



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS , ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.

**TERAPIA GÉNICA DIRIGIDA A LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS
MINERALIZADOS *IN VIVO*, MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE LA
PROTEÍNA DEL CEMENTO 1 (CEMP1).**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JANETH SERRANO BELLO

TUTOR:

DR. HIGINIO ARZATE.
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

MÉXICO, D.F.

JULIO 2014



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	4
Resumen	
Abstract	5
1. Antecedentes	7
1.1 Periodonto	7
1.2 Encía.....	7
1.3 Ligamento periodontal.....	7
1.4 Hueso alveolar.....	8
1.5 Cemento radicular.....	8
1.6 Composición del cemento.....	9
Glicosaminoglicanos.....	10
Osteopontina y sialoproteína ósea.....	11
Proteínas Gla.....	11
Fosfatasa alcalina.....	12
1.7 Proteínas específicas de cemento.....	13
Factor de crecimiento derivado de cemento.....	13
Proteína de adhesión del cemento (CAP).....	14
Proteína del cemento 1 (CEMP1).....	14
2 Terapias de regeneración	18
2.1 Terapia génica.....	19
2.2 DNA desnudo.....	22
3. Justificación y planteamiento del problema	23
4. Hipótesis	24
5. Objetivos	24
Objetivo general.....	24
Objetivos específicos.....	24

6. Metodología.....	25
7. Resultados.....	31
8. Discusión.....	62
9. Conclusiones.....	66
10. Referencias bibliográfica.....	67

Resumen

El hueso presenta un potencial de reparación a través de procesos dinámicos de remodelación, que involucra la neoformación y la reabsorción ósea. A pesar de ello, algunos defectos óseos no presentan remodelación espontánea, necesitando factores que estimulen la reparación.

Los defectos de tamaño crítico en calvarias de rata es un modelo bien establecido para el estudio de la regeneración ósea, las alternativas terapéuticas actuales para la regeneración de tejidos mineralizados, particularmente hueso, se enfocan en el uso de factores de crecimiento osteoinductivos, ya sea utilizando la liberación directa de proteína/s recombinante/s y alternativas basadas en plásmidos de DNA.

La proteína del cemento 1 (CEMP1) es una proteína específica del cemento radicular, la cual está involucrada en procesos de mineralización, adhesión y diferenciación celular. En estudios previos al transfectar con el gen de CEMP1 células no esqueléticas como los fibroblastos humanos, su fenotipo se modificó a mineralizante, además de expresar moléculas involucradas en el proceso de mineralización, como la fosfatasa alcalina, osteocalcina, osteopontina y sialoproteína ósea. Por tal motivo surgió la hipótesis de que al colocar el gen de CEMP1 en defectos de tamaño crítico en calvarias de ratas *Wistar*, este será regenerado con hueso, para comprobarlo se planteó el objetivo de determinar que el gen de CEMP1 induce la formación de hueso en dichos defectos.

La metodología empleada fue purificar el plásmido pcDNA40-CEMP1-6XHis de bacterias *E. coli BL21* hasta obtener 8.4 mg, lo que corresponde a 400µg para cada una de las ratas (la misma cantidad para el vector que no contenía el gen, el cual se utilizó como control). Se formaron 4 grupos 7 ratas por periodo de tiempo (4, 7 y 12 meses) a las cuales se les realizaron defectos de tamaño crítico (9 mm), donde al primer grupo solo se le realizó el defecto, al segundo grupo se le colocó únicamente gelfoam, al tercer grupo se le colocó gelfoam y el vector vacío, es decir no tenía el gen que codifica para la CEMP1, el cuarto grupo es el experimental, al cual se le colocó el plásmido embebido el gelfoam.

Al cumplimiento del tiempo establecido, se tomaron radiografías y microtomografías (μ CT) para evaluar la densidad ósea. Se realizaron cortes del área los cuales fueron teñidos con tricrómica de Masson y se evaluaron los cortes histológicos. Los resultados que se observaron en las imágenes del μ CT fueron zonas hiperdensas en el grupo experimental desde los 4 meses con respecto al control, observándose más homogéneas a los 12 meses. En los cortes histológicos se demostró que en los grupos controles presentaron tejido conectivo fibroso bien vascularizado en los diferentes periodos de tiempo. En contraste con el experimental en donde se observó la formación de líneas de crecimiento óseo, actividad osteoblástica y osteocitos en sus lagunas desde los 4 meses, además el área del defecto se encuentra completamente ocupada por tejido óseo. Con base a los resultados se puede concluir que CEMP1 induce regeneración ósea en calvarias de ratas *Wistar*, por lo cual tiene potencial terapéutico en la regeneración de tejidos mineralizados.

Abstract

The bone presents a potential of reparation through dynamic remodeling processes. However, some defects do not present spontaneous bone remodeling, needing repair factors.

Critical size defects in a calvarian rats is well established for the study of bone regeneration model, current treatment options for regenerating mineralized tissues, particularly bone, focusing on the use of osteoinductive growth factors, either using the direct administration of recombinants proteins and DNA plasmids. Cementum protein one (CEMP1) is a specific protein of cementum play a role as a local regulator of cementoblast differentiation and cementum-matrix mineralization. This protein was shown to be expressed by cementoblasts and progenitor cells localized in the periodontal ligamen transfection of CEMP1 into human gingival fibroblasts (HGF) induces mineralization and expression of bone and cementum-matrix proteins. The transfected HGF cells had higher alkaline phosphatase activity and proliferation rate and they expressed genes for alkaline phos- phatase, bone sialoprotein, osteocalcin, osteopontin, for this reason, the

hypothesis arises that by placing the CEMP1 gene in critical size defects will induces bone formation.

The methodology used was purify the plasmid pcDNA40 CEMP1 - 6XHis of E.coli BL21 to obtain 8.4 mg , corresponding to 400ug for each rat (the same amount for the vector not containing the gene, which was used as a control).

were formed 4 groups of 7 rats per period of time of 4, 7 and 12 months. Were performed which critical size defects of 9 mm, the first group have gelfoam disc containing plasmid, the second group was placed gelfoam + empty vector, the third only gelfoam and the fourth was left empty.

When the time was finished, were taken microtomography and cuts the area stained with masson trichrome. The results obtained in the microtomograph images were observed areas hyperdense in the experimental group from 4 months compared to the control group.

In histological sections in control groups was observed connective tissue in the different periods of time, in contrast with the experimental groups was observed the defect area fully occupied by bone tissue, was observed formation of growth lines bone, osteoblast activity and the osteocytes in their gaps for period to 4 and 7 months. Based on the results it can be concluded that CEMP1 induce bone regeneration in rat calvariae , thus has therapeutic potential in the regeneration of mineralized tissue.

1. Antecedentes

1.1 Periodonto

El periodonto se define como el conjunto de tejidos que soportan y rodean a los dientes, estos comprenden la encía, ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento radicular^{1,2}.

1.2 Encía:

Es una porción de mucosa oral que cubre los procesos alveolares y rodea a los cuellos de los dientes (epitelio de unión), al insertarse con las fibras colágenas (inserción conectiva) forma un sellado que protege al hueso y demás tejidos de soporte. El componente epitelial de la encía muestra variaciones morfológicas que son un reflejo de la adaptación de los tejidos para el diente y el hueso alveolar. Esto incluye el epitelio gingival oral, el epitelio sulcular y el epitelio de unión^{3,4}

Gracias a la cobertura de la superficie, el epitelio gingival realiza una protección muy importante en las funciones de defensa. Mientras que la encía oral y el epitelio sulcular oral es de gran medida en función protectora. El epitelio de unión sirve considerablemente en la regulación de la salud del tejido. El epitelio de unión no sólo forma el aparato de unión epitelial a la superficie del diente sino que también proporciona un vehículo para el movimiento bidireccional de sustancias entre la encía, tejido conectivo y la cavidad oral, además, juega un papel importante en la defensa del huésped contra la infección bacteriana⁴

1.3 Ligamento periodontal:

El ligamento periodontal, es el tejido conectivo blando especializado, el cual se encuentra interpuesto entre el cemento de las raíces de los dientes y la pared interna de la cavidad alveolar. Sus fibras forman una malla que se extiende entre el cemento y el hueso^{5,6}. Se extiende en anchura de 0.15 a 0.38 mm, con su porción más delgada alrededor del tercio medio de la raíz, que muestra una disminución progresiva en el espesor con la edad. Es un tejido conectivo en

particular bien adaptado a su función principal, el apoyo de los dientes en los alveolos correspondientes, al mismo tiempo lo que les permite soportar las fuerzas considerables de la masticación. Además, el ligamento periodontal tiene la capacidad de actuar como receptor sensorial necesario para el correcto posicionamiento de la mandíbula durante la masticación y, muy importante, es un depósito de células para la homeostasis del tejido y reparación / regeneración^{1,4}.

1.4 Hueso alveolar:

El proceso alveolar, es el hueso del maxilar y de la mandíbula que contiene los alvéolos de los dientes. Se compone de placas corticales externas (bucal , lingual y palatina) de hueso compacto, un tejido esponjoso en el centro, y el hueso de revestimiento del alveolo (hueso alveolar). La placa cortical y hueso que recubre los alvéolos se encuentran en la cresta alveolar. El hueso brinda un ajuste para las fibras del ligamento periodontal.

Las placas corticales se componen de capas superficiales (laminillas) de hueso fino apoyado por sistemas de Havers (la unidad anatómica y funcional del tejido óseo). Estas placas son más delgadas en el maxilar y más gruesas en la cara vestibular de los premolares y molares mandibulares. El hueso trabecular o esponjoso que ocupa la parte central del proceso alveolar también consta de hueso dispuesto en laminillas, con presencia de sistemas de Havers presentes en las trabéculas más grande^{1,7}.

1.5 Cemento radicular:

El cemento es el tejido mineralizado especializado que recubre las superficies radiculares y, ocasionalmente, pequeñas porciones de las coronas dentarias. Tiene muchos rasgos en común con el tejido óseo. Sin embargo el cemento no presenta vasos sanguíneos ni linfáticos, no posee inervación, no experimenta reabsorción ni remodelado fisiológico, pero se caracteriza por estar depositándose continuamente durante toda la vida. Como otros tejidos mineralizados, consta de fibras colágenas incluidas en una matriz orgánica. Su componente mineral principalmente hidroxapatita, es alrededor de 65% en peso, poco más que el hueso (60%). El cemento cumple distintas funciones. Se

insertan en él las fibras periodontales dirigidas a la raíz y contribuye al proceso de reparación consecutivo a un daño en la superficie radicular. Se conocen dos tipos distintos de cemento: 1. Cemento primario o cemento acelular, que se forma conjuntamente con la raíz y la erupción dentaria. 2. Cemento secundario o cemento celular, que se forma después de la erupción dentaria y en respuesta a las exigencias funcionales. Sin embargo, sobre la superficie radicular pueden alternarse zonas de cemento acelular y celular.

El cemento actúa como una barrera para delimitar el crecimiento epitelial que puede poner en peligro la unión al hueso alveolar, si no también la presencia de una capa de cemento continua es necesaria para actuar como barrera microbiana, ya que defectos en este tejido podrían resultar en la periodontitis^{4, 8}. Con base en los ejemplos de diferentes funciones atribuidas al cemento es evidente que se requiere un conocimiento profundo de las propiedades biológicas del cemento para determinar su papel en la formación del periodonto y por lo tanto la regeneración periodontal. Por otra parte, los principios atribuidos a la regeneración del cemento podría ser utilizado en la regeneración de otros tejidos.

1.6 Composición del cemento

El componente orgánico principal de cemento es la colágena tipo I en un 90%, la cual desempeña un papel estructural durante el proceso de biomineralización, ya que esta funciona como reservorio para la nucleación de hidroxiapatita¹⁰

Dentro de las proteínas no colagénicas se compone de glicosaminoglicanos, osteopontina, sialoproteína ósea, proteínas Gla, fosfatasa alcalina, proteínas específicas del cemento, las cuales son: factor de crecimiento derivado de cemento, proteína de adhesión del cemento (CAP) y la proteína del cemento 1 (CEMP1).

Glicosaminoglicanos

Los glicosaminoglicanos, también llamados mucopolisacaridos, son cadenas largas y no ramificadas de heteropolisacáridos. Compuestas generalmente por una unidad repetitiva de azúcar, ácido-amino, azúcar. El azúcar amino puede ser D-glucosamina o D-galactosamina, en el que el grupo amino está normalmente acetilado con el fin de eliminar su carga positiva, también puede llevar un grupo sulfato en el carbono 4 o 6 o en un nitrógeno no acetilado. El porcentaje de glicosaminoglicanos es alta en tejidos sometidos a fuerzas de compresión, como el cemento¹¹⁻¹³.

Los principales glicosaminoglicanos presentes en cemento humano, son el ácido hialurónico, dermatán sulfato y sulfato de condroitina, en el tejido conjuntivo gingival y ligamento periodontal predomina el dermatán sulfato^{14,15}. En general, el contenido de proteoglicanos de tejidos mineralizados es menor, ya que podrían reflejar diferencias en la función entre tejidos duros y blandos, debido a que los proteoglicanos parecen inhibir la mineralización de la colágena al ocupar lugares estratégicos normalmente destinados a ser llenados con hidroxapatita. En el hueso los proteoglicanos de dermatán sulfato son orientados en paralelo al eje de la fibra de colágena con proteoglicanos de sulfato de condroitina y ácido hialurónico, que ocupa la región interfibrilar en una capacidad de llenado de espacio¹⁶.

Entre otros glicosaminoglicanos presentes en el cemento, el queratán sulfato parece ser uno de los principales componentes que después de la digestión con queratanasa II y endo – beta - galactosidasa producen dos proteínas del núcleo: lumican y fibromodulina, estas proteínas se localizan predominantemente en el cemento no mineralizado, lo que sugiere que desempeñan importantes funciones de regulación durante la mineralización de cemento^{17,18}.

La distribución diferencial de los tejidos sugiere que pueden desempeñar distintas funciones durante el proceso de cementogénesis, además de regular la biomineralización del cemento¹⁹.

La osteoadherina, que es una queratina, también se asocia a la fase inicial de formación del cemento, desde células de la vaina epitelial de Hertwig²⁰.

Osteopontina y Sialoproteína Ósea

El cemento contiene proteínas no colágenas, entre ellas algunas fosfoproteínas como la osteopontina (OPN) y sialoproteína ósea (BSP). Estas proteínas juegan un papel importante en el llenado de espacios creados durante el montaje de colágena y la transmisión de la cohesión al tejido semejante al mineral, permitiendo la deposición de minerales se extienda a través de toda la malla de colágena^{21,22}. El papel propuesto para estas proteínas es de reguladores y nucleadores del crecimiento de cristales de hidroxiapatita. Se ha sugerido que la OPN y BSP son necesarios para la iniciación de la formación de cristales en las fibrillas altamente ordenadas de colágena de tipo I⁸. La OPN está presente en el ligamento periodontal en dientes maduros. Estas proteínas se mantienen unidas a la matriz de colágena y poseen propiedades de unión celular a través de sus secuencias arginina-glicina-ácido aspártico (Arg-Gly-Asp [RGD])²³. En el periodonto la OPN es expresada por las células en estrecho contacto con el cemento acelular, así como en cementocitos²⁴. También se ha sugerido que la OPN regula la migración celular, la diferenciación y la supervivencia a través de la interacción con la integrina $\alpha v \beta 3$ ²⁵. La BSP es una proteína que contiene secuencias RGD con propiedades de unión celular²⁶ y tiene una asociación espacial precisa con agregados minerales, se une fuertemente a la hidroxiapatita y actúa como nucleador específico y potente para la formación de cristales de hidroxiapatita *in vitro*²⁷. El cemento contiene BSP y durante la formación radicular es claramente localizada en las células que recubren la superficie de cemento. Se ha sugerido que esta proteína modula el proceso de cementogénesis: está implicada en el proceso de precementoblastos, quimioatracción, adhesión y diferenciación^{19,28,29}.

Proteínas Gla

La proteína de la matriz gamma carboxiglutámico (MGP) y la osteocalcina (OCN) son las dos principales proteínas Gla, las cuales están asociadas con tejidos duros calcificados^{2,30-33}. Ambas proteínas tienen una alta afinidad por Ca^{2+} e hidroxiapatita a través de la interacción con el residuo Gla. La distribución de OCN en el cuerpo de los mamíferos es bastante limitado a los tejidos

mineralizados, tales como hueso, dentina y cemento³⁴. En la raíz de los dientes, la expresión de OCN se localiza en las células que recubren el cemento celular y cemento acelular.

MGP es secretada por las células en la formación de cemento y se incorpora en el frente de mineralización³⁵. Una posible explicación para la acumulación de MGP en cemento acelular y la superficie exterior de cemento celular podría ser la de prevenir hipercalcificación de la superficie del cemento^{36,37}.

Se ha sugerido que tanto, OCN y MGP actúan como reguladores negativos de mineralización debido a los resultados en ratones con deficiencia de MGP, los cuales promueven la calcificación de las paredes aórticas y válvulas. Por lo tanto, OCN y MGP parecen regular la mineralización al actuar como reguladores negativos, pero en diferentes grados porque OCN también inhibe la conversión de brushita a la hidroxiapatita^{30,31,33}. Otras moléculas presentes en la matriz extracelular del cemento incluyen osteonectina (ONC), que durante la cementogénesis es sintetizada por los fibroblastos, cementoblastos y cementocitos³⁸. Basado en la observación de que ONC a bajas concentraciones retrasa el crecimiento del cristal de hidroxiapatita, se especula que ONC también actúa como un regulador negativo mediante la prevención en lugar de promover la mineralización de la matriz³⁹.

Fosfatasa Alcalina

La fosfatasa alcalina (ALP) juega un papel importante en la mineralización del esqueleto, esta es una enzima de glicoproteína unida a la membrana que hidroliza grupos fosfatos a pH alcalino⁴⁰. La ALP se expresa durante el desarrollo embrionario, mientras que se limita a huesos, riñones, hígado y linfocitos B durante la vida adulta. El hecho de que se expresa en tejidos no mineralizantes sugiere que tiene otras funciones además de los asociados con la mineralización. Se ha sugerido que la ALP puede regular el volumen de tejidos, la proliferación celular, la diferenciación y la maduración^{40,41}. La ALP es altamente expresada en las células del ligamento periodontal^{10,41-46}, donde se cree que desempeñan un papel en el metabolismo del fosfato y la formación de cemento¹⁰, particularmente cemento acelular^{47,48}. En ratones deficientes de la ALP muestran formación

defectuosa del cemento acelular que resultó en placas muy delgadas alrededor de las bases de las fibras del ligamento periodontal. No se observaron defectos en hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento celular, lo que sugiere que la ALP es esencial para la formación del cemento acelular⁴⁹. Una de las principales funciones de la ALP es la hidrólisis de pirofosfato (PPi), un potente inhibidor de la formación de hidroxiapatita⁵⁰, los cementoblastos son específicamente sensibles a los niveles de pirofosfato/ fosfato (PPi/Pi) dentro de la matriz extracelular⁵¹, los cambios en el nivel de la proteína ALP pueden tener un efecto significativo sobre la función de los osteoblastos y, por consiguiente mineralización de la matriz, lo que indica que la ALP desempeña papeles biológicos clave en la mineralización del hueso y el cemento⁵².

1.7 Proteínas específicas del cemento.

Factor de crecimiento derivado de cemento

Los tejidos mineralizados como el hueso y la dentina son excelentes reservorios de factores de crecimiento que, cuando sea necesario, pueden ser liberados por la desmineralización y sirven para reparar o regenerar tejidos. De una manera similar, se ha demostrado que los extractos de cemento tienen la capacidad de promover diversas actividades biológicas como la migración celular, la adhesión, la actividad mitogénica y la diferenciación que son esenciales para la regeneración periodontal^{53,54}. El factor de crecimiento derivado de cemento (CGF) actúa de forma sinérgica con el factor de crecimiento epidermal (EGF), e induce muchas de las vías de señalización asociadas con la mitogénesis⁵⁵. Estas vías incluyen aumento de Ca²⁺ en concentración citosólica, activación de la cascada y la expresión de protooncogenes celulares de la proteína cinasa C. Además el CGF puede promover la migración y el crecimiento de las células progenitoras presentes en las estructuras adyacentes hacia la matriz de dentina y participar en su diferenciación en cementoblastos^{56,57}.

La presencia de el CGF y otros factores de crecimiento en el cemento indican que el cemento tiene el potencial para regular el metabolismo y la rotación de los tejidos circundantes. El cemento podría servir como sitio de almacenamiento de

estas moléculas y es probable que sean una opción biológica posible para promover la regeneración periodontal^{53,57}.

Proteína de adhesión del cemento (CAP)

La proteína CAP se aisló de cemento Humano y bovino⁵⁸, se localiza en cementoblastos, cementocitos, células paravasculares de hueso alveolar. La CAP está involucrada en procesos de adhesión, migración, mineralización⁵⁹.

El gen de la CAP se localiza en el cromosoma 10p13-p14 y tiene 6 exones. El gen codifica para dos isoformas de 288 y 140 aminoácidos, respectivamente.

El RNA mensajero que codifica para la proteína de 140 aminoácidos se denomina CAP/PTPLA y contiene los exones 1 y 3 de los 6 del gen. El DNAc está conformado por 1435 pb.

La proteína CAP tiene un peso molecular de 14.920 kDa. Los análisis *in Silico* indican que su carga eléctrica es neutra (pI 7.78), así mismo, refieren que es una proteína hidrofóbica y que su localización es citoplasmática en un 94.19% debido a la carencia de péptido señal. También estos análisis sugieren la existencia de modificaciones postraduccionales, particularmente, fosforilaciones.

