



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA PROTEÍNA
RECOMBINANTE HUMANA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO
RADICULAR (hrCAP) Y SU EFECTO CON INMUNOSUPRESORES

T E S I S

QUE PRESENTA

ANA LILIA GARCÍA HERNÁNDEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

Tutor:

DR. HIGINIO ARZATE





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EL ÉXITO

Reír mucho y a menudo; ganarse el respeto de las personas inteligentes y el aprecio de los niños; merecer el elogio de los críticos sinceros y mostrarse tolerante con las traiciones de los falsos amigos; saber apreciar la belleza y hallar lo mejor en el prójimo; dejar un mundo algo mejor, bien sea por medio de un hijo sano, de un rincón de jardín o de una condición social redimida; saber que al menos una vida ha alentado más libremente gracias a la nuestra: eso es haber triunfado.

RALPH WALDO EMERSON

La gran finalidad de la vida no es el conocimiento, sino la acción.

THOMAS HENRY HUXLEY

Agradecimientos

Al Dr. Higinio Arzate, mi tutor. Gracias por permitirme trabajar hombro a hombro contigo y permitirme aprender mucho de ti en el ámbito laboral y científico. Pero sobre todo te agradezco el darme la oportunidad de conocer a la persona detrás del tutor, por nuestras pláticas científicas y personales. Ha sido una experiencia fascinante y enriquecedora hacer mi maestría contigo.

Gracias por ser más que mi maestro y mi tutor.

A la Dra. Ana Ma. Fernández, por todo su apoyo, animo y apoyo cuando me hacia falta, por sus observaciones a mi investigación. Gracias por brindarme su amistad y cariño.

A los miembros de mi jurado de examen de grado. Dra. Patricia Tato, Dr. Luis Felipe Jiménez, Dr. Marco Antonio Velazco, Dra. Argelia Almager. Muchas gracias por leer mi tesis y darme sus comentarios. En verdad fue muy enriquecedor para este trabajo su opinión.

A mis compañeros del laboratorio, Marco, Bruno, Eduardo, Jose Luis, Mercedes, Enrique, Juan Luis, muchas gracias por brindarme su amistad, sus puntos de vista, por ayudarme y enseñarme durante mi formación académica y la realización de esta investigación.

A mis amigos Nadia e Isaac, gracias por su amistad, por su apoyo cuando mas lo necesitaba, por compartir mi estrés y mis proyectos.

A mis padres, Aurelio e Isabel y mis hermanos Ely, Clemen y Bety, muchas gracias por apoyarme tanto y respetar mis decisiones, por entender mi pasión a la investigación y querer compartirla. Sin ustedes este trabajo no hubiera sido posible. No me bastarían los días para agradecerles todo lo que han hecho por mi.

A mi esposo, Gustavo, muchas gracias por tu apoyo, tu confianza y tu fe en mi.

Índice

Resumen	- 6
Abstract	- 7
CAPITULO I	- 8
Cemento Radicular.....	- 8
Desarrollo del cemento radicular.	- 8
Clasificación del cemento radicular.....	- 9
Composición del cemento radicular.	- 10
Participación de proteínas colágenas y no colágenas en la biomineralización en el cemento radicular.....	- 10
Estrategias para la reparación y la regeneración periodontal.....	- 13
Participación de la CAP en la regeneración del cemento radicular.....	- 17
CAPITULO II	- 19
Inmunosupresores.	- 19
Ciclosporina (CsA)	- 20
Tracolimus o Fk506.....	- 21
Ácido micofenólico (MPA).....	- 22
Participación de CsA, Fk506 y MPA en los tejidos mineralizados	- 23
Planteamiento del problema y justificación	- 26
Hipótesis	- 27
Objetivo general.....	- 28
Objetivos específicos.....	- 28
CAPITULO III	- 29
Material y Métodos.....	- 29
Clonación y expresión de la hrCAP.....	- 29
Inmunodetección.....	- 29
Purificación.....	- 30
Cultivo celular.....	- 30
Ensayo de la proliferación celular	- 30
Ensayo de diferenciación celular	- 31
Determinación de la Actividad específica de la Fosfatasa Alcalina.....	- 32
Ensayos de Mineralización	- 33
Análisis estadístico.....	- 34
CAPITULO IV	- 35
Resultados	- 35
Purificación de la hrCAP	- 35
Ensayo de la proliferación celular	- 36
Ensayo de diferenciación celular	- 36
Determinación de la Actividad específica de la Fosfatasa Alcalina.....	- 44
Ensayos de biomineralización	- 44
Discusión	- 46
Conclusiones.....	- 50
Referencias.....	- 51

