ . El principal glucosaminoglucano identificado en el hueso alveolar es el condroitín sulfato, que está presente junto con heparán sulfato, dermatán sulfato y hialuronato.

## **2.4. CEMENTO RADICULAR.**

### **2.4.1. DESARROLLO.**

Después de la completa formación de la corona, las células del epitelio externo e interno reducido del esmalte, forman una bicapa de células conocida como vaina epitelial radicular de Hertwig. Las células del epitelio interno reducido del esmalte inducen a las células adyacentes a diferenciarse en odontoblastos y subsecuentemente a depositar dentina en la raíz (Bosshardt 1991). En el ser humano la vaina epitelial de Hertwig es desintegrada y no cubre más que la cara externa de la predentina recién formada. A lo largo de las grietas que sufre la vaina epitelial se permite el contacto directo de la dentina recién formada con el tejido conectivo del folículo dental. Las células derivadas de este tejido conectivo son las responsables de la formación del cemento. Estas células primero forman compartimentos con el proceso celular que demarcan las fibras intrínsecas de colágena que son paralelas al eje mayor de la raíz del diente. Las fibras extrínsecas son formadas después. Una vez que el cemento es formado, las células retractan sus procesos y forman fibras intrínsecas alrededor de las fibras principales. El cemento probablemente sea depositado en la superficie de la raíz durante el desarrollo del diente o subsecuente a la erupción de estos durante su función normal (Schroeder 1992).

Las células responsables de la formación del cemento pueden ser cementoblastos o fibroblastos localizados en el ligamento periodontal. Estas células tienen su origen en el folículo dental, sin embargo los cementoblastos son la primera fuente para la formación del cemento durante el desarrollo dentario y post-erupcionalmente. Estas células se localizan cerca de la superficie de aposición del cemento y poseen la apariencia típica de una célula productora de matriz, muy semejante a los osteoblastos. Los cementocitos son cementoblastos que quedaron atrapados en la matriz que ellos mismos produjeron. Estos están localizados dentro de la matriz mineralizada de cemento y poseen un menor nivel de síntesis de matriz lo que prácticamente los hace metabólicamente inactivos. El papel que juegan los fibroblastos en la cementogénesis a la fecha resulta poco claro, sin embargo células mesenquimatosas del ligamento periodontal se encuentran formando lagunas de células que tienen el potencial para diferenciarse tanto en fibroblastos del ligamento periodontal, como en cementoblastos dependiendo de su localización y de la exposición a agentes inductores (Bosshardt y Schroeder 1996).

#### **2.4.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES.**

El cemento es el tejido conectivo calcificado que cubre la raíz del diente desde la unión amelocementaria hasta el ápice. Este es uno de los más importantes componentes del aparato de unión porque es el sitio en el cual las fibras

del ligamento periodontal se insertan en el diente. Histológicamente el cemento es muy parecido al hueso y a la dentina, sin embargo, este cuenta con características únicas que lo hacen diferente.

Este tejido hasta hace algunos años había sido clasificado como cemento primario y cemento secundario, pero actualmente se utiliza otra clasificación más específica basada en la presencia o ausencia de células y en la organización de fibras colágenas (Schroeder 1992).

1. **Cemento acelular afibrilar.** Localizado en la unión amelodentinaria, esta estructura consiste en una matriz homogénea sin células ni fibras colágenas.
2. **Cemento acelular con fibras extrínsecas.** Localizado desde cervical hasta tercio medio del diente, esta estructura tampoco tiene células, pero si contiene fibras de Sharpey involucradas en el anclaje del diente.
3. **Cemento celular con fibras intrínsecas.** Este cubre las superficies apicales e interradiculares, también es encontrado en lagunas de reabsorción y sitios de fractura. Los cementocitos están presentes junto con las fibras colágenas y este cemento parece estar relacionado con la reparación y adaptación.
4. **Cemento acelular con fibras intrínsecas.** Es similar al cemento celular con fibras intrínsecas, pero no posee células. Este cemento ocupa las superficies apicales e interradiculares (Schroeder 1992).

5. **Cemento celular combinado estratificado.** Este cemento posee fibras intrínsecas y extrínsecas, además de cementocitos, está involucrado en el anclaje y adaptación.

Las fibras intrínsecas y extrínsecas son dos sistemas de fibras con diferentes funciones. Las fibras intrínsecas corren paralelas a la superficie radicular y se cree que tienen la función primaria de reparar componentes producidos por los cementocitos. En contraste las fibras de Sharpey o extrínsecas, se encuentran formando un ángulo recto con la superficie radicular y son las responsables del anclaje del diente (Schroeder 1992).

#### 2.4.3. BIOQUÍMICA.

Bioquímicamente el cemento esta formado por una matriz inorgánica de la cual aproximadamente 50 % es hidroxiapatita, y un matriz orgánica compuesta predominantemente por colágena tipo I y III (Birkedal-Hansen *et al.*, 1977). Esta matriz orgánica también contiene una variedad de proteínas no colágenas, como la sialoproteína ósea, osteopontina, tenascina, fibronectina, osteonectina, osteocalcina, glucosaminoglucanos y proteoglucanos (MacNeil and Somerman 1993, MacNeil *et al.*, 1995). La sialoproteína ósea contiene la secuencia de aminoácidos RGD que confiere la propiedad de adhesión celular y también es asociada a la mineralización durante la cementogénesis (Bronckers *et al.*, 1994;

Cheng *et al.*, 1994; McKee *et al.*, 1996). La osteopontina es otra proteína de adhesión presente en el cemento y esta asociada con el cemento acelular en el desarrollo de los incisivos de ratones (Somerman *et al.*, 1990). El cemento secuestra muchos factores de crecimiento incluyendo FGFa y FGFb, proteínas morfogenéticas de hueso, TGF- $\beta$  y IGF-I y receptores para factores de crecimiento (MacNeil y Somerman 1993; Bronckers *et al.*, 1994). Encontramos además componentes glucosaminoglucanos como el hialuronán, dermatán sulfato y condroitín sulfato, éstos compuestos al parecer participan en la formación de matriz mineralizada del cemento, sin embargo hasta ahora se desconocen las células responsables de la producción de dicha matriz. Las recientes evidencias indican que el sistema de fibras extrínsecas es producido por fibroblastos desde el ligamento periodontal mientras que las fibras intrínsecas son formadas por cementoblastos originados de los espacios endosteales del hueso alveolar (Pitaru *et al.*, 1994; Schoroeder 1992). Hasta la fecha el cultivo de cementoblastos y el estudio de sus características ha resultado difícil, debido a que se cree que sus progenitores se encuentran en espacios del ligamento periodontal y en los espacios endosteales del hueso (Pitaru *et al.*, 1994) Sin embargo, como alternativa a esta problemática se cuenta con del modelo de cementoblastos putativos aislados a partir de un cementoblastoma humano en cultivo, ya que estas células producen proteínas del cemento (Arzate *et al.*, 1992; 1998; 2000).

El cemento radicular ha sido generalmente considerado similar al hueso y tener propiedades parecidas a este ya que los cementoblastos y osteoblastos comparten marcadores biológicos como la fosfatasa alcalina (ALP), osteopontina (OPN), osteocalcina (OCN) y sialoproteína ósea (BSP), (Pitaru 1994; Schroeder 1993; Paynter y Pudy 1958). Sin embargo, las funciones que el cemento radicular desempeña son diferentes a las del hueso alveolar.

## 2.5 REGENERACIÓN PERIODONTAL.

Durante la regeneración periodontal se requiere de respuestas coordinadas de los diversos tipos celulares que comprenden el periodonto. Sin embargo las funciones precisas en la regulación de la formación de tejidos mineralizados como el hueso alveolar y el cemento radicular, así como tejidos conectivos fibrosos como la encía y el ligamento periodontal, que conducen a dicha regeneración no han sido establecidos a la fecha.

La regeneración periodontal involucra diversos procesos biológicos tales como proliferación, migración, adherencia, selección y diferenciación de las células progenitoras (Christner *et al.*, 1997; Reichert 1992; Bronckers *et al.*, 1994). Para que la regeneración periodontal se lleve a cabo, estos procesos deben estar coordinados en una secuencia espacial y temporal concertada para cada uno de

estos tejidos. Evidencias actuales apoyan el concepto de que la regeneración periodontal es promovida a través de la activación de células en la porción remanente sana del ligamento periodontal así como a través de la activación de células en las regiones paravasculares del ligamento periodontal (Somerman *et al.*, 1987; Somerman *et al.*, 1991). Sin embargo, los procedimientos actuales utilizados para lograr la regeneración periodontal parecen no ser predecibles. Esto es debido probablemente a la limitada capacidad de regeneración del periodonto.

Para solucionar este problema es necesario el entendimiento de los mecanismos bioquímicos y moleculares que se llevan a cabo en el periodonto, así como conocer las vías metabólicas que controlan estos mecanismos. A este respecto la regeneración del hueso alveolar y la promoción de la nueva formación del cemento radicular, son cruciales para la regeneración exitosa del periodonto (Miki *et al.*, 1987; McAllister *et al.*, 1990; Somerman *et al.*, 1989) después de la enfermedad (periodontitis).

El conocimiento sobre la localización de las células progenitoras de los cementoblastos durante el desarrollo y en estado adulto, permanece oscuro. Una aproximación a este hecho puede ser dada a través de datos obtenidos por un modelo animal (ratón), estos indican que las células de los espacios endosteales del hueso alveolar migran y adoptan una localización paravascular en el ligamento periodontal. Es preciso establecer también que el proceso de la cementogénesis en

ratón no constituye un modelo paralelo a la cementogénesis en humanos (Schroeder 1992) por lo que este concepto debe tomarse con reserva. Las células de ligamento periodontal obtenidas de roedores y los explantes marcados *in vitro* y examinados a través de autorradiografía, revelaron la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en células paravasculares en el grosor del ligamento periodontal, lo cual indica que estas células darían origen a células progenitoras que a su vez se diferenciarían en los diversos linajes celulares presentes en el ligamento periodontal (Andujar *et al.*, 1991). Análisis fenotípicos de estas poblaciones celulares, hacen hincapié en su capacidad de expresar el fenotipo fibroblástico u osteoblástico, dependiendo de las condiciones de cultivo (Kollar y Fisher 1980). Los factores que disparan la proliferación de los precursores de los cementoblastos, los que controlan la migración celular dirigida hacia la superficie radicular y aquellos que regulan su diferenciación en el periodonto adulto, permanecen como preguntas abiertas.

Para contestar estas interrogantes es necesario identificar, aislar y caracterizar poblaciones celulares que expresen el fenotipo del cemento radicular, sin embargo, existen dos mayores dificultades para lograr este objetivo. Una de ellas es que a la fecha no existe un marcador biológico específico de la matriz extracelular del cemento radicular y del linaje cementoblástico, la segunda la población celular del

ligamento periodontal es heterogénea, comprendiendo linaje osteoblástico, cementoblástico y diversos linajes fibroblásticos, lo que nos impide aislar una población puramente cementoblástica (Mina y Kollar 1987), el 40% del total de las poblaciones del ligamento periodontal expresan un fenotipo asociado a la formación de tejido mineralizado y el 7 % de esta población expresa el fenotipo cementoblástico con alta actividad específica de ALP, lo que revela estadios de diferenciación. Recientemente se ha aislado, expandido y caracterizado parcialmente una línea celular a partir de un cementoblastoma humano. Los resultados mostraron que esta línea celular parece ser homogénea y clonal así como expresar el fenotipo del cemento celular humano. También la naturaleza y propiedades estructurales del tejido mineral depositado por estas células son diferentes de aquél tejido mineralizado depositado por células derivadas de hueso alveolar. Por esto, estas células pueden ser consideradas como cementoblastos putativos (Slavkin *et al.*, 1989; Somerman *et al.*, 1990; Arzate *et al.*, 1998; 2000.).

Los resultados preliminares sugieren que las células derivadas del cementoblastoma humano, aunque comparten un progenitor común con las células osteoblásticas, siguen diferentes vías metabólicas en el proceso de mineralización y por lo tanto en la diferenciación. Estas células nos ofrecen una oportunidad única para elucidar como el proceso de la cementogénesis es regulado *in vitro*, ya que esta línea celular de un modo importante también ha mostrado producir la proteína

de adherencia del cemento radicular (CAP), la cual es el único marcador biológico de este tejido disponible a la fecha (Arzate *et al.*, 1992; Arzate, 1994; Arzate *et al.*, 1996.). Esta proteína ha demostrado ser capaz de promover la expresión de ALP, así como inducir la formación de nódulos mineralizados en células mesenquimatosas embrionarias sin un fenotipo definido *in vitro*, promueve la adherencia celular, además de tener afinidad por la hidroxiapatita (Pitaru *et al.*, 1995) y tiene un efecto preferencial en la quimiotaxis de células del ligamento periodontal que representan el linaje cementoblástico, lo que sugiere que la proteína de adherencia del cemento radicular es un factor importante en la quimioatracción, adhesión y diferenciación celular en el proceso de la cementogénesis y la regeneración periodontal (McCulloch 1985; McCulloch y Bordin 1991; Groeneveld *et al.*, 1993).