Proteína del cemento 1 (CEMP1)

La proteína CEMP1, fue aislada a partir de una biblioteca derivada de cementoblastos putativos (células derivadas de un cementoblastoma humano) cultivados *in vitro*⁶⁰. El gen se encuentra localizado en el cromosoma 16, en el brazo corto, en la región 13.3 (Gene Bank AC093525.3), contiene un exón y está formado por 1374 pares de bases (pb) con un marco de lectura abierto de 744 pb que codifican para una proteína de 247 aminoácidos (Fig. 1), los cuales son principalmente prolina (11.3 %), glicina (10.5 %), alanina (10.1 %), serina (8.9 %), leucina (8.1 %), treonina y arginina (7.7 %), contiene bajos niveles de triptófano, ácido aspártico, isoleucina (20 %) y fenilalanina (1.6 %), no presenta residuos de tirosina. Se calcula con un peso molecular de 26 kDa. Teóricamente es una proteína alcalina (pI 9.73). Análisis predictivos de modificaciones postraduccionales (ExpASy) revelan que el gen de CEMP1 contiene sitios de N–

La expresión tanto a nivel de RNAm como de proteína *in vitro* se limita a una subpoblación de células derivadas del ligamento periodontal; en cortes histológicos de tejidos periodontales humanos, su expresión y localización se restringe a cementoblastos, cementocitos, células progenitoras localizadas en zonas para vasculares del ligamento periodontal y espacios endósateles del hueso alveolar (Fig. 2 A). No se detectó el RNAm ni la proteína en diferentes tejidos humanos tales como cerebro, placenta, musculo esquelético, corazón, riñón, hígado, páncreas, pulmón, bazo y colon⁶⁰.

Esta proteína presenta una movilidad relativa de 56,000 Da, esta movilidad esta relacionada con el grado de fosforilaciones, glicosilaciones y miristilaciones⁶⁰.

Se refieren que esta proteína esta formada principalmente por β -plegada (55%), asas (35%) y α -hélice (10%)⁶¹.

La proteína CEMP1 es fundamental para la síntesis de cristales de fosfato octacálcico en un sistema libre de células, ya que forma esférulas por múltiples placas que tienen su origen en un núcleo en común. Dadas las características de crecimiento de los cristales se puede determinar que esta proteína es responsable de la nucleación y regulación del crecimiento de cristales de fosfato octacálcico en sistema de contra difusión en gel de silicato⁶² (Fig. 2 B).

Al transfectar el gen que codifica para la proteína CEMP1 en células de origen no esquelético como son los fibroblastos gingivales humanos (FGH), estos adoptan un fenotipo mineralizante ya que tienen la capacidad de inducir la formación de nódulos mineralizados (Fig. 2 C), además de expresar moléculas involucradas en el proceso de mineralización como son fosfatasa alcalina, sialoproteína ósea, osteocalcina y osteopontina. Estos resultados sugieren que la CEMP1 podría tener una función potencial en la formación de cemento y hueso²⁶.

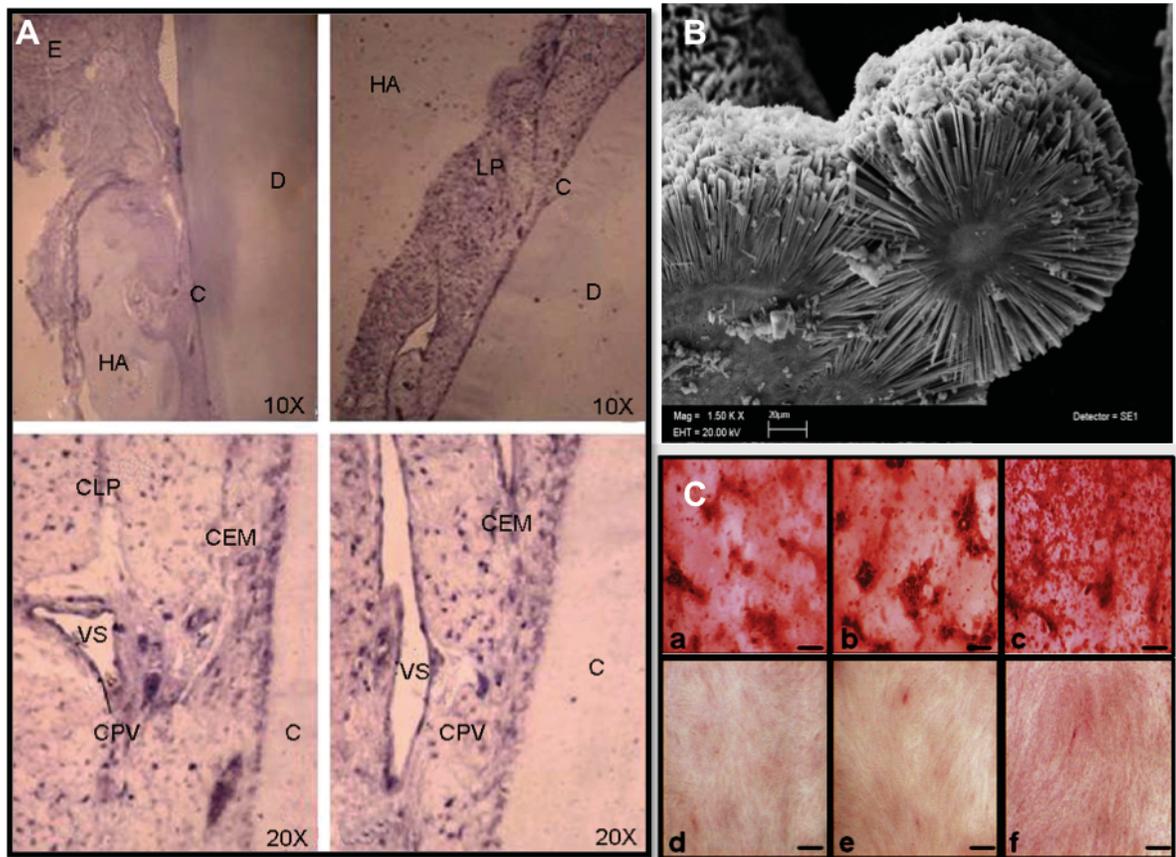


Fig. 2 **A)** Hibridación in situ de CEMP1 en estructuras periodontales de humanos adultos, se observa una señal intensa en células que recubren la superficie de cemento (C). El RNAm de CEMP 1 se distribuye homogéneamente en las células del ligamento periodontal (LP), se observa señal intensa en células paravasculares (CPV), cementoblastos (CEM) y subpoblaciones de células en el ligamento periodontal (LP), en un grupo de células en torno a un vaso sanguíneo (VS)⁶⁰. **B)** CEMP1 es nucleadora y reguladora de cristales de fosfato octacalcio, precursor de la hidroxiapatita, en un sistema libre de células, en esta imagen se muestran tres esférulas divididas a la mitad, demostrando que estos cristales tienen su origen a partir de un núcleo, sobre el cual crecen cristales hexagonales alargados⁶². **C)** El gen de CEMP1 al ser transfectado a fibroblastos gingivales humanos, promueve la formación de nodulos de calcio insolubles, los cuales están teñidos con alizarina roja, (a,b,c), contrastando en la parte correspondiente a; d, e, f, los cuales son fibroblastos gingivales humanos transfectados con el vector vacío, donde no se observa la presencia de estos nodulos²⁶.

Los estudios sobre la regeneración de cemento, utilizando un modelo animal, en el cual evaluaron dientes de perros con necrosis pupar, demostraron la capacidad de la CEMP1 para reclutar células madre mesenquimales del ligamento periodontal, y para promover la proliferación y la mineralización de estas células. En los estudios *in vivo* co-localizando la CEMP1 y células STRO-1-positivos (marcador de células mesenquimales) adyacentes a las áreas de superficie de la raíz, donde se deposita nuevo cemento, esto indica que las células responsables de la deposición de cemento reparativa son de origen mesenquimal⁶³.

La CEMP1 juega un papel importante durante el proceso de diferenciación y mineralización de cementoblastos humanos, mediado por la vía de las proteínas cinasas activadora de mitógeno (MAPK por sus siglas en inglés)⁶⁴.

A manera de resumen la proteína CEMP1 es una proteína única que tiene varias propiedades como inductora de la mineralización, proliferación, diferenciación y adhesión celular. La CEMP1 podría servir para regular las células madre mesenquimales presentes en ligamento periodontal e inducir su diferenciación en diversos caminos. Estas propiedades abren las posibilidades de crear nuevas terapias basadas en la regeneración periodontal.

2 Terapias de regeneración

El termino regeneración se aplica cuando hay restitución de partes destruidas del organismo, por otras iguales o similares, se tiende a preservar el plan de organización normal del organismo, siendo este un fenómeno regulado. La restitución de células y tejidos se realiza a partir de elementos de la misma estirpe, cuando más elevado es el organismo en la escala biológica es menor la capacidad regenerativa⁶⁵, de ahí el auge del estudio de nuevas estrategias moleculares para la regeneración periodontal, ya que a la fecha las terapias empleadas dan como resultado procesos de reparación (sustitución de partes del organismo por una cicatriz de tejido conectivo fibroso denso)⁶⁵ y no tanto de regeneración.

Entre las terapias estudiadas para tratamientos regenerativos se encuentran los factores de crecimiento como el derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento insulínico (IGF)^{29,44}, factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1)⁶⁶, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF)⁶⁷, las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs)⁶⁸ y proteínas de matriz del esmalte porcino (EMDOGAIN®)⁶⁹. Se cree que estas moléculas se producen durante la formación del cemento y se almacenan en la matriz de dicho tejido para inducir la regeneración del ligamento periodontal cuando sea necesario⁷⁰. Sin embargo, uno de los problemas de aplicación de estos factores es la pérdida de ellos cuando son aplicados vía tópica⁵.

2.1 Terapia génica

Se denomina terapia génica a la transferencia de material genético en células humanas para tratar una enfermedad, difiere de la terapia farmacológica en que se busca corregir permanentemente un defecto genotípicamente asociado a la enfermedad, en lugar de simplemente tratar a la expresión fenotípica, debido a la posibilidad de tratar enfermedades por medio de la inserción de genes en células y tejidos humanos, se desarrolló así la terapia génica, esta técnica se propuso como la terapia del siglo 21⁷¹ con el primer ensayo clínico reportado por Anderson a principios de 1990, desde entonces se han realizado diferentes protocolos para diversos trastornos y se han obtenido resultados prometedores⁷². Dado que se transfectan las células somáticas y no las células germinales, la terapia génica afecta al paciente y no a su descendencia⁷³.

La terapia génica se basa en el método por el cual el material genético entra a las células generalmente por un vector. Los vectores se dividen en dos clases principales: los vectores virales, que comprenden ya sea de DNA y RNA unido en un complejo de lípidos o proteínas y vectores no virales DNA solo (DNA desnudo) administrado generalmente por métodos físicos⁷⁴⁻⁷⁹. Cada vector tiene una variedad de usos potenciales con ventajas y desventajas como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1 Sistema de vectores, para la transferencia de genes⁷³⁻⁷⁹

Vector	Ventajas	Desventajas
Adenovirus	<ul style="list-style-type: none"> *Altos títulos 10^{12} unidades formadoras de plaquetas/ml. *Alta eficiencia de transducción <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i>. *Se transduce a diferentes tipos celulares. *Transduce células en división y no división. *Fácil producción. 	<ul style="list-style-type: none"> *Remanentes episomales. *Expresión transitoria. *Requiere líneas celulares de empaquetamiento. *Toxicidad relacionada con la respuesta inmune *Administración repetida *Competencia para potencial de replicación *No focalización *Tamaño de inserto limitado de 4-5 kb
Adeno-asociado virus	<ul style="list-style-type: none"> *La integración en el cromosoma 19 humano (de tipo silvestre solamente), se establece infección latente. *Expresión prolongada *Transducción no requiere división celular. 	<ul style="list-style-type: none"> *No esta bien caracterizado. *No focalizado. *Requiere de línea celular de empaquetamiento. *Potencial mutagénico *Altos títulos, sin embargo es muy difícil su producción. *Tamaño de inserto limitado: 5 kb
Virus del herpes simple	<ul style="list-style-type: none"> *Tamaño del inserto largo: 40-50 kb. *Tropismo neuronal. * Expresión latente. Eficiente transducción <i>in vivo</i>. *Disponibles vectores de replicación. 	<ul style="list-style-type: none"> *Citotóxico. *No focalización. *Requiere línea celular de empaquetamiento. *La expresión es transitoria. *No se integra en el genoma.
Lentivirus	<ul style="list-style-type: none"> *Transduce células en división y no división. Transduce células madre hematopoyéticas *Expresión prolongada 	<ul style="list-style-type: none"> *Las preocupaciones de seguridad: origen del virus de inmunodeficiencia humana. *Difíciles de fabricar y almacenar. *Tamaño de inserto limitado: 8 kb. *Inexperiencia clínica.
Retrovirus	<ul style="list-style-type: none"> *Se integra al genoma celular. *Amplio tropismo celular *La expresión es estable y prolongada *Requiere de división celular para la transducción. 	<ul style="list-style-type: none"> *Transducción ineficiente *Mutagénico *Requiere la división celular para la transfección *Requiere línea celular de empaquetamiento * No focalización

	<ul style="list-style-type: none"> *Mayor tamaño del inserto: 9-12 kb. 	<ul style="list-style-type: none"> * Competencia para la replicación.
Vaccinia virus (viruela)	<ul style="list-style-type: none"> *Tamaño del inserto: >25 kb. *Se transduce en células en división y no división. *Alto nivel de expresión. *Producción relativamente fácil y estable. *Amplio tropismo celular. 	<ul style="list-style-type: none"> *Toxicidad relacionada con la respuesta inmune. *La expresión transitoria. *No se integra en el genoma.
Liposomas DNA	<ul style="list-style-type: none"> *No inmunogénico. *Buen perfil de seguridad *Completamente sintética *Tamaño del inserto ilimitado. *Transfección eficiente ex vivo. *Relativamente simple de fabricar, almacenar y controlar su calidad. 	<ul style="list-style-type: none"> *Transfección ineficiente. * Difícil orientación *Experiencia clínica limitada.
Proteínas conjugadas a DNA	<ul style="list-style-type: none"> *Tamaño de inserto ilimitado. *Orientación a células específicas. *Relativamente simple de fabricar, almacenar y controlar su calidad. *Flexible en el diseño. *Transfección eficiente ex vivo. *Baja inmunogenicidad. *Buen perfil de seguridad. 	<ul style="list-style-type: none"> *Expresión transitoria. *Transfección ineficiente in vivo. *Remanentes episomales. *Experiencia clínica limitada. *Inestable <i>in vivo</i>.
DNA desnudo	<ul style="list-style-type: none"> *Tamaño de inserto ilimitado. *Relativamente simple de fabricar, almacenar y controlar su calidad. *Muy baja inmunogenicidad. *Eficacia clínica demostrada. *Buen perfil de seguridad. 	<ul style="list-style-type: none"> *Muy corta duración de la expresión en la mayoría de los tejidos. *Restos episomales. *Transfección muy ineficiente <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i>.

2.2 DNA desnudo

La técnica de terapia génica de DNA desnudo, es el método más simple empleado, una gran desventaja es que muestra muy poca difusión y transfección en sitios distantes, sin embargo se puede volver a administrarse varias veces en mamíferos (incluidos los primates) sin la inducción de la respuesta inmune, (es decir, no hay anticuerpos anti-DNA generado)⁸⁰. Independientemente de su tamaño, las moléculas de DNA desnudo son difíciles de transfectar en células tanto *in vivo* e *in vitro* debido a una serie de obstáculos relacionados con casi todos los aspectos de la biología celular. Estas barreras incluyen la degradación por nucleasas presentes en la sangre, la matriz extracelular, membrana plasmática, la transformación de los endosomas a lisosomas digestivos tras la endocitosis y la envoltura nuclear⁸¹. Varios métodos físicos han sido empleados para facilitar la transferencia de DNA desnudo en células con eficiencias que en algunos casos se asemejan a los de los métodos virales.

La inyección directa de un plásmido que contiene el gen de interés tiene algunos ventajas sobre los sistemas de transferencia de genes mediada por virus. En primer lugar, la preparación de DNA es simple y se puede realizar a un costo relativamente bajo. Además, los problemas de seguridad son mucho más bajos y se pueden transferir grandes cantidades de DNA. Sin embargo, la principal limitación de este método es que se requiere una administración local y el nivel de expresión de los transgenes es relativamente bajo y restringido al sitio de inyección⁸².

En la práctica, la entrada de DNA exógeno desnudo al núcleo celular resulta problemático debido a los diferentes obstáculos extra e intracelulares. Por una parte, la circulación sistémica de DNA se ve obstaculizada por la degradación de nucleasas y una vez en el interior de las células también se encuentra con diferentes obstáculos para llegar al núcleo, ya que la movilidad del DNA libre se basa en la difusión en el citoplasma una vez dentro de las células debe de escapar del compartimiento endosomal y liberar el DNA en el citoplasma, donde su movilidad es baja, posiblemente debido a elementos del citoesqueleto que funcionan como tamices moleculares y así evitar la difusión de moléculas

grandes, finalmente, el DNA debe de translocarse al núcleo de la célula, pasando por la doble membrana nuclear y sus poros, ya que se debe de formar un complejo del poro nuclear, el cual esta compuesto por más de 50 proteínas diferentes. El complejo del poro reconocerá proteínas unidas a intervalos cortos (normalmente 4-8 aminoácidos) o bien señales de localización nuclear como la secuencia de SV40 que tienen algunos vectores, posteriormente transcribirse a RNAm y finalmente traducir el producto a proteína⁸¹.

3. Justificación y planteamiento del problema

El hueso presenta un potencial de reparación muy elevado a través de procesos dinámicos de remodelación que envuelve la neoformación y la reabsorción ósea, caracterizando la casi total ausencia de cicatriz. A pesar de ello, algunos defectos óseos no presentan remodelación espontánea, necesitando factores que estimulen la reparación. La velocidad de reparación del hueso es inferior a la de otros tejidos, motivo por el cual también en algunos casos es necesario la utilización de materiales de reconstrucción ósea que actúen como injertos y auxilien el proceso de reparación ósea.

Los defectos de tamaño crítico en calvarias de rata es un modelo bien establecido para el estudio de la regeneración ósea, ya que estos defectos no se regeneran espontáneamente con hueso, en vez, forman una cicatriz de tejido conectivo fibroso, el cual ocupa la mayor parte del área de dicho defecto, con la formación de tejido óseo limitado a los márgenes, por tal motivo, se necesitan de factores que ayuden en este proceso. Sin embargo, hoy en día, no hay un material que ofrezca una predictibilidad del 100%.

Las alternativas terapéuticas actuales para la regeneración de tejidos mineralizados, particularmente hueso, se enfocan en el uso de factores de crecimiento osteoinductivos, ya sea utilizando la liberación directa de proteína/s recombinante/s y alternativas basadas en plásmidos de DNA. Por tal motivo en este trabajo nos proponemos a utilizar un vector que contiene el gen de la proteína CEMP1, la cual esta involucrada en procesos de adhesión,

diferenciación y mineralización, esperando que defectos de tamaño crítica sean regenerados.

4. Hipótesis

El gen de CEMP1 induce la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico en calvarias de ratas Wistar.

5. Objetivos

Objetivo general

Determinar la formación de tejido óseo que se produce al colocar el gen de CEMP1 en defectos de tamaño crítico en calvarias de ratas *Wistar*.

Objetivos específicos

*Determinar radiográficamente las zonas radiolúcidas y/o radiopacas de las muestras tanto controles como experimentales en calvarias de ratas *Wistar* posterior a los tiempos establecidos (4, 7 y 12 meses).

*Valorar histológicamente la formación y tipo de tejido tanto en los bordes como en el área del defecto de tamaño crítico de las calvarias de ratas *Wistar*.

*Cuantificar la cantidad de tejido formado en la zona del defecto en las calvarias de ratas *Wistar*, por medio de imágenes de microtomografía computarizada (μ CT).

*Evaluar la densidad de tejido óseo neoformado en los defectos de tamaño crítico en calvarias de ratas *Wistar*, mediante imágenes digitales de μ CT.

6. Metodología.

Construcción del vector:

La región codificante del gen de CEMP1 (Gene Bank N° de acceso NM_001048212) se subclonó en el vector pENTR/SD/D (Invitrogen, Carlsbad, CA). La construcción resultante pENTR/SD/D-CEMP1 DNAc se ligó a el vector pcDNA40 (+), lo que dio como resultado la construcción del vector de expresión pcDNA40-CEMP1 (+) con una terminal 6XHis tag-COOH (Invitrogen, Carlsbad, CA). Con el plásmido resultante se transformaron bacterias *E. coli* BL21, utilizando lipofectamina 2000 de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las bacterias controles, se transformaron con el vector pcDNA40 (+) vacío. Se realizó la selección de bacterias que sobre-expresen el gen y su producto, manteniendo a las bacterias transformadas en el medio LB para evaluar la expresión estable de CEMP1.

Una vez que se obtuvo la construcción del vector de expresión pcDNA40-CEMP1-6XHis, se prepararon 4 litros de medio Luria-Bertani (LB) dividiéndolos en 8 matraces de 250 ml cada uno, posteriormente se esterilizan por calor húmedo durante 14 minutos, al finalizar se tempera el medio y se agrega 5 ml de ampicilina a una concentración de 200 mg/ml, este se agrega por litro de medio y por ultimo se coloca la bacteria transformada para su crecimiento en una incubadora a 37°C con agitación constante durante 12 horas.

Cuando se cumplió el tiempo de incubación, se concentraron las bacterias en 7 tubos de 50 ml cada uno a 7500 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 min, se desechó el sobrenadante y los tubos se guardaron a -20°C hasta el momento de su purificación.

Purificación de plásmido:

El proceso de purificación de plásmido se realizó por la técnica de lisis alcalina, la cual se basa en la fragmentación lineal que ocurre durante la lisis celular del DNA genómico. Al incrementar su pH cerca de 12, pueden eliminarse los puentes de hidrogeno y separarse cada una de las cadenas del ADN. Los plásmidos son resistentes y no se alteran por lisis celular, permaneciendo como DNA bacteriano circular súper enrollado. Cuando el pH es reducido, las uniones entre las cadenas en el plásmido se remueven y entran en un estado más relajado. Sin embargo, los fragmentos lineales de DNA genómico no tienden a renaturalizarse, por lo que pueden agregarse en una malla insoluble que se remueve por centrifugación, mientras que los plásmidos permanecen en solución.