Resumen

Introducción. La cementogénesis es el proceso más importante en la regeneración periodontal, los mecanismos celulares y moleculares que la regulan no han sido esclarecidos a la fecha. El cemento radicular contiene proteínas específicas, como la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP) que se ha inmunolocalizado en células paravasculares del ligamento periodontal, espacios endosteales del hueso alveolar y se ha reportado que favorece la diferenciación de células indiferenciadas hacia un fenotipo mineralizante. Los inmunosupresores son drogas usadas para evitar el rechazo de trasplante de órganos, los más usados son la ciclosporina A (CsA), Fk506 y el ácido micofenólico (MPA). Se ha visto que el Fk506 y la CsA incrementan la diferenciación osteoblástica, la CsA posiblemente estimula la diferenciación de células progenitoras a un fenotipo cementoblástico. **Objetivo.** Determinar los efectos de la hrCAP con CsA, FK506 o MPA durante el proceso de biomineralización. **Métodos.** Se evaluó la proliferación celular, y la expresión de los ARNm de: ALP, Col1, CAP, CEMP1, OCN, OPN, BSP, TGF-beta y GDF5 por RT-PCR. Se realizaron ensayos para determinar la actividad específica de ALP, y la cuantificación del contenido mineral para evaluar la mineralización. **Resultados.** La CsA y el Fk506 incrementan significativamente la proliferación con la hrCAP, el MPA inhibe la proliferación celular. La CsA con la hrCAP incrementa la expresión de ALP y OCN a los 3 días de cultivo, CAP y CEMP-1 a los 7 días y TGF-beta a los 14 días de cultivo. El Fk506 con la hrCAP parece tener un efecto inhibitorio en la diferenciación celular. El MPA en combinación con la hrCAP incrementa la expresión de ALP y Col-1 a los 3 días de cultivo, de CAP y TGF-beta a los 7 y CEMP-1 a los 14 días. La hrCAP con la CsA incrementa la actividad específica de la ALP y el depósito de Calcio en cultivo de un modo significativo. El FK506 con la hrCAP tiene un efecto similar, incrementa la actividad de la ALP y el depósito de calcio en cultivo con respecto al control a partir de los 7 días de cultivo. El MPA con la hrCAP inhibe la actividad específica de la ALP y el depósito de Calcio. **Conclusiones.** El Fk506 con la hrCAP promueve la proliferación celular y la mineralización de la matriz extracelular por medio del incremento de la actividad específica de la ALP y el depósito de calcio en cultivo de células derivadas del cementoblastoma humano. Sin embargo, inhibe la diferenciación celular. El MPA con la hrCAP inhibe la proliferación celular y la mineralización de la matriz extracelular. Contrariamente, promueve fuertemente la diferenciación celular hacia un fenotipo mineralizante-cementoblástico. Las células derivadas del cementoblastoma mostraron sensibilidad particular a la CsA con la hrCAP promoviendo los procesos biológicos de proliferación, diferenciación celular a un fenotipo cementoblástico y mineralización de la matriz extracelular. La combinación de la CsA con la hrCAP pudiera ser usada como modelo para promover la formación de cemento en un sistema *in vitro* y estudiar los mecanismos celulares y moleculares de la cementogénesis y proponer la utilización de hrCAP+CsA como una alternativa terapéutica local para lograr la regeneración de las estructuras periodontales.

Abstract

Introduction. The cementogenesis is the most important process in periodontal regeneration; however, the cellular and molecular mechanisms of this process have not been elucidated to date. The cementum contains specific proteins: the cementum attachment protein (CAP) which has been located in paravascular cells, endosteal spaces of alveolar bone, and favors the differentiation of stem cells towards a mineralizing phenotype. Immunosuppressive drugs are used to avoid the rejection of organ transplant, the most used are cyclosporin A (CsA), Fk506 (tacrolimus) and micophenolic acid (MPA). It has been reported that the Fk506 and CsA increase osteoblastic differentiation, CsA possibly stimulates the differentiation of progenitor cells toward a cementoblastic phenotype. **Objective.** To determine the effects of hrCAP with CsA, Fk506 or MPA during the biomineralization process. **Methods.** Cellular proliferation was evaluated and RT-PCR for ALP, Col1, CAP, CEMP1, OCN, OPN, BSP, TGF-beta and GDF5 were performed to determine cellular differentiation. Alkaline phosphatase specific activity and quantitation of mineral content was performed. **Results.** CsA and Fk506 increasing significantly cell proliferation with hrCAP, and MPA inhibits cell proliferation. The CsA administered with hrCAP increases RNA expression of ALP and OCN at 3 days of culture, CAP and CEMP-1 increased at 7 days and TGF- beta increased at 14 days of culture. Fk506 in combination with hrCAP seems to induce an inhibitory effect on cell differentiation. MPA in combination with hrCAP increases the expression of ALP and Col-1 at 3 days of culture, CAP and TGF- beta at 7 days and CEMP-1 at 14 days of culture. CsA with hrCAP increased the ALP specific activity and the deposition of calcium in culture. Fk506 with hrCAP has a similar effect, increases ALP activity and deposition of calcium in culture when compared to control after 7 days of culture, and MPA inhibits specific activity of ALP and deposit of calcium. **Conclusions.** The Fk506 with hrCAP promotes cell proliferation and extracellular matrix mineralization through the increase of ALP specific activity and the deposit of calcium in cell culture derived from human cementoblastoma. However, inhibits cell differentiation. MPA with hrCAP inhibits cell proliferation and extracellular matrix mineralization. In contrast, strongly promotes cell differentiation towards a cementoblastic phenotype. Cells derived from cementoblastoma showed particular sensitivity to CsA with hrCAP promoting biological processes of proliferation, cell differentiation to a cementoblastic phenotype and mineralization of the extracellular matrix. The combined of CsA with hrCAP could be used as a model to promote training cement in a system *in vitro* and study the cellular and molecular mechanisms of cementogenesis and propose the use of hrCAP + CsA treatment option for achieving local regeneration of the periodontal structures.

CAPITULO I

Cemento Radicular.

El cemento radicular es un tejido conectivo mineralizado no uniforme que rodea la raíz dentaria desde la unión amelocementaria hasta el ápice. Este tejido es uno de los componentes más importantes del aparato de unión porque es el sitio en el cual las fibras del ligamento periodontal se insertan en el diente.

Desarrollo del cemento radicular.

La formación del periodonto se inicia con la formación de la raíz precedida por la formación de la corona dental. El mesénquima apical continúa proliferando para formar el periodonto, mientras el epitelio interno y externo se fusionan a nivel cervical formando una vaina epitelial llamada vaina epitelial de Hertwig. Las células de la vaina epitelial de Hertwig proliferan y migran hacia apical a través de los tejidos ectomesenquimatosos dentales, donde se dividen en la papila y el folículo dental. Las células de la vaina epitelial de Hertwig migran de la raíz a la región del futuro ligamento periodontal donde se reasocian para formar los restos epiteliales de Malassez. No todas las células de la vaina epitelial de Hertwig migran al sitio del ligamento periodontal, algunas entran en apoptosis y algunas mas permanecen en la superficie radicular (Kanenko *et al.* 1999).

A pesar de que se ha aceptado que la vaina epitelial de Hertwig juega un papel importante en el desarrollo de la raíz dental, la naturaleza precisa de su papel sigue siendo controversial. Algunos investigadores sugieren que el papel de la vaina epitelial de Hertwig es inducir la diferenciación de odontoblastos para formar la raíz dentaria (Owens *et al.* 1978, 1980., Selving *et al.* 1963, Ten Cate 1978, Thomas 1995) o inducir la diferenciación de las células del saco dental hacia cementoblastos (Orban 1952).