La producción de CAP por células del cementoblastoma humano nos indica que esta línea celular es una fuente significativa para la obtención, purificación y caracterización del único marcador biológico del cemento radicular existente a la fecha.

Existen algunas moléculas que también juegan un papel preponderante en el proceso de la cementogénesis, por ejemplo; la ALP que es reconocida como un marcador biológico en el complejo proceso de la diferenciación de osteoblastos y que participa en la mineralización de la matriz extracelular, posiblemente a través

de la regulación de las concentraciones extracelulares de fosfatos. Los mecanismos precisos por la cual la ALP participa en el proceso de mineralización no están aún claramente entendidos (Cho y Garant 1988). Durante el proceso de la cementogénesis *in vivo*, ha sido observado que la ALP incrementa su expresión en tanto en células progenitoras como en cementoblastos (Cheng *et al.*, 1994). La sialoproteína ósea (BSP) y la osteopontina (OPN) son las dos mayores proteínas no colágenas que están presentes en tejidos mineralizados y han sido implicadas en la deposición de mineral y en las interacciones matriz-matriz durante el desarrollo radicular (Ramakrshan *et al.*, 1995; Gould *et al.*, 1977; Gould *et al.*, 1980). Ambas proteínas son expresadas tanto por osteoblastos, como por cementoblastos y se acumulan en sus respectivas matrices mineralizadas. Asimismo, estas moléculas han recibido substancial atención como reguladores potenciales de la nucleación de cristales de hidroxiapatita y su crecimiento.

Durante el proceso de la cementogénesis se ha sugerido que la BSP y la OPN podrían mediar la migración, adhesión (considerando que contienen la secuencia RGD, arginina – glicina – ácido aspártico, que es bien conocido promueve la adhesión celular) y posterior diferenciación de células progenitoras del linaje cementoblástico (Narayanan *et al.*, 1995; Arzate, 1992; Olson *et al.*, 1991; Pitaru *et al.*, 1995; Arzate *et al.*, 1996). La OPN se ha visto asociada a los estadios

tempranos de mineralización del cemento radicular y conjuntamente con la BSP podrían regular la dispersión y acomodamiento de los cristales de hidroxiapatita.

La CAP y el anticuerpo específico contra esta, así como la existencia de una línea celular que expresa el fenotipo del cemento radicular humano nos ofrece la posibilidad de determinar cual es el papel regulador que las moléculas producidas por esta línea celular ejercen en la diferenciación celular y deposición de matriz mineralizada en células del ligamento periodontal humano y en células del hueso alveolar. Asimismo, estudios previos demuestran que el ligamento periodontal posee la capacidad de inhibir la osteogénesis en el espacio que este tejido ocupa (Melcher 1970), por lo tanto resulta importante tratar de determinar como se llevan a cabo estos procesos.

### **3. Planteamiento del problema.**

Debido a que a la fecha el proceso homeostático del periodonto no es bien conocido, así como tampoco ha sido esclarecido el papel regulador que poseen los tres principales tipos celulares que lo conforman (fibroblastos, osteoblastos y cementoblastos) en la estabilidad y en los procesos de diferenciación celular, que derivan, por lo tanto, en el crecimiento controlado del ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento radicular, es preciso tratar de contestar la interrogante de ¿Que efectos inhibitorios o proliferativos se ejercen entre estos tres tipos celulares?

## **4. Justificación.**

El conocer el papel que juegan los tejidos periodontales en la homeostasis del periodonto, específicamente en los procesos de mineralización y diferenciación, nos permitirá entender la influencia que tienen las moléculas asociadas a los tejidos mineralizados, de tal manera que se logra conservar el equilibrio entre estos tejidos. A este respecto se puede decir que prácticamente se desconoce la función que tienen el cemento radicular, el hueso alveolar y el ligamento periodontal, así como el de sus moléculas específicas en el proceso de diferenciación y deposición de matriz mineralizada y no mineralizada, por lo que los resultados de este estudio nos permitirán determinar con mayor precisión como se mantiene el equilibrio en el periodonto.

## **5. Hipótesis**

Los medios condicionantes de células derivadas de un cementoblastoma humano, del hueso alveolar y del ligamento periodontal regularán los procesos de diferenciación y mineralización en células cementoblásticas putativas, osteoblásticas y del ligamento periodontal, influenciando en la expresión de la sialoproteína ósea (BSP), fosfatasa alcalina (ALP) y la proteína de adherencia del cemento radicular (CAP).

## **6. Objetivos.**

### **6.1. Objetivo general.**

Determinar si los medios condicionantes de células derivadas de un cementoblastoma humano, del hueso alveolar y del ligamento periodontal regulan los procesos de diferenciación y mineralización en células cementoblásticas putativas, osteoblásticas y del ligamento periodontal *in vitro*.

### **6.2. Objetivos específicos**

A). Determinar si los medios condicionantes de células derivadas de un cementoblastoma humano, del hueso alveolar y del ligamento periodontal regulan la expresión de la sialoproteína ósea, la fosfatasa alcalina y la proteína de adherencia del cemento radicular en células cementoblásticas putativas, osteoblásticas y del ligamento periodontal.

B). Determinar si los medios condicionantes de células derivadas de un cementoblastoma humano, del hueso alveolar y del ligamento periodontal inhiben o favorecen el proceso de mineralización en células cementoblásticas putativas, osteoblásticas y del ligamento periodontal.

## **7. Materiales y métodos**

### **7.1. CULTIVO CELULAR.**

#### **7.1.1. Células del ligamento periodontal.**

Las células del ligamento periodontal humano se obtuvieron de premolares extraídos por razones ortodóncicas a un paciente masculino de 20 años de edad. Después de la extracción, los dientes fueron lavados profusamente con medio de cultivo mínimo esencial Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) y se raspó el tercio medio de la raíz para obtener el tejido periodontal. El fin de raspar únicamente el tercio medio es el de evitar la contaminación de células gingivales del tercio cervical y células pulpares provenientes del tercio apical. Los explantes obtenidos fueron colocados en cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), 4 % de suero humano y una solución de antibióticos compuesta por: 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. Las muestras fueron incubadas en un ambiente al 100 % de humedad, a 37°C y en una atmósfera con 95 % aire y 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo no se cambió hasta que se observó un crecimiento significativo (aproximadamente día 14 –20). Una vez que las células llegaron al estado de

confluencia, fue preciso tripsinizarlas con tripsina bovina-EDTA al 0.025% y fueron subcultivadas ahora en cajas de 75 cm<sup>2</sup>. A partir de esta etapa del cultivo no se utilizó suero humano.

### **7.1.2. Células cementoblásticas.**

La línea cementoblástica se generó a partir de un espécimen quirúrgico diagnosticado como cementoblastoma, proveniente de un paciente del sexo masculino de 38 años de edad. El diagnóstico se llevó cabo en la unidad de Cirugía de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM. Este diagnóstico clínico fue corroborado con el análisis histopatológico en la unidad de patología de dicha institución.

El espécimen fue transportado en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 %. El tejido blando circundante fue raspado y los pedazos de tejido macerados. Los explantes obtenidos fueron colocados en cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> en medio DMEM y al igual que las células del ligamento periodontal fue este medio suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), 4 % de suero humano y una solución de antibióticos compuesta por: 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. Las muestras fueron incubadas en las mismas condiciones de humedad, temperatura y atmósfera que el cultivo en las células del ligamento periodontal, del mismo modo, el medio de cultivo no se cambió hasta

que poder ver crecimiento significativo (aproximadamente día 14 –20). Una vez que las células llegaron al estado de confluencia, también fueron tripsinizadas con tripsina bovina-EDTA al 0.025 % y subcultivadas en cajas de 75 cm<sup>2</sup>.

### **7.1.3. Células osteoblásticas.**

De manera similar fueron obtenidas las células osteoblásticas, a partir de fragmentos de hueso alveolar obtenidos de una cirugía de tercer molar. Los fragmentos de aproximadamente 1 mm<sup>2</sup> se sembraron. Una vez que proliferaron, fueron tripsinizados y subcultivados como se explico en los anteriores cultivos.

## **7.2. OBTENCIÓN DE MEDIOS**

### **CONDICIONANTES DERIVADOS DE CÉLULAS.**

(cementoblastos putativos, osteoblastos y fibroblastos del ligamento periodontal).

Los medios condicionantes fueron obtenidos de manera separada de los cultivos confluentes de los cementoblastos putativos, de los osteoblastos y de las células del ligamento periodontal, en cajas de 75 cm<sup>2</sup>. Las monocapas celulares fueron lavadas con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 4 veces, esto con el fin de eliminar posibles restos de suero fetal bovino, después fueron incubadas durante 48 horas en medio DMEM libre de suero, al término de este tiempo el

medio fue recolectado y dializado contra PBS para después ser liofilizado y reconstituido en este mismo buffer.

### **7.3. ENSAYOS DE MINERALIZACIÓN.**

Una vez obtenidas las 3 líneas celulares, cada una de estas fueron sembradas en cajas de 96 pozos a una densidad de  $1 \times 10^4$  células por pozo, por triplicado. Los controles fueron realizados con medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino y cada uno de los experimentales se les fue adicionado además 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de medio condicionante de las otras dos líneas celulares, el cultivo se realizó durante 7, 14 y 21 días. El medio fue cambiado cada 72 horas.

Cumplidos los días correspondientes de cultivo, las células fueron fijadas con 100  $\mu\text{L}$  de Me-OH (metanol) por pozo durante 5 minutos, después de esto se retira el metanol y se dejan secar los pozos. Los cultivos una vez fijados se tiñeron con una solución saturada de alizarina roja pH 4.1 y fue determinada la cantidad de tejido mineralizado por medio de un analizador de imágenes, tanto en las células controles como en las que fueron adicionadas con algunos de los medios condicionantes.

## **7.4. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE FOSFATASA ALCALINA.**

Cada una de las líneas celulares fueron sembradas en cajas de 48 pozos a una densidad de  $1.5 \times 10^4$  células por pozo. De manera similar a los ensayos de mineralización, a cada uno de estos pozos se le adicionaron 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de medio condicionante de las dos líneas celulares y el cultivo se realizó a 3, 5, 10 y 15 días. Cumplido el tiempo de 3 días las células fueron cosechadas, lavando primero con buffer de lavado (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, Tween 20 0.1 M, pH 7.5) y adicionándoles después 200  $\mu\text{L}$  del mismo buffer en cada uno de los pozos, raspando posteriormente el fondo de estos, obteniendo así una suspensión que fue colocada en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL, estos tubos fueron conservados a  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ . Este mismo procedimiento fue hecho para los días 5, 10 y 15. Una vez finalizado las células fueron sonicadas durante 4 seg y centrifugadas por espacio de un minuto a 12000g.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford utilizando una concentración de 1:100 (990  $\mu\text{l}$  de solución de Bradford más 10  $\mu\text{l}$  de la solución obtenida después de centrifugar), la lectura se realizó en un espectrofotómetro Beckman a 595nm.

La actividad específica de fosfatasa alcalina se determinó por medio del método de Lowry, utilizando 8 mM de p-nitrofenil fosfato disódico (PNP) como sustrato y 2 mM de  $MgCl_2$  en 0.1 M de amortiguador Tris-HCL pH 9.8 para posteriormente incubar la reacción a 37 °C. Las absorbancias fueron determinadas a 405 nm, las lecturas fueron hechas cada 5 minutos a lo largo de una hora. Posteriormente, se sacó el promedio de los triplicados de las lecturas de ambos métodos, con estos resultados se aplicó la fórmula para determinar la actividad específica de fosfatasa alcalina (AE= lectura a 405 nm (Método de Lowry) / lectura a 595 (método de Bradford).