Este método explota las diferencias en las propiedades de desnaturalización y renaturalización entre el DNA plásmidico y el DNA cromosómico, alcalinización con Hidróxido de sodio (NaOH) en presencia de un detergente fuertemente aniónico, el dodecilsulfato sódico (SDS) el cual provoca la lisis celular, la desnaturalización del DNA cromosómico y de las proteínas, así como la liberación de los plásmidos.

Los plásmidos se ven menos afectados por su pequeño tamaño y estructura súper enrollada. La neutralización del medio en presencia de una concentración alta de sal (acetato de potasio), provoca la precipitación de las proteínas (por el tratamiento con el detergente y la insolubilidad de la sal potásica del duodecil sulfato) y la del DNA cromosómico (por reacciones aleatorias intracatenarias).

Los agregados insolubles de proteínas y DNA cromosómico se separan por centrifugación del DNA plasmídico que queda en el sobrenadante y conserva mayoritariamente su estructura nativa.

Preparación de los discos:

Los andamios donde se colocó el vector que contiene el gen de CEMP1, se cortaron de un bloque de esponja de gelatina (Gelfoam 70 x 50 x 10 mm). Para mantener su esterilidad se prepararon en una campana de flujo laminar, ahí se marcaron y cortaron con sacabocado de 9 mm de diámetro (tamaño del defecto). En total se cortaron 63 discos los cuales se dividieron en tres grupos y se colocaron en tres cajas de Petri (23 discos por caja).

En el primer grupo se agregaron 400 µg del plásmido, en cada uno de los discos (8.4 mg en total), en el segundo grupo se colocaron 400 µg de el vector pcDNA40 vacío en cada uno de los disco (8.4 mg en total) y el último grupo no se le colocó nada.

Los discos que contenían el plásmido y el vector vacío se metieron al vacum para desecarlos.

Procedimiento quirúrgico:

Para cumplir con los objetivos, se utilizaron 84 ratas macho, cepa *Wistar* de 18 semanas y 250 g de peso. Dichas ratas se dividieron aleatoriamente en doce grupos siguiendo los parámetros de la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO1999; la cual describe las especificaciones técnicas, cuidados y uso de los animales de laboratorio. Además de los procedimientos establecidos por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la UNAM. En la tabla 2 se describe cada uno de los grupos, los cuales son tres controles y un experimental.

Grupo	Abreviatura	Tiempo	Número de animales	Descripción
Control vacío	CV	4, 7 y 12 meses	7 ratas <i>Wistar</i>	El aspecto intracraneal de cada defecto no fue rellenado con ningún material, es decir solo se realizó el defecto. El aspecto extracraneal fue cubierto con satín.
Control con gelfoam	CG			El aspecto intracraneal de cada defecto fue rellenado únicamente con gelfoam. El aspecto extracraneal fue cubierto con satín.
Control con el vector vacío	CV			El aspecto intracraneal de cada defecto fue rellenado con 400 µg del vector vacío (el vector sin el gen de la CEMP1) embebido en gelfoam. El aspecto extracraneal fue cubierto con satín.
Experimental plásmido pcDNA40-CEMP1	P			El aspecto intracraneal de cada defecto fue rellenado con 400 µg del plásmido (el cual contiene el gen de CEMP1) embebido en gelfoam. El aspecto extracraneal fue cubierto con satín.

Tabla 2 Los primeros 3 grupos son los controles y el último es el grupo experimental

Las ratas fueron sedadas y tranquilizadas con Ketamina (80 mg/Kg) y Xilacina (10mg/Kg), ambas por vía intramuscular. Se rasuró la zona quirúrgica y se realizó antisepsia de rutina con yodopovidona. Se aplicó anestésico la zona quirúrgica con mepivacaína con epinefrina, a continuación se realizó una incisión lineal de 3 cm a través de la piel y el periostio de la calota hasta exponer el vértice craneal. Para la realización del defecto de tamaño crítico, se utilizó una trefina con un diámetro de 9 mm (tamaño del defecto), montado en un motor para implantes a 4,000 rpm. El defecto se delimitó con dicha trefina en la porción media del hueso frontal, irrigando con una solución amortiguadora de fosfatos estéril (PBS), posteriormente con un cincel se realizó el clivaje del fragmento óseo con sumo cuidado de no dañar la duramadre (Fig. 3). Finalmente se lavó la zona con PBS estéril para remover detritos, los animales fueron aleatoriamente asignados a cada una de las diferentes condiciones en los doce grupos.

El sitio quirúrgico fue cerrado con sutura continua de ácido poliglicólico 4-0. Después de la cirugía, durante 10 días, se aplicó Brosin (Neomicina sulfato 114.5mg, Tetraciclina Clorhidrato 105.0mg, Prednisolona acetato 12.5mg y Vitamina A 100,000 U.I., Excipiente, c. b. p. 25g. Brovel, S.A. de C.V. México). El periodo de cicatrización fue de 15 días. Se realizó un seguimiento clínico posquirúrgico, valorándose una serie de parámetros: estado general del animal, aspecto de la herida y de la zona intervenida, sangrado, exudado o colecciones o extrusión de los biomateriales.

Las ratas fueron alimentadas con rodent diet 5001 *ad libitum*.

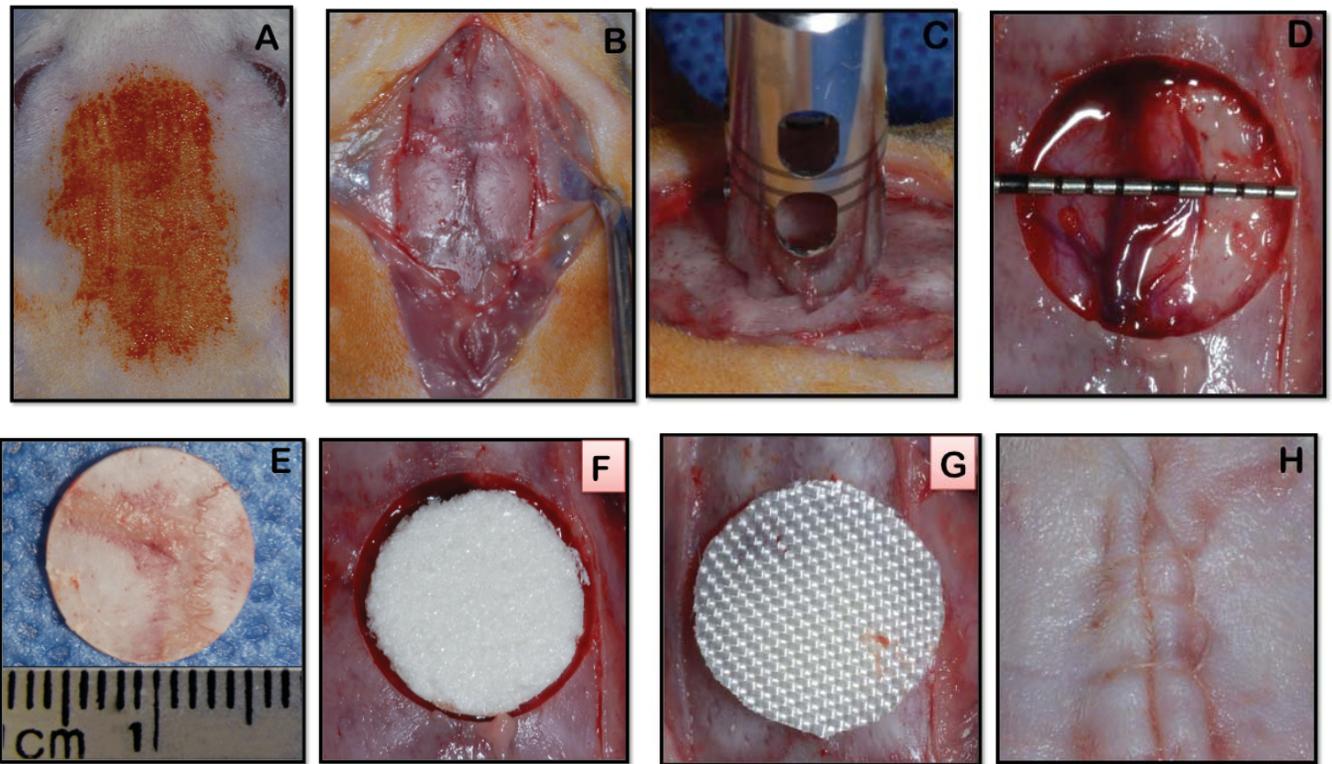


Fig. 3 Procedimiento quirúrgico. **A)** Se rasuró la zona y se realizó antisepsia. **B)** Se realizó una incisión lineal y se desbridó hasta exponer el vértice craneal. **C)** Con un trefina de 9mm de diámetro se marcó el borde del defecto y se efectuó el clivaje óseo. **D)** Aspecto del defecto **E)** Bloque de hueso retirado que dio origen al defecto. **F)** Colocación del gelfoam donde se embebió el plásmido. **G)** Satén hemostático sobre el defecto. **H)** Se suturó los bordes con ácido poliglicólico de 4-0 y se colocó tópicamente antibiótico y antiinflamatorio.

Sacrificio de los animales:

Al finalizar el tiempo establecido para cada uno de los grupos (4, 7 y 12 meses), los animales se sacrificaron mediante sobredosis de cloroformo hasta llegar al paro cardiorrespiratorio. Posteriormente en la calota se realizó osteotomía de la zona del defecto, la cual se realizó con pieza de baja rotación e irrigación constante con agua corriente. Se tuvo máximo cuidado de cortar la periferia del defecto con un margen de seguridad de 10 mm en toda la periferia del defecto. Se lavó cuidadosamente la muestra y se colocó en paraformaldehído al 10% durante 24 horas para su fijación.

Radiografías y microtomografías

Después de fijar las muestras, se lavaron con agua corriente para quitar el exceso de paraformaldehído. Posteriormente a cada uno de las especímenes se les tomo radiografías con un aparato Corix, empleando una película radiográfica periapical de Kodak, la distancia del tubo con respecto a la muestra fue de 7 cm de distancia, utilizando un tiempo de exposición corto a 30 mA. Finalmente se marcan de manera individual y se almacenaron nuevamente en paraformaldehído al 10%.

La toma de microtomografías se realizó en un μ PET, μ SPECT, μ CT (Albira) en el Instituto Nacional de Cancerología. Se utilizó una fuente de rayos X de 35 micras (tamaño nominal de punto), 50 kVp máx, 1 mA máx, CT- Good HD-LV, con un offset de 158 mm. La reconstrucción 3D se realizó a máxima intensidad de proyecciones con el software del aparato.

Proceso histológico

Una vez fijadas las muestras, se lavaron con agua corriente durante 2 horas y se colocaron en una solución de EDTA al 10% durante 4 semanas para su descalcificación. Al finalizar el tiempo se deshidrataron, se clarificaron en xileno y se embebieron en parafina para la realización de cortes de 5 μ m de grosor, las cuales fueron teñidas con tricrómica de Masson para el análisis histomorfológico mediante microscopía óptica utilizando un microscopio Carl Zeiss, Alemania.

Se tomaron fotomicrografías de los cortes histológicos con el fin de analizar las zonas correspondientes a los bordes del defecto, se observó los patrones de regeneración ósea, la presencia de reacción inflamatoria, tejido conectivo, osteocitos, osteonas, conductos de Havers, frentes de mineralización, osteoblastos, vascularización, osteoclastos y matriz osteoide.

Análisis estadístico

La determinación de la cantidad de tejido óseo así como la densidad del tejido neoformado, se evaluó mediante las imágenes tomadas con el microtomógrafo (μ CT). Las imágenes se analizaron con el programa Image J, donde se efectuaron tres mediciones por muestra en la zona del defecto y de la misma manera en el hueso propio de la rata para comparar ambas densidades. Los datos resultantes se introdujeron al programa estadístico GraphPad donde se realizó la prueba de análisis de varianza.

7. Resultados

En general, se pudo comprobar que los animales toleraron el procedimiento quirúrgico sin complicaciones. El andamio de gelfoam que contenía el plásmido y el vector vacío fue considerado biocompatible y de buena tolerancia desde el punto de vista clínico e histológico, ya que no tuvieron problemas en relación a su comportamiento biológico.

Hallazgos radiográficos:

La figura 4 muestra las radiografías de todos los grupos a los diferentes periodos de tiempo. Al evaluar las radiografías de cada una de las muestras se determinó que en todos los grupos controles a los 4 y 7 meses se observaron los bordes del defecto de manera radiopaca, estos se distinguen de modo irregular.

Continuando con los grupos control, a los 12 meses, se observaron cúmulos radiopacos en la zona del defecto, mezclados con zonas radiolúcidas.

En las radiografías correspondientes al grupo experimental a los 4 meses se observó los bordes y aglomeraciones en el centro del defecto de una manera radiopaca con una densidad variable. Estas aglomeraciones se observaron más densas en las radiografías correspondientes a lo 7 meses. A los 12 meses en la zona que corresponde al defecto se encontró una región radiopaca más homogénea que incluso se fusiona con los bordes del defecto. Esto da la apariencia de tejido mineralizado.

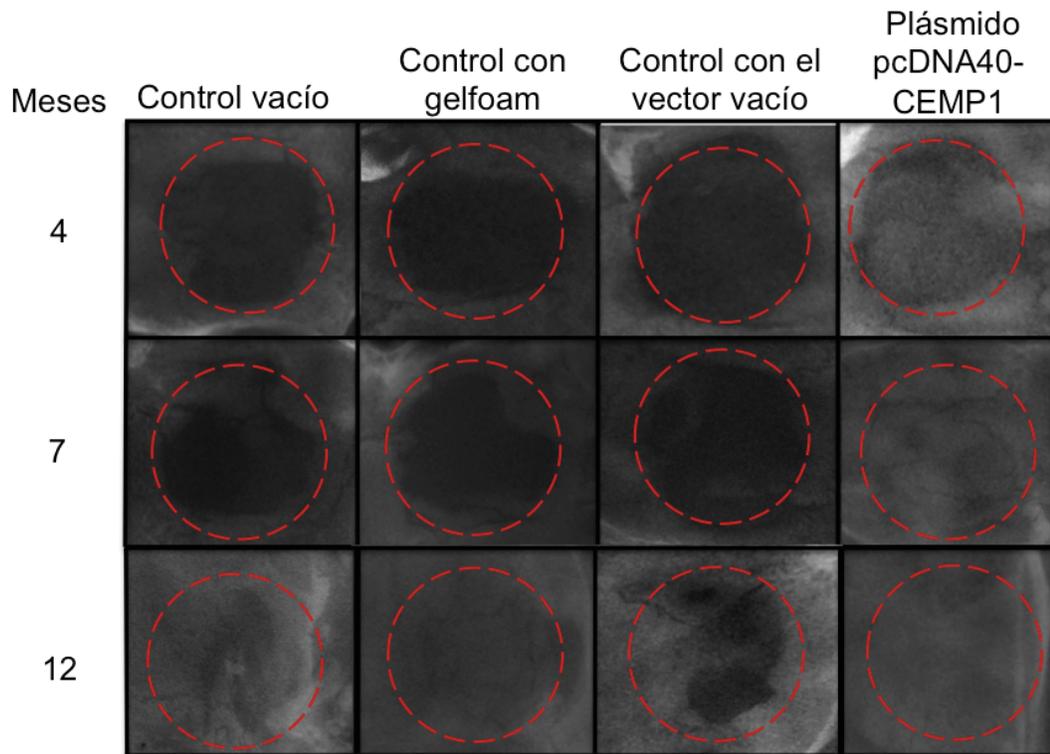


Fig. 4. Radiografías de los grupos controles y experimentales en los diferentes periodos de tiempo.

Imágenes de microtomografía computarizada (μ CT) a los 4 meses

En la figura 5 se observa la representación gráfica en máxima intensidad de proyecciones de un estudio de micro tomografía axial computarizada (μ CT), de la calota de ratas *Wistar*, la imagen consta de 500 proyecciones reconstituidas en una matriz de 528 x 528 pixeles con un valor nominal de 20 micras por pixel. En la imagen inicial se puede distinguir perfectamente un corte coronal donde se observa la convexidad (imagen antero-posterior) y la concavidad (imagen postero-anterior) de la calvaria de rata, en esta se puede observar un defecto en el hemisferio izquierdo de bordes regulares bien definidos, que abarca desde el borde anterior en la sutura fronto-parietal hasta su borde posterior en la sutura parieto-occipital, su margen medial en la sutura sagital y su margen lateral en el borde de la sutura escamosa. Todos los cortes que se presentan en dicha imagen tienen las mismas características.

En los grupos controles se observa una imagen radiopaca en el hemisferio izquierdo que corresponde a un defecto hipodenso de constitución mixta y distribución heterogénea de menor y mayor densidad, en el control sin nada, esta distribución se proyecta desde el borde inferior al centro, en el control con gelfoam se proyecta y elonga al centro y en el control que contiene el vector vacío se proyecta desde el borde medial al centro.

En la figura correspondiente al grupo experimental (plásmido) se observa un defecto en el hemisferio izquierdo, el cual presenta una constitución heterogénea con zonas de mayor y menor densidad que sugieren tejido óseo mineralizado. Para evaluar la densidad que presenta el hueso que se formó en la zona del defecto, se determinó el porcentaje de densidad ósea comparándola con el hueso adyacente al defecto, en los grupos controles; control vacío, control con gelfoam y control con vector vacío el porcentaje de densidad fue del 41.1, 43.2 y 46.66 por ciento respectivamente (Gráfica 1), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos, en comparación con el grupo experimental que presentó un porcentaje de 77.48 encontrando diferencia estadística con un valor de $p > 0.01$.

μ CT – 4 meses

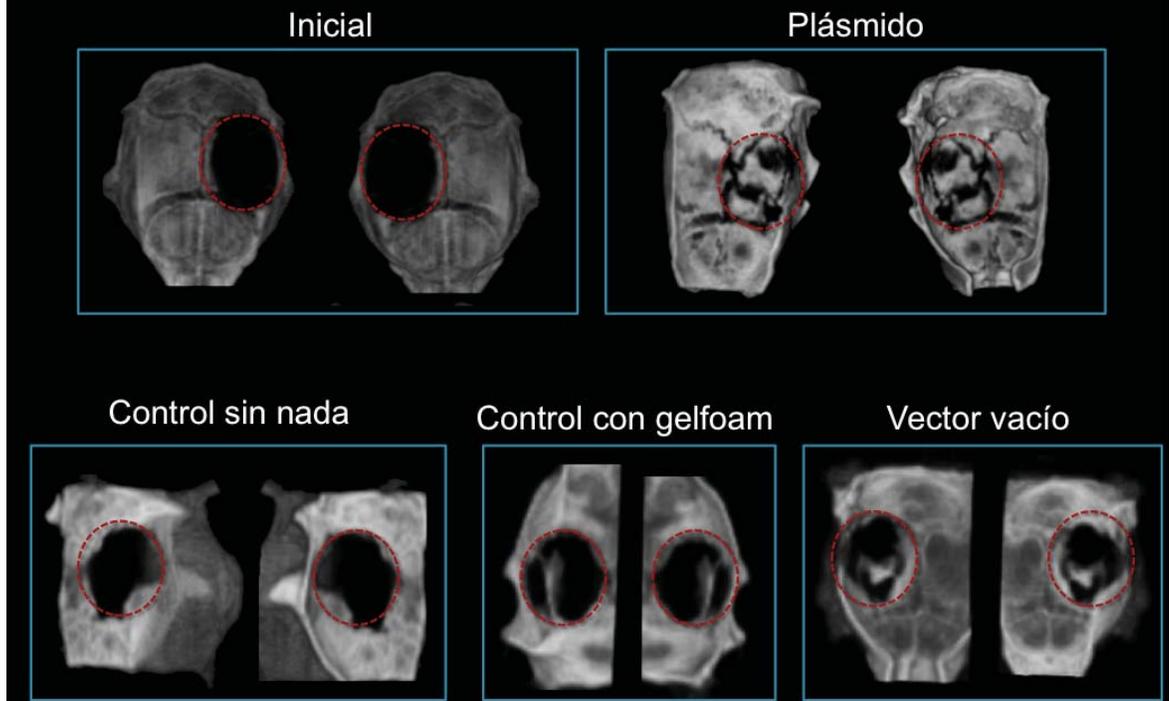
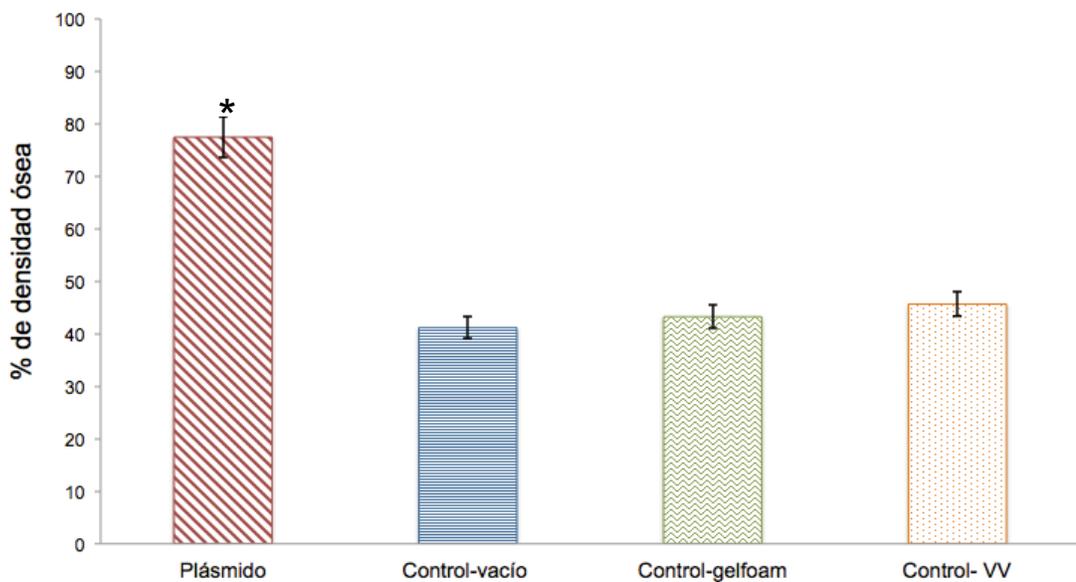


Fig. 5 Imágenes de μ CT. Se distingue en el grupo experimental zonas hiperdensas en medio del defecto. En contraste con los grupos controles donde se observa zonas hiperdensas en los bordes.