Las investigaciones actuales postulan que la vaina epitelial de Hertwig produce una membrana basal que contiene proteínas quimiotácticas que sirven para la migración de las células precementoblásticas (Mac Neil *et al.* 1993., Owens 1978., Slavkin *et al.* 1989., Thomas 1995., Rincón *et al.* 2006) e inducen la diferenciación hacia cementoblastos (Paynter *et al.* 1958., Slavkin *et al.* 1976., Slavkin 1988).

En el segundo estadio de la cementogénesis (cuando la raíz alcanza la oclusión y el cemento celular se ha formado), la proliferación de las células de la vaina epitelial de Hertwig se reduce considerablemente y algunas de ellas quedan atrapadas en la formación del mineral. También se ha sugerido que las células de la vaina epitelial de Hertwig experimentan una transformación epitelio-mesenquimal para convertirse en un cementoblasto funcional encargado de producir cemento acelular (Thomas 1995., Zeichner *et al.* 2003).

Se ha postulado que existen diferentes tipos de cementoblastos: los originados de la vaina epitelial de Hertwig vía transformación epitelio-mesenquimal, y los derivados del folículo dental que forman el cemento celular (Arzate *et al.* 1996., Bosshardt *et al.* 2005., Kagayama *et al.* 1998, Thomas 1995., Zeichner *et al.* 2003). También que las células progenitoras del ligamento periodontal (LP), osteoblastos y cementoblastos, adoptan una localización paravascular en el ligamento periodontal (figura 1), estas células exhiben algunas características de células troncales y pueden regenerar tejido funcional (McCulloch *et al.* 1995, 2000., Melcher 1976, 1985., Pitaru *et al.* 1994).

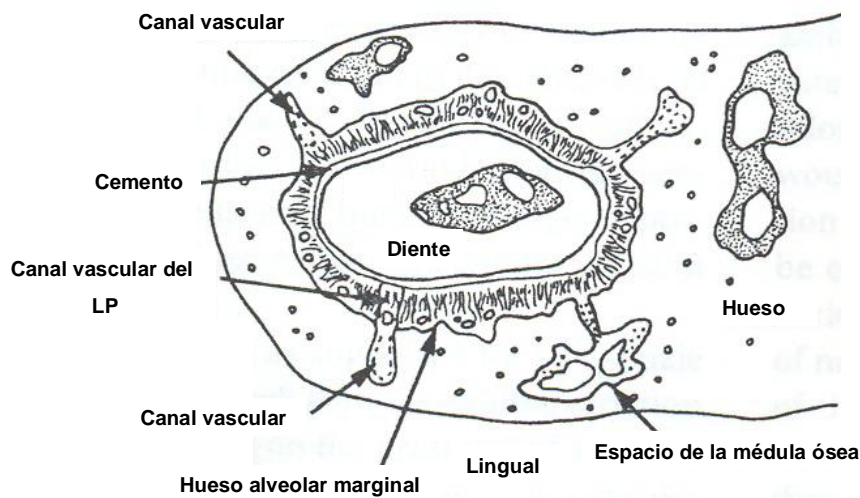


Figura 1. Esquema de corte trasversal de un molar de ratón y periodonto. Se observa la conexión anatómica entre los espacios endosteales y el LP, esta puede ser la ruta de migración de las células osteogénicas del LP. (Adaptado de McCulloch *et al.* 1995)

Clasificación del cemento radicular.

Actualmente el cemento radicular se clasifica según la presencia o ausencia de células y la organización de fibras colágenas (Schoroeder 1993):

1. Cemento afibrilar y acelular (AAC). Localizado en la unión dentina esmalte, esta estructura consiste de una matriz homogénea sin componentes celulares ni fibras de colágenas.
2. Cemento celular con fibras intrínsecas (CIFC). Cubre la parte apical e interradicular de las superficies radiculares donde los cementocitos están presentes a lo largo de estas zonas junto con las fibras colágenas intrínsecas. Está localizado en lagunas de resorción y sitios de fractura, por lo que podría estar involucrado en la reparación del cemento radicular.
3. Cemento acelular con fibras intrínsecas (AIFC). Similar al anterior. Ocupa zonas apicales e interradiculares, solo que no contiene células.

Composición del cemento radicular.

Histológicamente el cemento es muy parecido al hueso y a la dentina, sin embargo, este tejido cuenta con características específicas que lo hacen diferente, como la ausencia de irrigación sanguínea directa, no tiene drenaje linfático, carece de inervación y posee bajo recambio metabólico.

El cemento está constituido por una matriz inorgánica de la cual aproximadamente 50 % es hidroxiapatita, y una matriz orgánica compuesta predominantemente por colágena tipo I y III (Birkedal-Hansen *et al.* 1977). Esta matriz orgánica también contiene una variedad de proteínas no colágenas que estimulan la migración, adhesión y proliferación celular, la síntesis proteica y la mineralización durante la formación de la raíz, (D'Errico *et al.* 1997., MacNeil *et al.* 1996., Matsuura *et al.* 1995) como: la sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN), tenascina, laminina, fibronectina, osteonectina, osteocalcina (OCN), glucosaminoglucanos y proteoglucanos (condroitin sulfato 4, 6 y dermatan sulfato) (MacNeil & Thomas 1993., MacNeil *et al.* 1996.; Bronckers *et al.* 1994., D'Errico *et al.* 1997.; Kagayama *et al.* 1997) así como proteínas específicas de este tejido; la proteína de cemento (CEMP1) (Arzate *et al.* 2002) y la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP) (Wu *et al.* 1996., Saito *et al.* 2001., Arzate *et al.* 1992a).

Participación de proteínas colágenas y no colágenas en la biomineralización en el cemento radicular.

La colágena tipo I es la proteína mas abundante en la matriz orgánica, representa cerca del 90% del total de las proteínas del cemento radicular. Se ha descrito que los cristales minerales se forman inicialmente en los espacios de los agujeros presentes entre las fibras de colágena (Weiner 1986). Estas fibras de colágena proporcionan una estructura que funciona como andamio sobre el que se relacionan otras proteínas, las cuales cumplen diversas funciones. Algunas de ellas actúan como proteínas que favorecen la nucleación; que constituye el proceso por medio del cual, un número de moléculas se van agregando o depositando hasta formar núcleos de crecimiento mineral, a estos núcleos se siguen agregando más moléculas hasta formar una nueva fase. La nucleación puede ser homogénea si ocurre sin la participación de elementos externos como la biomineralización de la dentina, y heterogénea si existe participación de elementos externos (Bonucci 1992). La nucleación en el proceso de biomineralización del cemento radicular es una nucleación heterogénea.