## **7.5. EXPRESIÓN DE BSP Y CAP.**

Se sembraron en cajas de 48 pozos cada una de las líneas celulares a una densidad de  $1.5 \times 10^4$  células por pozo. A cada uno de los pozos experimentales se les adicionó 5  $\mu g/mL$  de medio condicionante de las dos líneas celulares restantes y el cultivo se realizó a 3, 7, y 14 días. El medio condicionante se adicionó cada 3<sup>er</sup> día. Al término de cada uno de los tiempos de cultivo, se fijaron las células con formaldehído al 3.5 % por 10 minutos, después de esto cada uno de los pozos fueron lavados con PBS y se les dejó secar a temperatura ambiente.

## **ELISA**

El primer paso es el de recubrimiento de cada pozo con el anticuerpo policlonal anti-CAP a una dilución de 1:1000 o bien con el anticuerpo policlonal anti-BSP, a la misma concentración, dependiendo de la proteína que se quería detectar, estos se diluyeron en una solución amortiguadora de recubrimiento (se utilizó un buffer de bicarbonato, con pH de 9.6, 1.59g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.93g NaHCO<sub>3</sub>, 0.2g NaN<sub>3</sub> / L H<sub>2</sub>O), para después ser incubados por 5 horas a temperatura ambiente.

Cada pozo fue lavado 3 veces en Tween PBS (Tween PBS a pH 7.4 = 8.0g NaCl, .02g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12mL H<sub>2</sub>O, .2 KCl, 0.5 mL Tween 20, .2 NaN<sub>3</sub>, 1 L H<sub>2</sub>O), llenando los pozos y dejando esta solución en ellos durante 3 minutos antes de vaciarlos.

200 µL de suero anti-CAP o anti-BSP diluido 1:200 en Tween PBS, fueron adicionados a cada pozo y se incubó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó nuevamente.

200 µL de solución de enzima marcada con inmunoglobulina cabra-anti-conejo (fracción IgG) fue agregada a cada pozo en una disolución 1:150 e incubada una noche mas a 4°C. Una vez mas se realizó el lavado de los pozos.

A cada pozo se le colocó 200  $\mu$ L de una solución de diaminobenzidina (DAB) como sustrato y fue incubado por 30 min. La reacción fue detenida y el contenido fue analizado en un espectrofotómetro, para leer la absorción a 610 nm. Los resultados fueron expresados como la media de los triplicados.

Como puede observarse este estudio es experimental y consigue su validez interna por medio de los ensayos hechos por triplicados, estos experimentos son totalmente reproducibles, y en ellos únicamente se modificaron las variables de interés, que en este caso son los medios condicionantes.

El análisis estadístico fue realizado por medio de la t de student, en el paquete estadístico sigma (Jandel Scientific) V. 2.0, para poder así determinar diferencias que fueran estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos controles y los grupos experimentales.

## **8. Resultados.**

### **8.1. Actividad específica de fosfatasa alcalina.**

#### **8.1.1. Células cementoblásticas.**

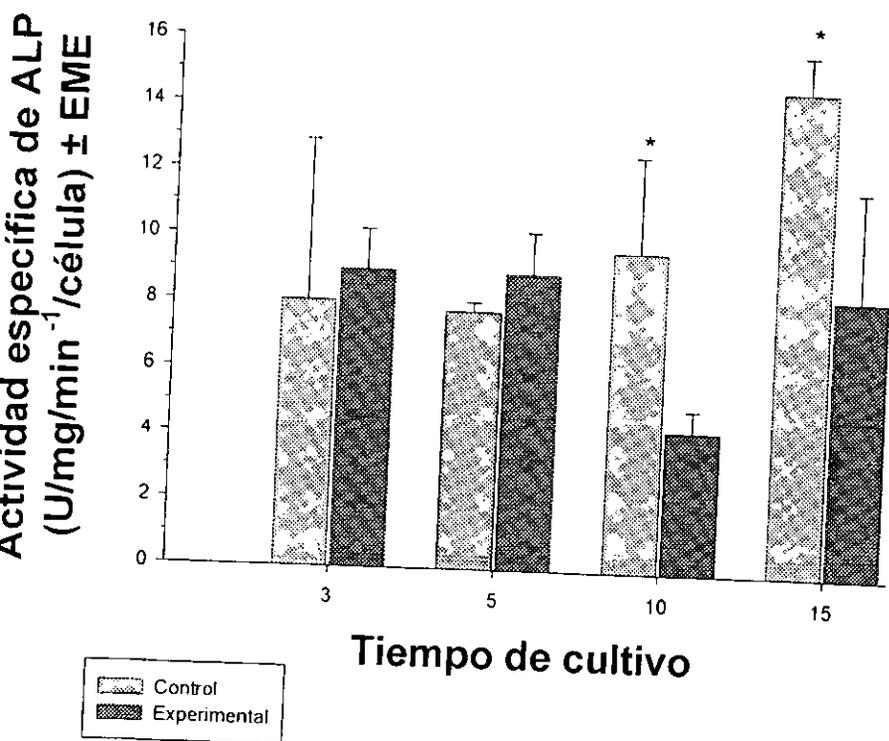
##### **8.1.1.1. Cementoblastos tratados con medio condicionante de osteoblastos.**

Durante los días 3 y 5 de cultivo, no existió diferencia significativa entre los cementoblastos control y aquellos que fueron tratados con medio condicionante de células osteoblásticas. Para el día 10, la actividad específica de fosfatasa alcalina presentó un decremento del 55.5 % ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo control y a los 15 días de cultivo la disminución en la actividad específica de fosfatasa alcalina fue de 42.37 % ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1).

##### **8.1.1.2. Cementoblastos con medio condicionante de células del ligamento periodontal.**

En el día 3 de cultivo celular no se presentó un cambio significativo entre las células control y las experimentales, sin embargo la actividad de fosfatasa alcalina se incremento durante el día 5 en un 36.22% ( $p < 0.05$ ), al igual que el día 10, con un incremento de 70.02 % ( $p < 0.05$ ) con respecto al control. Para el día 15 las células control y las experimentales no evidenciaron diferencias que fueran significativas en la actividad específica de fosfatasa alcalina (Fig. 2).

## Cementoblastos con medio condicionante de osteoblastos



**Fig. 1. Actividad específica de fosfatasa alcalina (ALP) en cementoblastos con medio condicionante de osteoblastos.** En el día 3 y 5 no se observó diferencias significativas entre el grupo control y el grupo experimental. En los días 10 y 15 se presentó un decremento en la actividad específica de ALP en el grupo experimental. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas.

## Cementoblastos con medio condicionante de células del ligamento periodontal

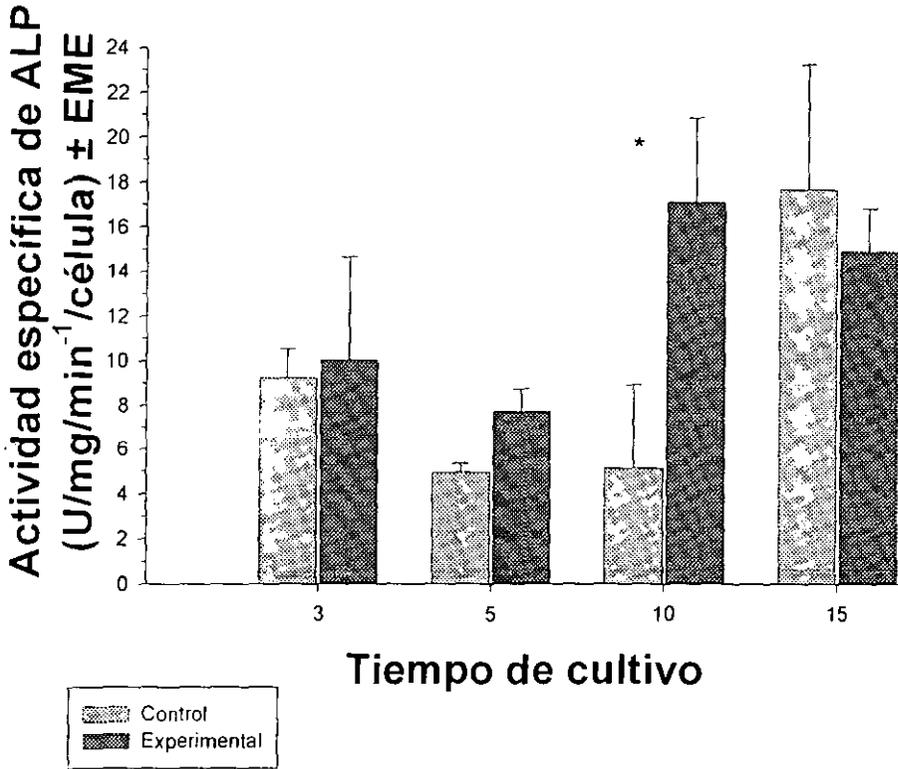


Fig. 2. Actividad específica de fosfatasa alcalina (ALP) con medio condicionante de células del ligamento periodontal.

En el día 3 de cultivo celular no se observan diferencias significativas, en el día 5, la actividad de ALP se incrementó 36.22 % con respecto al control, en el día 10, 70.02 % y en el día 15, no hubo diferencia significativa entre ambos grupos. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas.

## **8.1.2. Células osteoblásticas.**

### 8.1.2.1. Osteoblastos con medio condicionante de células cementoblásticas.

En la línea celular osteoblástica no existieron diferencias significativas durante los días 3 y 5. En el día 10 la actividad de fosfatasa alcalina disminuyó en un 42.33 % ( $p < 0.05$ ) con respecto a las células del grupo control. Sin embargo, en el día 15 no se observó diferencia que resultara significativa en la actividad de fosfatasa alcalina entre los grupos control y experimental (Fig. 3).

### 8.1.2.2. Osteoblastos con medio condicionante de células del ligamento periodontal.

En esta línea celular durante los días 3, 5 y 10 de cultivo no fue perceptible alguna diferencia significativa entre el grupo control y las células tratadas con el medio condicionante de células del ligamento periodontal. Sin embargo los resultados obtenidos revelaron que el día 15 se observó una disminución en la actividad específica de fosfatasa alcalina en el grupo experimental de un 64.64 % ( $p < 0.05$ ) con respecto al control (Fig. 4).

## Osteoblastos con medio condicionante de cementoblastos

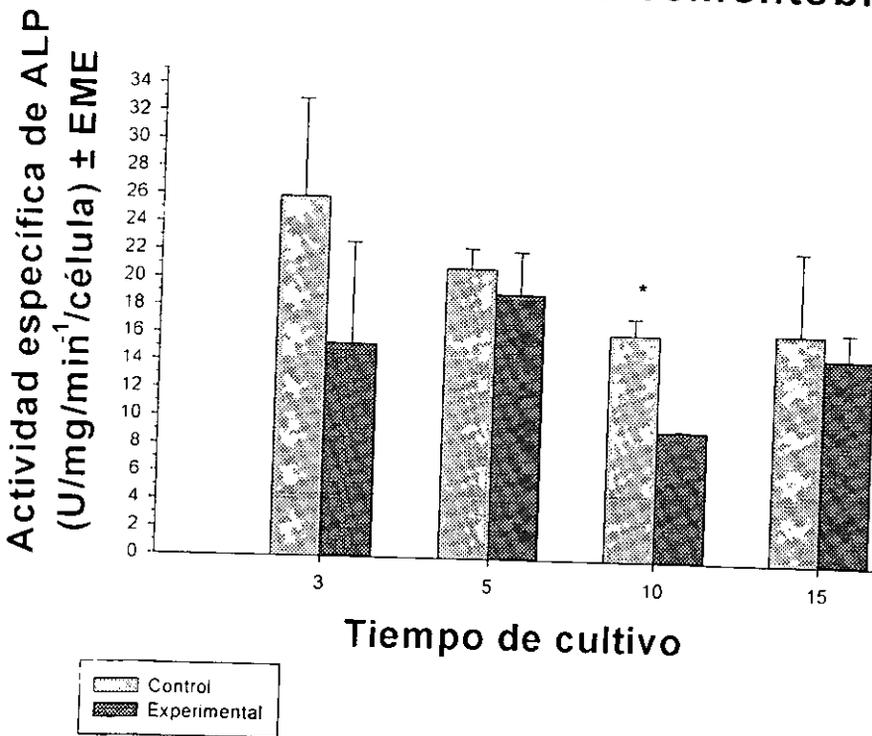
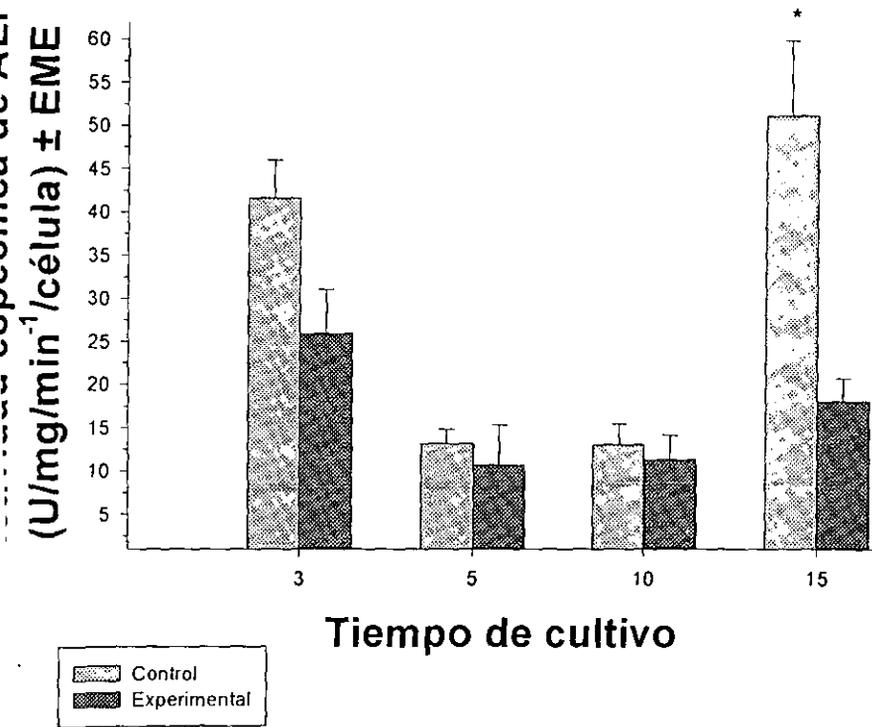