Gráfica 1.- Porcentaje de densidad ósea a los 4 meses correspondiente a Plásmido 77.48%, control-vacío 41.16%, control gelfoam 43.25% y control vector vacío 45.66%.

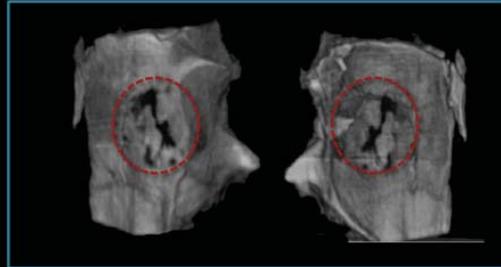
Imágenes del μ CT a los 7 meses

Se puede observar en la figura 6 la representación imagenológica en máxima intensidad de proyecciones de un estudio de μ CT de calvarias de ratas *Wistar*, la cual consta de 500 proyecciones reconstituidas en una matriz de 528 x 528 píxeles con un valor nominal de 20 micras por píxel. Las imágenes muestran un corte coronal antero-posterior y postero-anterior, donde se encuentra un defecto en el hemisferio izquierdo, que se forma desde el borde anterior en la sutura fronto-parietal hasta su borde posterior en la sutura parieto-oxipital, su margen medial en la sutura sagital y su margen lateral en el borde de la sutura escamosa, en los grupos controles este defecto se distingue con bordes irregulares, de constitución mixta y distribución heterogénea de menor y mayor densidad únicamente de los bordes del defecto hacia el centro del mismo, que sugieren tejido óseo neoformado con un porcentaje de regeneración de 47.2% para control sin nada, 52.3% control con gelfoam y 50.4% para control con vector vacío (gráfica 4) con respecto al defecto original.

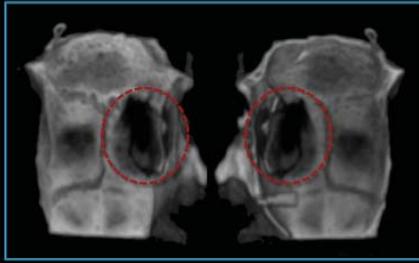
Para evaluar la densidad que presenta el hueso que se formó en la zona del defecto, se determinó el porcentaje de densidad ósea comparándola con el hueso colindante al defecto, los resultados del porcentaje son los siguientes: 52.69 para el control vacío, 52.33 para control con gelfoam y 50.18 para control con vector vacío, el grupo experimental es de 82.75 (gráfica 2) no se encontró diferencia estadísticamente significativa con los grupos controles ($p > 0.01$).

μ CT – 7 meses

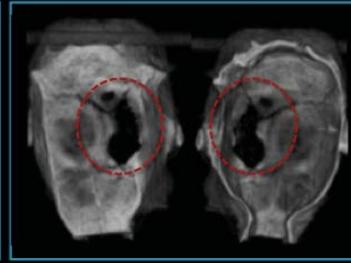
Plásmido



Control sin nada



Control con gelfoam



Vector vacío

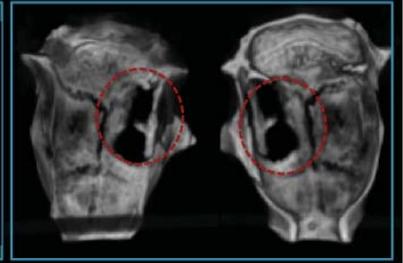
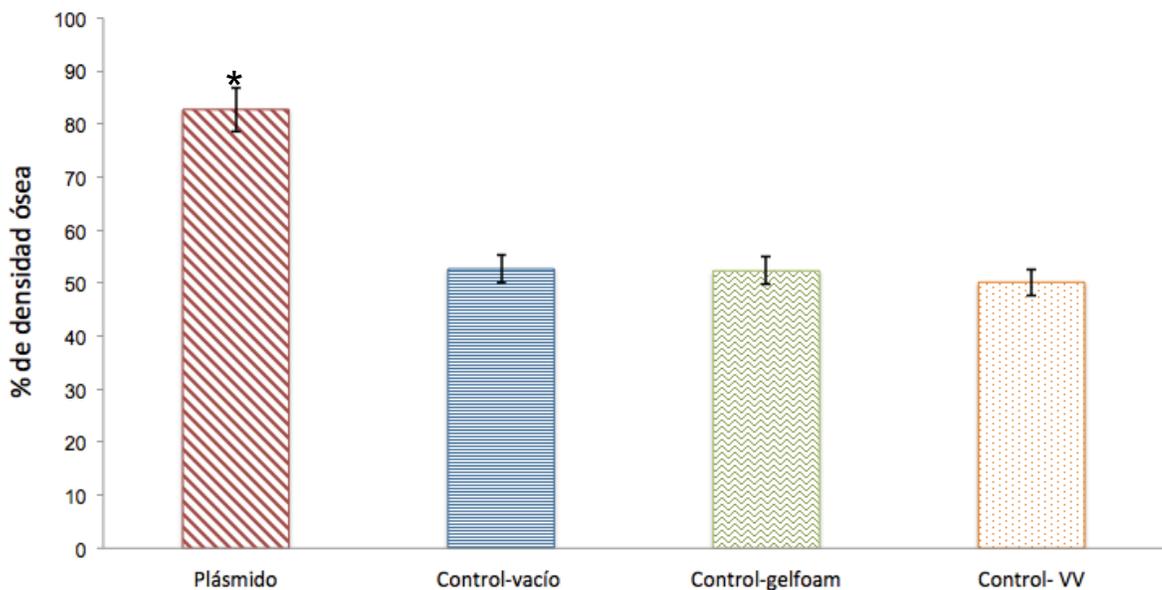


Figura 6. Imágenes en 3D de los defectos de calvaria de rata, se observa tejido hiperdenso en la zona media del defecto en el grupo experimental, en los grupos controles se observa únicamente en los bordes.



Gráfica 2.- Porcentaje de densidad ósea a los 7 meses correspondiente a Plásmido 82.75, control-vacío 52.69, control gelfoam 52.33% y control vector vacío 50.18%.

Imágenes del μ CT a los 12 meses

En las imágenes del μ CT (Fig.7) se observa la representación imagenológica en máxima intensidad de proyecciones de un estudio de μ CT de calvarias de ratas *Wistar*, la cual consta de 500 proyecciones reconstituidas en una matriz de 528 x 528 píxeles con un valor nominal de 20 micras por píxel. Las imágenes muestran un corte coronal antero-posterior y postero-anterior, donde se encuentra un defecto en el hemisferio izquierdo, que se forma desde el borde anterior en la sutura fronto-parietal hasta su borde posterior en la sutura parieto-oxipital, su margen medial en la sutura sagital y su margen lateral en el borde de la sutura escamosa, en los grupos controles este defecto se distingue con bordes irregulares, de constitución mixta y distribución heterogénea de menor y mayor densidad, en ninguno de los casos se observa una densidad homogénea en el defecto en comparación con la imagen que representa al grupo experimental, ya que se observa hiperdensa la zona del defecto de una manera más homogénea lo que corresponde a tejido óseo, los resultados de la densidad ósea demuestran que el grupo experimental tiene una densidad del 94.67 %, el control sin nada es del 77.22% y el control con gelfoam y el vector vacío es del 65.58 % y 73.10 % respectivamente (gráfica 3), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas con los grupos controles ($p > 0.01$).

μ CT – 12 meses

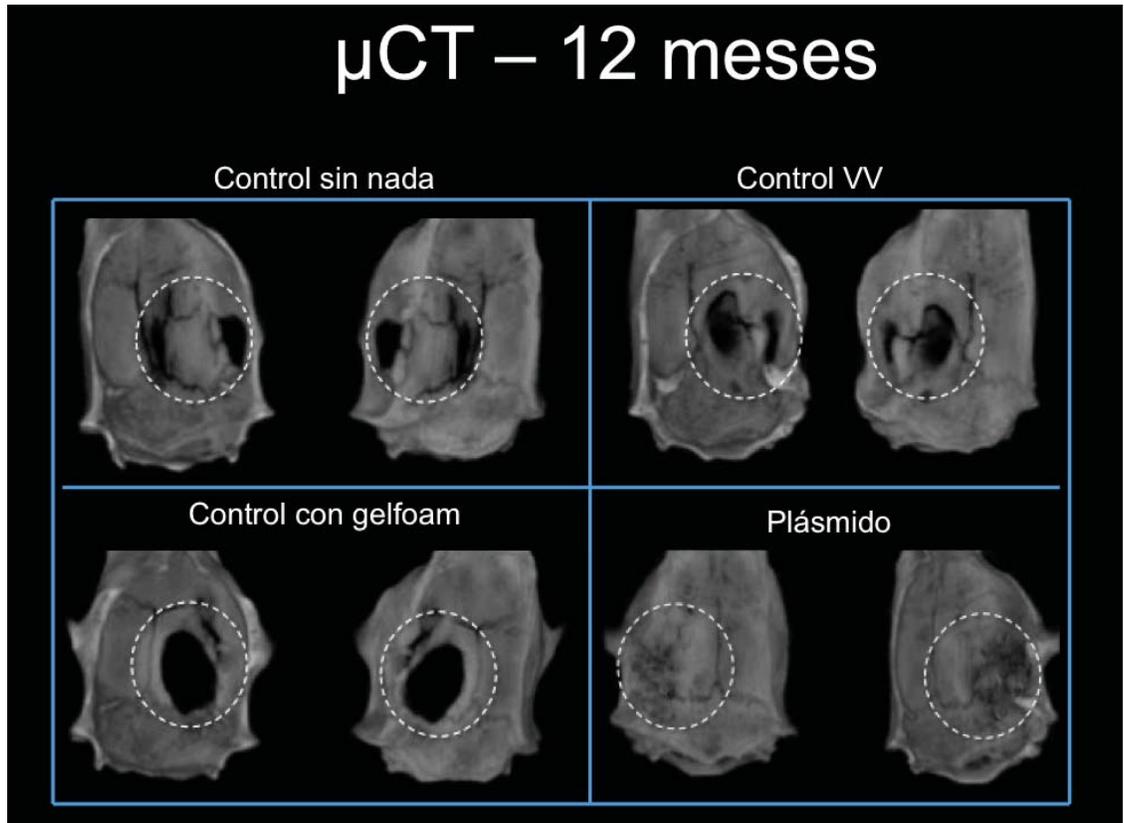
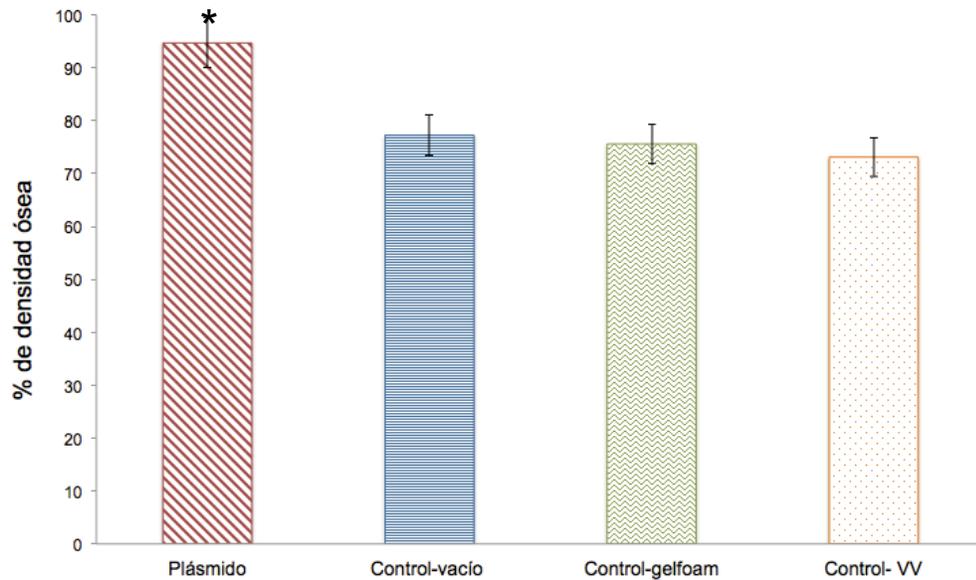


Fig. 7 Imágenes 3D de calvaria de rata en un corte coronal, se observa en el grupo del plásmido completamente hiperdenso en la zona del defecto.



Gráfica 3.- Porcentaje de densidad ósea a los 12 meses correspondiente a Plásmido 94.67%, control-vacío 77.22%, control gelfoam 75.58% y control vector vacío 73.1%.

Cantidad de tejido mineralizado formado en la zona del defecto.

Para determinar la cantidad de tejido óseo que se formó en la zona del defecto, se analizaron y midieron las imágenes en 3D obtenidas por el μ CT.

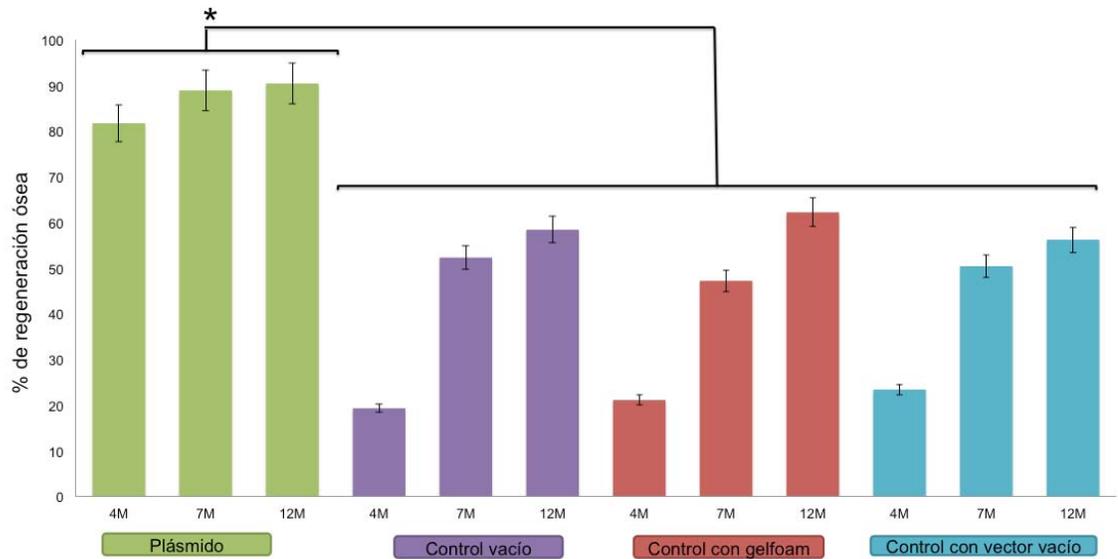
A los 4 y 7 meses en los grupos que contenían el plásmido se observó el defecto de una manera heterogénea con zonas de mayor y menor densidad lo cual sugieren tejido óseo mineralizado al evaluar la cantidad de este tejido que se formó en la zona fue del 81.7% y el 88.9% respectivamente. A los 12 meses la constitución del tejido formado en la zona del defecto se observó con una constitución más homogénea formando el 90.4% de tejido mineralizado.

En contraste en los grupos controles la cantidad de tejido mineralizado fue la siguiente: para el control que no se colocó nada la formación de tejido mineralizado en la zona del defecto (principalmente en los bordes) fue a los 4, 7 y 12 meses de 19%, 52% y 58% respectivamente.

En el control únicamente con gelfoam se formó el 21%, 47.2% y 62.2% a los 4, 7 y 12 meses respectivamente.

Finalmente en los grupos controles que se les colocó el vector vacío la formación de tejido fue a los 4, 7 y 12 meses de 23.4%, 50.4% y 56% respectivamente.

Estos porcentajes se pueden observar en la gráfica 4, donde se muestra que en los grupos experimentales hay diferencia estadísticamente significativa con respecto a los controles.



Gráfica. 4 La grafica corresponde al % de formación ósea total, comparando los cuatro grupos en los diferentes periodos de tiempo, donde se puede observar claramente que desde lo cuatro meses en el grupo experimental, hay formación de más de más del 80% de tejido mineralizado.

Observaciones histológicas

El proceso histológico se llevó a cabo en el laboratorio de patología clínica y experimental de la división de estudios de posgrado e investigación en odontología de la UNAM.

Se cortaron muestras seriadas de 5 micras de grosor, las cuales se tiñeron con tricrómica de Masson (técnica de coloración especial que permite visualizar claramente las fibras de colágena tipo I).

Los cortes histológicos de cada grupo tanto controles como experimentales se observaron a diferentes aumentos (10X, 20X y 40X). De las observaciones a 20X se tomaron fotomicrografías seriadas con la finalidad de construir una sola imagen, con la cual se pudiera mostrar un panorama general. Posteriormente se les tomó a las muestras fotomicrografías a mayor aumento de las zonas más representativas (bordes y la zona del defecto).

Hallazgos histología a los 4 meses

En la figura 8, se puede identificar de manera general el corte histológico de los grupos controles (defecto vacío, únicamente gelfoam y gelfoam + vector vacío) a los 4 meses. En estas imágenes se distingue perfectamente los bordes del defecto, los cuales están formados por tejido óseo cortical. En la zona que corresponde al defecto se identifica únicamente tejido conectivo fibroso denso bien vascularizado.

A mayor aumento en todos los controles (Fig. 9, 10 y 11) se distingue actividad osteoblástica únicamente en los bordes. En la zona del defecto hay presencia únicamente de fibras de colágena madura, las cuales están dispuestas de manera regular entre las que se identifican algunos eritrocitos. Toda la zona del defecto de tamaño crítico está ausente de infiltrado inflamatorio.

En la figura 12 se observa de manera general diferentes cortes histológicos, los cuales corresponden al grupos donde se les colocó el plásmido con el gen de CEMP1. En estas imágenes se puede observar los bordes del defecto, los cuales están formados con tejido óseo cortical. En la zona del defecto de tamaño crítico se observa formación de tejido óseo principalmente del centro a los bordes.

En algunas zonas se distinguen islas de tejido óseo separadas por tejido conectivo fibroso denso. A mayor aumento (Fig. 13) se aprecian áreas formadas con fibras de colágena bien organizada, seguidas de tejido óseo donde se localiza actividad osteoblástica, osteocitos en sus lagunas y vasos nutricios.

En todo el corte no se observa infiltrado inflamatorio ni reacción a cuerpo extraño.

Grupos control a los 4 meses

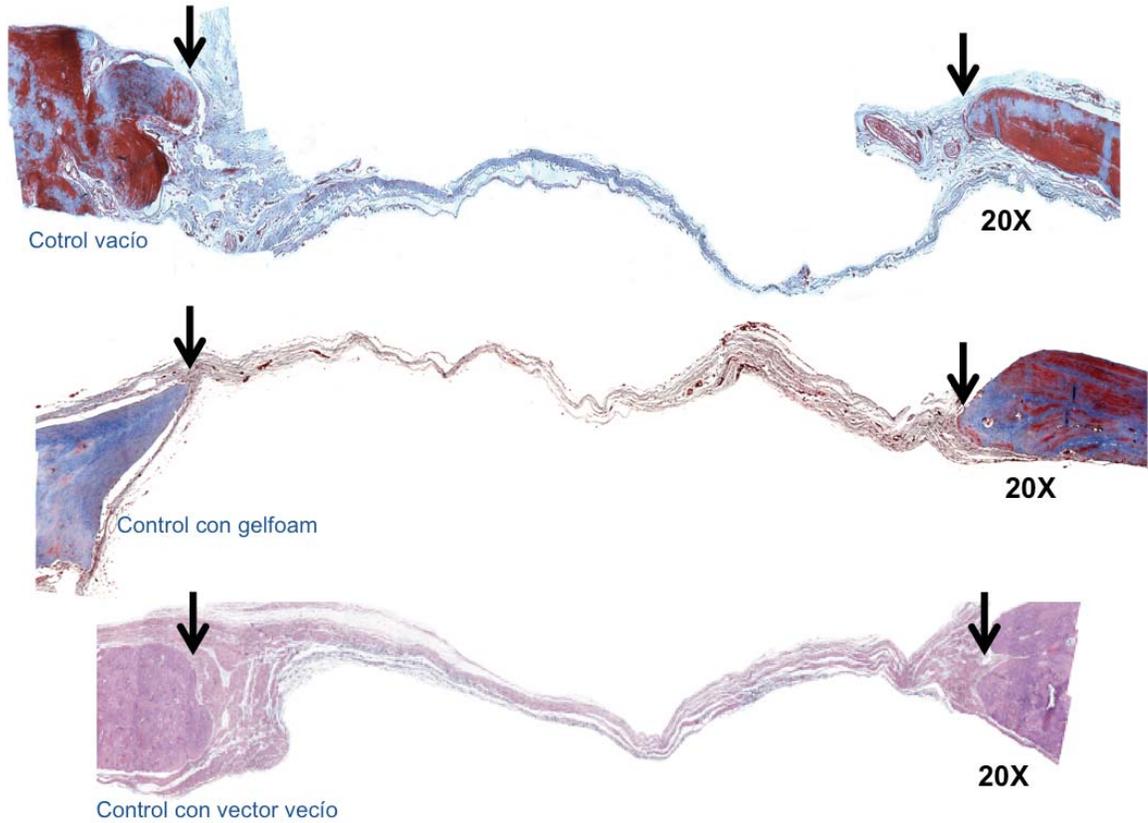


Fig. 8 Serie de fotomicrografías tomadas a 20X de los grupos control. Se observa un patrón similar en los tres casos (control vacío, control con gelfoam y control + el vector vacío). Las flechas indican el lugar donde termina el borde del defecto de tamaño crítico el cual es tejido óseo cortical. Seguido de las flechas hacia el centro corresponde al defecto. En esta zona se puede distinguir tejido conectivo fibroso denso.