La proteína más conocida y estudiada como nucleadora es la sialoproteína ósea (BSP), es una glicoproteína altamente fosforilada de 45-70 KDa con altos niveles de ácido glutámico (Cowles 1998). Diversos estudios han relacionado esta proteína con los procesos de mineralización (Hunter 1994) y de ser la responsable de la formación de tejido mineralizado en zonas ectópicas, fracturas y en procesos de mineralización anormal. La BSP contiene un motivo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), por lo que esta proteína se asocia a la adhesión celular y contribuye al inicio de la formación de tejido mineralizado sobre la superficie radicular (Somerman *et al.* 1991), además de activar vías de señalización celular a través de la activación de integrinas (Ganss 1999).

En contraste con las proteínas nucleadoras encontramos a las proteínas moduladoras, las cuales se encargan de modular el crecimiento, tamaño y forma de los cristales de hidroxiapatita. Las principales proteínas relacionadas con este proceso son la osteocalcina (OCN) y la osteopontina (OPN). La OCN es una proteína pequeña de 5.8 KDa, que presenta 2 ó 3 residuos de ácido glutámico que han sido γ -carboxilados por una enzima específica (γ -carboxilasa) la cual requiere de la vitamina K como cofactor (Suttie 1985). Estos residuos de ácido glutámico modificados (residuos gla) le confieren a la proteína una alta afinidad por iones minerales como el Ca^{2+} y cristales de hidroxiapatita (Ducy 1996). La osteocalcina también participa en la formación de cemento radicular de tipo celular y acelular (Bronkers *et al.* 1994., Kagayama *et al.* 1997). Tenorio *et al.* (1993) reportaron la presencia de OCN en el AEFC, pero no en asociación con cementoblastos.

Por otro lado, la OPN es una proteína altamente fosforilada y se caracteriza por la presencia de poliseuencias de ácido aspártico. Esta es una proteína que es expresada por células de varios tejidos, dentro de los cuales tenemos hueso, dentina, cemento, cartílago hipertrófico, riñón, cerebro, algunas glándulas y tejido vascular (Patarca 1993., Giachelli 1995., Butler 1996., Rittling 1999). Además la OPN modula e inhibe el crecimiento de los cristales de hidroxiapatita, ha demostrado promover la migración y la adhesión de células progenitoras del ligamento periodontal (PDL) durante la formación del cemento radicular (Mac Neil 1995., Hunter 1994).

Otra proteína de suma importancia en el proceso de biomineralización es la fosfatasa alcalina (ALP). Esta es una proteína glicosilada con actividad de enzima, localizada en la porción externa de la membrana citoplasmática (Low 1989) y también se encuentra en las vesículas de matriz, las cuales son organelos producidos por las células mineralizantes y están localizadas en la matriz extracelular, estas estructuras contribuyen a la mineralización de la matriz extracelular formando fosfatos de calcio amorfos y cristales de hidroxiapatita (Sela 1992). La ALP es también la responsable de regular las concentraciones extracelulares de fosfatos, desfosforilando diversas moléculas. La actividad de esta enzima se incrementa cuando comienza la mineralización de la matriz extracelular, por lo que es un indicador temprano de la biomineralización (Whyte 1989).

Durante el proceso de biomineralización es necesario que las células interactúen con su sustrato por medio de integrinas, estas son proteínas que actúan como receptores de membrana formando heterodímeros consistentes de una cadena α y una cadena β ; al ser proteínas

transmembranales poseen una porción citoplasmática unida al citoesqueleto. Estas proteínas favorecen la organización del citoesqueleto además de activar diversos procesos celulares, como la proliferación y la diferenciación. Esta interacción célula-sustrato propicia la expresión de numerosas moléculas por parte de las mismas células y de células del sistema inmune como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de crecimiento tipo insulínico (IGF-I ó II), proteínas morfogenéticas del hueso (BMP's), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento y diferenciación 5 (GDF-5) y citocinas entre otras, que se sabe estimulan la proliferación, (Gehron 1992) y diferenciación celular. La interacción de la célula con su sustrato también propicia a que expresen otras proteínas que favorecen la formación de la matriz extracelular, así como el desarrollo del sistema de inserción del periodonto donde las células pluripotenciales del folículo dental se diferencian en osteoblastos, cementoblastos o fibroblastos periodontales (Sena *et al.* 2003).

Durante este proceso de proliferación las células condicionan el sustrato modificándolo con las proteínas adecuadas para establecer las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (Gehron 1992). Durante el proceso proliferativo, las células secretan activamente proteínas, componentes de la matriz extracelular como lo son: la colágena tipo I, fibronectina y trombospondina las cuales participan en la adhesión celular. Los proteoglicanos como la decorina y el biglicano crean un microambiente favorable para que se lleve a cabo la mineralización de la matriz extracelular (Boyan 2001). En el cemento radicular de bovino en zonas cercanas al precemento y alrededor de lagunas donde se encuentran inmersos los cementocitos se han inmunoidentificado los proteoglicanos lumicano y fibroglicano (Cheng *et al.* 1996). La fibromodulina se ha encontrado en forma abundante en el ligamento periodontal durante el desarrollo del cemento; específicamente sobre la interfase del cemento y el ligamento periodontal. Por lo que se considera que puede tener un papel importante en la formación y mantenimiento de las fibras de Sharpey, además de regular la mineralización durante la cementogénesis (Matias *et al.* 2003). Los cementoblastos secretan diversos glucosaminoglucanos como el condroitin sulfato 4, 6 y el dermatan sulfato presentes en la unión cemento-dentina (Ho *et al.* 2005., Yamamoto *et al.* 2004)

Posteriormente, la proliferación celular disminuye, se da una disminución en la expresión de la colágena y comienza un incremento en la expresión y actividad de la fosfatasa alcalina, la cual actúa regulando las concentraciones de fosfato. En esta etapa se da un reordenamiento o modificación de la matriz extracelular eliminando o adicionando proteínas a ella (Gehron 1992). Las proteínas más estudiadas en esta etapa del proceso son la BSP, OPN y OCN. No se sabe con certeza el momento exacto donde comienzan a actuar, pero se ha observado que la BSP se presenta en etapas más tempranas de la biomineralización y en zonas de formación ósea *de novo*, mientras que la OCN, se presenta en etapas más tardías.

