



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS MEDICAS, ODONTOLOGICAS Y
DE LA SALUD**

**“Cultivos tridimensionales
de células derivadas del
periodonto humano”**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO
DE MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Viridiana Loustalot Angulo

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. Higinio Arzate
México, D.F. Ciudad Universitaria,
Febrero, 2006**





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Página

Marco teórico	5
El periodonto	5
Enfermedad periodontal	7
Colágena	8
Proteínas no colágenas	8
Cultivos tridimensionales	11
Planteamiento del problema	9
Justificación	12
Objetivos	13
Materiales y métodos	14
Resultados	20
Discusión	32
Conclusiones	35
Referencias	36

RESUMEN

El periodonto es el conjunto de tejidos que dan soporte al diente, está constituido por hueso alveolar y cemento radicular (tejidos duros), ligamento periodontal y encía (tejidos blandos). Las células que conforman a estos tejidos son osteoblastos, cementoblastos y fibroblastos, respectivamente. Las células de los tejidos duros elaboran matriz extracelular, que posteriormente es mineralizada. Algunas de las proteínas que participan en el proceso de la mineralización son: colágena tipo I (COL I), sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN), osteocalcina (ONC) y proteína de adherencia del cemento radicular (CAP). La enfermedad periodontal destruye los tejidos periodontales, el proceso de mineralización está íntimamente relacionado al proceso de reparación de éstos tejidos. El problema actual es que el cultivo de células derivadas del periodonto se ha realizado en monocapas, mientras que un tejido *in vivo* posee una estructura tridimensional. Por ello el objetivo de este estudio es el observar la expresión de proteínas que participan en el proceso de mineralización en cultivos tridimensionales, por medio de inmunolocalización. Se empleo un sistema tridimensional con una matriz de colágena tipo I, para el cultivo de fibroblastos del ligamento periodontal, con un cultivo control y otro experimental, adicionado son CAP, en éste último se observó una matriz extracelular mas abundante, y un marcaje mas evidente para BSP y OPN. En fibroblastos del ligamento periodontal, osteoblastos del hueso alveolar y cementoblastos, se empleo un sistema de cultivo tridimensional de baja gravedad. De manera cualitativa la marca para COL I fue muy evidente, en los tres tipos celulares, lo que coincide con estudios en los cuales se ha observado que ésta molécula aparece en etapas tempranas de la reparación de éstos tejidos. La expresión de BSP se ha relacionado con la enucleación de los cristales de mineral. En éstos cultivos fue mas evidente esta proteína en los fibroblastos del ligamento periodontal, aunque también fue abundante en los osteoblastos y cementoblastos. La OPN presentó un patrón similar de marcaje a la BSP, pero se observó una marca menos intensa. La expresión de OSC y CAP fue menos apreciable, excepto en los cementoblastos. La conclusión de éste estudio fué que estos cultivos tuvieron un comportamiento similar a los tejidos que se encuentran en reparación, por lo menos en lo que respecta a la expresión de moléculas asociadas al proceso de mineralización.

ABSTRACT

The periodontium can be considered an organ system composed of two hard tissues (cementum and alveolar bone) and two soft tissues (periodontal ligament and gingival tissue). The cell types that conform these tissues are fibroblasts, cementoblasts and osteoblasts. Cementoblastic and osteoblastic cells secrete and deposit extracellular matrix, which becomes mineralized eventually. Some of the proteins that regulate the mineralization process are type I collagen (COL I), bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), osteocalcin (ONC) and cement attachment protein (CAP). The periodontal disease once it is established destroys the periodontal tissues both soft and mineralized. Importantly, the biomineralization process is intimately associated to the tissue regeneration process. However, it has been difficult to determine how the biomineralization process is regulated during the periodontal regeneration process. Several attempts have been performed to answer this question *in vivo* and *in vitro*. The *in vitro* approach is very promising since it can establish the conditions to develop three-dimensional tissues with similar characteristics to those *in vivo*. The purpose of this study is to determine the expression of those proteins related to the mineralization process in a three-dimensional culture system *in vitro*. We have used the rotary cell culture system (RCCS) and determine the expression by immunolocalization. We have used type I collagen as a matrix and determine the morphological changes when the cement attachment protein is added to the periodontal ligament cell cultures. Our results showed that the matrix produced by periodontal ligament fibroblasts *in vitro* became thicker when they were treated with cement attachment protein respect to the control cultures and the expression of BSP and OPN was strongly evident when compared to the controls. Periodontal ligament fibroblasts, cementoblasts and osteoblasts were cultured using the Rotary Cell Culture System (low gravity). Our results showed that Type I collagen expression was evident on the three cell types, which supports previous findings that associate the expression of this molecule during the early events of tissue regeneration. BSP is highly related to the mineralization process and is thought to be responsible of hydroxyapatite crystal nucleation. The expression of this protein was strongly evident in periodontal ligament fibroblasts and in a lesser degree in cementoblasts and osteoblasts. Osteopontin expression pattern was similar to that observed by BSP. The expression of osteocalcin and cement attachment protein was evident mainly in cells of the cementoblastic lineage. From the results of this study we conclude that the three-dimensional cultures *in vitro* show a similar behavior as those tissues observed *in vivo* mainly regarding to the mineralization process.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La enfermedad periodontal es el padecimiento bucal con mayor incidencia. Las secuelas que esta enfermedad deja van desde resorción ósea moderada, migración gingival, hasta pérdida de las piezas dentarias. Para que se de una regeneración de las estructuras periodontales remanentes, es necesario que los tejidos mineralizados sean reestablecidos para que las fibras del ligamento periodontal puedan reinsertarse en éstos. La mineralización es un paso obligado para recuperar la homeostasis en el periodonto, por lo cual es importante conocer qué moléculas participan en este proceso y cuales son las células que expresan estas moléculas durante la mineralización.

MARCO TEORICO

EL PERIODONTO

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: dos tejidos blandos, (encía y ligamento periodontal) y dos tejidos mineralizados, (hueso alveolar y cemento radicular; Cho y Garant, 2000).

El ligamento periodontal es un 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 (Hassel, 1993).

Uno de los elementos importantes del ligamento periodontal son las fibras de Sharpey se insertan en el cemento y hueso alveolar. Este grupo de fibras individuales se anastomosan formando una red entre el hueso y el diente. Las fibras principales están compuestas en su mayoría por colágena tipo I. La configuración molecular de las fibras de colágena confiere gran flexibilidad y fuerza tensil (Holmstrup, 1996).

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 (Ramakrishnan *et al.*, 1995). 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. Los fibroblastos con tipo osteoblásticos tienen gran importancia ya que se propone que pueden diferenciarse en cementoblastos y producir fibras de Sharpey que se insertan en el cemento (Pitaru *et al.*, 1995; Schroeder, 1992).

La función de anclaje del ligamento periodontal se realiza gracias a fibras de colágena, de las cuales se ha hecho referencia anteriormente. 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. (Mariotti, 1993).

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. Los componentes glucosaminoglicanos (GAGs) que se encuentran en el ligamento periodontal incluyen hialuron, heparán sulfato, dermatán sulfato y condroitín sulfato, de estos el más abundante es el dermatán sulfato (Gibson y Pearson, 1992).

El proceso alveolar es una estructura en el cual se encuentran alojados los dientes en criptas óseas (Schroeder, 1986; Hassel, 1993). Éste 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. 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 multiradiculares. (Sodek y McKee, 2000). La naturaleza dinámica del proceso alveolar es evidente debido a su capacidad de remodelación, en respuesta a demandas funcionales. 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 horizontal y vertical. (Sodek y McKee, 2000; Hassel, 1993).

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. 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 una gran cantidad de moléculas de adhesión celular como fibronectina, sialoproteína ósea y osteopontina, además de factores de crecimiento y proteínas morfogenéticas de hueso (BMP's) (Nakae *et al.*, 1991).

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, como la ausencia de vasos sanguíneos y linfáticos, así como una bajo recambio metabólico (Saygin *et al.*, 2000). Actualmente se le clasifica en cinco tipos dependiendo de la presencia o ausencia tanto de células como de fibras y son: cemento acelular afibrilar, cemento acelular con fibras extrínsecas, cemento celular con fibras intrínsecas, cemento acelular con fibras intrínsecas y cemento celular combinado estratificado (Schroeder, 1992).

Las fibras intrínsecas son sintetizadas por cementoblastos y las extrínsecas o de Sharpey son producidas por fibroblastos del ligamento periodontal.

Bioquímicamente el cemento está formado por una matriz inorgánica de la cual aproximadamente 50 % es hidroxiapatita, y una 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; Bronckers *et al.*, 1994).

A la fecha el cultivo de cementoblastos y el estudio de sus características ha resultado difícil, debido a que no se conoce con certeza de donde provienen las células progenitoras del cemento que permiten que este tejido se siga aposicionando durante toda la vida. Algunos estudios refieren que se encuentran en los espacios del ligamento periodontal y en los espacios endosteales del hueso (Pitaru *et al.*, 1995). Una alternativa a esta problemática es utilizar el modelo de cementoblastos putativos aislados a partir de un cementoblastoma humano en cultivo, ya que estas células producen proteínas de matriz extracelular que se encuentran en la matriz del cemento *in vivo*, relacionadas muchas de ellas con el proceso de mineralización (Arzate *et al.*, 1992; 1998; 2000).

ENFERMEDAD PERIODONTAL

La enfermedad periodontal es aquella en la cual se pierde el aparato de inserción del diente (periodonto). Esta enfermedad tiene el primer lugar de prevalencia dentro de las enfermedades bucales a nivel mundial (Barnes, 2000). La etiología de esta enfermedad es la placa bacteriana, una vez que ésta ha sido eliminada, es preciso que se inicie la regeneración de los tejidos dañados, en primer lugar de los tejidos duros, para que de esa manera las fibras del ligamento periodontal puedan reinsertarse y volver a constituir un periodonto funcional.

La regeneración periodontal requiere de respuestas coordinadas de los diversos tipos celulares, por lo que involucra diversos procesos biológicos tales como proliferación, migración, adhesión, selección y diferenciación de las células progenitoras (Christner *et al.*, 1997; Reichert, 1992; Bronckers *et al.*, 1994). Estos procesos deben presentarse en una secuencia espacial y temporal. Además evidencias apoyan el hecho 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.

Para solucionar este problema es necesario entender los mecanismos bioquímicos y moleculares que se llevan a cabo durante la regeneración del periodonto. Al 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). Ambos tejidos son mineralizados, por lo cual la regeneración periodontal se encuentra íntimamente ligada al proceso de mineralización y éste a su vez a la expresión de algunas proteínas, como la colágena, sialoproteína ósea, osteopontina (Roach, 1994; Bosshardt, Zalzal, McKee y Nanci, 1998), osteocalcina (Roach, 1994; Papagerakis *et al.*, 2002) y la proteína de adherencia del cemento radicular (Arzate *et al.*, 1992 a y b).

COLÁGENA.

Colágena es el nombre genérico que recibe una familia de proteínas. Cada molécula de colágena consiste en tres largas cadenas polipeptídicas que reciben el nombre de cadenas alfa. Cada una de estas cadenas tienen un giro hacia la izquierda que se presenta cada tres aminoácidos. Las cadenas se encuentran unidas unas con otras formando un espiral con giro hacia la derecha formando así una estructura muy rígida. La secuencia predominante de estas cadenas es característica y consiste en un tripéptido de Gly-X-Y, donde X y Y representan cualquier otro aminoácido diferente a la glicina. X frecuentemente es prolina y Y una aminoácido derivado de esta, la hidroxiprolina (Landis *et al.*, 1996).

Al menos han sido descritos 19 diferentes tipos de colágena. El tipo de colágena más abundante es la colágena tipo I, la cual forma fibras. Al microscopio electrónico, estas fibras lucen un bandeo característico y son capaces de asumir una forma de rodillo, con una longitud de 300 nm e interactúan de manera cooperativa con otras moléculas de colágena adyacentes.