Control vacío a los 4 meses

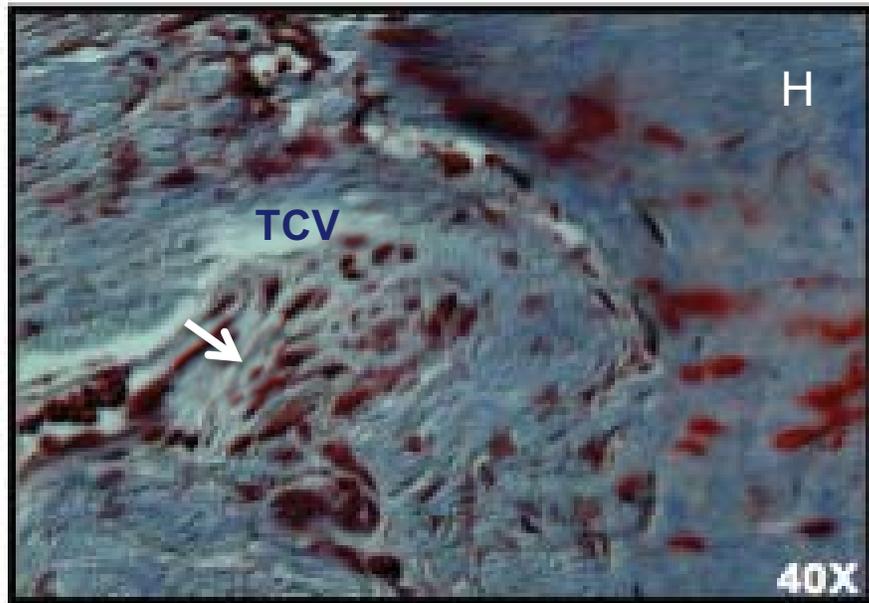
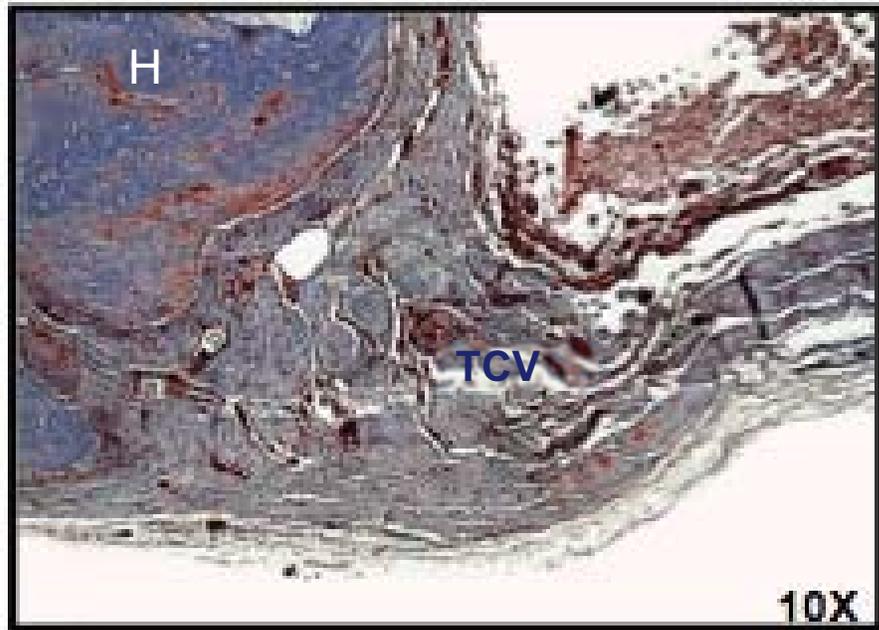


Fig. 9 Fotomicrografías del grupo al cual se dejó vacío, se observa principalmente hueso en la zona del borde (H), seguido de tejido conectivo fibroso denso bien vascularizado (TCV).

Control con gelfoam a los 4 meses

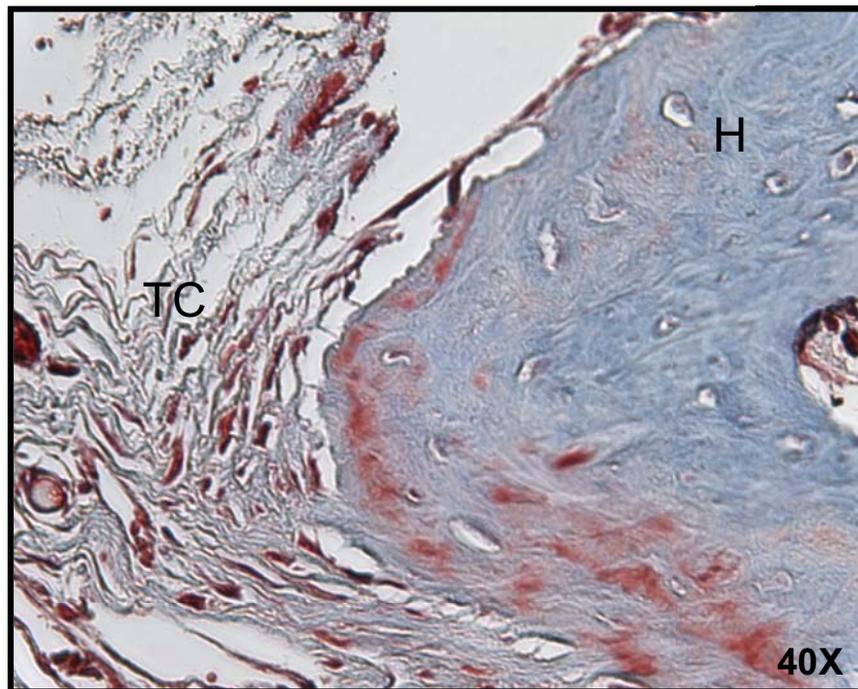
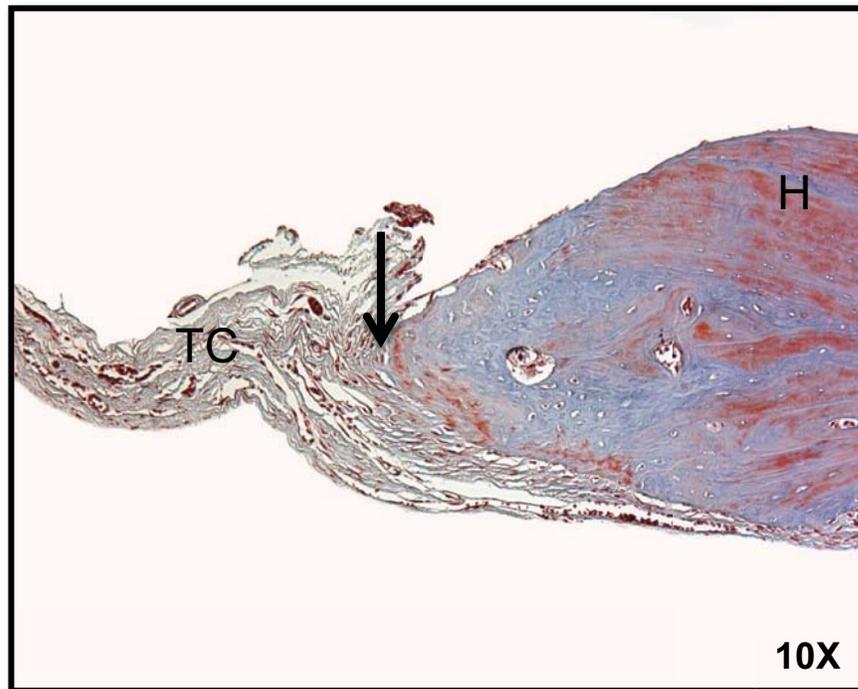


Fig.10 Fotomicrografía del grupo control con gelfoam, se observa el borde del defecto el cual es hueso nativo (H). La flecha indica donde termina el borde (flecha). Seguido se observa tejido conectivo fibroso denso bien vascularizado (TC).

Control con vector vacío a los 4 meses

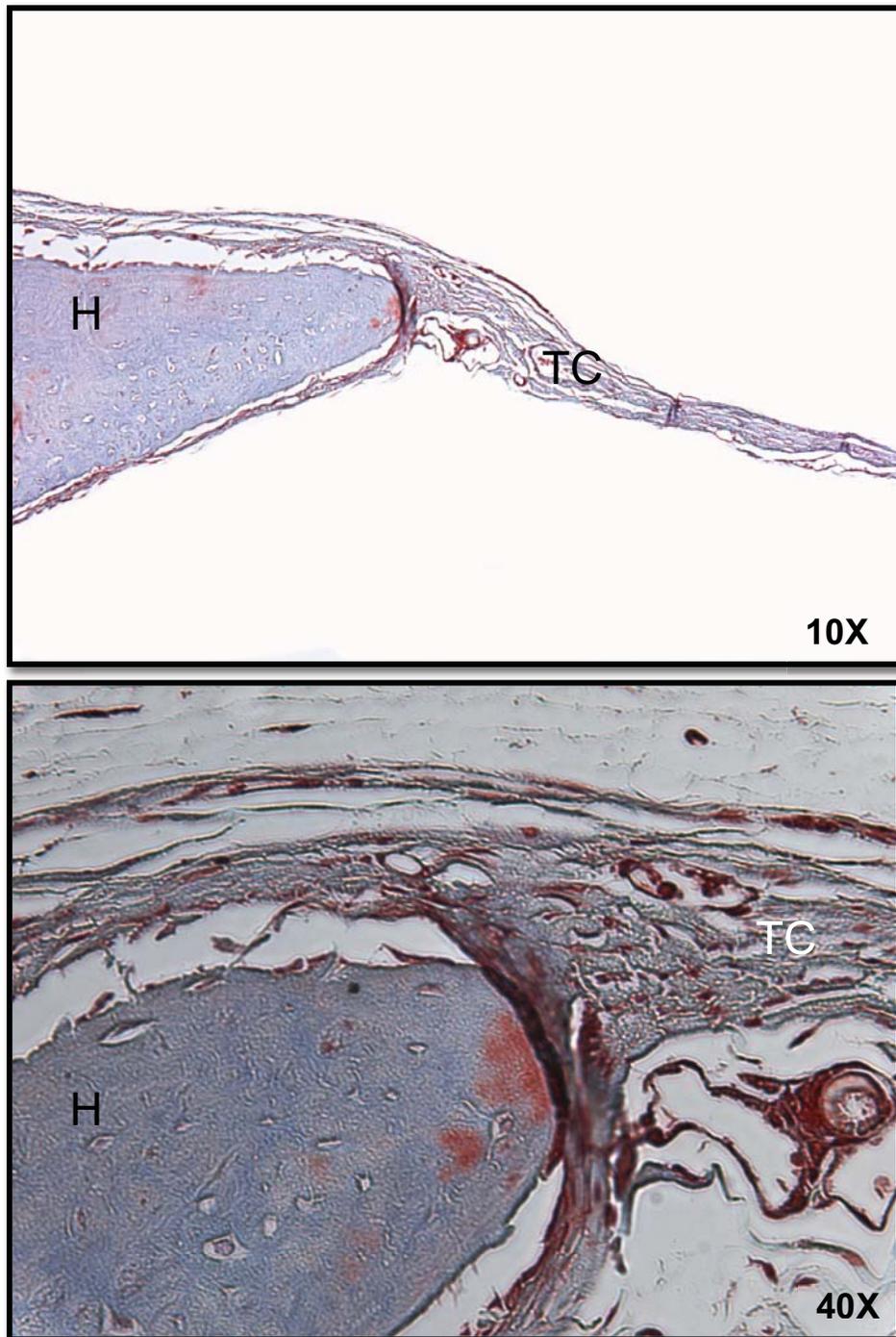


Fig. 11 Fotomicrografías del control con el vector vacío. Los bordes están formados por hueso laminar (H), seguido de tejido conectivo fibroso denso bien vascularizado (TC).

**Grupo experimental a los 4 meses
Plásmido pcDNA-40CEMP1**

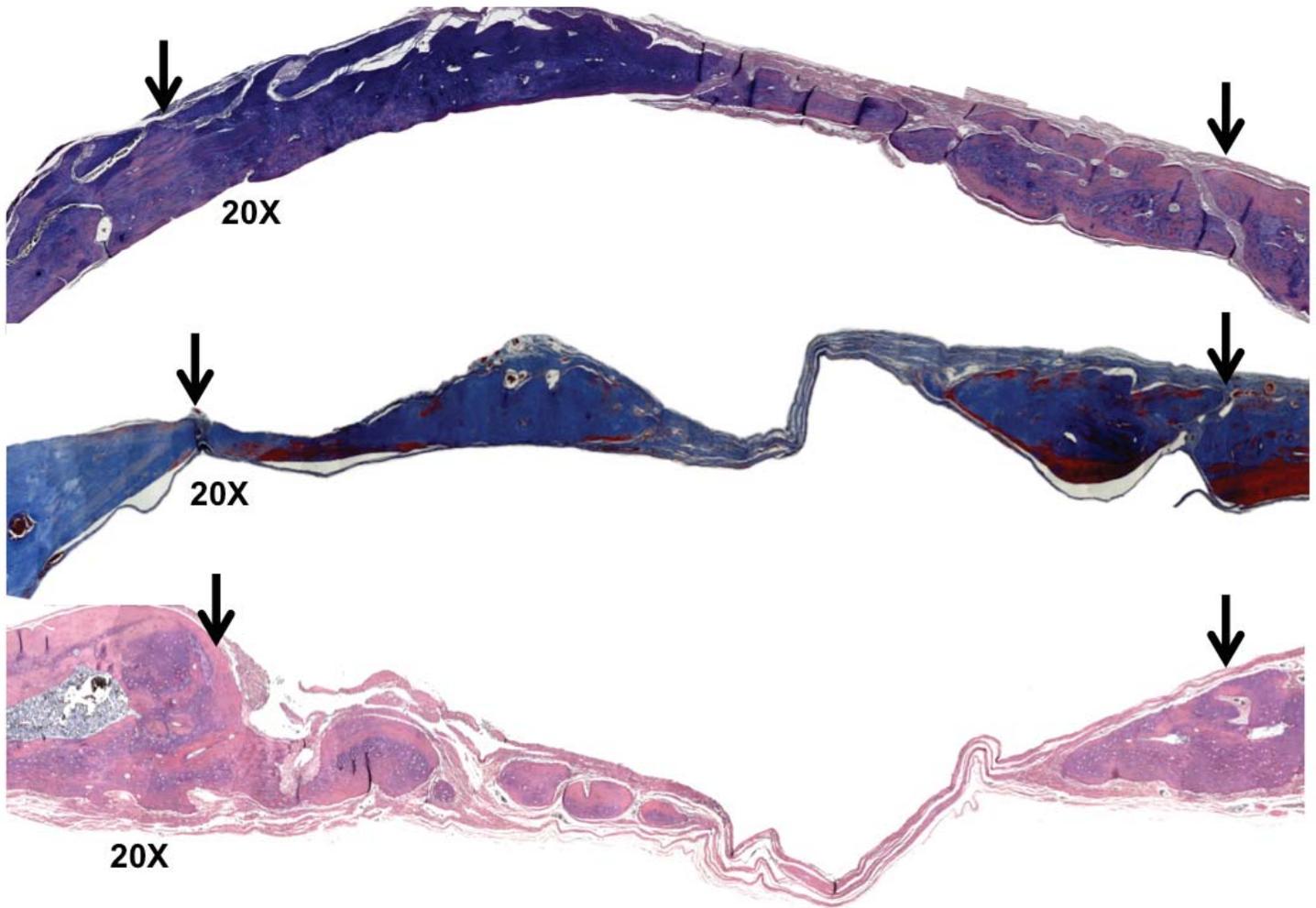


Fig. 12 Fotomicrografías seriadas del grupo experimental a 20X. Las flechas indican los bordes del defecto de tamaño crítico, los cuales están formados por tejido óseo. En la zona del defecto propiamente dicha se pueden observar formación de tejido óseo, en algunas zonas se distinguen islas de tejido óseo rodeadas de tejido conectivo fibroso denso.

Plásmido pcDNA-40CEMP1 a los 4 meses

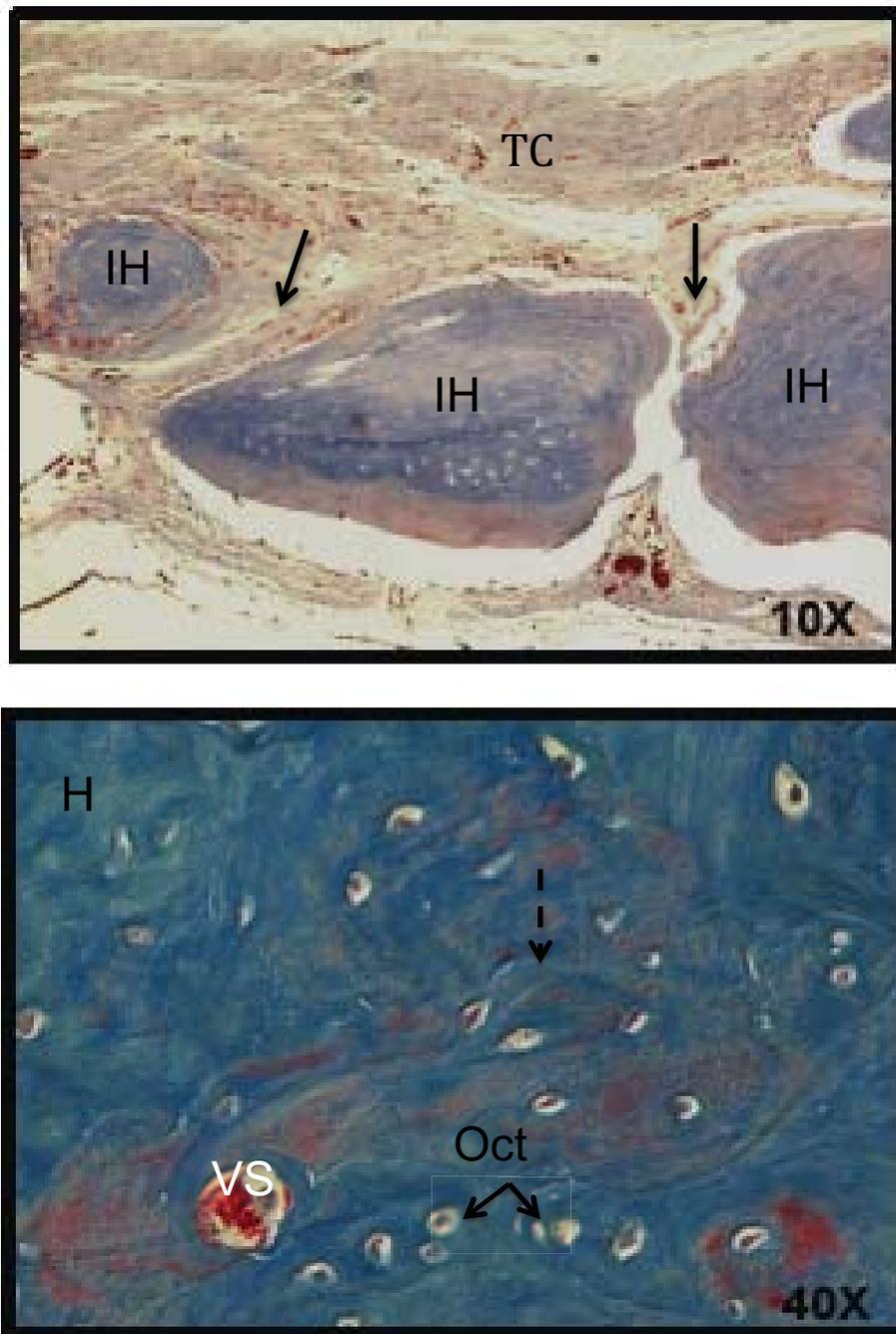


Fig. 13 Fotomicrografías a mayor aumento del grupo experimental, en la imagen superior se observan islas de tejido óseo (IH), separadas por septos de tejido conectivo (TC y flechas). En la imagen inferior (a mayor aumento) se observa tejido óseo (H), osteocitos (Oct), vaso sanguíneo (VS) y líneas de crecimiento óseo (flecha entrecortada).

Hallazgos histológicos a los 7 meses

En la figura 14, se puede identificar de manera general el corte histológico de los grupos controles a los 7 meses (defecto vacío, únicamente gelfoam y gelfoam + vector vacío). En estas imágenes se distingue una mínima formación de tejido óseo de los bordes al centro, seguido de tejido conectivo fibroso denso en la mayoría de la zona del defecto. A mayor aumento (Fig. 15, 16 y 17) en todos los controles se observa en los bordes actividad osteoblástica así como osteocitos en sus lagunas, se distinguen fibras de colágena madura dispuestas de manera regular, con ausencia de infiltrado inflamatorio.

En la figura 18 se observa de manera general diferentes cortes histológicos del grupo experimental. En estas imágenes se puede distinguir los bordes del defecto, los cuales están formados por tejido óseo laminar. En la zona del defecto de tamaño crítico se observa que esta completamente ocupada por tejido óseo. A mayor aumento en la figura 19 se distingue hueso lamelar, se observa gran cantidad de osteocitos en sus lagunas con distribución uniforme, además presencia de vasos sanguíneos que alrededor de ellos se agrupan laminillas concéntricas las cuales contienen osteocitos. En algunas zonas se observan líneas de crecimiento óseo con mineralización homogénea.