Estrategias para la reparación y la regeneración periodontal.

La enfermedad periodontal es una enfermedad crónica infecciosa que afecta los tejidos de soporte de los dientes, el periodonto. Resulta de una infección crónica provocada por bacterias que se localizan en las superficies dental y radicular. Como resultado de su presencia, el hospedador, intentando eliminarlas, desarrolla una respuesta inflamatoria e inmune que es la causa de la destrucción de los tejidos. La respuesta del hospedador no es sólo resultado de la presencia de las bacterias sino también de sus productos como endotoxinas. (Newman 2003)

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

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

Durante los años 50's y 60's la terapia periodontal estaba enfocada a la terapia quirúrgica resectiva con o sin injerto óseo, en la meta de disminuir la profundidad de la bolsa periodontal. Recientemente las investigaciones se han centrado en las terapias reconstructivas y regenerativas.

Los estudios de casos y ensayos clínicos, han proporcionado evidencia de que la regeneración periodontal se puede alcanzar, es decir la formación de hueso y cemento nuevo, así como del ligamento periodontal. Sin embargo, los resultados de las terapias regeneradoras hasta ahora desarrolladas aunque han tenido resultados positivos, son decepcionantes al considerar el grado de la regeneración y por el hecho de no ser predecibles (Ivanovski *et al.* 2001; Okuda *et al.* 2003; Zeichner 2006)

En dichos estudios clínicos, se han utilizado diversos biomateriales para inducir la regeneración ósea investigando su capacidad de estimular la formación de hueso nuevo. Estos materiales pueden clasificarse de la siguiente forma:

- Materiales aloplásticos, que son materiales sintéticos.
- Autoinjertos, que son injertos de tejido de un sitio a otro del mismo individuo
- Aloinjertos, que son injertos de tejido entre individuos de la misma especie, pero diferente composición genética.
- Xenoinjertos, que consisten en injertos entre diferentes especies.

Aunque el uso de estos biomateriales han dado algunos resultados clínicos positivos y evidencia radiográfica de una regeneración ósea, los exámenes histológicos revelan que estos materiales tienen poca capacidad osteoinductiva y generalmente promueven la formación de tejido conectivo denso fibroso (Garraway *et al.* 1998).

En otro acercamiento para inducir la regeneración periodontal, se ha aplicado localmente en la superficie radicular factores de crecimiento para facilitar los eventos de la cascada de cicatrización, permitiendo la formación de cemento nuevo y tejido conectivo.

Se piensa que los factores de crecimiento juegan un papel importante modulando la proliferación, la migración y la diferenciación celular en el periodonto (Gao *et al.* 1998., Helder *et al.* 1998., Ivanovski *et al.* 2001., Plemons *et al.* 1996., Shroff *et al.* 1996). Se ha sugerido que estas moléculas son producidas durante la formación del cemento y permanecen en la matriz del cemento maduro con el potencial de inducir la reparación o regeneración periodontal cuando es necesario (Somerman *et al.* 1987).

La producción de factores de crecimiento recombinantes han facilitado los estudios *in vitro* e *in vivo* para determinar la eficacia de estas moléculas en la regeneración periodontal.

Entre los factores de crecimiento actualmente utilizados están: el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Cho *et al.* 1995., Giannobile *et al.* 1994., Howell *et al.* 1997., Lynch *et al.* 1991., Park *et al.* 1995., Rutherford *et al.* 1992) y el factor de crecimiento tipo insulínico I (IGF-I) que han demostrado de un modo sinérgico regenerar las estructuras periodontales en perros y monos (Lynch *et al.* 1991., Rutherford *et al.* 1993).

Sin embargo, el problema en la aplicación de estos factores de crecimiento es el hecho de que algunos factores no tienen actividad específica en diversos linajes celulares en un tiempo y espacio determinado, así como la rápida pérdida del potencial de acción cuando son aplicados localmente y además se requieren concentraciones elevadas de los factores de crecimiento para obtener los resultados deseados (Beersten *et al.* 1997., Lynch *et al.* 1991).

Una alternativa para el uso de factores de crecimiento recombinantes es el uso de plaquetas en gel en combinación con un aloinjerto (Anitúa *et al.* 1999., D'Obarrio 2000). La limitante de esta terapia es que el uso tópico de las proteínas en los defectos óseos, provocando una biodisponibilidad transitoria de los factores de crecimiento en el sitio de la herida.

Otro grupo de factores de crecimiento que han demostrado tener un alto potencial para estimular la regeneración de hueso y cemento, son las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) (King *et al.* 1998., Ripamonti *et al.* 1997., Rutherford *et al.* 1993., Nakashima *et al.* 2003). Algunos de los miembros de esta familia se expresan normalmente durante el desarrollo del periodonto como la BMP-3 y la BMP-7, y se han inmunolocalizado en el hueso alveolar, cemento y ligamento periodontal. La BMP-2 ha sido localizada sólo en el hueso alveolar (Thesleff 2003., Yamashiro *et al.* 2003). Aunque el papel exacto de las BMPs en el desarrollo periodontal no ha sido determinado aún. Kobayashi *et al.* (1999) realizaron un estudio en el que determinaron que la BMP-2 recombinante no tiene efectos sobre el crecimiento y

diferenciación de las células del ligamento periodontal humano *in vitro*; aunque estimula la actividad de la ALP, marcador temprano de la diferenciación osteoblástica, pero no estimula su maduración ya que inhibe la expresión de la osteocalcina y la síntesis de la vitamina D₃. Paradójicamente, se ha encontrado que la BMP-2 inhibe la mineralización *in vitro* de los cementoblastos disminuyendo la expresión de BSP y colágena tipo I (Zhao *et al.* 2003). Recientemente, se ha visto que la aplicación de un polipéptido sintético de la BMP-6 en un defecto periodontal en rata incrementa la formación de hueso y cemento nuevo (Huang *et al.* 2005).