Fig. 3. Actividad específica de fosfatasa alcalina (ALP) en osteoblastos con medio condicionante de cementoblastos. Durante los días 3 y 5, no se observan diferencias significativas. Para el día 10, la actividad de ALP disminuyó 44.23 % con respecto al grupo control y en el día 15 no hubo variación significativa entre ambos grupos. El asterisco indica una diferencia significativa de  $p < 0.05$ .

# Osteoblastos con medio condicionante de células del ligamento periodontal



**Fig. 4. Actividad específica de fosfatasa alcalina (ALP) en osteoblastos con medio condicionante de células del ligamento periodontal.**

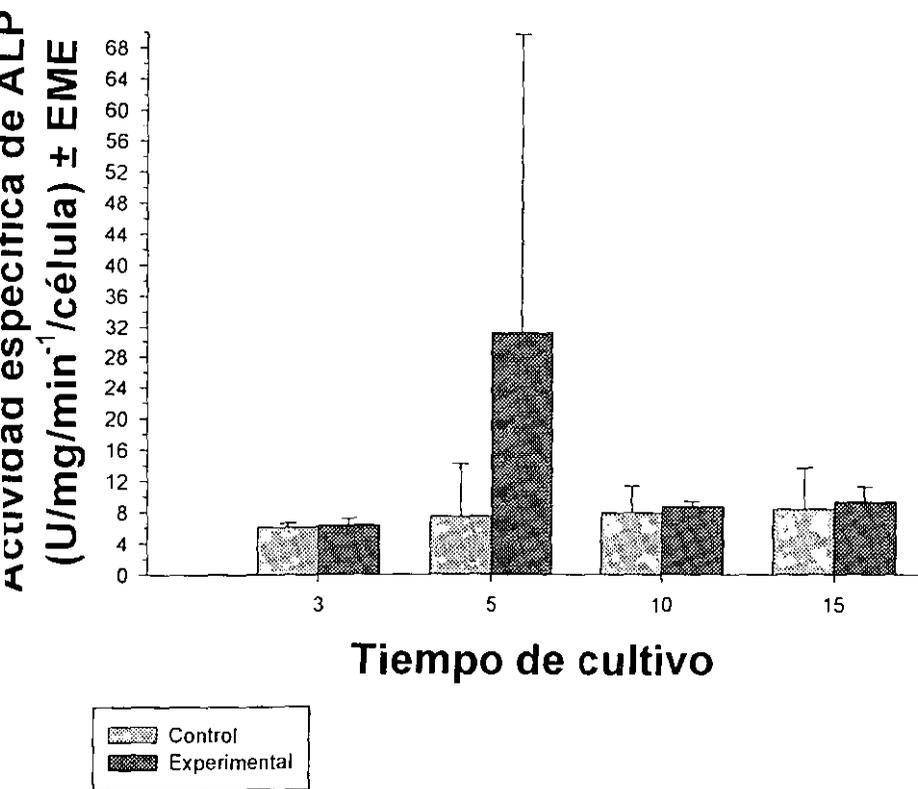
En este grupo celular no se evidencian diferencias significativas en la actividad específica de ALP entre el grupo control y el grupo experimental en los días 3, 5 y 10 de cultivo, pero en el día 14 se observó una disminución de un 64.64 % en la actividad específica de ALP con respecto al control. \*= $p < 0.05$

### **8.1.3. Células del ligamento periodontal.**

#### 8.1.3.1-8.1.3.2

La actividad específica de fosfatasa alcalina no presentó diferencias significativas entre los grupos control y experimental durante ninguno de los tiempos establecidos de cultivo celular aún con el tratamiento de medios condicionantes derivados de cementoblastos y osteoblastos (Fig. 5 y 6).

# Células del ligamento periodontal con medio condicionante de cementoblastos



**Fig. 5. Actividad específica de fosfatasa alcalina (ALP) en células del ligamento periodontal con medio condicionante de cementoblastos.**

Se observa que durante los tiempos de cultivo asignados no existieron diferencias significativas en la actividad específica de ALP entre el grupo control y el grupo experimental.

## Células del ligamento periodontal con medio condicionante de osteoblastos

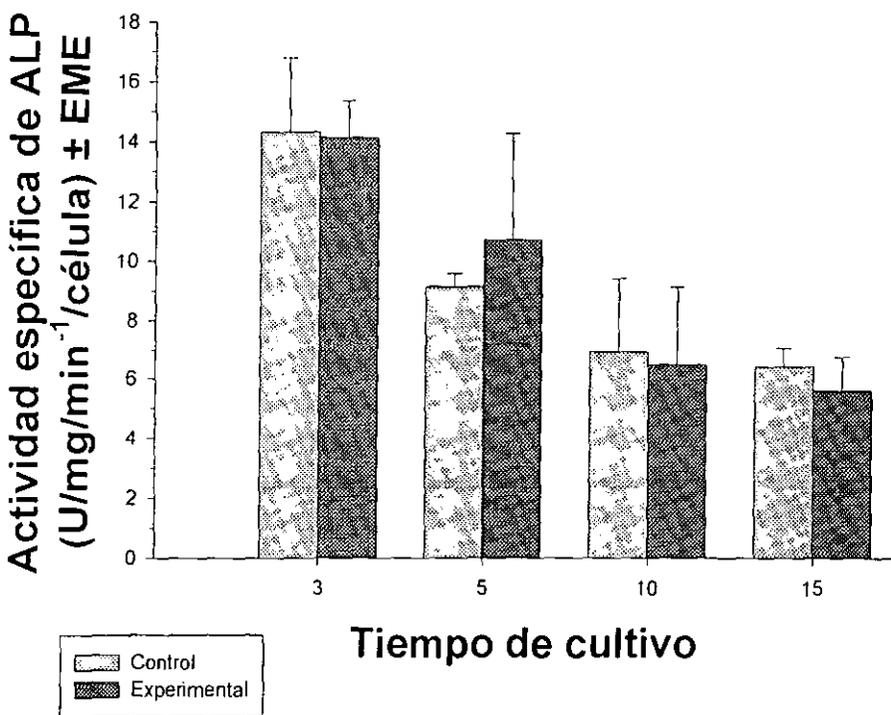


Fig. 6. Actividad específica de fosfatasa alcalina (ALP) en células del ligamento periodontal con medio condicionante de osteoblastos.

La actividad específica de ALP no presentó diferencias significativas entre el grupo control y el experimental durante los tiempos de cultivo establecidos.

## **8.2. Porcentaje de tejido mineralizado.**

### **8.2.1. Células cementoblásticas.**

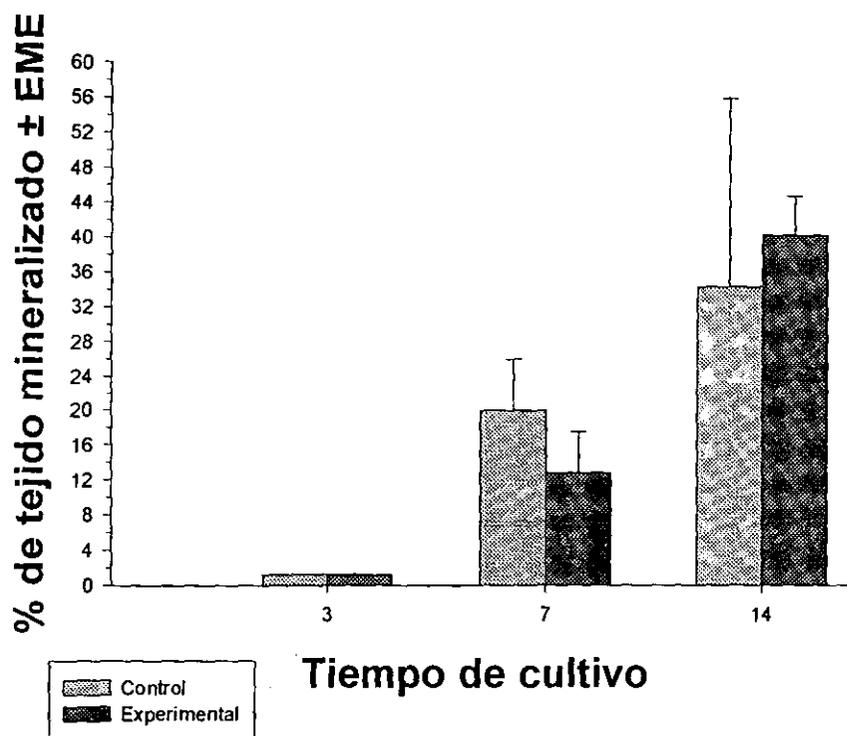
#### **8.2.1.1. Cementoblastos con medio condicionante de osteoblastos**

Las células tratadas con medio condicionante de osteoblastos no tuvieron una diferencia significativa en la producción de tejido mineralizado con respecto al control en ninguno de los tiempos de cultivo establecidos, es decir, 3, 7 y 14 días. Sin embargo, estos resultados demuestran que existió un incremento de entre 20 y 40% en la formación de tejido mineralizado tanto en el grupo control como en el grupo experimental (Fig 7).

#### **8.2.1.2. Cementoblastos con medio condicionante de células del ligamento periodontal.**

El medio condicionante de células del ligamento periodontal pareció no ejercer efecto en la síntesis de tejido mineralizado en las células cementoblásticas. Sin embargo, la formación de tejido mineralizado por estas células mostró un incremento del 18% a los 14 días de cultivo con respecto a el grupo control (Fig. 8).

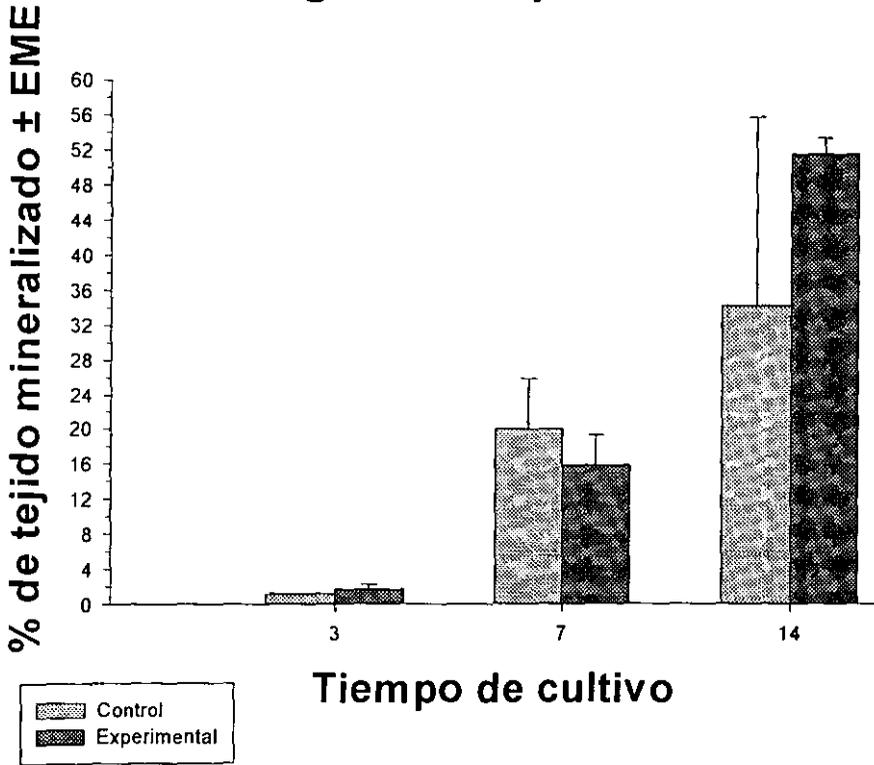
## Porcentaje de tejido mineralizado en cementoblastos con medio condicionante de osteoblastos



**Fig. 7. Porcentaje de tejido mineralizado en cementoblastos con medio condicionante de osteoblastos.**

Los cementoblastos tratados con medio condicionante de células osteoblásticas no tuvieron una producción de tejido mineralizado que fuera significativamente diferente de la cantidad de tejido mineralizado producido por el grupo control. (EME = error medio estandar).