Las tres cadenas alfa de la colágena al entrecruzarse dan como resultado la formación de pozos, zonas de sobreposición y formación de canales por la acumulación de varios pozos, estas estructuras tridimensionales permiten que los cristales de mineral se depositen en esta proteína. Además la presencia de motivos ácidos como γ -glutamil

fosfato dentro de las cadenas alfa determinan la unión de grupos de Ca^{2+} (Landis *et al.*,1996). Se ha establecido la localización exacta de estos cristales dentro de la molécula de colágena principalmente en los pozos y en las zonas de sobreposición y en menor medida en la superficie de la molécula. (Landis y Song,1991).

PROTEÍNAS NO COLÁGENAS.

SIALOPROTEINA ÓSEA

Se cree que las proteínas no colágenas tienen un importante papel en la organización de la matriz mineralizada debido a que regulan la formación y crecimiento de los cristales de hidroxiapatita. Dentro de las principales proteínas no colágenas de hueso y cemento tenemos a la sialoproteína ósea (Sodek *et al.*, 1991) con un peso de 59 kDa, constituye de un 8 a un 12 % del total de las proteínas no colágenas de hueso y cemento (Fisher *et al.*, 1990). Es una fosfoproteína ácida, que además posee la secuencia RGD que se encuentra relacionada con la adhesión celular por medio de integrinas, gracias al receptor de vitronectina (Oldberg, 1986). También se le ha dado especial interés a esta proteína por su capacidad como nucleador de los cristales de hidroxiapatita (Hunter y Goldberg, 1993), así como un marcador de la diferenciación tanto de osteoblastos como de cementoblastos. Por otro lado se encuentra esencialmente en tejidos mineralizados y es expresada en altos niveles durante la formación de hueso y cemento *de novo* (MacNeil *et al.*, 1994, 1995,1996).

OSTEOPONTINA

La osteopontina es una sialoproteína de 44-kDa que se encuentra principalmente en el hueso (Heinegrad y Oldberg, 1989), también se localiza en tejidos no mineralizados, como el sistema nervioso central, el riñón y la placenta (Nomura *et al.*, 1988). Algunas de las funciones que han sido atribuidas a esta proteína son adhesión, debido a que posee la secuencia RGD, movilización de osteoblastos y osteoclastos vía integrinas. Además participa en la regulación del calcio debido a su potencial para unirse a éste gracias a la presencia de ácido aspártico y glutámico (Mariotti, 1993). La osteopontina se encuentra también en líquidos con gran contenido de sales de calcio (leche, bilis y orina) así como en el asa de Henle, lo cual indica su papel para la prevención de la precipitación espontánea de las sales de calcio (Kleinman *et al.*,1995).

OSTEOCALCINA

La osteocalcina, también llamada proteína - Gla es una de las proteínas no colágenas más abundante en hueso. Es una pequeña molécula ácida altamente conservada con un peso molecular de 5.8 kDa que se caracteriza por las modificaciones por medio de enzimas carboxilantes dependientes de vitamina K que convierten de dos a tres residuos de ácido glutámico a ácidos γ -carboxiglutámico (grupos Gla). La utilización de un anticuerpo contra esta proteína ha evidenciado su presencia tanto en cemento celular como acelular (Kagayama *et al.*, 1997), así como en

hueso alveolar y dentina (Sodek y McKee, 2000). Las funciones de esta molécula aún no son claras, sin embargo cuando es utilizada la warfarina, un antagonista de la vitamina K, la carboxilación de los residuos de ácido glutámico es inhibida y el hueso en estas condiciones sufre una hipermineralización (Prince y Williamson, 1981), un efecto similar se ha observado en ratones knock-out, (Ducy *et al.*, 1996) indicando que la osteocalcina regula la maduración de los cristales minerales (Sodek y McKee, 2000; Cole, 1991). Sin embargo la regulación de la osteocalcina por hormonas osteotrópicas como la 1,25-dihidroxitamina D₃ y la hormona paratiroidea (Prince y Baukol, 1980), junto con al habilidad como quimioatrayentes de precursores de osteoclastos por medio de su segmento carboxílico (Mudy y Poser, 1983), también sugieren un papel en la resorción del hueso (Glowacki *et al.*, 1989).

PROTEINA DE ADHERENCIA DEL CEMENTO RADICULAR

Estudios previos han demostrado que los extractos de cemento maduro tienen una función de quimioatrayente selectivo para las células del ligamento periodontal, se sabe que induce la proliferación y favorece la síntesis de los componentes de la matriz extracelular (Nishimura *et al.*, 1989; Somerman *et al.*, 1987). De estos extractos se ha aislado, purificado y parcialmente caracterizado, la proteína de adherencia del cemento radicular (Wu *et al.*, 1996), ésta proteína tiene un peso molecular de 56 kDa con una secuencia de aminoácidos que presenta cierta homología con la colágena tipo I y XII. A pesar de esto no se ha encontrado reacción cruzada en inmunotrasferencias entre la proteína de adherencia del cemento radicular y estas colágenas, así como tampoco con otras moléculas de adhesión (Wu *et al.*, 1996).

El anticuerpo contra esta proteína ha revelado la presencia de ésta en la matriz del cemento radicular humano, en células perivasculares dentro de los espacios endosteales (Arzate *et al.*, 1992), así como en cementoblastos putativos *in vitro* (Arzate *et al.*, 1998, 2000).

También ha sido demostrado que la proteína de adherencia del cemento radicular promueve la migración y la adhesión de células del ligamento periodontal y del hueso alveolar a la superficie radicular mas que los fibroblastos gingivales (Metzger, 1988; Pitaru, 1995), además de que favorece la diferenciación celular de células mesenquimatosas sin un fenotipo definido hacia un fenotipo mineralizante (Arzate *et al.*, 1996). La existencia de la proteína de adherencia del cemento radicular con estas funciones específicas sugieren que ésta puede jugar un papel de importancia en la cementogenesis, como parte de la regeneración periodontal.

CULTIVOS TRIDIMENSIONALES

La mayor parte de los estudios *in vitro* realizados en cultivos primarios de células del periodonto hasta ahora, se han realizado en cultivos monocapas, sin embargo, éstos crecen hasta alcanzar la confluencia, una condición que normalmente no se encuentra *in vivo*. En estas condiciones las células no se encuentran rodeadas de una matriz extracelular organizada de manera tridimensional, por esto el crecimiento y comportamiento de las células cultivadas *in vitro* difiere considerablemente de las condiciones que se presentan *in vivo* (Weber *et al.*, 1986; Mueller-Klieser, 1997). De esta forma se ha encontrado que la síntesis de colágena en fibroblastos periodontales humanos *in vivo* es mucho mas baja que en cultivos monocapa (Mauch *et al.*, 1988).

Ante este problema, el empleo de cultivos tridimensionales de células derivadas del periodonto representa una opción para su estudio *in vitro*.

Los cultivos tridimensionales son aquellos que nos permiten relacionar de manera directa la estructura con la función celular (Mueller-Klieser, 1997). En combinación con técnicas moleculares, se ha determinado que este tipo de cultivos poseen características que se apegan de mejor forma a las observadas *in vivo* lo anterior debido a la disposición espacial determinante tanto en la expresión génica como en el desarrollo celular (Mueller-Klieser, 1997).

La ingeniería de tejidos es un campo científico emergente, cuyo propósito es el desarrollo de técnicas para la fabricación de nuevos tejidos que puedan reemplazar tejidos dañados. Los principales requerimientos para producir un tejido por medio de ingeniería son: la presencia de células formadoras del tejido en cuestión, la presencia de una matriz que soporte a estas células de manera tridimensional, y las señales reguladoras que optimicen el crecimiento y diferenciación celular.

Por tanto, los cultivos tridimensionales como parte de la ingeniería de tejidos, son aquellos en los que se utilizan andamios o matrices exógenas para brindar un soporte a las células y permitir que éstas crezcan de manera tridimensional. En este tipo de cultivos tridimensionales se han utilizado diversos tipos de matrices, por ejemplo, esponjas porosas, agarosa o colágena (Cochran y Wozney, 1999; Langer y Vacanti, 1993) principalmente la tipo I. Los

fibroblastos gingivales crecidos en este último tipo de matriz, a diferencia de los cultivos en monocapa detienen su capacidad proliferativa (Schor, 1980), sin embargo morfológicamente presentan características muy similares a los fibroblastos observados en cortes de encía (Hillmann *et al.*, 1999).

Existen además otros tipos de cultivos tridimensionales, en los cuales no se utilizan matrices para dar soporte a las células, sino que la estrategia que se sigue es la de prevenir la unión celular a las paredes del recipiente que las contiene, lo que da como resultado la formación de cúmulos celulares que son denominados como esferoides (Kunz-Schughart, 1999). Existiendo dos estrategias para el cultivo de esferoides.

1. En medio fluctuante, se logra colocando aditamentos que generen el movimiento del medio dentro del contenedor y en medio estático, por medio del recubrimiento de platos de cultivo que eviten la adhesión celular a la superficie de éstos

2. Cultivos de baja gravedad. Consiste en el empleo de contenedores rotatorios, que impiden la adhesión celular al mismo (Jessup, Godwin y Spaulding, 1993). Una de las grandes ventajas de este sistema es que se logra un ambiente espacial más apegado a las condiciones *in vivo* que las obtenidas en los cultivos monocapa tradicionales (Freed y Vunjak, 1995). Los cultivos tridimensionales con fibroblastos y queratinocitos por medio de este sistema, han sido ampliamente utilizados para el estudio de la matriz extracelular (Armstrong *et al.*, 1996; Taquezawa *et al.*, 1993).

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar el fenómeno de mineralización en un cultivo tridimensional de fibroblastos del ligamento periodontal, empleando una matriz de colágena tipo I. Estudiar este mismo fenómeno en osteoblastos del hueso alveolar, cementoblastos y fibroblastos del ligamento periodontal en cultivos de baja gravedad utilizando un sistema rotatorio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Comprobar cualitativamente la expresión de proteínas de la matriz extracelular asociadas al proceso de mineralización, como lo son la sialoproteína ósea y la osteopontina en el modelo tridimensional empleando una matriz de colágena tipo I.

Comprobar cualitativamente la expresión de la colágena tipo I, sialoproteína ósea, osteopontina, osteocalcina, proteína de adherencia del cemento radicular y proteína del cemento radicular en cultivos tridimensionales en baja gravedad, utilizando un sistema rotatorio.

Localizar nódulos de mineralización por medio de una tinción específica con alizarina roja en ambos métodos de cultivo tridimensional.

JUSTIFICACIÓN.

La mineralización es un fenómeno de gran relevancia en el restablecimiento de las estructuras periodontales que han sido afectadas por la enfermedad periodontal, por tanto el estudio del proceso de mineralización *in vitro* por parte de las células que forman los tejidos periodontales duros resulta importante. Sin embargo la gran mayoría de los estudios con estos tipos celulares, se ha realizado en cultivos monocapa, los cuales no reflejan las condiciones que se presentan *in vivo*. Por ello es importante el proponer alternativas ante este problema, como lo es el uso de cultivos tridimensionales, en los cuales se logran condiciones mas apegadas a lo que sucede *in vivo* , el empleo de células de los tejidos periodontales en estos sistemas, permitirá en un futuro el comprender el comportamiento de estas células dentro de un sistema tridimensional, para que más tarde se abra la posibilidad de utilizar ésta técnica en la elaboración de terapias alternas para favorecer la regeneración de los tejidos periodontales.

MATERIALES Y MÉTODOS.

CULTIVO CELULAR.

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) con una solución de antibióticos compuesta por: 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Con el propósito de evitar la posible contaminación de fibroblastos gingivales del tercio cervical y fibroblastos pulpares provenientes del tercio apical, únicamente se raspó el tercio medio de la raíz para obtener el tejido periodontal. Los explantes obtenidos fueron colocados en cajas de cultivo de 25 cm² 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 estreptomicina. Las muestras fueron incubadas en un ambiente al 100 % de humedad a 37°C y en una atmósfera con 95 % aire y 5 % de CO₂. Una vez que las células llegaron al estado de confluencia, se tripsinizaron (tripsina bovina-EDTA al 0.025%) y se subcultivaron en cajas de 75 cm². A partir de esta etapa únicamente se utilizó suero fetal bovino al 4 %. (Narayanan y Page, 1976)

Células derivadas de un cementoblastoma humano.