Grupos control a los 7 meses

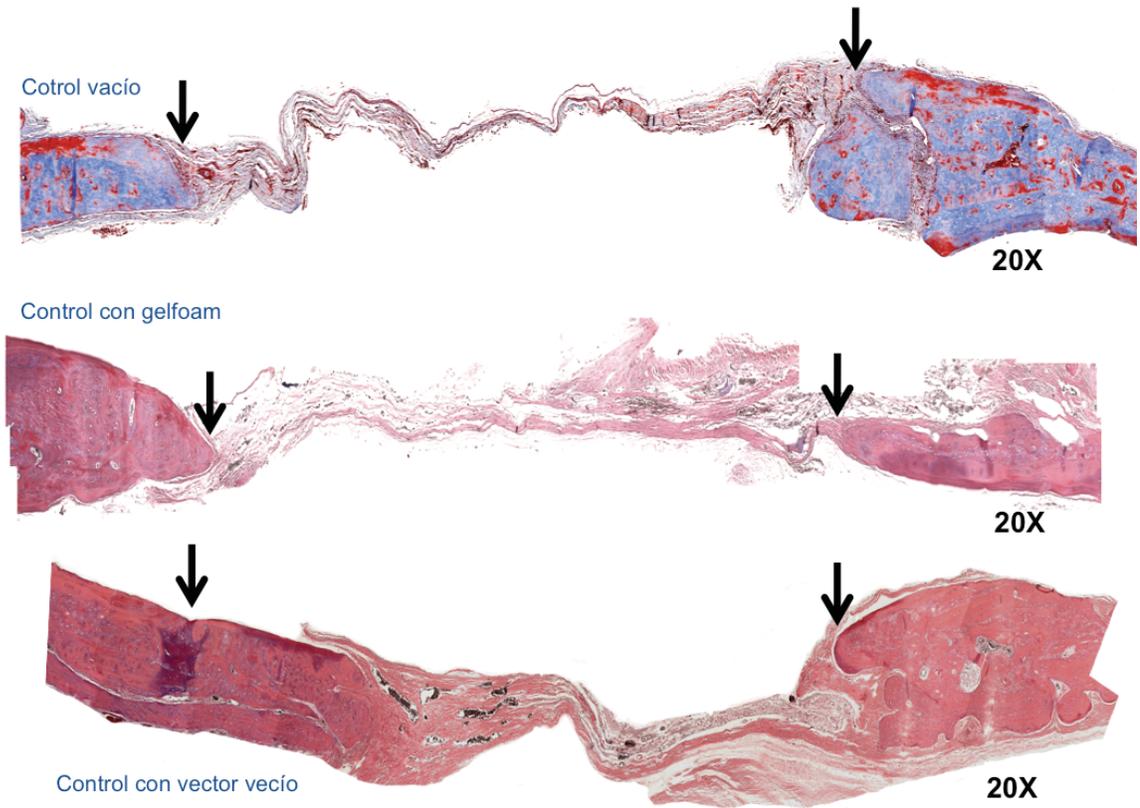


Fig. 14 Fotomicrografías seriadas de los grupos control a 20X. Las flechas indican donde termina el borde e inicia la zona del defecto. Dichos bordes están formados por tejido óseo seguido de tejido conectivo fibroso denso bien vascularizado.

Control vacío a los 7 meses

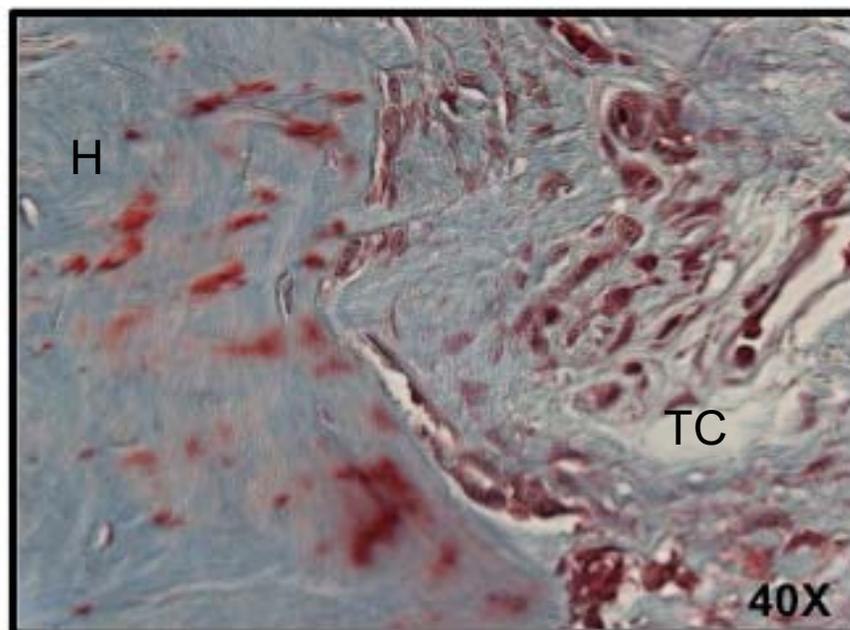
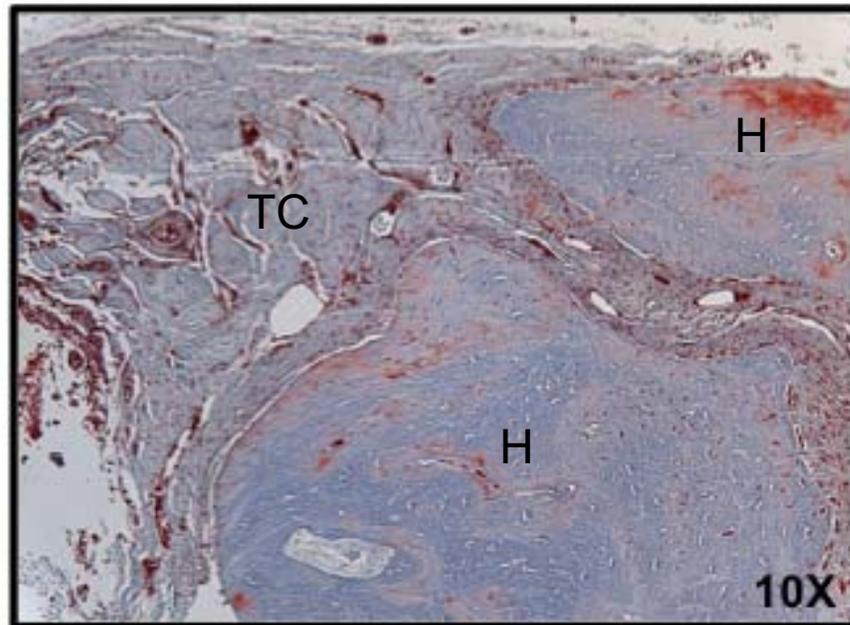


Fig. 15 En la fotomicrografía superior se observa uno de los bordes del defecto el cual esta constituido por hueso lamelar (H), seguido de tejido conectivo (TC). En la fotomicrografía inferior se observa hueso lamelar bien calcificado (H), seguido de tejido conectivo (TC).

Control Gelfoam a los 7 meses

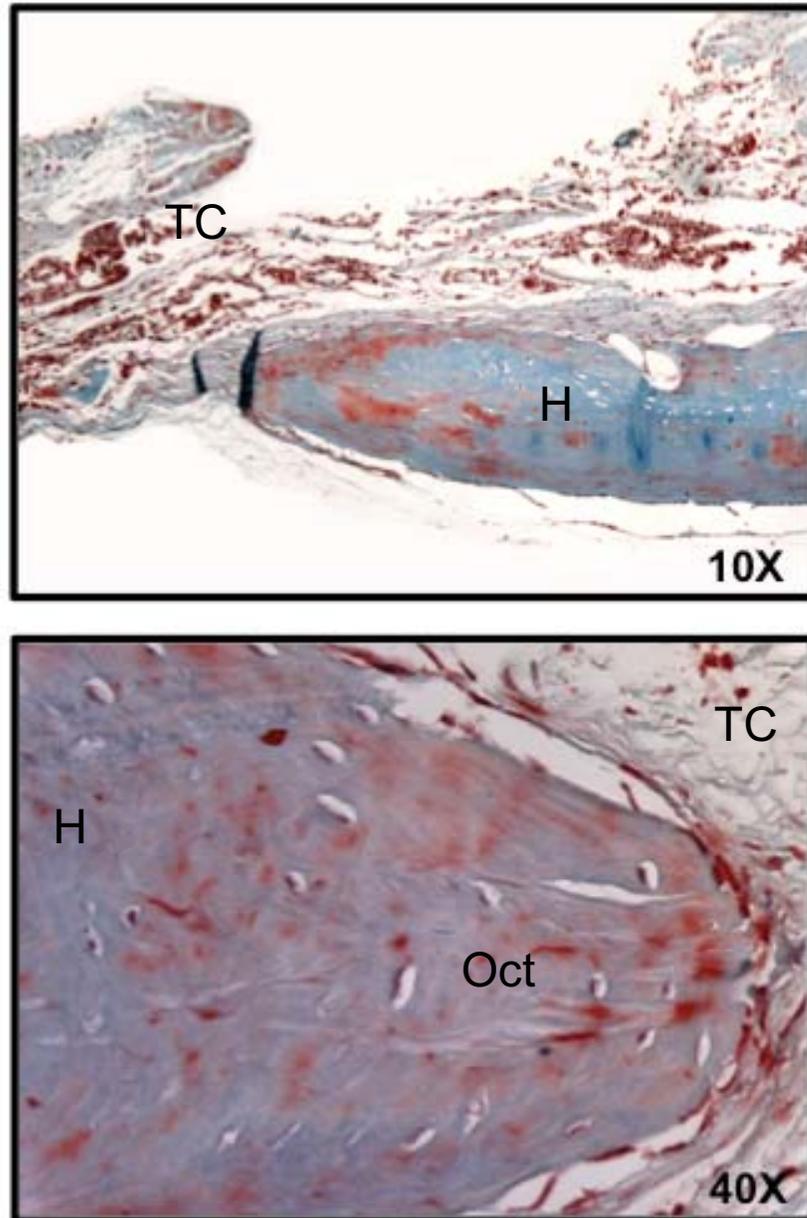


Fig. 16 En la fotomicrografía superior se observa el borde del defecto, formado por hueso (H), seguido de tejido conectivo fibroso denso bien vascularizado (TC), la fotomicrografía inferior corresponde al borde donde se observa tejido óseo (H), osteocitos (Oct) y tejido conectivo (TC).

Control vector vacío a los 7 meses

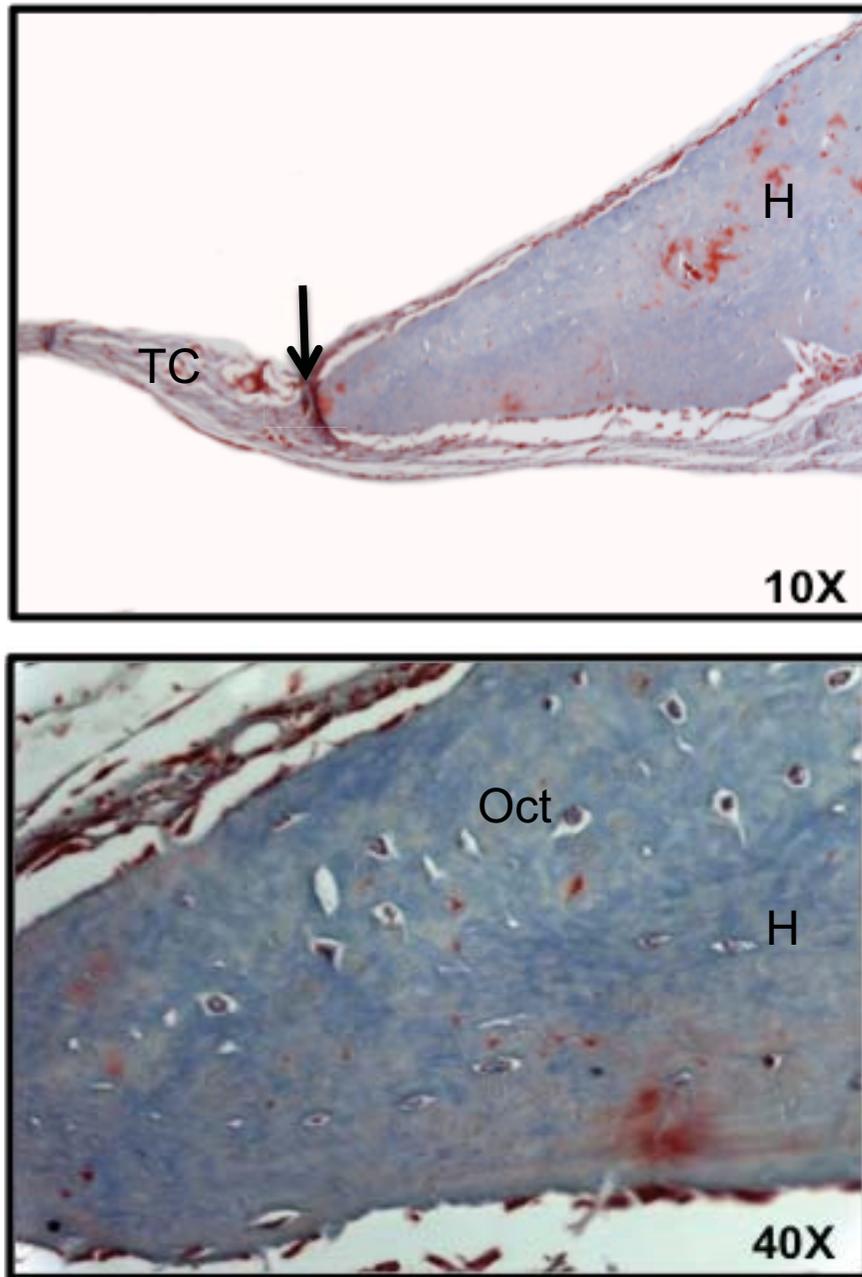


Fig. 17 En la imagen superior se observa el borde completo del defecto el cual esta constituido por hueso lamelar (H), seguido del borde se observa únicamente tejido conectivo fibroso denso (TC). A mayor aumento en la fotomicrografía inferior se observa tejido óseo correspondiente al borde con osteocitos (Oct).

**Grupo experimental a los 7 meses
Plásmido pcDNA-40CEMP1**

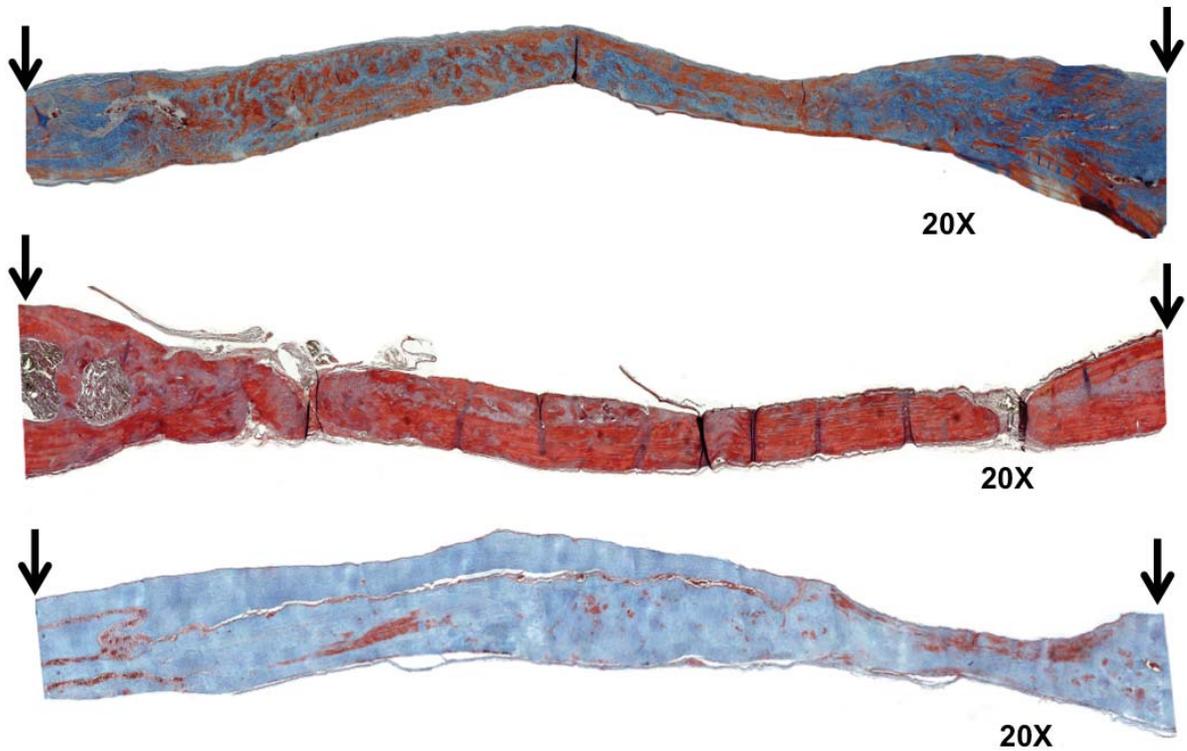


Fig. 18 Fotomicrografías seriadas del grupos experimentales, las flechas indican donde termina el borde del defecto y a su vez el inicio de la zona del defecto la cual esta completamente ocupada por tejido óseo lamelar de manera irregular.

Plásmido pcDNA40-CEMP1 a los 7 meses

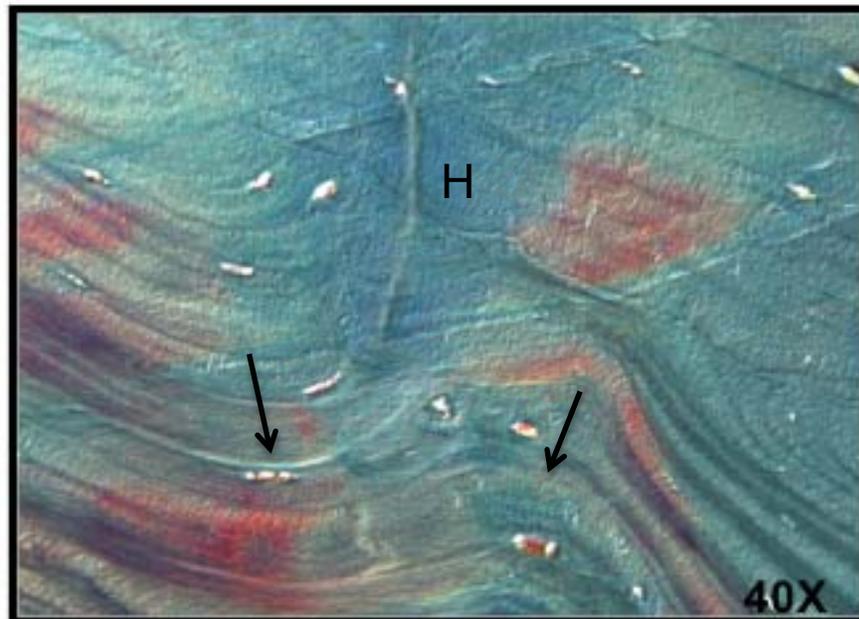
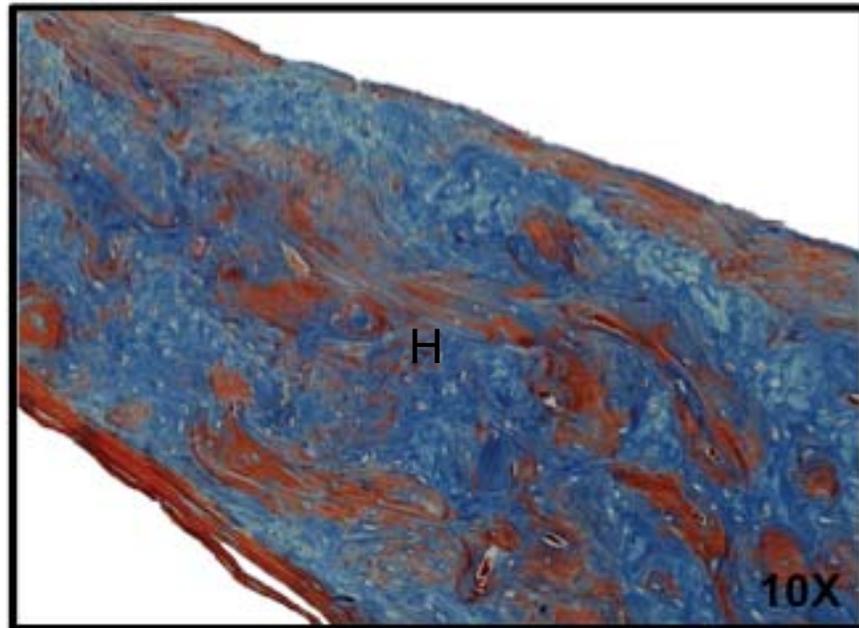


Fig.19 En la fotomicrografía superior se observa tejido óseo lamelar dispuesto de una manera irregular. En la fotomicrografía inferior se observa tejido óseo (H) y líneas de crecimiento óseo (flechas).

Hallazgos histológicos a los 12 meses

En la figura 20, se puede identificar de manera general el corte histológico de los grupos controles (defecto vacío, únicamente gelfoam y gelfoam + vector vacío) a los 12 meses. En estas imágenes se observa la formación de tejido óseo de los bordes al centro, en ninguno de los casos el defecto se cierra completamente, ya que se puede distinguir un septo de tejido conectivo fibroso denso, siendo más evidente en el control con gelfoam. A mayor aumento en todos los controles (Fig. 21, 22 y 23) se distingue escasa actividad osteoblástica y osteocitos en sus lagunas, seguido al tejido óseo se encuentran fibras de colágena madura dispuestas de manera regular.

En la figura 24 se observa de manera general diferentes cortes histológicos, los cuales corresponden al grupos donde se les colocó el plásmido con el gen de CEMP1. En estas imágenes se puede observar que la zona que corresponde al defecto esta completamente ocupada por tejido óseo de una manera regular. A mayor aumento se puede observar en la figura 25 hueso lamelar maduro, con presencia de osteocitos en sus lagunas de una manera uniforme, además se identifica la presencia de gran cantidad de vasos sanguíneos que alrededor de ellos se agrupan laminillas concéntricas las cuales contienen osteocitos, lo que indica que se trata de un tejido vital y normal.