# Porcentaje de tejido mineralizado en cementoblastos con medio condicionante de células del ligamento periodontal



**Fig. 8. Porcentaje de tejido mineralizado en cementoblastos con medio condicionante de células del ligamento periodontal.**

Los cementoblastos tratados con el medio condicionante de células del ligamento periodontal no presentaron una cantidad de tejido mineralizado que fuera significativamente diferente a la cantidad de tejido mineralizado producido por el grupo control.

## **8.2.2. Células osteoblásticas.**

### 8.2.2.1 Osteoblastos con medio condicionante de cementoblastos.

Las células osteoblásticas presentaron un aumento en la formación de tejido mineralizado del 82.53% ( $p < 0.05$ ) con respecto al control durante el día 3 de cultivo, mientras que en los días 7 y 14 no aparecieron diferencias significativas en dicho tejido, aunque en ambos grupos hubo una formación de tejido mineralizado de 17% (7 días) y 51% (14 días) (Fig. 9)

### 8.2.2.2. Osteoblastos con medio condicionante de células del ligamento periodontal.

En células osteoblásticas tratadas con medio condicionante de células del ligamento periodontal, se observó que el porcentaje de tejido mineralizado aumentó en un 73.16% ( $p < 0.05$ ) a los 3 días de cultivo con respecto al control. En el día 7 las diferencias en el porcentaje de tejido mineralizado no fueron significativas y éste disminuyó un 57.97 % ( $p < 0.05$ ) a los 14 días en el grupo experimental con respecto al control (Fig. 10).

## Porcentaje de tejido mineralizado en osteoblastos con medio condicionante de cementoblastos

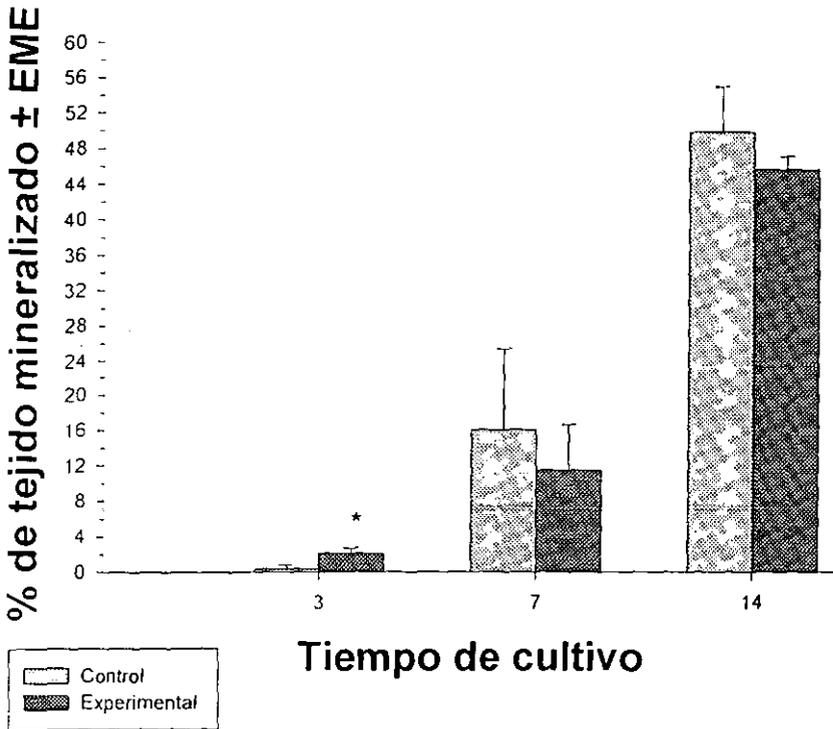
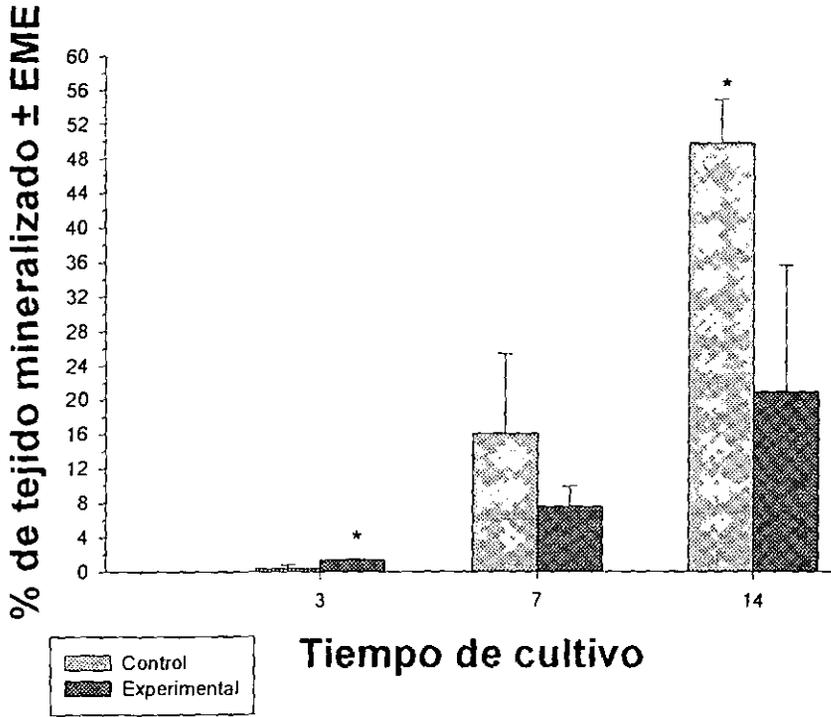


Fig. 9. Porcentaje de tejido mineralizado en osteoblastos con medio condicionante de cementoblastos.

Los osteoblastos tratados con medio condicionante de cementoblastos expresaron un incremento del 82.53 % en la producción de tejido mineralizado con respecto al control en el día 3, durante los días 7 y 14 no se produjeron diferencias significativas entre ambos grupos. (EME = error medio estandar. \* =  $p < 0.05$ ).

## Porcentaje de tejido mineralizado en osteoblastos con medio condicionante de células del ligamento periodontal



**Fig. 10. Porcentaje de tejido mineralizado en osteoblastos tratados con medio condicionante de células del ligamento periodontal.**

Se observa un aumento de un 73.16 % con respecto a los osteoblastos del grupo control durante el día 3, en el día 7 no se presentaron diferencias significativas y para el día 14 el porcentaje disminuyó 57.97% en el grupo experimental, con respecto al control. (EME = error medio estandar. \* =  $p < 0.05$ ).

### 8.2.3. Células del ligamento periodontal.

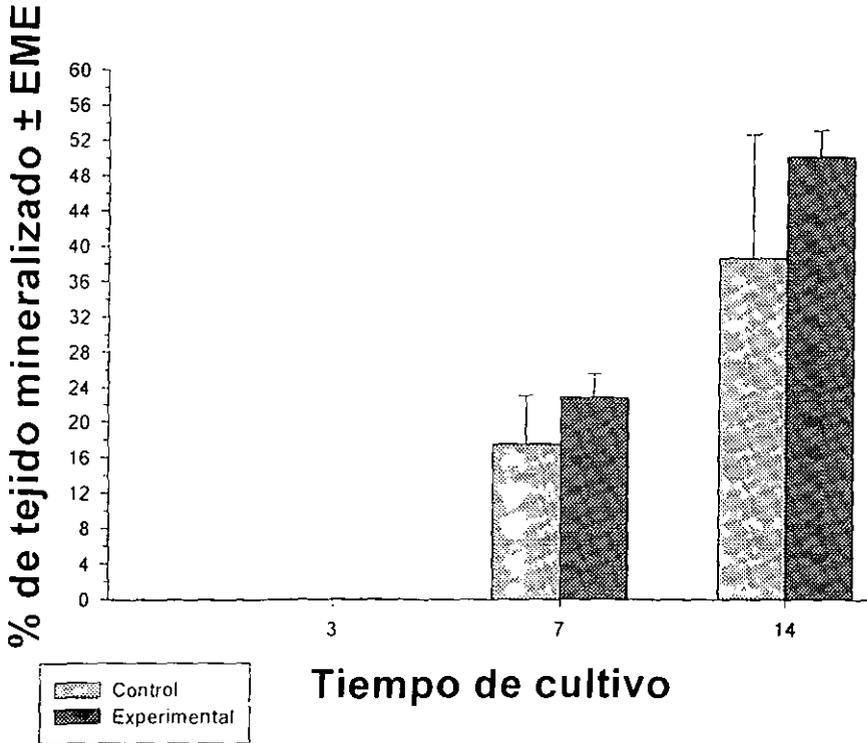
#### 8.2.3.1. Células del ligamento periodontal con medio condicionante de cementoblastos.

En las células del ligamento periodontal con medio condicionante de cementoblastos no existieron diferencias significativas en ninguno de los tiempos de cultivo en el porcentaje de tejido mineralizado entre el grupo control y experimental. Sin embargo, tanto en el grupo control como en el experimental hubo un incremento de entre 25% (7 días) y 51 % (14 días) en la formación de tejido mineralizado.(Fig. 11).

#### 8.2.3.2. Células del ligamento periodontal con medio condicionante de osteoblastos.

Las células del ligamento periodontal tratadas con medio condicionante de osteoblastos, se observó una diferencia significativa durante el día 7 donde hubo un incremento del 59.34 % ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de tejido mineralizado con respecto al control (Fig. 12).

## Porcentaje de tejido mineralizado en células del ligamento periodontal con medio condicionante de cementoblastos



**Fig. 11. Porcentaje de tejido mineralizado en células del ligamento periodontal con medio condicionante de cementoblastos.**

En éstas células no se presentaron diferencias significativas en la producción de tejido mineralizado por parte del grupo experimental y el grupo control. (EME = error medio estandar).

## Porcentaje de tejido mineralizado en células del ligamento periodontal con medio condicionante de osteoblastos

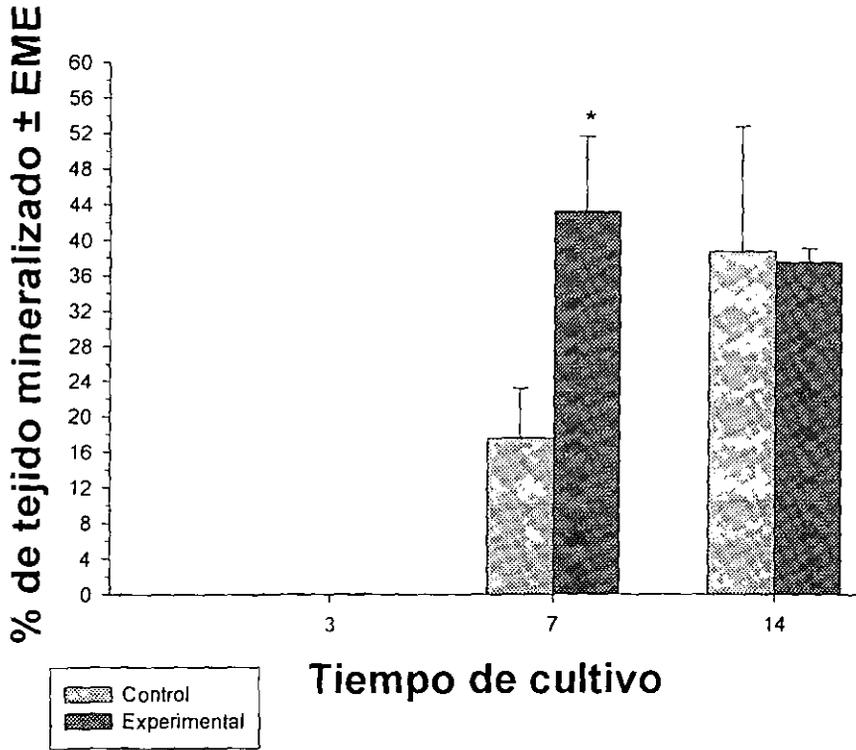


Fig.12. Porcentaje de tejido mineralizado en células del ligamento periodontal con medio condicionante de osteoblastos.