Quizás el uso de otros miembros de la familia de las BMP's, tales como los factores de crecimiento y diferenciación 5, 6 y 7 (GDF-5, 6, 7) pudieran proporcionar mejores y mas completos resultados en la regeneración periodontal. Estos factores se han detectado durante el desarrollo periodontal, en la superficie del hueso alveolar, cemento y en las fibras del ligamento periodontal (Slavkin *et al.* 1974)

Dentro de las limitaciones de usar BMPs están; la necesidad de usar altas dosis, que no tienen actividad específica en los diversos linajes celulares en un tiempo y espacio específico y la pérdida rápida de su potencial de acción al ser aplicados tópicamente (Beersten *et al.* 1997., Lynch *et al.* 1991).

Algunos de estos problemas se pueden superar con el uso de la tecnología de la transferencia de genes (ingeniería de tejidos). Así, Jin *et al.* (2003), usando un adenovirus que contenía el gen de la BMP-7, que fue traducido en fibroblastos de la dermis. La BMP-7 se purificó y la proteína se utilizó para tratar un defecto óseo mandibular en rata. Los resultados mostraron que induce la condrogénesis, con la subsiguiente osteogénesis y cementogénesis, sugiriendo que la ingeniería genética puede ser utilizada con éxito en la regeneración del hueso alveolar. Recientes estudios concluyen que a pesar de la promesas para conducir un meta-análisis en el efecto de los factores de crecimiento para la regeneración periodontal, los datos obtenidos hasta el momento son insuficientes y son necesarios mas ensayos clínicos (Giannobile *et al.* 2003., Zeichner 2006).

El uso de factores de crecimiento se ha extendido utilizando construcciones con matriz libre de células en la superficie radicular con el objetivo de promover la repoblación celular y aumentar la regeneración, las proteínas de matriz del esmalte son un ejemplo de esto. Esta matriz ha sido comercializada bajo el nombre de EMDOGAIN®. Existe evidencia de que esta matriz del esmalte puede asistir en la regeneración de tejidos periodontales (Hammarstrom *et al.* 1997., Wilson, 1999) ya que se han encontrado proteínas del esmalte en el cemento celular (Lindskog *et al.* 1982., Slavkin *et al.* 1976, 1989., Owens 1978). Se ha postulado que los derivados de la matriz del esmalte actúan como factores que estimulan la síntesis de matriz extracelular creando un ambiente propicio para la proliferación y diferenciación celular (Lysaght *et al.* 1998., Haase *et al.* 2001), induciendo la formación de cemento, hueso y dentina (Gestrelus *et al.* 2000., Greenstein 2000., Heard *et al.* 2000., Melcher 1985). Sin embargo, en muchos estudios los resultados obtenidos no son mejores a los obtenidos con los tratamientos previamente establecidos (Sculean *et al.* 2000, 2005). Los estudios histológicos revelaron que el tratamiento con EMDOGAIN® es impredecible, dando como resultado la formación de cemento

celular pero no de cemento acelular. El cemento celular se une parcialmente a la superficie radicular, similar al cemento formado en la regeneración tisular guiada.

La regeneración tisular guiada hace uso de membranas o andamios como barrera para dirigir los componentes celulares y guiar la regeneración, excluye la migración apical de células epiteliales gingivales y proporciona un espacio aislado para la migración de los precursores de los osteoblastos y cementoblastos periodontales. Esta terapia periodontal se basa en el fundamento científico de que en el ligamento periodontal se encuentran las células progenitoras requeridas para la regeneración periodontal (osteoblastos, cementoblastos, fibroblastos periodontales y gingivales) (Gottlow *et al.* 1986., Karting *et al.* 1993., Nyman *et al.* 1982). Sin embargo, se ha cuestionado si esta terapia produce una verdadera regeneración del cemento o solamente una reparación cementoide. El cemento formado de novo se caracteriza por un cemento celular que generalmente tiene poca adhesión a la superficie del esmalte dental (Kostopoulos *et al.* 2004).

Al parecer, la combinación de varias técnicas pueden ofrecer mejores resultados a través de la selección apropiada de células preparadas, en combinación con un biomaterial, con una mezcla de moléculas señaladoras y componentes extracelulares de matriz para permitir la proliferación y especialización de las células.

Las investigaciones más recientes se han enfocado al desarrollo de la ingeniería genética y el uso de células progenitoras para entender los mecanismos bioquímicos y moleculares que se llevan a cabo en la formación del periodonto, así como conocer las vías metabólicas que controlan estos mecanismos para lograr la regeneración periodontal. (McCulloch 1993., Grzesik & Narayanan 2000., Ivanovski *et al.* 2006., Bartold *et al.* 2006).

Para resolver estas interrogantes es necesario identificar, aislar y caracterizar poblaciones celulares que expresen el fenotipo del cemento radicular. Sin embargo, la población celular del ligamento periodontal es muy heterogénea, con linajes osteoblástico, cementoblástico y fibroblástico, lo que nos impide aislar una población puramente cementoblástica (Mina *et al.* 1987).

Se ha aislado y caracterizado parcialmente una línea celular a partir de un cementoblastoma humano que parece ser homogénea y clonal y que expresa el fenotipo del cemento celular humano. La naturaleza y propiedades estructurales del tejido mineral depositado por estas células son diferentes del tejido mineralizado depositado por células derivadas de hueso alveolar, por lo que estas células pueden ser consideradas como cementoblastos putativos (Slavkin *et al.* 1989., Somerman *et al.* 1990., Arzate *et al.* 1998, 2000). Las células derivadas del cementoblastoma humano nos ofrecen una oportunidad única para delucidar como los procesos moleculares de la cementogénesis son regulados *in vitro*.

Esta línea celular ha mostrado producir la proteína de cemento (CEMP-1), que promueve la mitogenicidad e induce la actividad específica de ALP en células del ligamento periodontal humano *in vitro* (Alvarez-Pérez *et al.* 2003) y la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP).

A la fecha la CEMP-1 y la CAP han sido las únicas moléculas identificadas específicas del cemento radicular (Arzate *et al.* 1992, 1994, 1996., Alvarez-Pérez *et al.* 2006), ambas capaces de identificar poblaciones cementoblásticas putativas tanto *in vitro* como *in vivo*. (Arzate *et al.* 2002).