Los cementoblastos fueron obtenidos a partir de un espécimen quirúrgico diagnosticado como cementoblastoma, proveniente de un paciente de 38 años. El diagnóstico se llevó a 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 duro macerados. Los explantes obtenidos fueron colocados en cajas de cultivo de 25 cm² en medio DMEM, suplementado con 10 % de SFB, 4 % de suero humano y una solución de antibióticos compuesta por: 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Las muestras fueron incubadas en las mismas condiciones de humedad, temperatura y atmósfera que en el cultivo de los fibroblastos del ligamento periodontal, del mismo modo, el medio no fue cambiado hasta el día 14. Una vez que las células llegaron al estado de confluencia, también fueron tripsinizadas y subcultivadas en cajas de 75 cm². (Bartold y Raben, 1996).

Células del hueso alveolar

Las células osteoblásticas, fueron tomadas de porciones de hueso alveolar resultantes de una cirugía de tercer molar. Estas pequeñas porciones fueron maceradas hasta obtener fragmentos de 1 mm² los cuales fueron sembrados y subcultivados de la misma manera como se describió para las células cementoblasticas. (Narayanan y Page, 1976)

PREPARACIÓN DE MATRIZ DE COLÁGENA EXÓGENA TIPO I.

La colágena tipo I fue preparada de tendones de cola de rata, esto separando las fibras bajo condiciones asépticas. Estas fueron disueltas en 0.2 % de ácido acético (~1 gr de fibras/100 mL), durante 2 días a 4°C con agitación lenta. Cumplido este tiempo y para conseguir la eliminación de las fibras no disueltas se sometió a centrifugación a 4000 rpm durante 30 minutos. La concentración de colágena en el sobrenadante se ajusta a 3mg/mL con 0.02% de ácido acético (Elsdale y Bard, 1972). Para la preparación de los geles de colágena se mezcló 3 volúmenes de colágena (3 mg/mL) con DMEM 5.7 X (1 vol), Na HCO₃ al 5 % (0.5 vol.), 0.1 M de HEPES (1 vol.), 0.17 M CaCl₂ (0.1 vol.) y 4.3 volúmenes de 1 X DMEM suplementado con 2 % de suero fetal bovino. Todo este procedimiento se lleva a cabo a 4°. (Miller y Rodes, 1982).

PREPARACIÓN DE LAS MATRICES DENTINARIAS.

Los soportes dentinarios bovinos de 300 µm de grosor y 4 x 4 mm² de área se obtuvieron de órganos dentarios a los cuales en primer lugar les fue eliminado el cemento radicular por medio de raspado y fueron sometidos a un tratamiento de desmineralización con una solución de ácido nítrico al 8% durante 15 horas, posteriormente fueron lavadas con agua corriente durante 3 horas. Una vez desmineralizadas fueron cortadas e incubadas a 37°C en medio libre de suero (DMEM) y una solución de antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 µg/mL) en medio ambiente con 100 % de humedad a una temperatura de 37°C en una atmósfera de 95 % aire y 5% CO₂. con el fin de evitar contaminación residual que pudiera afectar al desarrollo experimental.

CULTIVOS TRIDIMENSIONALES.

CULTIVO CELULAR EN MATRIZ DE COLÁGENA TIPO I.

La obtención de células fibroblásticas se realizó como se ha explicado anteriormente por la técnica de convencional de explante. Una vez que se encontraron en estado de confluencia fueron tratadas con tripsina porcina al 0.025% + 1.0 mM de EDTA. Las células se sembraron sobre los soportes dentinarios a una densidad de 5×10^5 en 15 μL de colágena (1mg/mL concentración final). Todo este procedimiento fue realizado a 4°C. La matriz fue gelificada a 37°C en medio ambiente con 100 % de humedad a una temperatura de 37°C en una atmósfera de 95 % aire y 5% CO_2 . Transcurrida 1 hora, las células fueron adicionadas con DMEM 10% de suero fetal bovino, 10mM de β -glicerofosfato, 50mg/mL de ácido ascórbico y 10^{-7} μ de dexametasona. El medio fue cambiado cada tercer día y los cultivos se realizaron a 3 y 5 días. Al cultivo experimental se le adicionó la proteína de adherencia del cemento radicular en una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cumplido este tiempo se utilizó paraformaldehído-PBS al 4% como fijador durante 1 hora. (Kleinman *et al.*, 1981)

INCLUSIÓN Y CORTE

Después de la fijación las muestras fueron sometidas a 3 lavados de 30 minutos cada uno en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4. Posteriormente fueron sometidos a tratamiento de deshidratación comenzando con alcohol etílico al 50, 60, 70, 96 y 100 %. Los especímenes fueron clareados con xilol durante 4 horas e incluidos en parafina para el procesamiento de corte. Los cortes obtenidos fueron de 5 μm de grosor. (Luna LG, 1978)

Una vez teniendo los cortes las laminillas fueron desparafinadas y rehidratadas por medio de concentraciones decrecientes de alcohol etílico (100, 96, 70, 60 y 50 %) y finalmente en PBS pH 7.4. (Sheehan DC y Hrapchak, 1980)

CULTIVOS EN EL SISTEMA ROTATORIO

Utilizando un sistema de cultivos rotatorio (RCCS. Synthecon, Inc) se sembraron cada uno de los tipos celulares a una densidad de 2.5×10^5 por mL de medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 %, el medio fue cambiado cada tercer día. Los tres diferentes cultivos fueron llevados a 10 días, cumplido este tiempo los esferoides fueron fijados con una disolución de p-formaldehído al 4 % en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4, durante 12 hrs. Posteriormente los esferoides fueron incubados en una disolución de sacarosa al 10 % en PBS pH 7.4 durante 24 hrs. (Freed y Vunjak-Novakovic, 1997).

INCLUSIÓN Y CORTE.

Los esferoides fueron incluidos en Tissue Tech, colocados a -20° C durante 30 minutos y cortados en un criostato a -20° C, con un grosor de 5 µm y estos fueron montados en portaobjetos tratados con silano al 2 % en disolución con acetona. (Mills, 1995).

TINCIÓN CON HEMATOXILINA EOSINA Y ALIZARINA ROJA.

Las laminillas fueron sometidas a la técnica de rutina con hematoxilina eosina. (Sheehan y Hrapchak, 1980)

La tinción con alizarina roja pH 4.1 para detectar sales de calcio se realizó colocando 500 µL de esta solución por laminilla después de 30 min., estas fueron lavadas profusamente y montadas para su observación. (McGee-Russell, 1958)

INMUNOLOCALIZACIÓN.

CULTIVOS TRIDIMENSIONALES EN MATRIZ DE COLÁGENA TIPO I.

Se utilizaron las laminillas correspondientes a los cultivos de células derivadas del ligamento periodontal.

Las laminillas fueron lavadas con PBS pH 7.4, incubadas en una disolución de albúmina al 2 % libre de IgG's en PBS, para bloquear sitios antigénicos inespecíficos. Las células fueron permeabilizadas con una disolución de tritón X-100 al 0.2 % en PBS pH 7.4. Se realizaron las inmunolocalizaciones por triplicado utilizando un anticuerpo policlonal contra osteopontina (OPN) y en otras laminillas un anticuerpo policlonal contra sialoproteína ósea (BSP), ambos a una dilución de 1:100, posteriormente fue colocado un segundo anticuerpo policlonal α-IgG de conejo acoplado a FITC utilizando una dilución de 1:60. Además se utilizó

ioduro de propidio a una concentración de 1mM para evidenciar el material genético. Entre cada uno de los anteriores pasos las laminillas fueron lavadas con PBS y finalmente montadas con Vecta-shield. Para su observación en un microscopio confocal de tres canales (BioRad).

CULTIVOS TRIDIMENSIONALES EN EL SISTEMA ROTATORIO.

En estas laminillas se realizó una doble inmunolocalización, del cultivo de células del ligamento periodontal, de células del hueso alveolar y de células derivadas de un cementoblastoma humano.

Se utilizaron anticuerpos policlonales específicos para colágena tipo I (COL I), sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN) y proteína del cemento (CP). Anticuerpos monoclonales contra proteína de adherencia del cemento radicular (CAP) y osteocalcina (OCN).

Las combinaciones de los anticuerpos fueron a) COL I + CAP; b) BSP + CAP; c) OPN + CAP y d) CP + OCN. Cada una de estas combinaciones se realizó en tres laminillas de los tres diferentes cultivos celulares.

Las laminillas fueron lavadas con PBS pH 7.4, incubadas en una disolución de albúmina al 2 % libre de IgG's, para bloquear sitios antigénicos inespecíficos. Las células fueron permeabilizadas con una disolución de tritón X-100 al 0.2 % en PBS pH 7.4. Se colocaron los primeros anticuerpos policlonales de conejo (COL I, BSP, OPN y CP) cada uno en diferentes laminillas a una dilución 1:100, en una cámara húmeda, incubándose durante 2 horas y posteriormente el segundo anticuerpo policlonal α -conejo específico acoplado a FITC utilizando una dilución de 1:60, durante 1 hora. Se repitió este protocolo, pero ahora utilizando los anticuerpos monoclonales α -CAP y OCN, el segundo anticuerpo α -ratón acoplado a rodamina. Entre cada uno de los anteriores pasos las laminillas fueron lavadas con PBS pH 7.4. Finalmente las laminillas fueron montadas con Vecta-shield. Para su observación en un microscopio confocal de tres canales (BioRad). (Arzate *et al.*, 2002)

RESULTADOS

CULTIVOS EN MATRIZ DE COLÁGENA TIPO I TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA.

Se observó de manera cualitativa la presencia de matriz extracelular, siendo más abundante en el grupo experimental que en el grupo control, tanto en las muestras del ensayo de proliferación (Fig.1), como en las muestras de cultivos a 3 y 5 días (Fig. 2 y 3 respectivamente). La letra a) corresponde al control y la letra b) al grupo experimental.

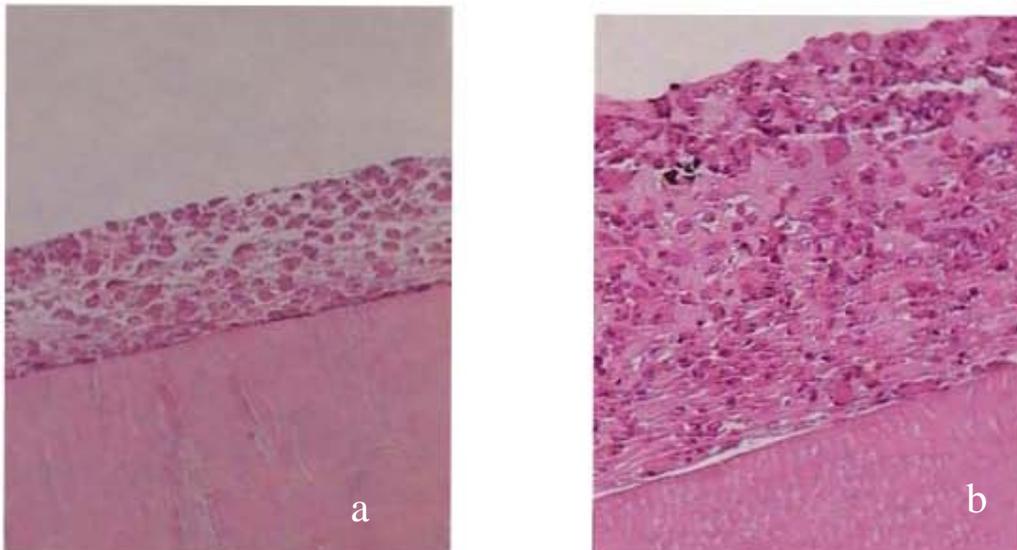


Fig. 1 Fibroblastos del ligamento periodontal. Ensayo de proliferación.
a) Control b) Experimental. Aumento 10 X



Fig. 2 Fibroblastos del ligamento periodontal. Ensayo de 3 días.
a) Control b) Experimental. Aumento 10 X

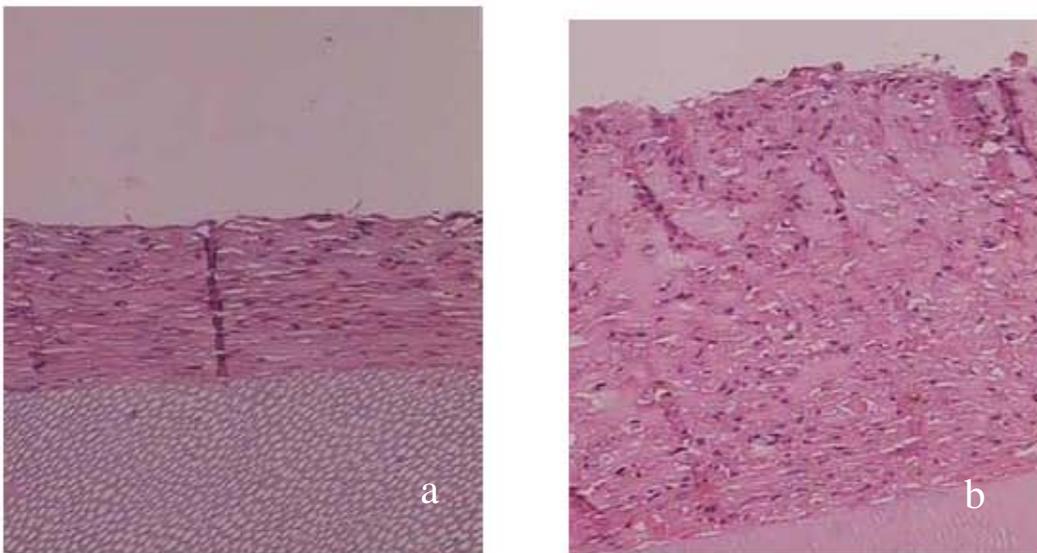


Fig. 3 Fibroblastos del ligamento periodontal. Ensayo de 5 días
a) Control b) Experimental. Aumento 10X.