Únicamente se pueden observar diferencias significativas durante el día 7 de cultivo celular, incrementándose el porcentaje de tejido mineralizado un 59.34 % con respecto al grupo control.

(EME = error medio estandar. \* =  $p < 0.05$ .)

### **8.3. EXPRESIÓN DE CAP Y BSP.**

#### **8.3.1. Células cementoblásticas**

##### **8.3.1.1. Expresión de CAP.**

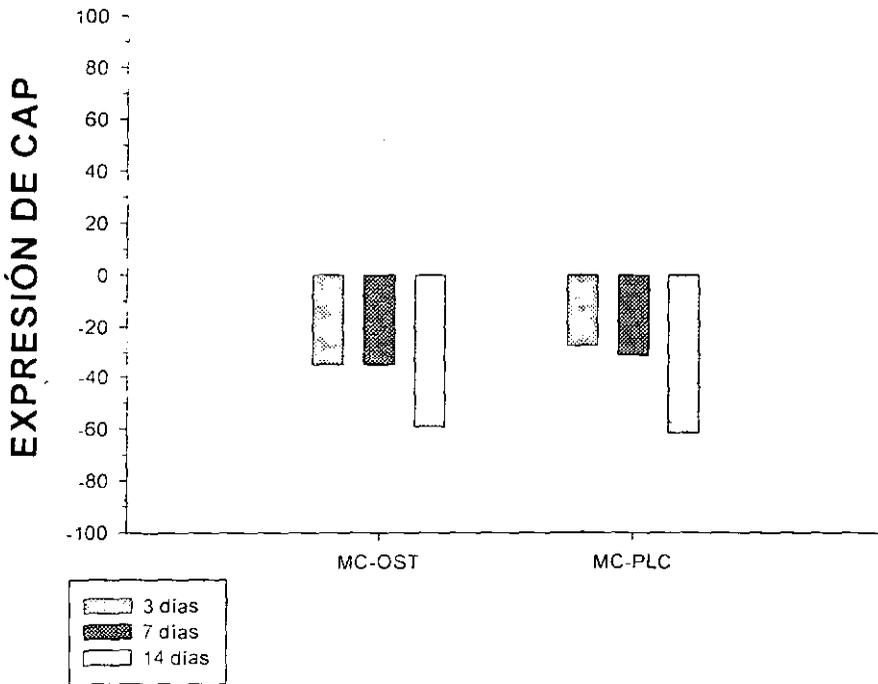
###### **8.3.1.1.1. Cementoblastos con medio condicionante de osteoblastos.**

Se determinó que el medio condicionante de osteoblastos ejerce un papel regulador, inhibiendo la inmunoexpresión de la CAP en células cementoblásticas. Esta inhibición fue en aumento conforme aumentaba el tiempo de cultivo. A los 3 días se observó una disminución del -35.1 % , a los 7 días de -35.4% y a los 14 días de -58.9 % en el día 14 con respecto al grupo control (Fig 13).

###### **8.3.1.1.2. Cementoblastos con medio condicionante de células del ligamento periodontal.**

Las células cementoblásticas tratadas con medio condicionante de células del ligamento periodontal, se comportaron de manera similar a las tratadas con medio condicionante de osteoblastos, presentándose una inhibición de la inmunoexpresión de la CAP -27.1% en el día 3, de -31.30% en el día 7 y de -61.61 % a los 14 días (Fig. 13).

## Expresión de CAP en cementoblastos con medio condicionante de osteoblastos y de células del ligamento periodontal



**Fig. 13. Expresión de proteína de adherencia del cemento radicular (CAP) en cementoblastos tratados con medio condicionante de osteoblastos (MC-OST) y medio condicionante de células del ligamento periodontal (MC-PLC).**  
En estas células ambos casos presentaron un decremento en la expresión de la CAP.

### **8.3.1.2. Expresión de BSP.**

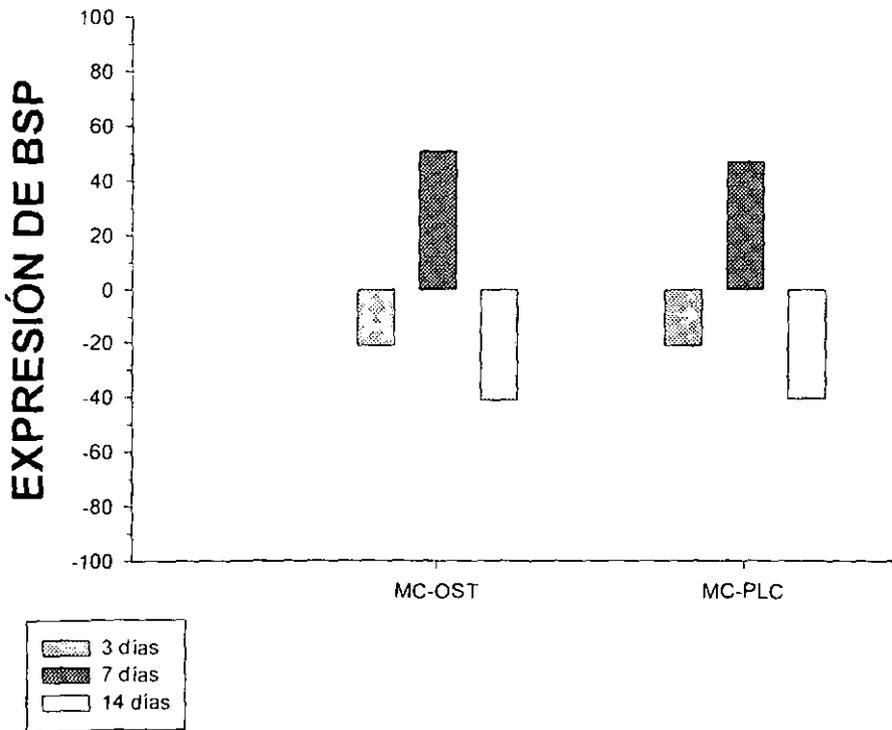
#### **8.3.1.2.1. Cementoblastos con medio condicionante de osteoblastos.**

La expresión de la sialoproteína ósea en cementoblastos tratados con medio condicionante de osteoblastos fue inhibida en un -21% a los 3 días, en el día 7 aumento su expresión en un 50.84%, para posteriormente, en el día 14 caer en una inhibición del -41.18 % (Fig. 14)

#### **8.3.1.2.2. Cementoblastos con medio condicionante de células del ligamento periodontal.**

La expresión de la sialoproteína ósea en células cementoblásticas con medio condicionante de células del ligamento periodontal fue muy similar a los anteriores. En los cementoblastos tratados con medio condicionante de células del ligamento periodontal se reveló que durante los tres primeros días de cultivo un -21.21 % de inhibición en la expresión de BSP, ocurriendo un incremento en la producción de esta proteína a los siete días de cultivo del 46.89 % y nuevamente una inhibición del -40.50% en el día 14 (Fig. 14).

# Expresión de BSP en cementoblastos con medio condicionante de osteoblastos y de células del ligamento periodontal



**Fig. 14.** Expresión de sialoproteína ósea (BSP) en cementoblastos con medio condicionante de osteoblastos (MC-OST) y de células del ligamento periodontal (MC-PLC).

El comportamiento en la expresión de BSP, para ambos casos fué similar, observándose una inhibición en la síntesis de esta proteína en los días 3 y 14. En el día 7 hubo mayor expresión de esta en los grupos experimentales con respecto al control.

## **8.3.2. Células osteoblásticas.**

### **8.3.2.1. Expresión de CAP.**

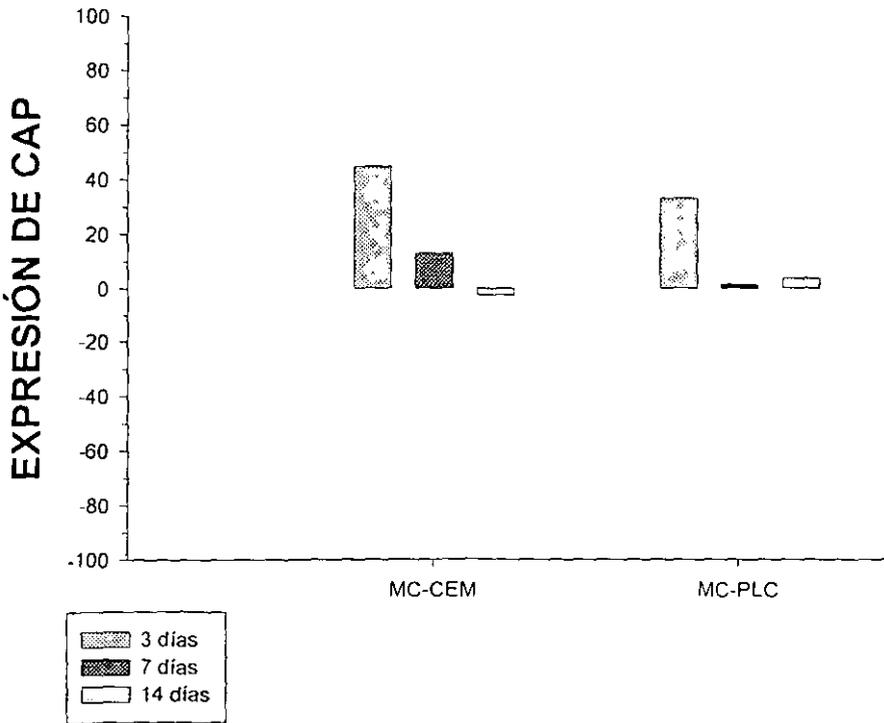
#### **8.3.2.1.1. Osteoblastos con medio condicionante de cementoblastos**

En la expresión de proteína de adherencia del cemento radicular (CAP) se observó un incremento a los 3 días en un 44.50 % en células osteoblásticas tratadas con el medio condicionante de células cementoblásticas. A los 7 días se observó un decremento del 13.04 % en la expresión de dicha proteína. Finalmente al día 14 se observó una disminución del -2.5 % para el día respecto al grupo control (Fig. 15).

#### **8.3.2.1.2. Osteoblastos con medio condicionante de células del ligamento periodontal.**

Durante el día 3 las células osteoblásticas tratadas con medio condicionante de células del ligamento periodontal presentaron un aumento de un 32.94 % en la expresión de CAP, con respecto al control, a los siete días se observó una disminución en la síntesis de esta proteína. En el día 7 solo se observó un aumento de 1.30 % respecto al control. El día 14 de la expresión de CAP aumentó en un 3.61% con respecto del control (Fig. 15).

## Expresión de CAP en osteoblastos con medio condicionante de cementoblastos y de células del ligamento periodontal



**Fig. 15. Expresión de proteína de adherencia del cemento radicular (CAP) en osteoblastos con medio condicionante de cementoblastos (MC-CEM) y de células del ligamento periodontal (MC-PLC).**  
En el día 3 en ambos grupos se presentó un aumento en la expresión de CAP, los días 7 y 14 se caracterizaron por la disminución en la síntesis de dicha proteína.

### **8.3.2.2. Expresión de BSP.**

#### **8.3.2.2.1 Osteoblastos con medio condicionante de cementoblastos.**

La expresión de BSP fue inhibida en células osteoblásticas por efecto del medio condicionante de células cementoblásticas durante los tres diferentes tiempos de cultivo, con porcentajes de -6.01 % a los 3 días, -12.2% en el día 7 y finalmente -1.5 % en el día 14 (Fig. 16).

#### **8.3.2.2.2. Osteoblastos con medio condicionante de células del ligamento periodontal.**

Los osteoblastos tratados con medio condicionante de células del ligamento periodontal, presentaron una inhibición de -5.06 % en la expresión de BSP durante el día 3, cambiando esta situación en el día 7 con .91 % de aumento en la expresión de esta proteína con respecto al control, para finalmente presentarse al día 14 un incremento del 25.15 % con respecto al grupo control (Fig. 16).