Participación de la CAP en la regeneración del cemento radicular

La proteína de adhesión del cemento radicular (CAP) (Saito *et al.* 2001., Arzate *et al.* 1992a) ha sido aislada de extractos de cemento maduro, se ha purificado y caracterizado parcialmente (Wu *et al.* 1996., Mc Allister *et al.* 1990), tiene un Mr de 54-57000 Da, con una secuencia de aminoácidos que presenta cierta homología con la colágena tipo I y XII. Sin embargo, no se ha encontrado reacción cruzada en inmunotrasferencias entre la CAP y estas colágenas, así como tampoco con otras moléculas de adhesión (Wu *et al.* 1996). Se ha inmunolocalizado en la matriz del cemento radicular humano, en células paravasculares del ligamento periodontal y en espacios endosteales del hueso alveolar (Arzate *et al.* 1992). Donde se sugiere se encuentran las células progenitoras del ligamento periodontal, así como en cementoblastos putativos *in vitro* (Arzate *et al.* 1998, 2000) e *in vivo* (BarKana *et al.* 2000). La CAP ha mostrado promover la migración y la adhesión de células del ligamento periodontal y del hueso alveolar a la superficie radicular mas que los fibroblastos gingivales (Metzger 1998.; Olson *et al.* 1991., Pitaru 1995). Además la CAP induce la expresión de fosfatasa alcalina (ALP) y favorece la diferenciación de células mesenquimatosas indiferenciadas hacia un fenotipo mineralizante (Arzate *et al.* 1996). Tiene una alta afinidad por la fibronectina, hidroxiapatita, dentina y cemento radicular, esto probablemente a que tiene un motivo RGD en su secuencia (Pitaru *et al.* 1993., Mc Allister *et al.* 1990., Arzate *et al.* 1992). Sirve como marcador para identificar a las células progenitoras de los cementoblastos en el ligamento periodontal adulto humano (Bar-Kana *et al.* 1998., Liu *et al.* 1997) y afecta la diferenciación de estos progenitores *in vitro* (Saito *et al.* 2001).

Arzate *et al.* (1992) purificaron la CAP por cromatografía de inmunoafinidad con un anticuerpo policlonal anti-CAP acoplado a una columna de sefarosa. El anticuerpo fue producido a partir de la CAP obtenida del medio condicionante de los cementoblastos aislados de explantes de un cementoblastoma humano. Demostraron que la CAP promueve una mayor adhesión de fibroblastos gingivales humanos *in vitro* en comparación con la colágena tipo I.

Saito *et al.* (2001) generaron un anticuerpo monoclonal anti-CAP, denominado 3G9, con lo que se logró aislar la CAP de gérmenes dentarios de bovino. Esta proteína fue inmunolocalizada sobre la matriz del cemento radicular y en los cementoblastos. Los ensayos de adhesión *in vitro* realizados en este estudio, demostraron que esta proteína promueve la adhesión de células del folículo dental.

En lo que se refiere a los eventos de señalización intracelular inducidos por la CAP durante la adhesión celular, se sabe que estimula la actividad de la MAP cinasa induciendo la expresión de *fos* en fibroblastos gingivales humanos. Aunque se desconoce el receptor de la CAP que desencadena dichos eventos celulares (Saito *et al.* 1999). Por las funciones biológicas que ha mostrado la CAP se sugiere que ésta puede jugar un papel importante en la cementogénesis, como parte de la regeneración periodontal.

CAPITULO II

Inmunosupresores.

Los inmunosupresores son drogas utilizadas para prevenir el rechazo de trasplantes de órganos.

Se pueden clasificar de acuerdo a su mecanismo de acción (figura 2.):

- Fármacos que inhiben la activación de las células T, evitando que éstas ataquen al órgano trasplantado o generador de estímulos antigénicos: ciclosporina, tacrolimus, sirolimus
- Fármacos que inhiben la síntesis de DNA y RNA, y por lo tanto, la división celular: azatioprina, mofetil micofenolato, ciclofosfamida, metotrexato, penicilamina.
- Corticosteroides que suprimen la inflamación asociada a la reacción inmunológica
- Anticuerpos monoclonales que bloquean algunos factores implicados en el mecanismo de la reacción inmunológica como las interleucinas o el factor de necrosis tumoral.: basiliximab, el muromonab CD3, el daclizumab, adalimumab, infliximab.
- Otros productos producidos por recombinación genética que bloquean algunos de los mecanismos implicados en la reacción inmunológica: etanercept, alefacept
- Fármacos que actúan sobre el factor estimulante de colonias filgastrim, pegfilgastrim, molgramostin, lenogastrim.

Los inmunosupresores mas utilizados en la práctica clínica son la Ciclosporina A (CsA), el tacrolimus o Fk506 y el mofetil micofenolato (MMF)

Ciclosporina (CsA)

Es un decapeptido cíclico (figura 3.). Se obtiene a partir del hongo *Tolypocladium inflatum Gams* y se introdujo como inmunosupresor a principio de la década de los ochentas. Por su carácter lipofílico es soluble en medios lipídicos y disolventes orgánicos.

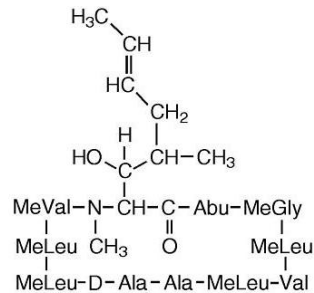


Figura 3. Estructura química de la CsA

Su mecanismo de acción consiste en unirse con la inmunofilina, ciclofilina, el complejo ciclosporinaA-ciclofilina bloquea a la serina/treonina fosfatasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina calcineurina, inhibiendo la translocación de NFAT al núcleo para la transcripción de citocinas inflamatorias como la interleucina-2 (IL-2), la interleucina 4 (IL4) y el TNF α , β e interferón γ (Espevik *et al.* 1987), bloqueando así la proliferación y la activación de linfocitos T. Se ha postulado que induce la proliferación celular mediante la inducción de TGF- β 1 (Suthathiran *et al.* 1996).

Sus efectos secundarios más importantes son la nefrotoxicidad y la neurotoxicidad, hipertensión arterial, hiperuricemia, hiperglucemia, hipercolesterolemia, hiperplasia gingival, toxicidad hepática y acidosis metabólica. La mayoría de ellas son leves y reversibles si se disminuye la dosis de CsA.