TINCIÓN CON ALIZARINA ROJA.

En los cortes teñidos con alizarina roja para detectar sales de calcio, se observaron de manera general más células positivas a esta tinción en el grupo experimental con respecto al grupo control, sin embargo la diferencia a simple vista fue mas notoria en las muestras con un tiempo de cultivo de 5 días. (Fig. 4)

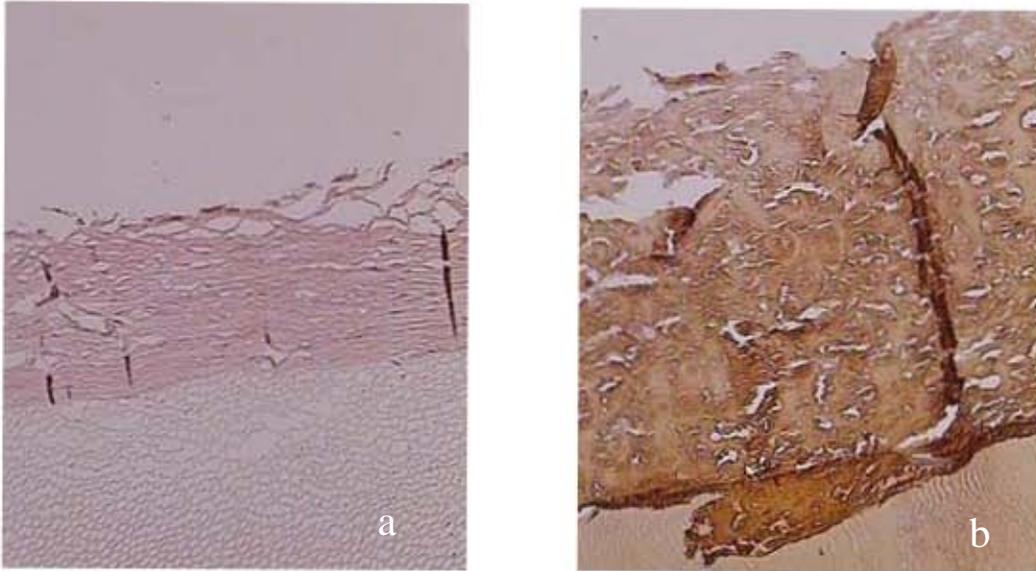


Fig. 4 Fibroblastos del ligamento periodontal. Ensayo de 5 días.
a) Control b) Experimental. Aumento 10 X

Inmunolocalización de OPN Y BSP.

En los cortes se puede observar una expresión pobre de osteopontina (OPN) en ambos grupos. Grupo control (a), grupo experimental (b). (Fig. 5)

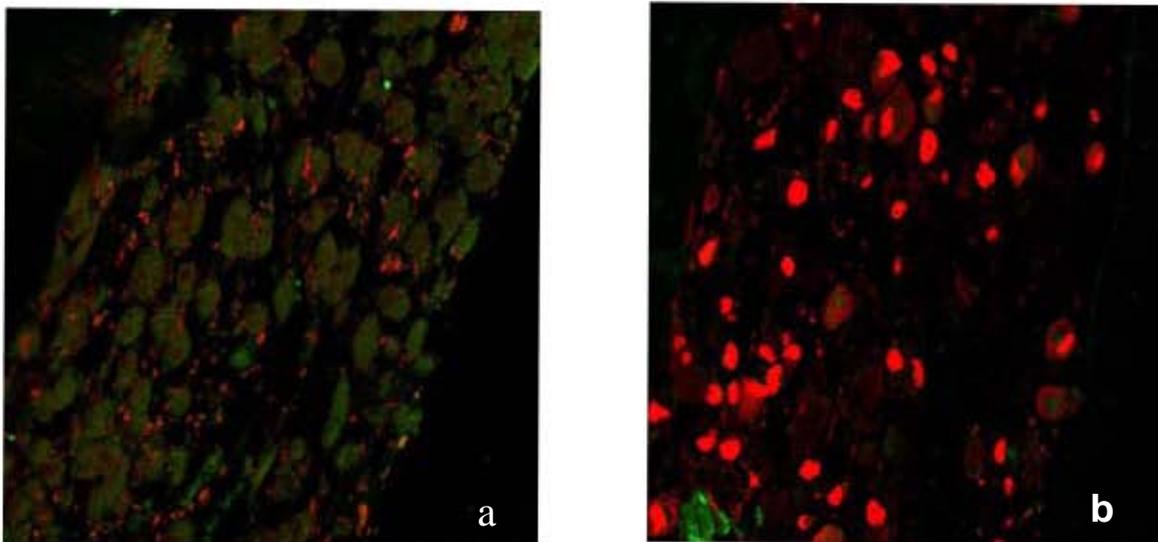


Fig. 5 Fibroblastos del ligamento periodontal. Ensayo de 5 días
a) Control b) Experimental. Aumento 40 X

La expresión cualitativa de sialoproteína ósea fue mayor en las células tratadas con la proteína de adherencia del cemento radicular (a), que en el grupo de células que no fueron tratadas con dicha proteína (b). (Fig. 6).



Fig. 6 Fibroblastos del ligamento periodontal. Ensayo de 5 días.
a) Control b) Experimental. Aumento 40 X

CULTIVOS TRIDIMENSIONALES EN SISTEMA ROTATORIO

FIBROBLASTOS DEL LIGAMENTO PERIODONTAL

Tinción hematoxilina-eosina y tinción con alizarina roja.

Se localizan algunos cúmulos o gránulos de mineralización pero de una manera incipiente.

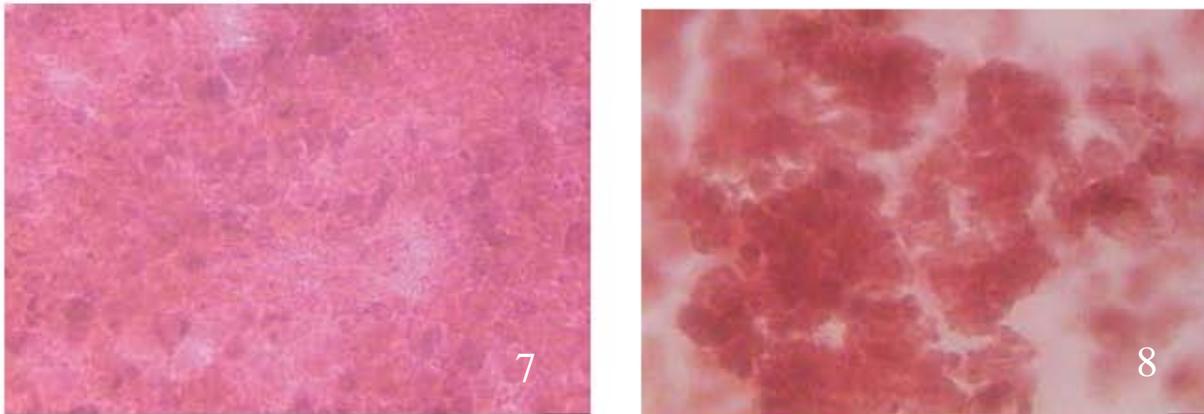


Fig. 7 y 8 Fibroblastos del ligamento periodontal.
Tinción HE y Alizarina roja, respectivamente. Aumento 40 X

Inmunotinción contra CAP (Rodamina) y COL I (FITC)

La presencia de colágeno tipo I es evidenciada cualitativamente por una intensa marca de fluoresceína que se localiza en todo el tejido, por el contrario el fluorocromo rodamina que evidencia a la proteína de adherencia del cemento radicular, se localiza en zonas aisladas. Las zonas de co-localización fueron prácticamente nulas.

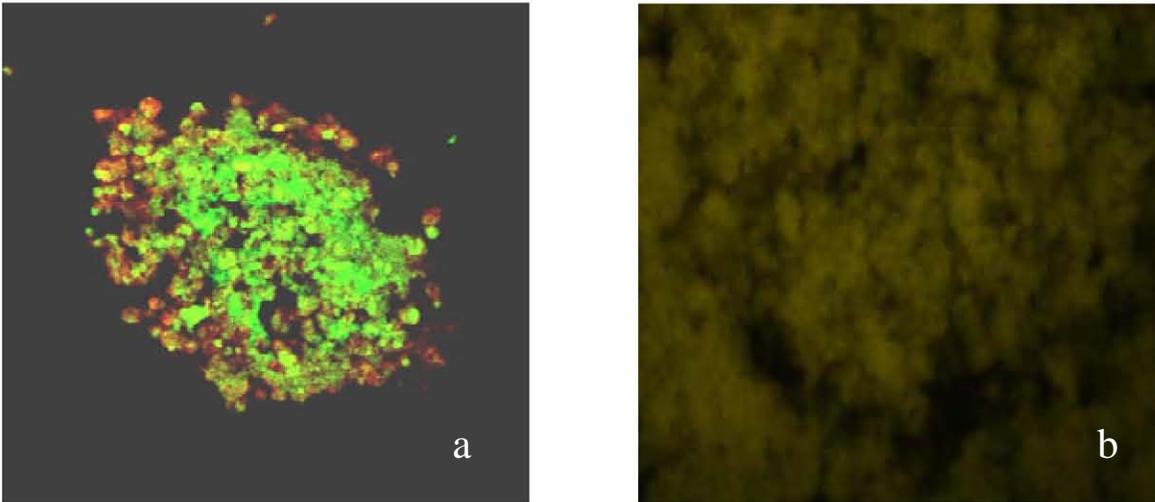


Fig. 9. Fibroblastos del ligamento periodontal. Aumento 40 X
 a) Expresión COL I-FITC; CAP- rodamina b) Control negativo

Immunotinción contra CAP (Rodamina) y BSP (FITC)

En este corte la expresión de BSP/CAP presentó un patrón similar tanto en localización e intensidad de el encontrado en estas mismas células para CAP/COL I con zonas generalizadas de FITC y expresión de CAP muy limitada.