Grupos control a los 12 meses

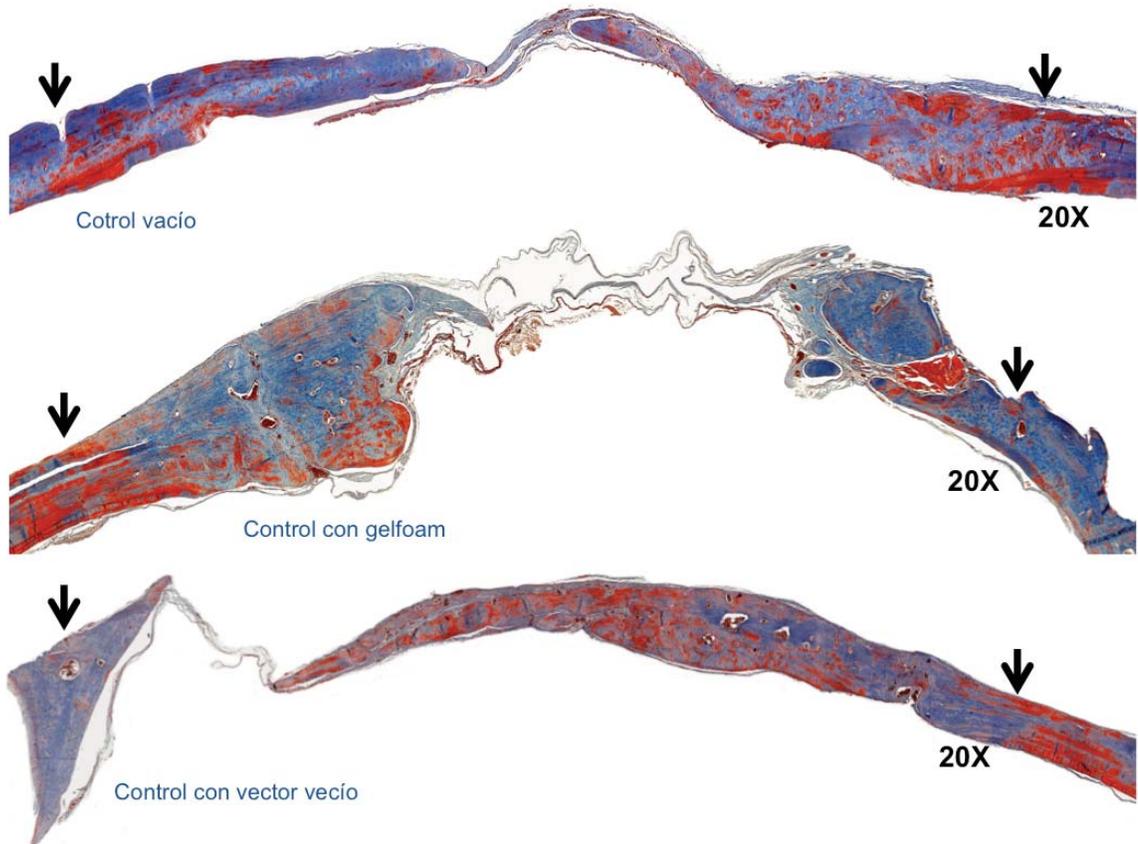


Fig. 20 Series de fotomicrografías tomadas a 20X de los grupos controles, las flechas indican el borde del defecto constituido por tejido óseo. En las tres imágenes se distingue que el defecto no se cerró completamente con tejido óseo, ya que hay zonas de tejido conectivo fibroso aun después de un año.

Control vacío a los 12 meses

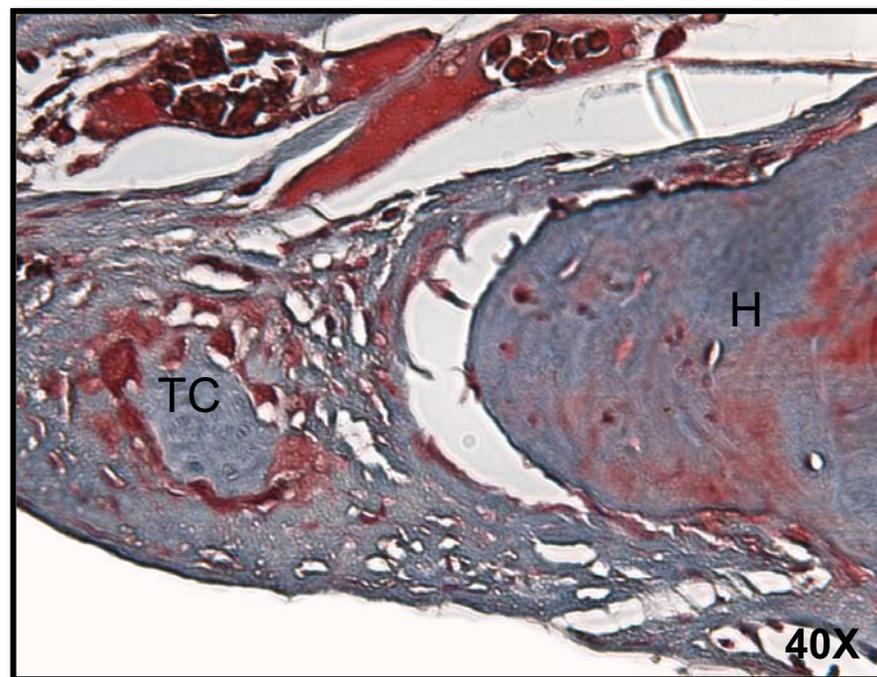
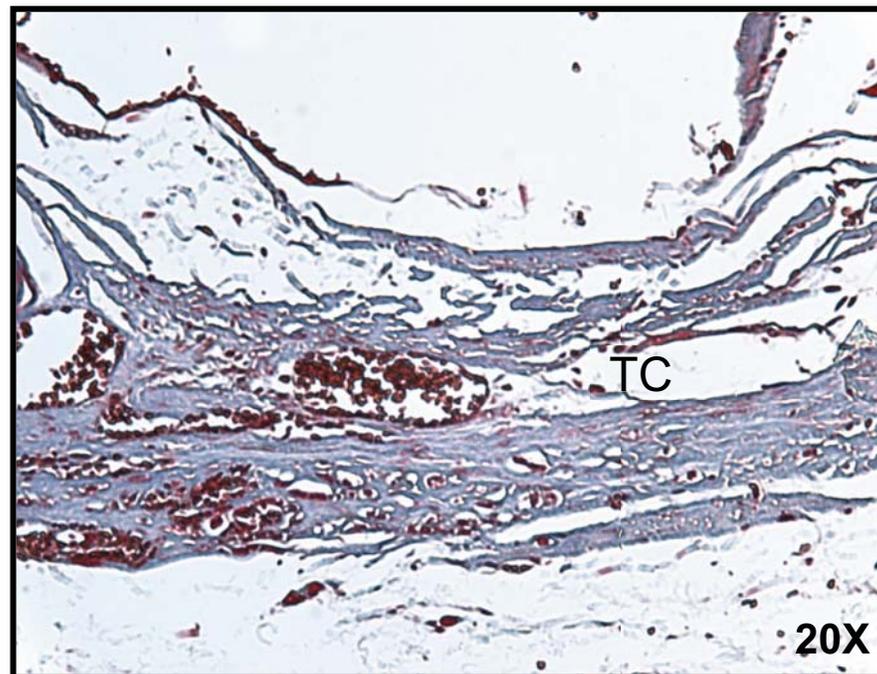


Fig. 21 En la fotomicrografía superior, se observa la zona donde no hubo regeneración ósea, la cual está formada por tejido conectivo fibroso denso bien vascularizado. En la fotomicrografía inferior se observan tejido óseo lamelar maduro, el cual corresponde al hueso que se formó en la zona del defeco, este es seguido de tejido conectivo fibroso.

Control con gelfoam a los 12 meses

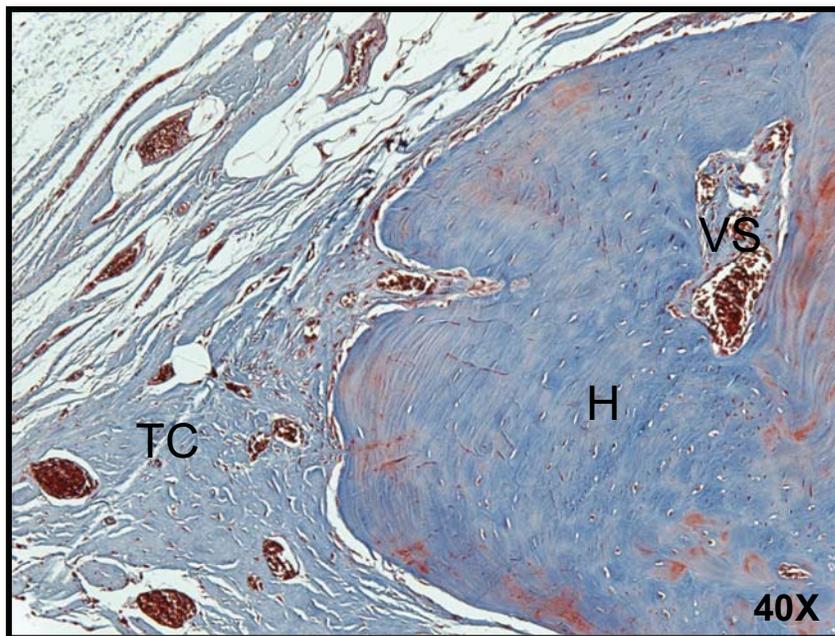
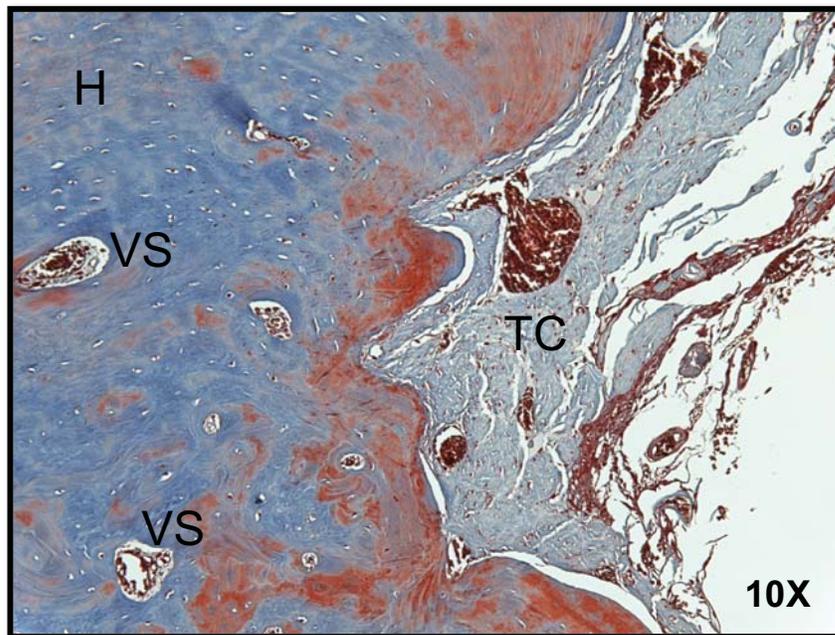


Fig. 22 Las fotomicrografías muestran a mayor detalle tejido óseo lamelar maduro con presencia de vasos sanguíneos (VS), lo cual corresponde a tejido óseo formado en la zona del defecto, sin embargo también se observa tejido conectivo fibroso denso bien vascularizado.

Control vector vacío a los 12 meses

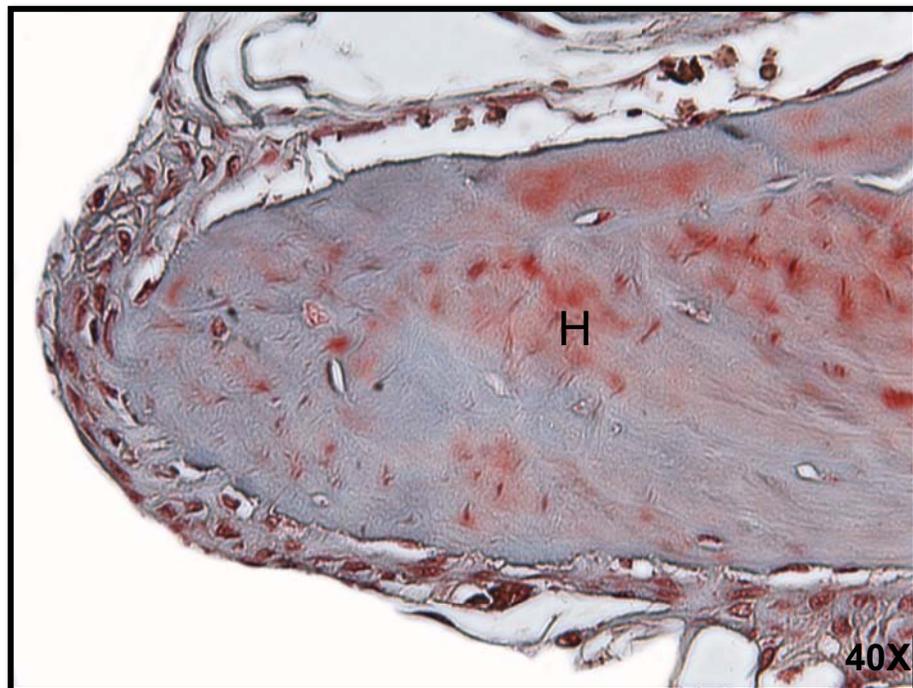
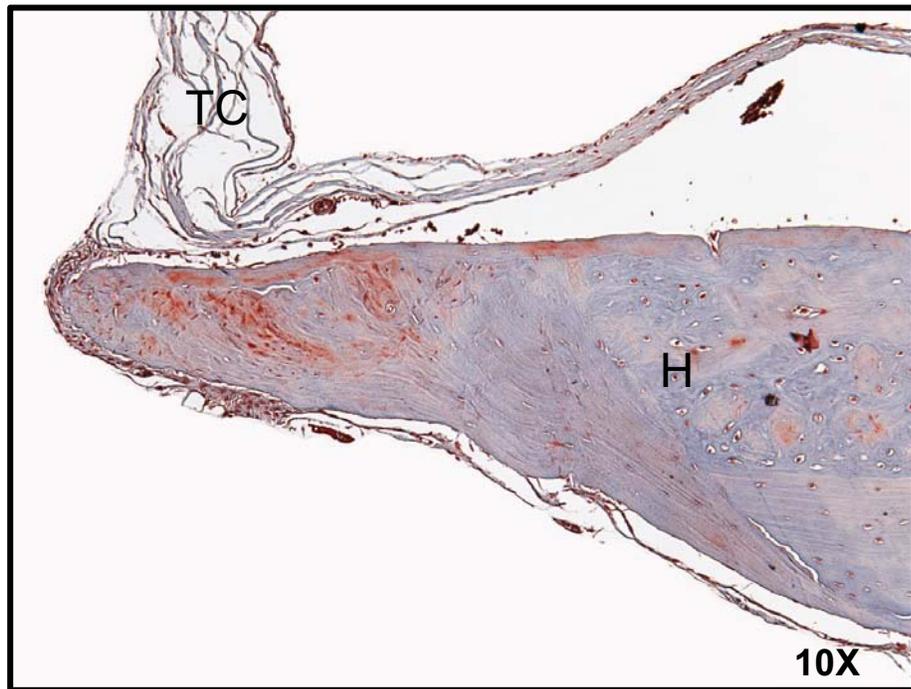


Fig. 23 En ambas fotomicrografías se observa tejido lamelar maduro el cual corresponde al hueso formado en la zona del defecto, seguido de tejido conectivo fibroso denso (TC).

**Grupos experimental a los 12 meses
Plásmido pcDNA-40CEMP1**

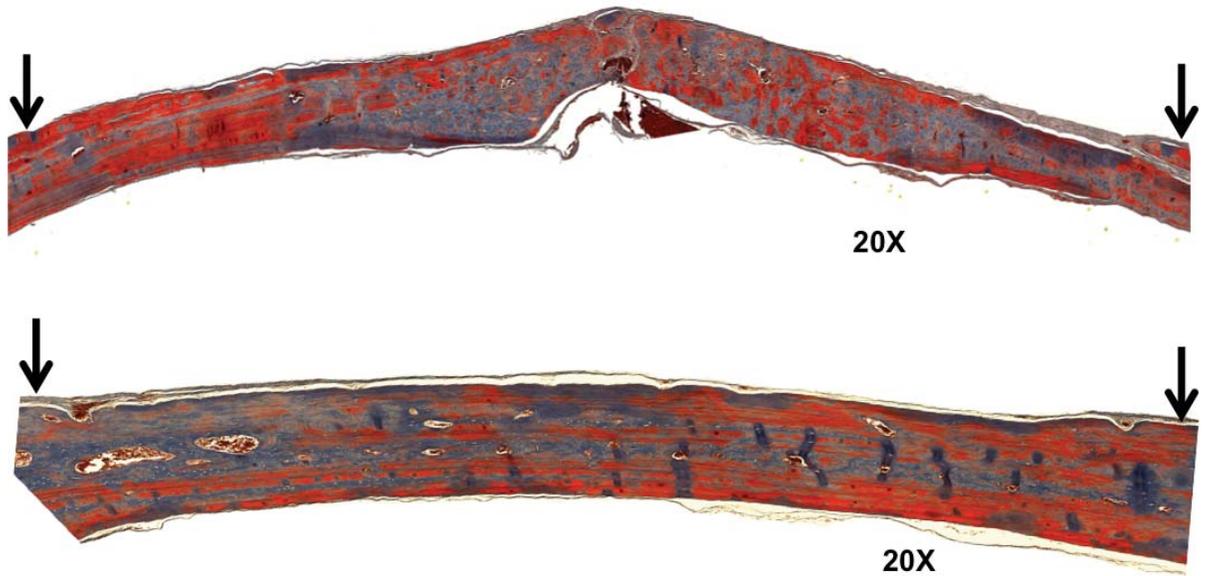


Fig. 24 Serie de fotomicrografías tomadas a 20X donde se puede observar que el defecto de tamaño crítico se cerró completamente con tejido óseo.

Plásmido pcDNA 40-CEMP1 a los 12 meses

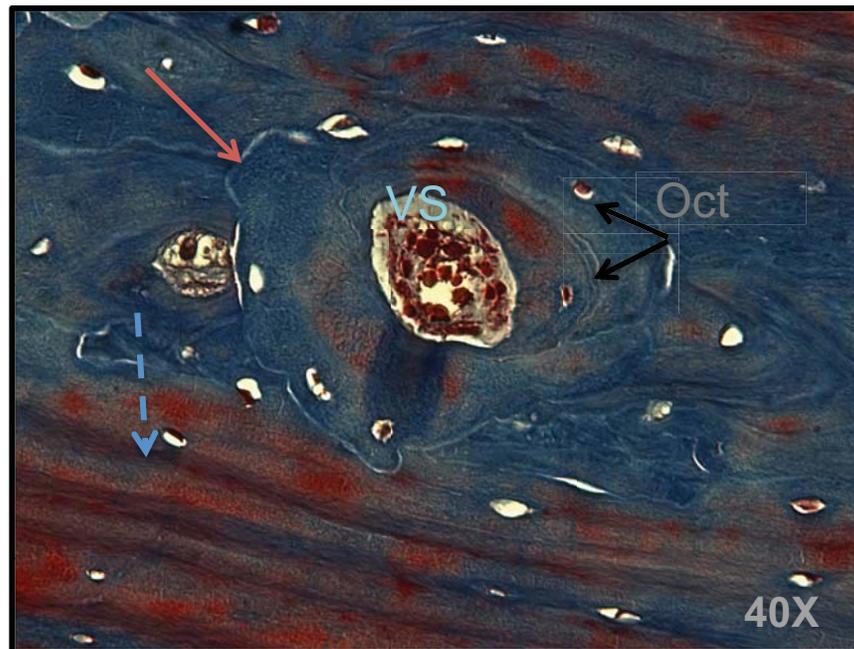
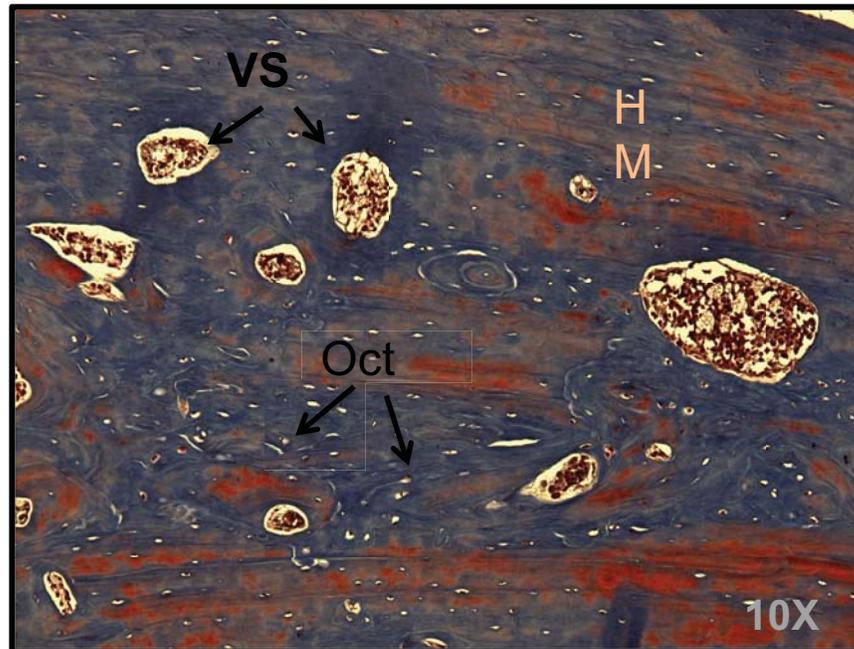


Fig. 25 En la fotomicrografía superior se puede observar hueso lamelar maduro (HM), abundantes vasos sanguíneos (VS) así como gran cantidad de osteocitos en sus lagunas (Oct). En la fotomicrografía inferior se distinguen líneas de crecimiento óseo (flecha punteada) así como una gran vaso sanguíneo (VS) que alrededor de el se agrupan laminillas (flecha roja) las cuales contienen osteocitos (Oct).