## Expresión de BSP en osteoblastos con medio condicionante de cementoblastos y de células del ligamento periodontal

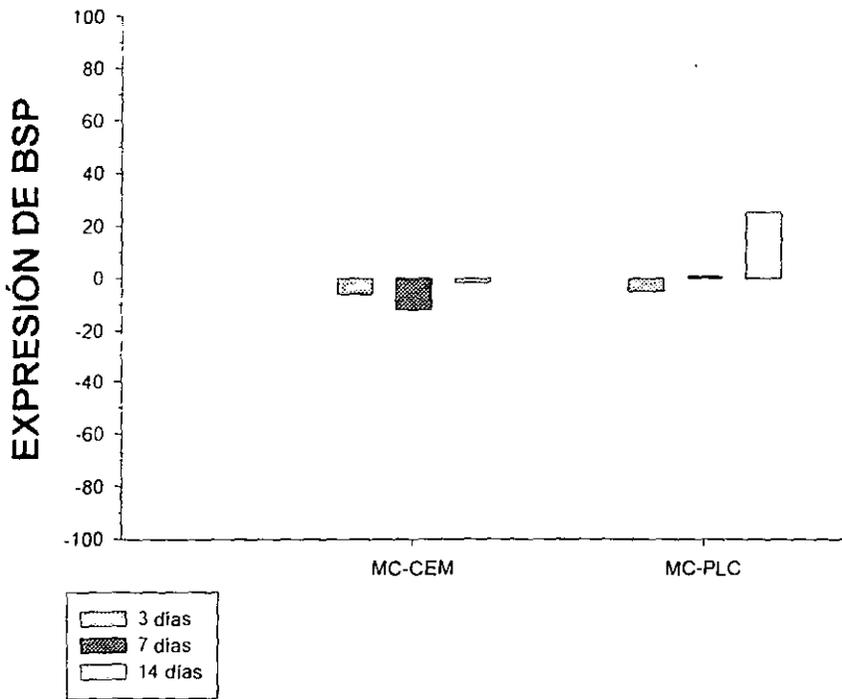


Fig. 16. Expresión de sialoproteína ósea (BSP) en osteoblastos con medio condicionante de cementoblastos (MC-CEM) y de células del ligamento periodontal (MC-PLC). Tanto los osteoblastos tratados con MC de cementoblastos como los tratados con MC de células del ligamento periodontal mostraron un aumento en la expresión de BSP con respecto al grupo control en el día 14 de cultivo.

### 8.3.3. Células del ligamento periodontal

#### 8.3.3.1. Expresión de CAP.

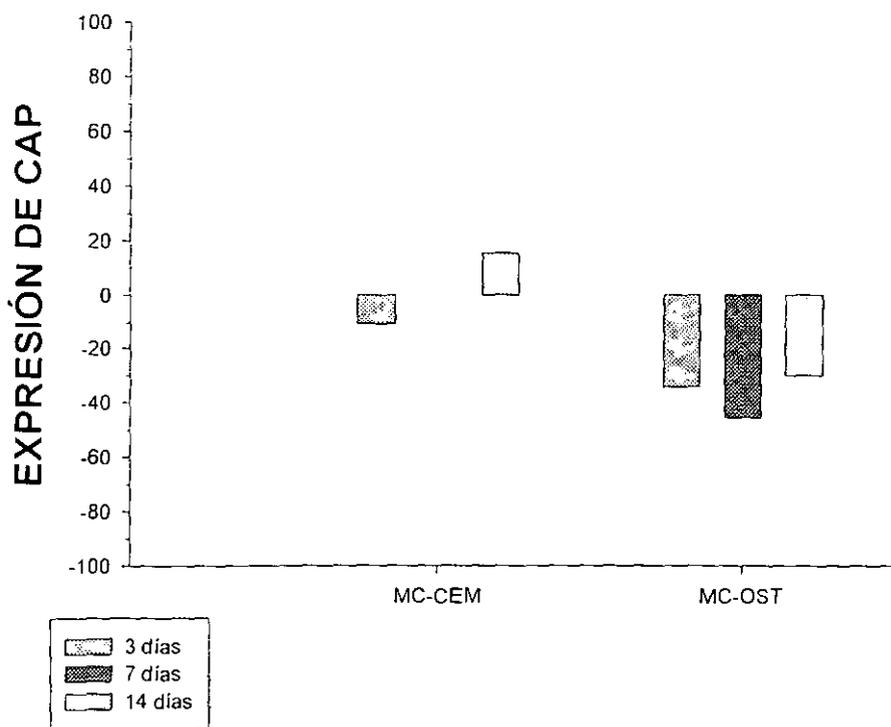
##### 8.3.3.1.1. Células del ligamento periodontal con medio condicionante de cementoblastos.

Las células del ligamento periodontal tratadas con medio condicionante de cementoblastos presentaron una inhibición en la expresión de CAP de un -11.37 en el día 3 de cultivo celular, durante el día 7 no existió diferencia significativa con el control, y, finalmente en el día 14 se presentó un aumento de un 15.54 % en la expresión de la CAP respecto al grupo control (Fig. 17).

##### 8.3.3.1.2. Células del ligamento periodontal con medio condicionante de osteoblastos.

La expresión de sialoproteína ósea (BSP) se vio inhibida fuertemente durante los tres diferentes tiempos de cultivo. A los 3 días se observó una inhibición de -34.49 %, al día 7 inhibición de -45.93 % y en el día 14 una inhibición de -30.38 % respecto a los controles (Fig. 17).

## Expresión de CAP en células del ligamento periodontal con medio condicionante de cementoblastos y de osteoblastos



**Fig. 17.** Expresión de proteína de adherencia del cemento radicular (CAP) en células del ligamento periodontal con medio condicionante de cementoblastos (MC-CEM) y de osteoblastos (MC-OST).

Estas células tratadas con MC-CEM presentaron una inhibición en la expresión de CAP a los 3 días y un aumento de esta expresión en el día 14. El MC-OST ejerció un efecto inhibitorio en los tres tiempos de cultivo con respecto al grupo control.

### **8.3.3.2. Expresión de BSP.**

#### 8.3.3.2.1. Células del ligamento periodontal con medio condicionante de cementoblastos.

En lo que respecta a células del ligamento periodontal y su expresión de sialoproteína ósea (BSP), las células tratadas con medio condicionante de cementoblastos presentaron una inhibición de -6.01 % durante el día 3 de cultivo celular, de un -12.2 % en el día 7 y de un -1.5 % para el día 14 respecto a los controles (Fig 18).

#### 8.3.3.2.2. Células del ligamento periodontal con medio condicionante de osteoblastos.

En el día 3 de cultivo se observó una inhibición de -5.06 en la expresión de BSP, durante el día 7 aumentó su expresión en un .91 % y en el día 14 se observó un aumento de 25.15 % en la expresión de la sialoproteína ósea (Fig 18).

## Expresión de BSP en células de ligamento peridontal con medio condicionante de cementoblastos y de osteoblastos

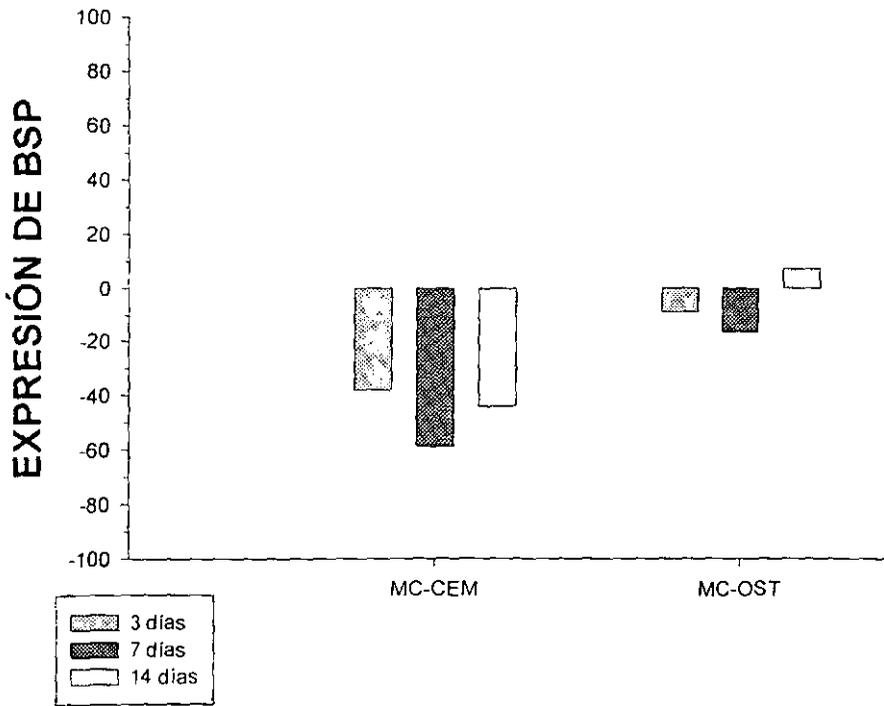


Fig. 18. Expresión de sialoproteína ósea (BSP) en células del ligamento periodontal con medio condicionante de cementoblastos (MC-CEM) y medio condicionante de osteoblastos (MC-OST). La BSP fué inhibida en los tres tiempos de cultivo con MC-CEM. La inhibición también se dió en las células con MC-OST en los días 3 y 7, en el día 14 se presentó un aumento en la expresión de BSP con respecto al grupo control

## **9. Discusión.**

La regeneración periodontal involucra diversos procesos biológicos tales como proliferación, migración, adherencia, selección y diferenciación de las células progenitoras (Christner *et al.*, 1997 Reichert, 1992; Bronckers *et al.*, 1994). Para que la regeneración periodontal se lleve a cabo, estos procesos deben estar coordinados en una secuencia espacial y temporal concertada para cada uno de estos tejidos.

Las células derivadas de cementoblastoma humano, han demostrado producir la proteína de adherencia del cemento radicular (CAP) (Arzate, 1994; Arzate *et al.*, 1996) esta proteína ha sido capaz de promover la expresión de ALP, la cual a su vez juega un papel importante en la mineralización de la matriz extracelular.

Los resultados mostraron que la expresión de fosfatasa alcalina fue inhibida en las células cementoblásticas tratadas con medio condicionante de osteoblastos, al igual que los osteoblastos con medio condicionante de los cementoblastos, de manera similar los osteoblastos con medio condicionante de células del ligamento periodontal produjeron menor cantidad de fosfatasa alcalina.

Las células en las cuales si se registro un aumento en la expresión de esta proteína fueron los cementoblastos con medio condicionante de células del

ligamento periodontal. A partir de estas observaciones se puede inferir que existe una regulación recíproca de inhibición de la expresión del marcador de diferenciación de tejidos mineralizados como lo es la fosfatasa alcalina, entre células cementoblásticas y osteoblásticas y obviamente sus productos génicos. Sin embargo, por lo observado en este estudio, se podría concluir a este punto que las células del ligamento periodontal y sus productos ejercen un efecto diferenciador sobre células cementoblásticas en la expresión de fosfatasa alcalina.

La proteína de adherencia del cemento radicular además ha demostrado que es capaz de inducir la formación de nódulos mineralizados en células mesenquimatosas y tener afinidad por la hidroxiapatita (Pitaru *et al.*, 1995). En este contexto, el medio condicionante de cementoblastos favoreció la formación de tejido mineralizado en los osteoblastos, así como el medio condicionante de osteoblastos fomentó la aparición de tejido mineralizado en células del ligamento periodontal. Esto apoya la hipótesis de que esta molécula es un potencial regulador de diferenciación del linaje cementoblástico y que podría jugar un papel clave en el proceso de la regeneración periodontal (Alvarez *et al.*, 2001, manuscrito en evaluación). Un hallazgo importante se observó en células osteoblásticas tratadas con el medio condicionante de células del ligamento periodontal, ya que el control sin este medio condicionante presentó mayor cantidad de tejido mineralizado, lo

cual apoya la hipótesis de que las células del ligamento periodontal poseen la capacidad de inhibir la osteogénesis en el espacio periodontal. (Melcher, 1970)

La expresión de la proteína de adherencia del cemento radicular, como se pudo observar fue fuertemente inhibida tanto por el medio condicionante de células osteoblásticas, así como el medio condicionante del ligamento periodontal, lo que nos indica que estos medios tienen efecto negativo sobre la síntesis de proteína de adherencia del cemento radicular por los cementoblastos.