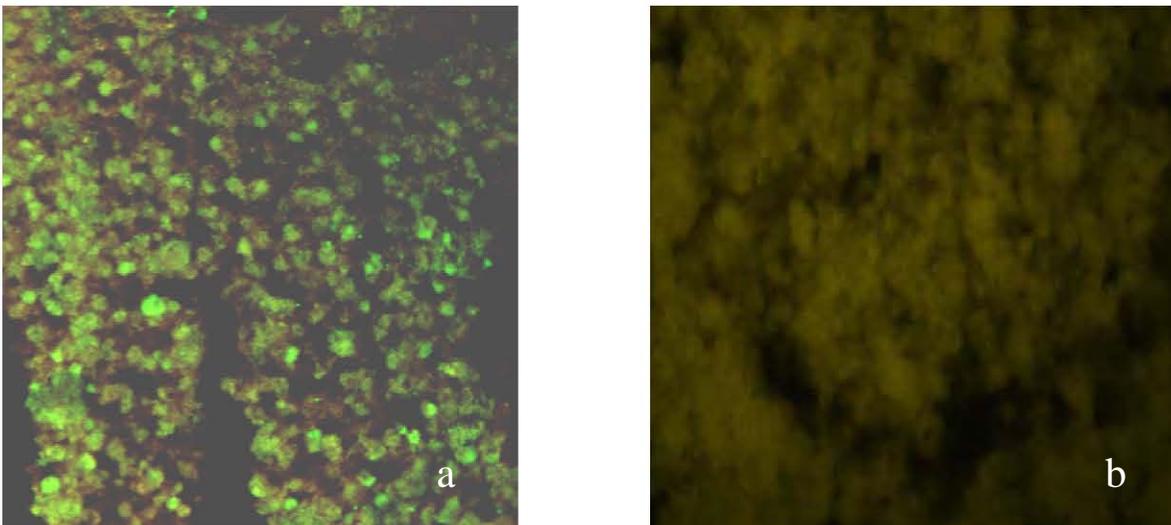


Fig. 10. Fibroblastos del ligamento periodontal. Aumento 40 X
 a) Expresión BSP-FITC; CAP- rodamina b) Control negativo

Immunotinción contra CAP (Rodamina) y OPN (FITC)

En este corte se presenta un patrón en la expresión de las proteínas similar al del anterior, con una localización generalizada de OPN y en muy pocas regiones se observa la CAP.

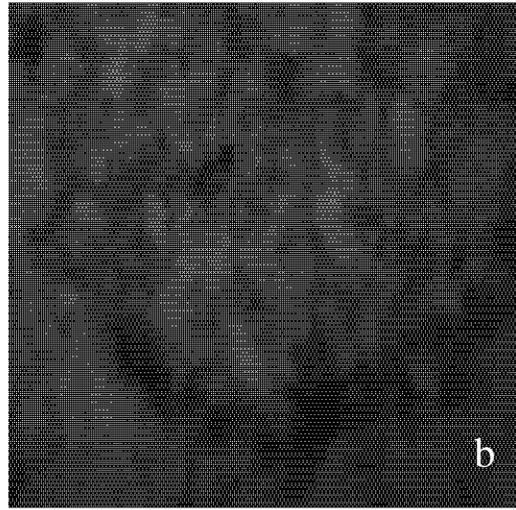
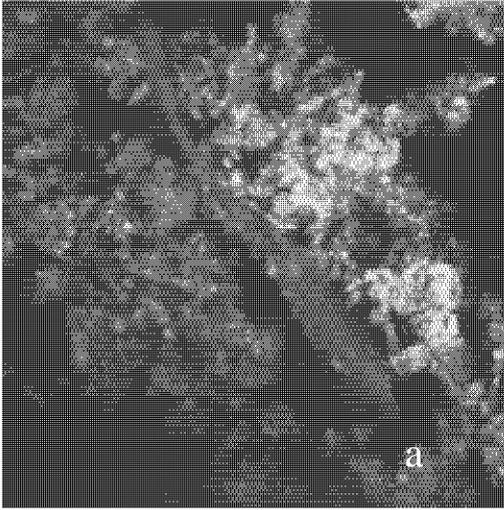


Fig. 11. Fibroblastos del ligamento periodontal. Aumento 40 X
a) Expresión OPN-FITC; CAP- rodamina b) Control negativo

Inmunotinción contra OCN (Rodamina) y CP (FITC)

De manera cualitativa la expresión de CP es más generalizada en todo el tejido, en comparación con la expresión de la osteocalcina, la cual se evidencia por la marca de color rojo de baja intensidad.

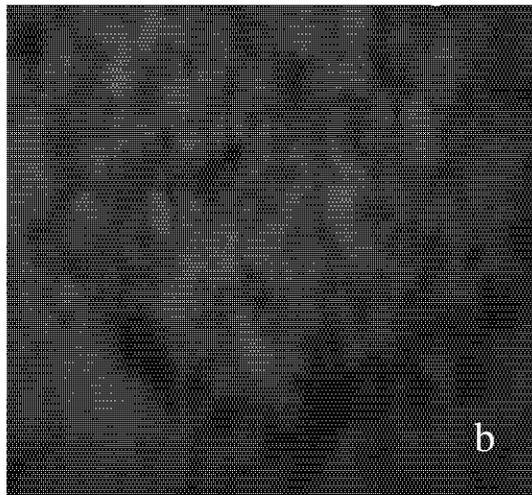
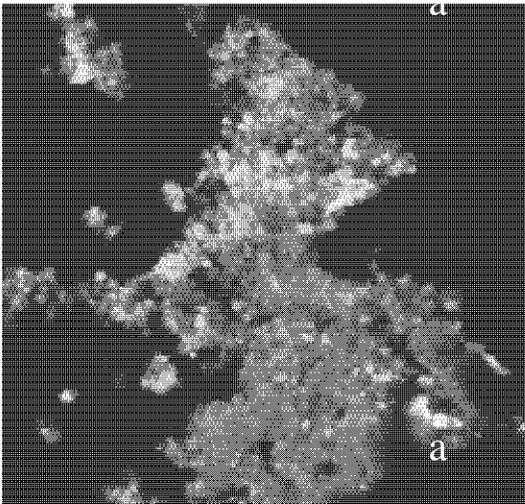


Fig. 12 Fibroblastos del ligamento periodontal. Aumento 40 X
a) Expresión CP-FITC; OCN- rodamina b) Control negativo

OSTEOBLASTOS DEL HUESO ALVEOLAR

Tinción hematoxilina-eosina y tinción con alizarina roja.

Con la tinción específica se localizan algunos gránulos que evidencian mineralización, siendo éstos aislados y su pigmentación es débil.

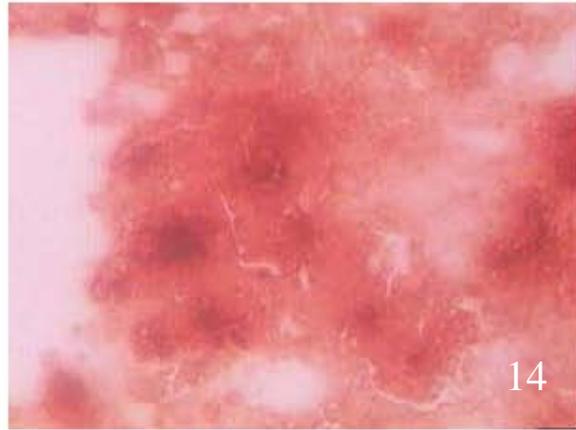
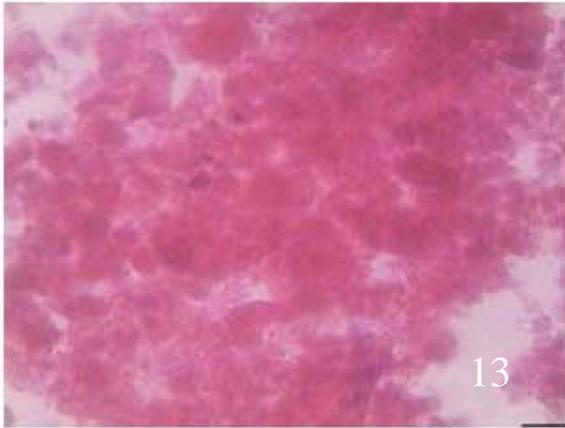


Fig. 13 y 14 Osteoblastos del hueso alveolar.
Tinción HE y Alizarina roja, respectivamente. Aumento 40 X

Inmunotinción contra CAP (Rodamina) y COL I (FITC)

Se logra observar de una manera cualitativa una gran positividad para la proteína de colágena tipo I, que se distribuye ampliamente en el tejido, en cuanto a la CAP que se observa por medio de la rodamina se aprecia una marca débil y puntual.

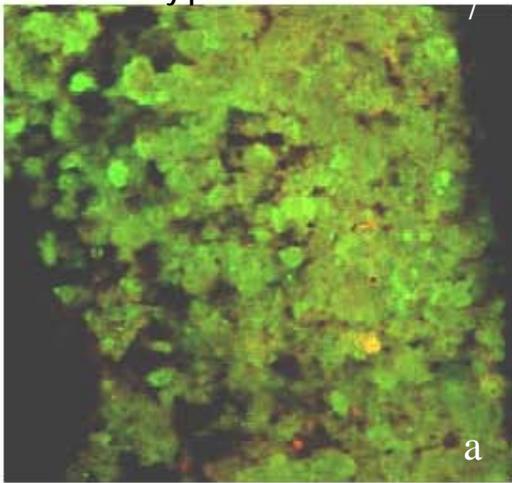


Fig.15 Osteoblastos del hueso alveolar. Aumento 40 X
a) Expresión COL I-FITC; CAP- rodamina b) Control negativo

Inmunotinción contra CAP (Rodamina) y BSP (FITC)

Al igual que en el corte anterior en estas células se encuentra un gran marcaje para la fluoresceína, pero que en este corte corresponde a la sialoproteína ósea, la marca se observa en todo el tejido, a diferencia de la CAP cuya expresión es prácticamente nula.

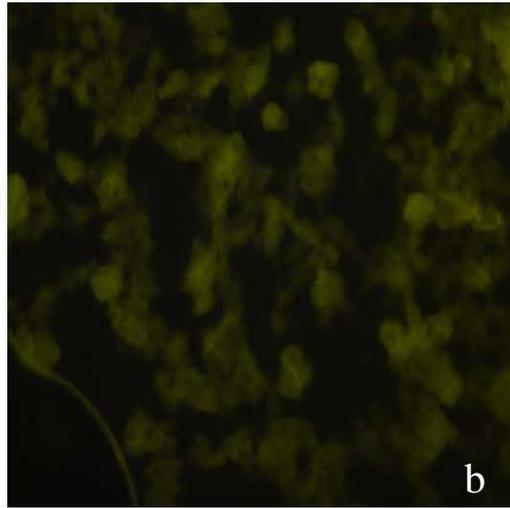
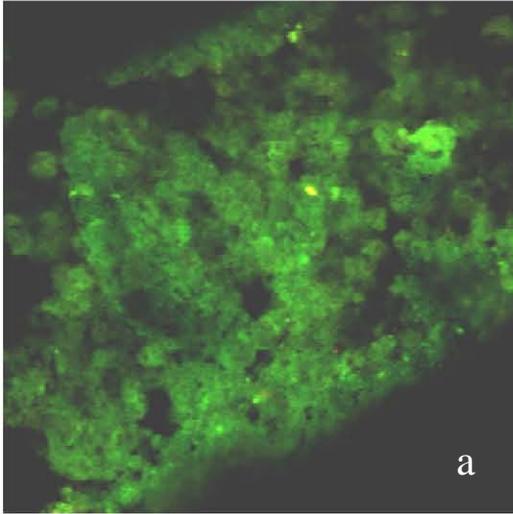


Fig.16 Osteoblastos del hueso alveolar. Aumento 40 X
a) Expresión BSP-FITC; CAP- rodamina b) Control negativo

Inmunotinción contra CAP (Rodamina) y OPN (FITC)

En el caso de la osteopontina, su localización es fue muy pobre con respecto a la COL I y la BSP, la proteína de adherencia del cemento radicular se encuentra expresada de manera limitada.