8. Discusión

El hueso es un tejido dinámico y metabólicamente activo que sufre un continuo proceso de remodelado, lo que confiere al esqueleto su capacidad regenerativa y de adaptación funcional. Sin embargo debido a enfermedades o accidentes, se forman defectos severos que necesitan de factores que estimulen la regeneración de la zona afectada. Hasta la fecha se han empleado un gran número de terapias para lograr dicha regeneración sin obtener resultados predecibles. Los resultados del presente trabajo, demuestran que no se está tan lejos de lograr que defectos de tamaño crítico se regeneren, tal es el caso de los realizados en calvarias de rata, ya que al utilizar el gen de la proteína CEMP1 dicho defecto se logró regenerar.

En trabajos previos se demostró que al transfectar con el gen de la proteína CEMP1 células de origen no esquelético, (como los fibroblastos gingivales humanos), su fenotipo se modificó a mineralizante, además de expresar moléculas involucradas en el proceso de mineralización como BSP, OPN, ALP²⁶. Estos resultados abrieron un amplio panorama para estudiar esta proteína y su capacidad en los procesos de regeneración. Uno de los puntos a estudiar, es precisamente la terapia génica, ya que al trasfectar el gen de una manera *in vitro* los resultados fueron contundentes, al hacerlo, *in vivo*, es decir en defectos de tamaño crítico en calvarias de rata, el cual es un modelo bien establecido para evaluar regeneración, los resultados fueron muy prometedores, ya que el defecto se regeneró completamente.

En este trabajo se utilizó un tipo de vector denominado de DNA desnudo, debido a que trae ciertas ventajas, por ejemplo, estos vectores no se insertan en el genoma, tal como los vectores virales que traen como consecuencia mutagénesis. Otra ventaja es que los vectores de DNA desnudos presentan muy baja inmunogenicidad, contrastando así con los vectores virales que presentan como principal desventaja la toxicidad relacionada con la respuesta inmune⁷³⁻⁷⁹. Una gran desventaja de utilizar vectores de DNA desnudo es la transfección transitoria que presenta⁷³, es decir, la duración de la expresión génica es muy

corta, sin embargo para este estudio dicha duración es una ventaja, ya que sólo se espera que el producto génico resultante, en este caso la proteína CEMP1, se exprese el tiempo suficiente para lograr inducir la regeneración del defecto. Para algunos autores el hecho de que los vectores no se inserten en el genoma es una gran desventaja, ya que se sugiere que la terapia génica solo es para reparar genes dañados⁷⁴. Sin embargo en este estudio se demuestra que la terapia génica no solo repara dichos genes, sino que al aplicar de manera directa el plásmido en la zona de interés, (gen de CEMP1), se logró inducir a la regeneración total del defecto de tamaño crítico, sin patología aparente después de un año.

Existen diferentes vías por las cuales se puede introducir el vector, la más común es por medio de inyección. Sin embargo hoy en día se debe de considerar que un punto importante en el tratamiento de defectos óseos, son los biomateriales empleados, ya que estos deben formar un andamio de tres dimensiones el cual funcione como soporte para que se lleve a cabo la migración, proliferación y diferenciación celular, estos parámetros son primordiales para la regeneración de tejidos⁶⁵ y de ese modo actuar como un andamio para la formación de nuevo hueso en zonas donde existe la presencia de defectos, este andamio debe mostrar la compatibilidad y afinidad con proteínas de la matriz ósea osteogénicas⁸³. En este estudio se empleó una esponja de colágena absorbible, la cual es altamente porosa y se utiliza como agente hemostático, además de que éste apoya la actividad osteoblástica y permiten la migración y proliferación celular en los poros de la esponja, en la clínica se han utilizado esponjas de gelatina a las cuales se les incorporó BMP2 para lograr la regeneración de hueso⁸³. En nuestros resultados se demostró que esta gelatina funcionó correctamente como andamio para la colocación del plásmido con el gen de CEMP1 y posteriormente en el sitio quirúrgico, donde se establece un micro ambiente, en el cual las células más susceptibles a ser transfectadas como los fibroblastos de la duramadre, osteoblastos y células troncales que se encuentran en zonas paravasculares, se transfectan de manera transitoria y por tanto expresan la proteína CEMP1. La cual se deduce que desempeñó un papel inductor óseo. Esto se puede corroborar desde los estudios radiográficos, donde se pueden observar a los 4 meses zonas radiopacas en el área del defecto, comparando nuestros resultados

con los de Gysin⁸⁴ y colaboradores, donde ellos utilizaron células estromales transfectadas con el gen de la BMP4, en defectos de tamaño crítico de 8 mm en ratas, reportan en los resultados radiográficos la presencia de cúmulos radiopacos en el área del defecto, en el grupo experimental, y en los controles únicamente en la periferia a las cuatro semanas, nuestros resultados son similares, sin embargo nuestra evaluación fue a partir de los 4 meses, observando de igual manera en el grupo experimental cúmulos en el área del defecto siendo más evidentes a los 7 meses y observándolos más densos a los 12 meses. Con respecto al control solo se observó principalmente zonas radiopacas en los bordes. Sin embargo los resultados que nos dan mayor información son los obtenidos con las imágenes del uCT. Huang y colaboradores⁸⁵ realizaron defectos de tamaño crítico de 9 mm de diámetro donde colocaron un andamio de ácido poli(láctico-co-glicólico), el cual estaba embebido con el plásmido que contenía el gen de la BMP4 (no especifican la cantidad que utilizaron), sus resultados concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo donde se puede observar en ambos, la formación de zonas con múltiples capas e islas dispersas irregularmente en la zona del defecto (grupo experimental). Sin embargo solo evaluaron la formación de tejido mineral hasta las 15 semanas, contrastando con nuestros resultados a los 7 meses y 12 meses donde la zona del defecto se observó completamente ocupada por tejido mineralizado.

Continuando con la evaluación de las imágenes de uCT, se pudo determinar el porcentaje de densidad mineral ósea, donde Gysi⁸⁴ reporta una densidad mayor del 126% a las 15 semanas, lo que indica que la zona del defecto esta más mineralizada que el hueso nativo, en nuestros resultados la densidad a los 4 meses fue del 77.48%, sin embargo la densidad fue aumentando con el paso del tiempo, a los 7 meses la densidad alcanzó el 82% y el 94.67% a los 12 meses, lo que indica que la densidad es muy parecida a la del hueso adyacente.

En estudios similares utilizando el gen de la BMP4 se realizó histomorfometría⁸⁵, esta técnica tiene una limitante ya que solo se puede evaluar mediante cortes histológicos en un solo plano. En nuestros resultados se evaluó la cantidad total de hueso neoformado por medio de imágenes 3D, lo que indica que se puede calcular la formación total de hueso en el defecto el cual fue en el grupo experimental del

90.4% a un año, comparado con el grupo control con tan solo un 58.73% en promedio.

Los resultados de la evaluación de la cantidad de hueso neoformado se refuerzan con los resultados histológicos, ya que en los grupos experimentales se observa la formación de tejido óseo normal desde los 4 meses. En este periodo de tiempo se pudo observar la formación de islas de tejido óseo rodeadas con tejido conectivo fibroso denso, en el centro del defecto lo que indica que probablemente hubo una transfección exitosa en las células que se encuentran en medio del defecto, ya que si comparamos con los controles se observó una mínima formación ósea en los bordes únicamente. Huang⁸⁵ obtuvo resultados histológicos parecidos, reportando a las 15 semanas también la formación de islas de tejido óseo lamelar rodeado de tejido conectivo fibroso denso. En los resultados de este estudio, a los 7 meses se observó que el defecto estaba completamente regenerado. Poniendo en evidencia que al utilizar el gen de CEMP1 se tiene una capacidad osteogénica elevada. En contraste con los grupos controles donde se observa reacción perióstica indicando la formación de una cicatriz.

9. Conclusiones

Los resultados del presente trabajo demuestran que el gen de CEMP1 induce regeneración ósea en defectos de tamaño crítico en calvarias de ratas *Wistar*.

El hueso neoformado es histológicamente igual al hueso adyacente al defecto, así como su densidad mineral ósea.

El uso del gen de CEMP para regeneración ósea en calvarias de ratas *Wistar* no desarrolló patologías aparentes después de un año.

La realización de estudios de regeneración con el plásmido de CEMP1 permite establecer el uso potencial terapéutico, para promover a futuro la regeneración de los tejidos periodontales y siendo ambiciosos incluso a estructuras óseas que se han perdido debido a enfermedades, defectos congénitos, cáncer, entre otros, aplicándolo así en la medicina regenerativa de tejidos mineralizados.

10. Referencias bibliográficas.

1. Nanci, A. & Bosshardt, D. D. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000* **40**, 11–28 (2006).
2. Cho, M. I. & Garant, P. R. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol 2000* **24**, 9–27 (2000).
3. Schroeder, H. E. & Listgarten, M. A. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol 2000* **13**, 91–120 (1997).
4. Bartold, P. M., Walsh, L. J. & Narayanan, A. S. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol 2000* **24**, 28–55 (2000).
5. Beertsen, W., McCulloch, C. A. & Sodek, J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000* **13**, 20–40 (1997).
6. Komiyama, Y. *et al.* Tenomodulin expression in the periodontal ligament enhances cellular adhesion. *PLoS One* **8**, e60203 (2013).
7. Nanci, A. in *J Struct Biol* **126**, 256–269 (1999 Academic Press., 1999).
8. Bosshardt, D. D. & Selvig, K. A. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000* **13**, 41–75 (1997).
9. Page, R. C. & Baab, D. A. A new look at the etiology and pathogenesis of early-onset periodontitis. Cementopathia revisited. *J Periodontol* **56**, 748–751 (1985).
10. Glimcher, M. J. Mechanism of calcification: role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo. *Anat Rec* **224**, 139–153 (1989).
11. Schek, R. M., Wilke, E. N., Hollister, S. J. & Krebsbach, P. H. Combined use of designed scaffolds and adenoviral gene therapy for skeletal. *Biomaterials* **27**, 1160–1166 (2006).
12. Vidal, B. C., Mello, M. L. & Valdrighi, L. Histochemical and anisotropical aspects of the rat cementum. *Acta Anat* **89**, 546–559 (1974).
13. Vukicevic, S., Luyten, F. P. & Reddi, A. H. Stimulation of the expression of osteogenic and chondrogenic phenotypes in vitro by osteogenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8793–8797 (1989).

14. Pearson, C. H. & Gibson, G. J. Proteoglycans of bovine periodontal ligament and skin. Occurrence of different hybrid-sulphated galactosaminoglycans in distinct proteoglycans. *Biochem J* **201**, 27–37 (1982).
15. Bartold, P. M., Miki, Y., McAllister, B., Narayanan, A. S. & Page, R. C. Glycosaminoglycans of human cementum. *J Periodontal Res* **23**, 13–17 (1988).
16. Scott, J. E. & Orford, C. R. Dermatan sulphate-rich proteoglycan associates with rat tail-tendon collagen at the d band in the gap region. *Biochem J* **197**, 213–216 (1981).
17. Cheng, H., Caterson, B., Neame, P. J., Lester, G. E. & Yamauchi, M. Differential distribution of lumican and fibromodulin in tooth cementum. *Connect Tissue Res* **34**, 87–96 (1996).
18. Worapamorn, W., Xiao, Y., Li, H., Young, W. G. & Bartold, P. M. Differential expression and distribution of syndecan-1 and -2 in periodontal wound healing of the rat. *J Periodontal Res* **37**, 293–299 (2002).
19. Cheng, H., Caterson, B. & Yamauchi, M. Identification and immunolocalization of chondroitin sulfate proteoglycans in tooth cementum. *Connect Tissue Res* **40**, 37–47 (1999).
20. Petersson, U., Hultenby, K. & Wendel, M. in *Eur J Oral Sci* **111**, 128–136 (2003).
21. Arzate, H., Chimal-Monroy, J., Hernandez-Lagunas, L. & Diaz de Leon, L. Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *J Periodontal Res* **31**, 144–148 (1996).
22. Bosshardt, D. D., Sculean, A., Windisch, P., Pjetursson, B. E. & Lang, N. P. in *J Periodontal Res* **40**, 158–167 (Blackwell Munksgaard 2005., 2005).
23. Bosshardt, D. D., Zalzal, S., McKee, M. D. & Nanci, A. in *Anat Rec* **250**, 13–33 (1998).
24. Bronckers, A. L., Farach-Carson, M. C., Van Waveren, E. & Butler, W. T. Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin, and dentin sialoprotein during dental root formation and early cementogenesis in the rat. *J Bone Min. Res* **9**, 833–841 (1994).
25. Bronckers, A. L., Gay, S., Dimuzio, M. T. & Butler, W. T. Immunolocalization of gamma-carboxyglutamic acid containing proteins in developing rat bones. *Coll Relat Res* **5**, 273–281 (1985).

26. A, M. A. *et al.* Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by. *Biochem Biophys Res Commun* **358**, 763–769 (2007).
27. Carrington, J. L. & Reddi, A. H. Temporal changes in the response of chick limb bud mesodermal cells to transforming growth factor beta-type 1. *Exp Cell Res* **186**, 368–373 (1990).
28. Chen, C. C. & Boskey, A. L. Mechanisms of proteoglycan inhibition of hydroxyapatite growth. *Calcif Tissue Int* **37**, 395–400 (1985).
29. Cho, M. I., Lin, W. L. & Genco, R. J. Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodontol* **66**, 522–530 (1995).
30. Cuisinier, F. J. *et al.* Compositional variations in apatites with respect to preferential ionic extraction. *Ultramicroscopy* **36**, 297–305 (1991).
31. D'Errico, J. A. *et al.* in *Bone* **20**, 117–126 (1997).
32. Dean, D. D. *et al.* in *Cells Tissues Organs* **171**, 117–127 (2002 S. Karger AG, Basel, 2002).
33. Deutsch, D. *et al.* in *Eur J Oral Sci* **114 Suppl** , 182–183,381 (2006).
34. Downie, S. A. & Newman, S. A. in *Dev Biol* **162**, 195–208 (1994).
35. Dunker, A. K. & Obradovic, Z. in *Nat Biotechnol* **19**, 805–806 (2001).
36. Esposito, M., Coulthard, P., Thomsen, P. & Worthington, H. V. in *J Dent Educ* **68**, 834–844 (2004).
37. Fong, C. D. & Hammarstrom, L. in *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **90**, 218–223 (2000).
38. Froum, S. J., Gomez, C. & Breault, M. R. Current concepts of periodontal regeneration. A review of the literature. *N Y State Dent J* **68**, 14–22 (2002).
39. Bosshardt, D. D. & Nanci, A. in *J Clin Periodontol* **31**, 184–192 (2004).
40. Gestrelus, S., Andersson, C., Lidstrom, D., Hammarstrom, L. & Somerman, M. In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol* **24**, 685–692 (1997).
41. Gestrelus, S., Lyngstadaas, S. P. & Hammarstrom, L. Emdogain--periodontal regeneration based on biomimicry. *Clin Oral Investig* **4**, 120–125 (2000).

42. Gibson, W. A. & Fullmer, H. M. Histochemistry of the periodontal ligament. II. The phosphatases. *Periodontics* **5**, 226–232 (1967).
43. Giachelli, C. M. & Steitz, S. in *Matrix Biol* **19**, 615–622 (2000).
44. Giannobile, W. V, Finkelman, R. D. & Lynch, S. E. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J Periodontol* **65**, 1158–1168 (1994).
45. Giannobile, W. V & Somerman, M. J. Growth and amelogenin-like factors in periodontal wound healing. A systematic review. *Ann Periodontol* **8**, 193–204 (2003).
46. Gibson, C. W. *et al.* in *J Biol Chem* **276**, 31871–31875 (2001).
47. Goldberg, H. A., Warner, K. J., Stillman, M. J. & Hunter, G. K. Determination of the hydroxyapatite-nucleating region of bone sialoprotein. *Connect Tissue Res* **35**, 385–392 (1996).
48. Goldstein, M., Brayer, L. & Schwartz, Z. A critical evaluation of methods for root coverage. *Crit Rev Oral Biol Med* **7**, 87–98 (1996).
49. Gould, T. R., Melcher, A. H. & Brunette, D. M. Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding. *J Periodontal Res* **15**, 20–42 (1980).
50. Grzesik, W. J. & Narayanan, a. S. S. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med* **13**, 474–484 (2002).
51. Grzesik, W. J. *et al.* in *J Biol Chem* **277**, 43638–43647 (2002).
52. Guida, L. *et al.* In vitro biologic response of human bone marrow stromal cells to enamel matrix derivative. *J Periodontol* **78**, 2190–2196 (2007).
53. Hamamoto, Y., Nakajima, T., Ozawa, H. & Uchida, T. Production of amelogenin by enamel epithelium of Hertwig's root sheath. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **81**, 703–709 (1996).
54. Hammarstrom, L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol* **24**, 658–668 (1997).
55. Hammarstrom, L., Alatli, I. & Fong, C. D. Origins of cementum. *Oral Dis* **2**, 63–69 (1996).

56. Hammarstrom, L., Heijl, L. & Gestrelus, S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol* **24**, 669–677 (1997).
57. Hashimoto, F. *et al.* in *Arch Oral Biol* **46**, 585–592 (2001).
58. Arzate, H., Olson, S. W., Page, R. C., Gown, A. M. & Narayanan, A. S. Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J* **6**, 2990–2995 (1992).
59. Valdés De Hoyos, a *et al.* in *J Dent Res* **91**, 203–209 (2012).
60. Álvarez-Pérez, M. A., Narayanan, S., Zeichner-David, M., Rodriguez Carmona, B. & Arzate, H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone* **38**, 409–419 (2006).
61. Villarreal-Ramírez, E. *et al.* Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): primary role. *Biochem Biophys Res Commun* **384**, 49–54 (2009).
62. Enrique, R. Papel inductor de la proteína del cemento 1 recombinante humana (hrCEMP1) en el proceso de mineralización in vitro. *Lab. Biol. periodontal y tejidos Miner. Maestria*, 67 (2010).
63. Paula-Silva, F. W. *et al.* in *Calcif Tissue Int* **87**, 144–157 (2010 Elsevier B.V, 2010).
64. Silvia, M. Efectos de la Proteína del Cemento 1 recombinante humana (hrCEMP1), sobre la vía de transducción de p38, JNK y PI3K en la diferenciación celular en cementoblastos humanos. *Lab. Biol. periodontal y tejidos Miner. Fac. Odontol. Doctorado* , 68 (2013).
65. Stanley, R., Cotran, R. & Kumar, V. *Patología estructural y funcional*. 1533 (McGRAW-Hill interamericana, 1999).
66. Matsuda, N., Lin, W. L., Kumar, N. M., Cho, M. I. & Genco, R. J. Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol* **63**, 515–525 (1992).
67. Selvig, K. A., Wikesjo, U. M., Bogle, G. C. & Finkelman, R. D. Impaired early bone formation in periodontal fenestration defects in dogs following application of insulin-like growth factor (II). Basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta 1. *J Clin Periodontol* **21**, 380–385 (1994).

68. Chen, D., Zhao, M. & Mundy, G. R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* **22**, 233–241 (2004).
69. Alhezaimi, K. *et al.* Connective tissue-cementum regeneration: a new histologic regeneration following the use of enamel matrix derivative in dehiscence-type defects. A dog model. *Int J Periodontics Restor. Dent* **29**, 425–433 (2009).
70. Somerman, M. J., Archer, S. Y., Hassell, T. M., Shteyer, A. & Foster, R. A. Enhancement by extracts of mineralized tissues of protein production by human gingival fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol* **32**, 879–883 (1987).
71. Verma, I. M. & Somia, N. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* **389**, 239–42 (1997).
72. O'Connor, T. P. & Crystal, R. G. Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 261–76 (2006).
73. Ratko, T. A., Cummings, J. P., Blebea, J. & Matuszewski, K. A. Clinical gene therapy for nonmalignant disease. *Am J Med* **115**, 560–569 (2003).
74. Roth, J. A. & Cristiano, R. J. Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst* **89**, 21–39 (1997).
75. Gomez-Navarro, J., Curiel, D. T. & Douglas, J. T. Gene therapy for cancer. *Eur J Cancer* **35**, 867–885 (1999).
76. Hitt, M. M. & Gauldie, J. Gene vectors for cytokine expression in vivo. *Curr Pharm Des* **6**, 613–632 (2000).
77. Romano, G., Michell, P., Pacilio, C. & Giordano, A. Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells* **18**, 19–39 (2000).
78. Nishikawa, M. & Huang, L. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther* **12**, 861–870 (2001).
79. Mountain, A. Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol* **18**, 119–128 (2000).
80. Wolff, J. A. & Budker, V. The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Adv Genet* **54**, 3–20 (2005).
81. Al-Dosari, M. S. & Gao, X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *AAPS J.* **11**, 671–81 (2009).

82. Glover, D. J., Lipps, H. J. & Jans, D. a. Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 299–310 (2005).
83. Rohanizadeh, R., Swain, M. V & Mason, R. S. Gelatin sponges (Gelfoam) as a scaffold for osteoblasts. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19**, 1173–82 (2008).
84. Gysin, R., Wergedal, J, Sheng, M. & Lau, H. *Ex vivo gene therapy with stromal cells transduced with a retroviral vector containing the BMP4 gene completely heals critical size calvarial defect in rats.* *Nat, Gene, Ther* **9**, 991–999 (2002).
85. Huang, Y., Simmons, C., Kaigler, D., & Mooney, D. Bone regeneration in a rat cranial defect with delivery of PEI-condensed plasmid DNA encoding for bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), *Nat, Gene, Ther*, **12**, 418–426 (2005).