Además de la proteína de adherencia del cemento radicular, otra molécula de gran relevancia es la sialoproteína ósea que puede mediar la migración, adhesión y posterior diferenciación de células progenitoras del linaje cementoblástico (Narayanan *et al.*, 1995; Arzate, 1992; Olson *et al.*, 1991; Pitaru *et al.*, 1995; Arzate *et al.*, 1996). La sialoproteína ósea presentó un aumento en su expresión en el día 7, presentando una disminución en los días 3 y 14, en los cultivos de cementoblastos tratados con medio condicionante de osteoblastos y células del ligamento periodontal. La inhibición en la expresión de la sialoproteína ósea esta asociada a la formación de tejido mineralizado, ya que ésta molécula juega un papel preponderante en los estadios iniciales del proceso de mineralización iniciando la nucleación de los cristales de hidroxapatita (Ramakrshnan *et al.*, 1995).

Por otro lado la expresión de proteína de adherencia del cemento radicular en osteoblastos se observó en mayor cantidad que el grupo control tanto en las células tratadas con medio condicionante de cementoblastos como medio condicionante de células del ligamento periodontal, pero esto únicamente durante el día 3, ya que en los posteriores tiempos de cultivo ésta disminuyó. El medio condicionante de cementoblastos tuvo un efecto inhibitorio sobre la síntesis de sialoproteína ósea elaborada por los osteoblastos, ya que esta fue inhibida durante todos los tiempos de cultivo. Un efecto contrario en estas células fue el que se presentó con el medio condicionante de células del ligamento periodontal, comenzando primero en los tres días de cultivo con una inhibición, que en el día 7 disminuyó, para finalizar con una aumento en la expresión de BSP en el día 14.

Finalmente la expresión de CAP por parte de las células del ligamento periodontal, fue fuertemente inhibida durante los tres tiempos de cultivo por el efecto del medio condicionante de osteoblastos, así como la síntesis de BSP en estas mismas células pero esta vez por efecto del medio condicionante de cementoblastos.

## **10. Conclusiones.**

Considerando en conjunto todos estos resultados, se puede inferir que en un sistema de cultivo *in vitro* existe un equilibrio homeostático que regula formación de tejido que mineraliza entre los componentes celulares del periodonto, así como en las moléculas asociadas a la formación de este tejido. Estos hallazgos también confirman resultados previos, que han demostrado que la proteína de adherencia del cemento radicular es un potente regulador del proceso de diferenciación en el periodonto. Sin embargo estos datos deben ser tomados con reserva, dado que la homeostasis es un sistema muy complejo y nosotros hemos utilizado un sistema *in vitro* donde existe un manejo de las condiciones y no necesariamente los fenómenos que hemos encontrado en este estudio son equiparables a lo que sucede en un sistema *in vivo*.

Debido a los eventos anteriormente comentados se puede concluir que existe una interregulación celular sobre la formación de tejido mineralizado, que se refleja en los procesos de diferenciación celular, esto fue ejemplificado en este trabajo con el importante hallazgo de que las células del ligamento periodontal y sus productos inhiben la diferenciación celular y por lo tanto evitan la deposición de tejidos mineralizados en células osteoblásticas. Esto es importante porque se conoce muy poco acerca de los mecanismos y factores que regulan el proceso de la cementogénesis y es este el proceso clave para entender como se lleva a cabo la regeneración del periodonto.

## 11. Referencias.

Alvarez-Pérez MA., Pitaru S., Bar-Kana I., Alvarez-Fregoso O., Landa -Piedra A., Reyes-Gasga J., Arzate H (2001). The effect of an anti-cementum attachment protein antibody on the differentiation and mineralization of a cementoblastic cell line. *J Struct Biol* (en evaluación).

Andujar MB., Couble P., Couble ML., Magloire H (1991). Differential expression of type I and type III collagen genes during tooth development. *Development* 111:691-698.

Arzate H, Chimal MJ, Hernández LL, Díaz LL (1996). Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *J Periodont Res* 31:144-148.

Arzate H, Portilla RJ, Aguilar MME (1996). Recombination of epithelial root sheath and dental papilla cells *in vitro*. *Arch Med Res* 27:573-577.

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

Arzate H., Alvarez-Pérez MA., Aguilar Mendoza ME., Alvarez-Fregoso O (1998). Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells *in vitro*. *J Periodont Res* 33: 249-258.

Arzate H., Olson S., Page RC., Gown AM., Narayanan AS (1992). Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J* 6:2990-2995.

Arzate, Alvarez-Pérez M.A., Alvarez-Fregoso O., Wusterhaus-Chávez A., Reyes-Gasga J. y Ximénez-Fyvie L.A (2000). Electron Microscopy, microanalysis, and X-ray diffraction characterization of the mineral-like tissue deposited by human cementum tumor-derived cells. *J. Dent Res* 79(1): 28-34.

Birkedal-Hansen H, Butler WT, Taylor RE (1977). Proteins of the periodontium. Characterization of the insoluble collagens of bovine dental cementum. *Calc. Tissue Res* 23:39.

Bosshardt DD, Schroeder HE (1996). Cementogenesis reviewed: A comparison between human premolars and rodent molars. *Ant. Rec* 245:287.

Bosshardt DD, Schroeder HE (1991). Initial formation of cellular extrinsic fiber cementum in developing human teeth. *Cell Tissue Res* 267:321-335.

Bronckers ALJJ, Farach-Carson MC, Van Waveren E, Butler WT (1994). Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin, and dentin sialoprotein during dental root formation and early cementogenesis in rat. *J Bone Miner Res* 9:833-841.

Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV (1994). Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells *in vitro*. Induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134:277-286.

Cho M-I., Garant PR (2000). Development and general structure of periodontum. *Periodonto 2000*. 24:9-27.

Cho M-I., Garant PR (1988). Ultrastructural evidence of directed cell migration during initial cementoblast differentiation in root formation. *J Periodont Res* 23:268-273.

Christner P, Robinson P, Clarck CC (1997). A preliminary characterization of human cementum collagen. *Calcif Tissue Int* 23:147-150.

Eskici A (1994). Dental development and tooth eruption after autogenic transplantation of tooth germs: an experimental investigation in beagle-dogs and clinical implication in humans. In Davidovitch Z, ed. The biological mechanisms of tooth eruption, resorption and replacements by implants. *Birmingham, AL: EBSCO Media* 507-512.

Gibson GJ, Pearson CH (1992). Sulfated galactosaminoglycans of bovine periodontal ligament. Evidence for the presence of two major types of hybrids but no chondroitin sulfate. *Connect tissue Res* 10:161.

Gould TRL, Melcher AH, Brunette DM (1977). Location of progenitor cells in periodontal ligament of mouse molar stimulated by wounding. *Anat Rec* 180:133-142.

Gould TRL, Melcher AH, Brunette DM (1980). Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding. *J Periodont Res* 15:20-42.

Groeneveld MC, Everts V, Beertsen (1993). A quantitative enzyme histochemical analysis of the distribution of alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament of the rat incisor. *J Dent Res* 72:1344-1350.

Hassel T.M (1993). Tissues and cells of periodontium. *Periodonto 2000* 3:9-38.

Holmstrup P (1996). The microanatomy of periodontium *Fundamentals of Periodontics* Chicago: Quintessence 27.

Johnson RB, Pylypas SP (1992). A re-evaluation of the elastic meshwork within the periodontal ligament of the mouse. *J Periodontology Res* 27:239

Kollar EJ., Fisher C (1980). Tooth induction in chick epithelium: Expression of quiescent genes for enamel synthesis. *Science* 207 29:993-995.

MacNeil RL and Somerman MJ (1993). Factors regulating development and regeneration of cementum. *J. Periodont. Res* 23:550.

MacNeil RL. Berry J., D'Errico J., Strayhorn C., Piotrowski B., Somerman MJ (1995). Role of two mineral-associated adhesion molecules osteopontin and bone sialoprotein during cementogenesis. *Connect Tissue Res* 33:1

Mariotti A (1993). The extracellular matrix of the periodontum: dynamic and interactive tissues. *Periodonto 2000* 3:39-63

McAllister B, Narayanan AS, Miki Y, Page RC (1990). Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum. *J Periodont Res* 25: 99-105.

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

McCulloch CAG (1985). Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. *Anat Rec* 21:258-262.

Mckee MD., Zalzal S., Nanci A (1996). Extracellular matrix in root cementum and mantle dentis: localization of osteopontin and other noncollagenous protein, plasma protein and glycoconjugates by electron microscopy. *Anat Rec* 245:293.

Melcher A.H (1970): Repair of wounds in the periodontum of the rat. Influence of periodontal ligament on osteogenesis. *Archs oral Biol* 15:1183-1204.

Melcher AH (1988). Does the developmental origin of cementum, periodontal ligament and bone predetermine their behavior in adults? In: Guggenheim B. ed. *Periodontology Today*. Basel:Karger AG:6-14.

Miki Y, Narayanan AS, Page RC (1987). Mitogenic activity of cementum components to gingival fibroblasts. *J Dent Res* 66:1399-1403.

Mina M., Kollar EJ (1987). The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol* 32:123-127.

Nakae H, Narayanan AS, Raines E, Page RC (1991). Isolation and partial characterization of mitogenic factors from cementum. *Biochemistry* 30:7047.

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

Nylen M., Grupe H (1969). Ultrastructure of epithelial cells in human periodontal ligament explants. *J. Periodont Res* 4:248-258.

Olson S, Arzate H, Narayanan AS, Page RC (1991). Cell attachment activity of cementum proteins and mechanism of endotoxin inhibition. *J Dent Res* 70:1272-1277.

Paynter KJ, Pudy G (1958). A study of the structure, chemical nature, and development of cementum in the rat. *Anat Rec* 131:233-251.

Pitaru S, Aubin JE, Bhargava U, Melcher AH (1987). Immunoelectron microscopic studies on the distributions of fibronectin and actin in a cellular dense connective tissue: the periodontal ligament of the rat. *J Periodont Res* 22:64.

Pitaru S, McCulloch CAG, Narayanan AS (1994). Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodont Res* 29: 81-94, 1994.

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

Ramakrshnan PR, Lin WL, Sodek J, Cho IL (1995). Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells *in vitro*. *Journal Periodont Res* 30:52-59.

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

Schroeder HE (1986). Handbook of microscopical anatomy The periodontium. Berlin: Springer, 5:12-323.

Schroeder HE, Listgarten MA (1997). The gingival tissues the architecture of periodontal protection. *Periodontol* 2000 13:91-120.

Schroeder HE (1992). Biological problems of regenerative cementogenesis: Synthesis and attachment of collagenous matrices on growing and established root surfaces. *Int Rev Cytol* 142:1.

Schroeder HE (1993). Biological problems of regenerative cementogenesis: Synthesis and attachment of collagenous matrices on growing and established root surfaces. In: Jean, Friedman, eds. *Int Rev of Cytology* 142:1-59.

Schroeder HE (1993). Human cellular mixed stratified cementum: a tissue with alternating layers of acellular extrinsic- and cellular intrinsic fiber cementum. *Schweiz Monatszshr Zahnmed* 103:550.

Sicher H (1954). The principal fibers of the periodontal membrane. *Bur* 55:2-6.

Slavkin HC., Bessem C., Fincham AG., Bringas P., Santos V (1989). Human and mouse cementum proteins immunologically related to enamel proteins. *Biochemica et Biophysica Acta* 991:12-18.

Sodek Jaro y McKee Marc D (2000). Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodont* 2000 24:99-125.

Somerman MJ, Archer SY, Hassel TM, Shteyer A, Foster RA (1987b). Enhancement by extracts of mineralized tissues of protein production by human gingival fibroblasts *in vitro*. *Archs Oral Biol* 12: 879-883.

Somerman MJ, Archer SY, Shteyer A, Foster RA (1987a). Protein production by human gingival fibroblasts is enhanced by guanidine extracts from cementum. *J Periodont Res* 22:75-77.

Somerman MJ, Argraves WS, Foster RA, Dickerson K, Norris K, Sauk JJ (1991). Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum. *J Periodont Res* 26:10-16.

Somerman MJ, Foster RA, Imm GM, Sauk JJ, Archer SY (1989). Periodontal ligament cells and gingival fibroblasts respond differently to attachment factors *in vitro*. *J Periodontol* 60:73-77.

Somerman MJ, Sauk JJ, Agraves WS, Morrison G (1990). Expression of attachment proteins during cementogenesis. *J Biol Buccale* 18: 207-214.

Williams David M (1992). Pathology of periodontal disease. Hong Kong Oxford University Press 18-31.

Zhang X, Schuppan D, Becker J, Reichart P, Gelderblom HR (1993). Distribution of undulin, tenascin and fibronectin in human periodontal ligament and cementum. Comparative electron microscopy with ultra-thin cryosections. *J Histochem Cytochem* 41:245