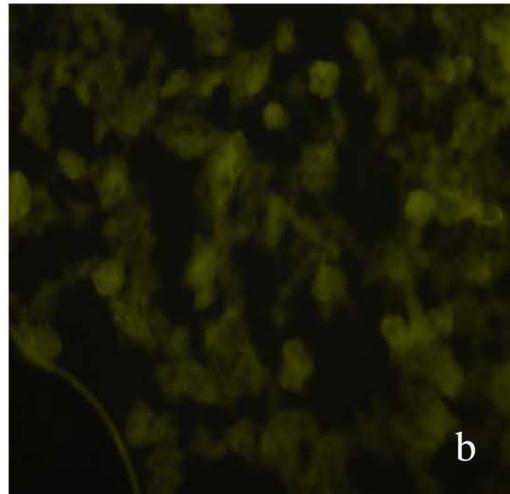
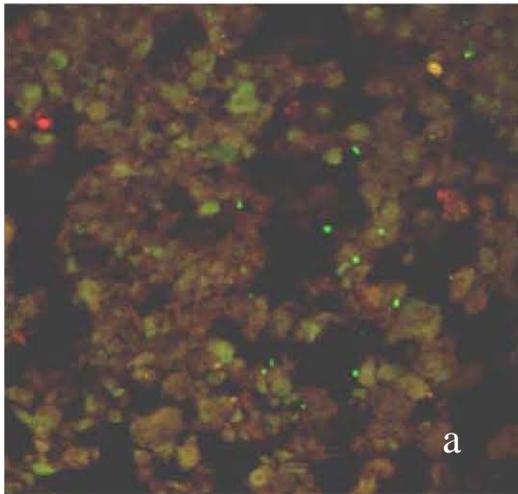


Fig.17 Osteoblastos del hueso alveolar. Aumento 40 X
a) Expresión OPN-FITC; CAP- rodamina b) Control negativo

Inmunotinción contra OCN (Rodamina) y CP (FITC)

Es este corte existe una pobre positividad para ambas proteínas, sin embargo la OCN es más evidente, en comparación de la marca para la CP.

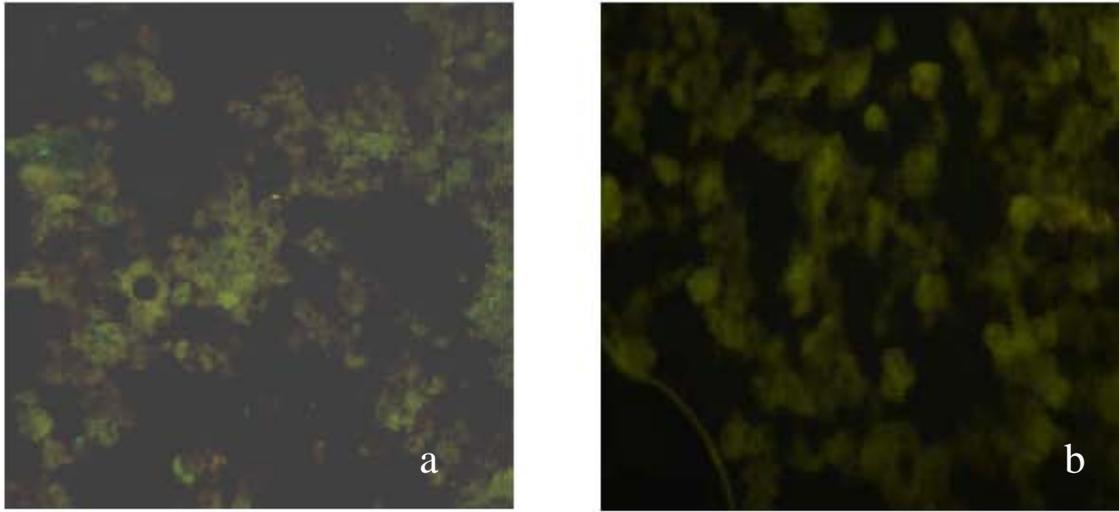


Fig.18 Osteoblastos del hueso alveolar. Aumento 40 X
 a) Expresión CP-FITC; OCN- rodamina b) Control negativo

CEMENTOBLASTOS

Tinción hematoxilina-eosina y tinción con alizarina roja.

Se localizan algunos cúmulos o gránulos de mineralización, pero no en todo el tejido. .

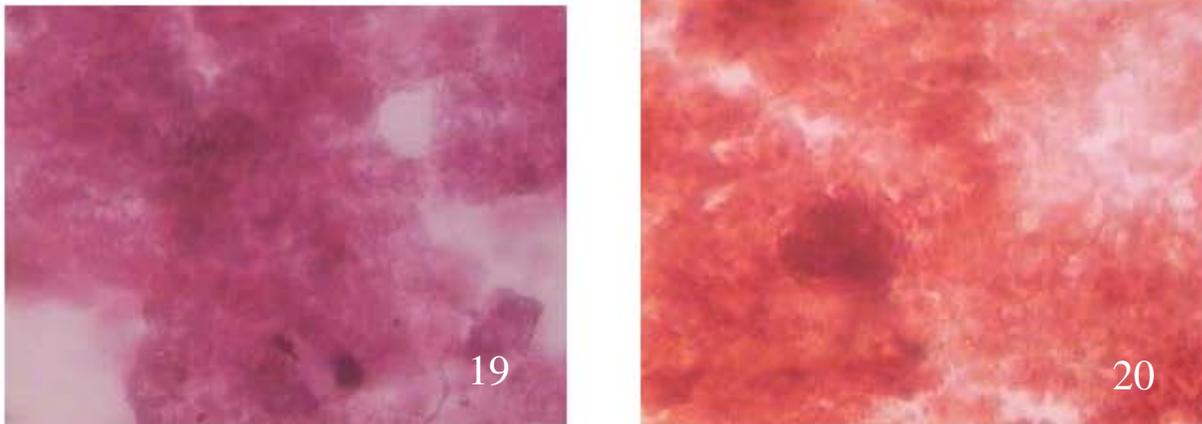


Fig. 19 y 20 Cementoblastos del cemento radicular.
 Tinción HE y Alizarina roja, respectivamente. Aumento 40 X

Inmunotinción contra CAP (Rodamina) y COL I (FITC)

En estas células la marca para la CAP es en zonas localizadas dentro del tejido, en la mayor parte de los casos se presenta con un patrón de puntilleo, sin embargo hay una mayor marca para la colágena

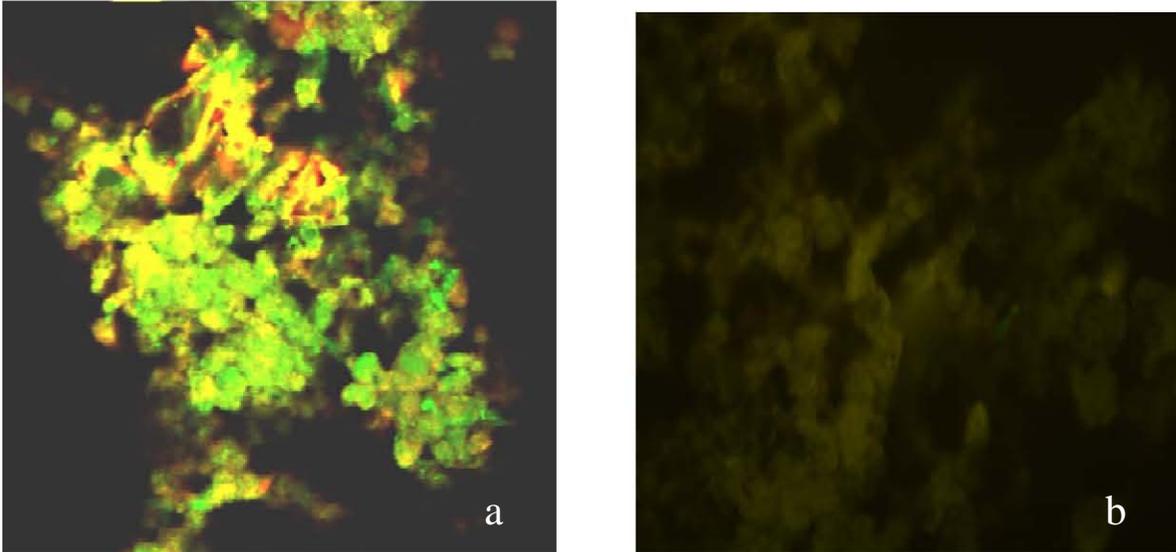


Fig.21 Cementoblastos del cemento radicular. Aumento 40 X
 a) Expresión COL I-FITC; CAP- rodamina b) Control negativo

Inmunotinción contra CAP (Rodamina) y BSP (FITC)

En este caso se observa que la expresión de BSP evidenciada por el color verde de la fluoresceína se encuentra ampliamente distribuida, la CAP se identifica con la rodamina, en color rojo, que poco se observa de manera individual, sino que se da una co-localización con la marca de la BSP.

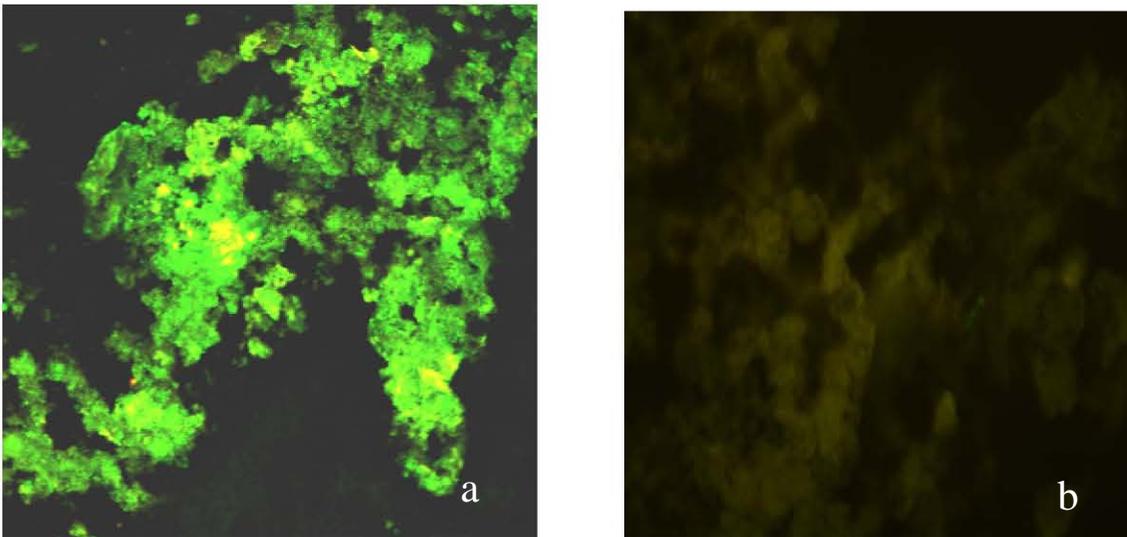


Fig.22 Cementoblastos del cemento radicular. Aumento 40 X
 a) Expresión BSP-FITC; CAP- rodamina b) Control negativo

Inmunotinción contra CAP (Rodamina) y OPN (FITC)

La expresión de la osteopontina es similar, en la distribución, aunque de menor intensidad a la presentada para la sialoproteína ósea, de igual manera podemos observar que la expresión de la CAP es escasa, con respecto a la OPN.

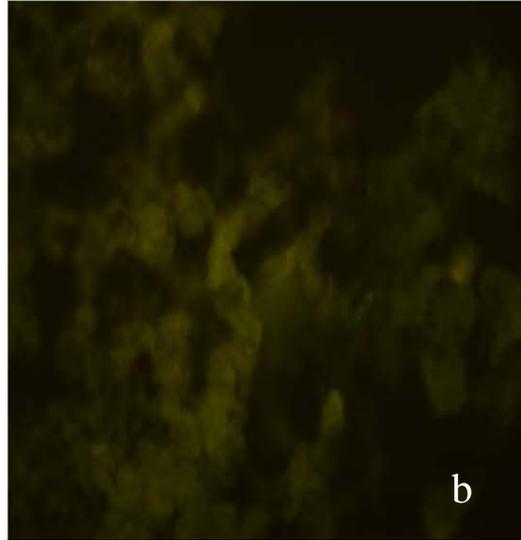
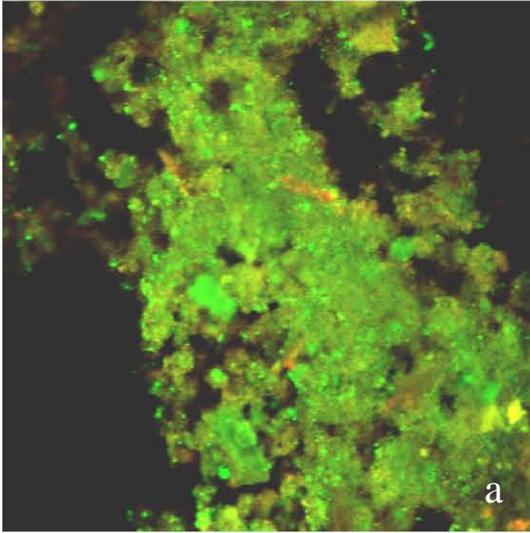


Fig.23 Cementoblastos del cemento radicular. Aumento 40 X
a) Expresión BSP-FITC; CAP- rodamina b) Control negativo

Immunotinción contra OCN (Rodamina) y CP (FITC)

En este corte se puede apreciar en todo el tejido la fluoresceína, evidenciando a la CP y en cuanto a la expresión de la osteocalcina fue poco evidente.

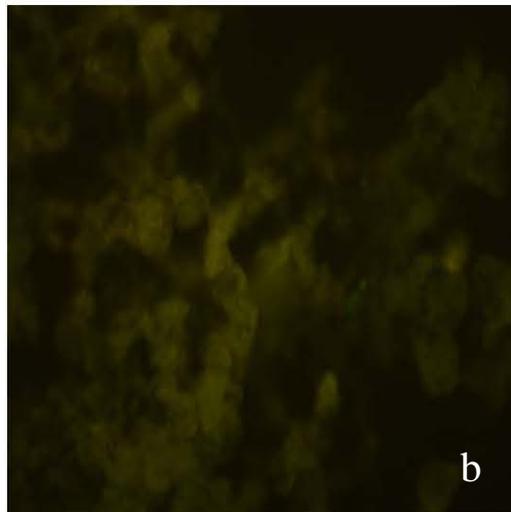
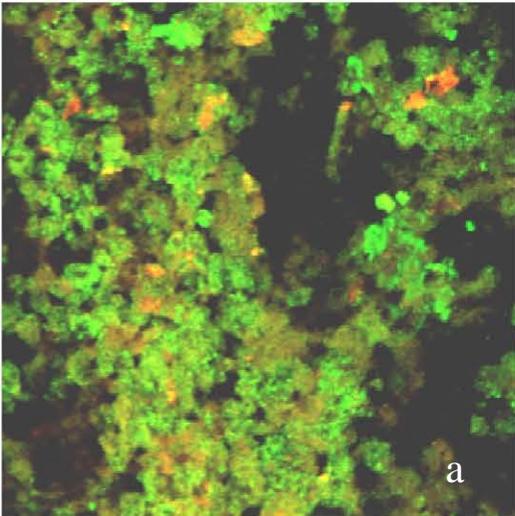


Fig.24 Cementoblastos del cemento radicular. Aumento 40 X
a) Expresión CP-FITC;OCN- rodamina b) Control negativo

DISCUSIÓN

Los cultivos tridimensionales son aquellos que en combinación con técnicas moleculares han determinado que poseen características más apegadas a las observadas *in vivo* en comparación con los cultivos convencionales, debido a que la disposición espacial y el ambiente que rodean a las células son determinantes tanto en la expresión génica como en el desarrollo celular (Mueller-Klieser, 1997).

Los principales requerimientos para producir un tejido por medio de ingeniería son: la presencia de una matriz que soporte a estas células de manera tridimensional, la presencia de células formadoras del tejido en cuestión y señales reguladoras para optimizar el desarrollo celular.

Por tanto en la ingeniería de tejidos, los cultivos tridimensionales son aquellos en los que se utilizan andamiajes o matrices exógenas para brindar un soporte a las células y permitir que éstas crezcan de manera tridimensional.

En este tipo de cultivos tridimensionales se han utilizado diferentes tipos de matriz para dar soporte a las células, como esponjas porosas, agarosa o colágena, esta última la de tipo I.

En este estudio se utilizó una matriz de colágena tipo I, debido a que es la proteína más abundante en el ligamento periodontal (Cochran y Wozney, 1999; Langer y Vacanti, 1993).

Además se utilizó en estos cultivos, la adición de proteína de adherencia del cemento radicular a los grupos experimentales, como señal reguladora.

De manera general se pudo observar en los cortes que la cantidad de tejido que se obtuvo en los grupos experimentales fue mayor, con una gran cantidad de matriz extracelular en comparación con los grupos controles, en ambos tiempos de cultivo, esto nos revela que la proteína de adherencia del cemento radicular favorece la producción de matriz extracelular. La proteína de adherencia del cemento radicular ha demostrado además favorecer la migración y adhesión de células del ligamento periodontal (Metzger, 1988; Pitaru, 1995).

En lo que respecta a la tinción con alizarina roja que evidencia el depósito de sales de calcio, se observó un incremento en la señal positiva en el grupo experimental, sin la observación de núcleos de mineralización bien definidos. Confirmando que esta proteína favorece la formación de tejido mineralizado, como se ha encontrado en cultivos monocapa (Liu *et al.*, 1997).

La inmunolocalización fue mas intensa en el grupo experimental al utilizar el anticuerpo contra sialoproteína ósea, encontrando mayor marca que en el grupo control, este mismo hallazgo fue obtenido por Álvarez-Pérez *et al.*, 2001 en los cuales se observó que la CAP regula la expresión de la sialoproteína ósea, favoreciendo de esa manera el proceso de mineralización, ya que la sialoproteína ósea es un nucleador de los cristales de hidroxiapatita (Hunter y Goldberg, 1993).

En contraste con el resultado anterior, la expresión de la osteopontina fue prácticamente nula en ambos grupos. Esta proteína ha demostrado tener como una de sus funciones el regular el crecimiento inicial de los cristales de hidroxiapatita (Marriotti, 1993), pero como el tiempo de cultivo máximo fue de 5 días probablemente no se inició el proceso de regulación del crecimiento de los cristales.

Existen además otros tipos de cultivos tridimensionales, en los cuales no se utilizan matrices para dar soporte a las células, sino que la estrategia que se sigue es la de prevenir la unión celular a las paredes o piso del recipiente que las contiene, lo que da como resultado la formación de cúmulos celulares que son denominados como esferoides (Kunz-Schughart, 1999).

Dentro de esta modalidad tenemos aquellos cultivos que se logran mediante el empleo de contenedores rotatorios, estos cultivos reciben el nombre de cultivos en baja gravedad (Jessup, Godwin y Spaulding, 1993).

En los cultivos de fibroblastos encontramos que el mayor marcaje fue para la colágena tipo I, lo cual coincide con los resultados en cultivos tanto en monocapa, como *in vivo* (Cho y Garant, 2000; Hassell, 1993; Mariotti, 1993). Lo anterior debido a que estas células tienen entre sus principales funciones la elaboración y

remodelación de la matriz extracelular del ligamento periodontal, siendo la molécula mas abundante dentro de ésta matriz la colágena tipo I.

Con respecto a las proteínas involucradas en el proceso de mineralización, estos cultivos presentaron un patrón similar para la expresión de sialoproteína ósea y osteopontina, este hallazgo se encontró también *in vivo* durante la reparación de tejidos después de una lesión inducida (Ivanovsky, 2000). La expresión de osteocalcina fue muy pobre, posiblemente debido a que los tiempos de cultivo, no fueron suficientes para esta proteína cuya función es la de regular la maduración de los cristales (Sodek y McKee, 2000).

Los osteoblastos son productores de una matriz extracelular que consiste predominantemente en colágena tipo I y proteínas no colágenas como lo son sialoproteína ósea, osteopontina y osteocalcina, (Sodek y McKee, 2000). En los cultivos tridimensionales se puede observar la presencia de estas moléculas en un patrón muy similar con el descrito para los fibroblastos del ligamento periodontal, aunque de manera general, de menor intensidad.

Tanto para los fibroblastos, como para los osteoblastos, la presencia de la proteína de adherencia del cemento radicular, fue muy poco evidente, con respecto a la marca observada en los cementoblastos debido a que es una proteína distintiva de cemento radicular (Arzate *et al.*, 1992, 1998, 2000, 2001)

El cultivo de cementoblastos y el estudio de sus características ha sido difícil, por lo cual una alternativa a esta problemática es la de emplear en este estudio el modelo de cementoblastos putativos aislados a partir de un cementoblastoma humano en cultivo, (Arzate *et al.*, 1992; 1998; 2000).

El hueso alveolar y el cemento son tejidos que poseen características en común, como su composición (Nazan *et al.*, 2000). Por otro lado ha sido considerado que una misma célula progenitora da origen a osteoblastos y cementoblastos (Nohutcu *et a.*, 1996) probablemente éstos factores expliquen que el patrón de tinción con alizarina roja es similar en cementoblastos con respecto a los cultivos de osteoblastos, de la misma manera con la expresión de colágena tipo I y sialoproteína, cualitativamente la intensidad y distribución de la marca fue similar en los dos cultivos, sin embargo la expresión de la osteopontina fue mayor en el tejido derivado de cementoblastoma humano. Por otro lado la expresión de la proteína de adherencia del cemento radicular, fue mas intensa en estos cultivos que en los cultivos de fibroblastos del ligamento periodontal y del hueso alveolar, esto se puede explicar debido a que dicha proteína es considerada como un marcador biológico del cemento radicular (Arzate *et al.*, 1992a y b; 1998, 2000, 2001)

CONCLUSIONES

La enfermedad periodontal tiene el primer lugar de prevalencia dentro de las enfermedades bucales, dejando como secuelas la destrucción de los tejidos periodontales.

El entender como se lleva a cabo el proceso de reparación de los tejidos que conforman al periodonto es de fundamental importancia, ya que es el comienzo para una buena rehabilitación bucal. Esta fué la razón por la cual este estudio estuvo enfocado observar la expresión de proteínas que participan en el proceso de mineralización, ya que dicho proceso se encuentra estrechamente relacionado a la de reparación de los tejidos afectados por la enfermedad periodontal, ya que es necesario restablecer los tejidos duros, para que de esa forma sirvan como un soporte para los tejidos periodontales blandos.

Las células que conforman los tejidos periodontales no se encuentran organizadas en monocapas, sino que presentan un arreglo tridimensional. Esta es la razón fundamental por la cual fueron empleados cultivos tridimensionales, brindando así una situación mas apegada a lo que ocurre dentro de los tejidos que forman el periodonto *in vivo*.

La expresión cualitativa de moléculas relacionadas con el proceso de mineralización, fue lo que se obtuvo como resultado.

De manera general se puede afirmar que las células presentaron una expresión de éstas moléculas similar a la que encontramos en los tejidos en reparación.

Tanto en los cultivos tridimensionales de células derivadas del periodonto empleados en este estudio, como en los tejidos periodontales en reparación se presenta una secuencia temporal de las proteínas que participan en el proceso de mineralización, teniendo una mayor expresión de colágena tipo I, sialoproteína ósea y osteopontina en las primeras fases del proceso de reparación y en éste caso en los primeros días de cultivo y en etapas mas avanzadas se localizan proteínas como la osteocalcina.

Debido a lo anterior se puede afirmar, que por lo menos desde este punto de vista de la expresión de proteínas relacionadas con el proceso de mineralización, los cultivos tridimensionales derivados de células del periodonto empleados en este estudio tienen un comportamiento similar a las células que tienen como función la reparación de éstos tejidos, después de la enfermedad periodontal.

Sin embargo, es bien sabido, que aun siendo estos cultivos tridimensionales hay un sin número de factores adicionales *in vivo* que desafortunadamente no pudieron ser reproducidos. No obstante, este modelo ofrece la posibilidad de simular condiciones mas reales y los resultados obtenidos pueden ser utilizados para futuras investigaciones, dentro de las cuales se emplee además un análisis cuantitativo, así como descripción ultraestructural de las células crecidas cultivadas tridimensionalmente.

REFERENCIAS

- Armstrong M. T, J.W. Fenton, T.T. Andresen y P.B. Armstrong (1996). Thrombin stimulation of matriz fibronectin. *J Cell Physiol.* 166: 112-120.
- Arzate H. LF Jiménez-García, MA Álvarez-Pérez, A Landa, I Bar-Kana y S. Pitaru (2002). Immunolocalization of human cementoblastome-conditioned médium-derived protein. *J Dent Res* 81(8):541-546.
- Arzate H., Alvarez MA., Aguilar ME., Alvarez O. (1998). Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells *in vitro*. *Journal of Periodontal Research.* 33:249-258.
- Arzate H., Alvarez MA., Alvarez O., Wusterhaus A., Reyes J., Ximénez LA. (2000) Electron microscopy, micro-analysis and X-ray diffraction characterization of the mineral-like tissue deposited by human cementum tumor-derived cells. *Journal of Dental Research.* 79:28-34.
- Arzate H., Chimal MJ., Hernández LL., Díaz LL (1996). Human cementum protein extract pormotes chondrogenesis and mineralización in mesenchymal cells. *Journal fo Periodontal Research.* 31: 144-448.
- Arzate H., Jiménez LF., Pitaru S., Bar-kana I., Alvarez MA., Landa P. (1992) Production of polyclonal antibody against a human cementoblastoma conditioned media-derived attachment protein. *Journal Of Histochemistry Cytochemistry.*
- Arzate H., Olson SW., Page RC., Gown AM., Narayanan S. (1992) Production of monoclonal antibody to an attachment protein drived from human cementum. *FASEB J.* 6:2990-2995.
- Barnes DE (2000) Public policy on oral health and old age: a global new. *Journal Public Health Dent* 60:335-337.
- Barnes Ms. (1973) Biochemistry of collagens from mineralized tissue. *Hard Tissue Growth. Repair and Mineralization.* Elsevier 247-261.
- Bartold PM, Raben A. (1996) Growth factor modulation of fibroblasts is simulated wound healing. *Journal of Periodontal Research.* 31:205-216.
- Birkedal-Hansen H., Butler WT., Taylor RE. (1977) Proteins of periodontum. Characterization of the insoluble collagens of bovine dental cementum. *Calc Tissue Research.*23:39.
- Bosshardt DD,Zalzal S,MacKee MD,Nanci A (1998) Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum. *Anatomical Record* 250:13-33.
- Bronckers ALLJJ.,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 Research.* 9:833-841.
- Cho M-I., Garant PR. (2000) Development and general structure of periodontum. *Periodontology* 2000. 24:9-27.
- Christner P.,Robinson P.,Clarck CC. (1997) A preliminary characterization of human cementum collagen. *Calcif Tissue Int.* 23:147-150.
- Cochran DL.,Wozney JM. (1999). Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontology* 2000. 19:40-48.
- Cole DE., Hanley DA. (1991) Osteocalcina. In: Hall BK, ed. *Bone matrix and bone specific products*, vol.3. Boston: CRC Press. 239-394.
- Ducy P., Desbois C., Boyce B., Pinero G., Story B., Dunstan C., Smith E., Bonadio J., Gldstein S., Gundberg C., Bradley A., Karsenty G, (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mouse. *Nature.* 382:448-452.
- Eldsdale T.,Bard J. (1972) Collagen substrata for studies on cells behavior. *Journal of Cell Biology.* 54:626-637.
- Fisher LW., McBride OW., Termine JD., Young MF. (1990). Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization.
- Freed L.E., Langer R., Martin I., Pellis N.R. Vunjak-Novakovic G. (1997). Tissue engineering of cartilage in space. *Proc Natl Acad Sci.* 94: 13885-13890.
- Freed LE, Vunjak-Nonakovic (1995). Cultivation of cell-polymer tissue contracts in simulated microgravity. *Biotech and Bioengin.* 46:306-313.
- Gibson GJ., Person CH. (1992)Sulfated galactosaminoglycans of bovine periodontal ligament. Evidence for the presence of two major types of hybrids but no chondroitin sulfate. *Connective Tissue Research.* 10:161
- Glowacki J., Rey C., Cox K., Lian J. (1989) Effects of bone matrix components on osteoclast differentiation. *Connective Tissues Research.* 21:121-129.
- Hassel Thomas M. (1993) Tissues and cells of the periodontum. *Periodontology* 2000. 3:9–38.
- Heinegard D., Oldberg A. (1989). Structure and biology of cartilage and bone matriz noncollagenous macromolecules. *FASEB J.* 224:180-188.
- Hillmann G.,Gebert A.,Geurtsen W. (1999) Matrix expression and proliferation of primary gingival fibroblasts in a three-dimensional cell culture model. . *Journal of Cell Science.* 112:2823-2832.
- Holmstrup P (1996) The microanatomy of periodontum. *Fundamentals of Periodontics* Chicago:Quintessence .27
- Hunter G. y Goldberg H.(1993) Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 8562-8565.
- Ivanovski S, Li H, Daley T, Bartold PM. (2000) An immunohistochemical study of matrix molecules associated with barrier membrane–mediated periodontal wound healing. *Journal Periodontology Research.* 35:115–126.

Jessup JM., Spaulding G. (1993). Prospects for use of microgravity-based bioreactors to study three-dimensional host-tumor interaction in human neoplasia. *J Cell Bioch.* 51:290-300.

Kagayama M., Li HC., Zhu J., Sasano Y., Hatakeyama Y., Mizoguchi I.(1997). Expression of osteocalcin in cementoblast forming accellular cementum. *Journal of Periodontology Research.* 32:273-278.

Kleinman HK. Klebe RJ. Martin GR. (1981) Role of collagenous matrices in the adhesión and growth of cells. *J. Cell Biol.* 88(3): 473-485.

Kleinman JG., Beshensky A., Worcester EM., Brown D. (1995) Expression of osteopontin, a urinary inhibitor of stone mineral crystal growth, in rat kidney. *Kidney Int.* 47: 1585-1596.

Kunz-Schughart L.A. (1999). Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and *in vivo* tumor. *Cell Biol Int.* Vol 3. 3:157-161.

Landis W., Hodgens K., Song M., Arena J., Kiyonaga S., Marko M., Owen C. y McEwen B.(1996). Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: Evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging. *Journal of Structural Biology.* 117:24-35.

Landis WJ,Song MJ (1991) Early mineral deposition in calcifying tendon characterized by hig voltage electron microscopy and three dimensional graphic imaging. *Journal of Structural Biology*108:116-127.

Langer R., Vacanti JP. (1993). Tissue Engineering. *Science* 260:920.

Liu HW, Yacobi R, Savion N, Narayanan A, Pitaru S (1997) A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitor of the mineralized tissue-forming cell lineage of the periodontal ligament. *Journal of Bone and Mineral Research.* 12:1691-1699.

Luna LG (1981) Methods for processing dried tissue specimens. *Histologic.* 8(2):1

Marriotti A. (1993) The extracellular matrix of the periodontum: dynamic and interactive tissue. *Periodontology 2000.*3:30-63

Mauch C, Hatamachi A, Scharffetter K, Krieg T (1988) Regulation of collagen synthesis within a three-dimensional collagen gel. *Exp Cell Res* 178:493-503.

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

Mcgee-Russell SM. (1958) Histochemical methods for calcium. *J Histochem Cytochem.* 6:22

McNeil RL., Berry J., Strayhorn C., Piotrowsky B., Somerman MJ. (1995) Role of two mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein, during cementogenesis. *Connect Tissue Research.* 33:1-7

McNeil RL., Berry J., Strayhorn C., Somerman MJ. (1996). Expression of bone sialoprotein mRNA by cells lining the mouse tooth root during cementogenesis. *Archives of oral biology.* 41:827-835.

McNeil RL., Sheng N., Strayhorn C., Fisher LW., Somerman MJ (1994). Bone sialoprotein is localized to the root surface during cementogenesis. *Bone and Mineral Research.* 9: 1597-1606.

McNeil RL.,Somerman MJ. (1993) Factors regulating development and regeneration of cementum. *Journal of Periodontology Research.* 23:550.

Metzger Z., Weinstock B., Dotan M., Narayanan AS., Pitaru S. (1998). Differential chemotactic effect of cementum attachment protein on periodontal cells. *Journal of Periodontal Research.* 33:123-129.

Miki Y.,Narayanan AS.,Page RC. (1987) Mitogenic activity of cementum components to gingival fibroblast. *Journal of Dental Research.* 66:123-127.

Miller EJ. Rodees RK. (1982). Preparation and characterization of the different types of collagens. *Methods Enzymol.* 82:53-64.

Mills B. (1995). Métodos histotecnológicos. Secciones por congelación. *Registro de patología de los E.U. de América.* Pp. 69-72.

Mudy GR., Poser JW. (1983) Chemotactic activity of the gamma-carboxyglutamic acid containing protein in bone. *Calcified Tissue International.* 35:164-168.

Mueller-Klieser Wolfgang (1997). Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *American Physiological Society.* C1109-C1123.

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

Narayanan AS, Page RC.(1976) Biochemical characterization of collagens synthesized by fibroblast derived from normal and diseased human gingiva. *J. Biol Cam.* 251:5464-5471

Nazan E. Saygin, Giannobile William V, Somerman J. Martha (2000). Molecular and cell bilogy of cementum. *Periodontology 2000.* 24:73–98.

Nishimura K., Hayashi M., Matsuda K., *et al.*, (1989) The chemoattractive potency of periodontal ligament, cementum and dentin for human gingival fibroblast. *Journal of Periodontal Research.* 24:146-148.

Nohutcu RM, McCauley LK, Shigeyama Y, Somerman MJ. (1996). Expression of mineral-associated proteins by periodontal ligament cells: *in vitro* vs *ex vivo*. *Journal of Periodontal Research.* 31:369-372.

Nomura S, Wills AJ, Edwards DR, Heth JK, Hogan BLM. (1988). Developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by *in situ* hybridization. *Journal of Cell Biology*. 106: 441-450.

Oldberg A., Frazén A., Heinegard D. (1986). Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an arg-gly-asp cell-binding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83:8819-8823.

Papagerakis P., Berdal M., Mesbah M., Peuchmaur M., Malaval L., Nydegger J., Simmer J., Macdougall M. (2002) Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialoprotein in developing human teeth. *Bone* 30:377-385.

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. *Journal of Periodontal Research*. 22:64.

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

Prince CW., Williamson MK. (1981) Effects of warfarin on bone. Studies on the vitamin K-dependent protein in rat bone. *Journal of Biology Chemistry*. 256: 12754-12759.

Prince PA., Baukol SA. (1980). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases synthesis of the vitamin-K dependent bone protein by osteosarcoma cell. *Journal of Biology Chemistry*. 255:11660-11663).

Ramakrishnan Pr., Lin WL., Sodek., Cho IL. (1995) Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralised nodules by rat periodontal ligament cells *in vitro*. *Journal of Periodontal Research*. 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.

Roach HI. (1994) Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biology International*. 18:617-628.

Saygin EN., Giannobile W., Somerman M. (2000). Molecular and cell biology of cementum. *Periodontology* 2000.24:73-98.

Schoeder HE. (1986). Handbook of microscopic anatomy. *The periodontium*. Berlin: Springer, 5:12-323.

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

Schor SL. (1980) Cell proliferation and migration on collagen substrata *in vitro*. *Journal of Cell Science*. 41:159-75.

Sheehan DC, Hrapchak BB. (1980) Theory and practice of Histotechnology. Battelle Press. 153-154

Sodek J., Zhang Q., Goldberg HA., Domenicucci C, Kasugai S., Wrana JI., et al. (1991) Non-collagenous bone proteins and their role in substrate-induced bioactivity in: the bone-biomaterial interface. Davies JE, editor. Toronto, ON: University of Toronto Press, pp. 97-110.

Sodek J., McKee M. (2000) Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology* 2000. 24:99-126.

Somerman MJ., Archer SY., Shteyer A., Foster RA. (1987). Protein production by human fibroblasts is enhanced by EDTA extracts of cementum. *Journal of Periodontal Research*. 22:75-77.

Somerman MJ., Argraves WS., Foster RA., Dickenson K., Norris K., Sauk JJ. (1991) Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum. *Journal of Periodontal Research*. 26:10-16.

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

Taquezawa T., Mori Y., Yonaha T. y Yoshizato K. (1993) Characterization of morphology and cellular metabolism during the spheroid formation by fibroblasts. *Exp Cell Res*. 208:430-441.

Weber L., Mauch C., Kirschen E., Müller PK, Krieg T (1986) Modulation of collagen type synthesis in organ and cell cultures of fibroblast. *Journal Biological Chemistry*. 265:2347-2351

West J.B. (2000) Physiology in microgravity. *J Appl Physiol*. 89: 379-384.

Wu D., Ikesawa K., Parker T. Saito M., Narayanan S. (1996). Characterization of collagenous cementum-derived attachment protein. *Bone and Mineral Research*. 11:686-592.