Ácido micofenólico (MPA)

Es el producto metabólico del mofetil micofenolato (MMF) (figura 5.). Se introdujo como agente inmunosupresor en la década de los 90's

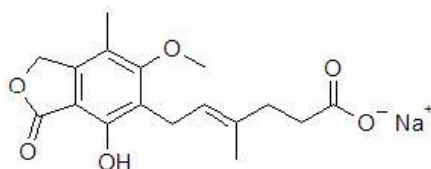
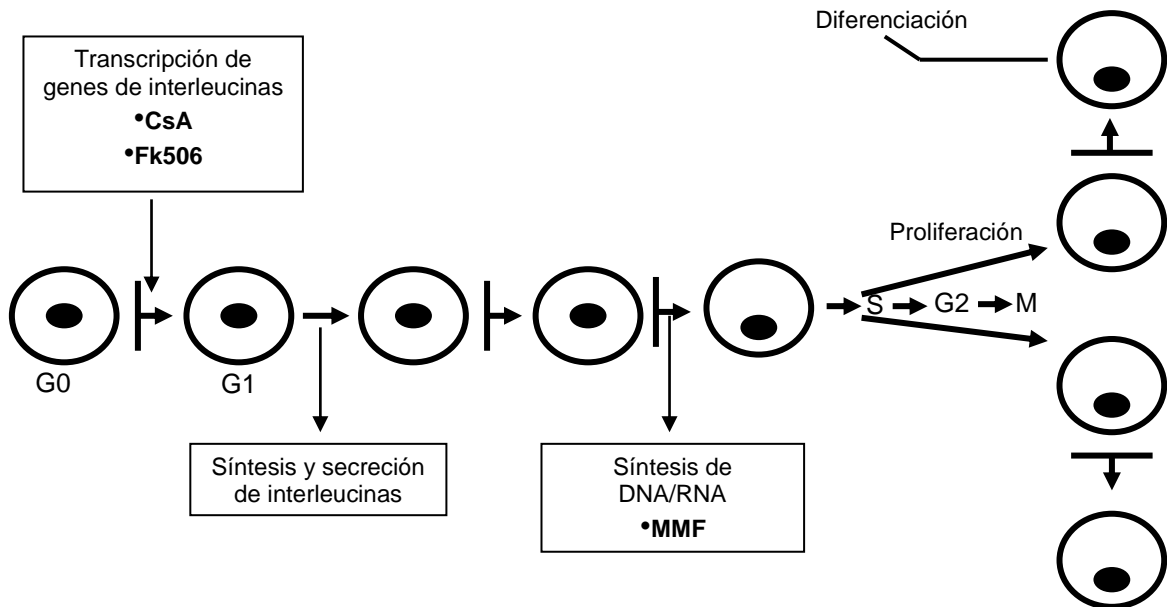


Figura 5. Estructura química del MPA

Su efecto inmunosupresor se debe a la inhibición del inosin fosfato deshidrogenasa (IMPDH) (Sinthack *et al.* 1996). La IMPDH es una enzima que participa en la síntesis de novo de nucleótidos purinados. Los linfocitos utilizan fundamentalmente la vía de novo de nucleótidos purinados, lo que los hace especialmente sensibles a la acción del MPA. Esto a su vez llevará a la disminución de la síntesis de GTP, componente fundamental para la transformación mitógena del linfocito (Bornhäuser 1999., Allison 1993., Natsumeda 1993). Hay dos isoformas de la IMPDH, la tipo I que se encuentra presente en los linfocitos en reposo y la tipo II que es la enzima predominante en los linfocitos activados. La IMPDH tipo II es aproximadamente cinco veces más sensible a la inhibición por el MPA que la tipo I. Aunque no está claro que isoforma es la diana más importante (Sintchak 1996). MPA puede tener impacto en la producción de anticuerpos al bloquear la proliferación de los linfocitos B (Jonson 2003). Además de esta acción sobre la proliferación linfocitaria, la deficiencia inducida en los nucleótidos guanosínicos por el MPA inhibe la transferencia de manosa y fructosa a las moléculas de adhesión glucoproteicas, como selectinas e integrinas. Las selectinas son necesarias para la unión mediada por integrinas del leucocito al endotelio del injerto. Por ello MPA puede interferir con esta unión y en el reclutamiento de leucocitos y monocitos en los sitios de inflamación. Además la disminución de GTP inducida por MPA puede alterar otras funciones de los linfocitos T entre las que se incluyen la actividad de las proteínas G involucradas en la señalización. MPA induce apoptosis linfocitaria y altera la expresión de marcadores de superficie celular (como CD25, CD134, CD11a, CD28 y CD71) y de citocinas (Budee 2004). También se ha visto que el MPA induce la apoptosis activando la cascada de señalización de las MAP cinasas activando p38 en células secretoras de insulina (Kimab 2006).

Entre sus principales efectos secundarios cabe destacar la toxicidad medular, (leucopenia, trombocitopenia y anemia) pero los más frecuentes son las alteraciones gastrointestinales (diarrea y dispepsia gástrica).

Figura 2. Esquema. Inhibición de los inmunosupresores CsA, Fk506 y MMF en el ciclo celular linfocitario



Participación de CsA, Fk506 y MPA en los tejidos mineralizados

Se ha reportado que estos inmunosupresores participan en el proceso de osteogénesis. La CsA, reduce la expresión de osteopontina, fibronectina, y ALP *in vitro* (Mc Cauley *et al.* 1992), inhibe la resorción ósea *in vitro* (Chowdhury *et al.* 1991) e *in vivo* (Orcel *et al.* 1989) y promueve la formación de hueso *in vivo* (Scholberg *et al.* 1989). Burcu *et al.* (2006) realizaron un estudio en ratas con enfermedad periodontal a las que les administró CsA, encontrando que se reducía la resorción y se estimulaba la formación de hueso alveolar.

Se ha reportado que la CsA induce alteraciones en la dentinogénesis en molares de rata y produce el depósito de una capa gruesa de cemento radicular a todo lo largo de la raíz dental (Ayanoglou 1997). La CsA promueve la formación de osteodentina e islotes de tejido parecido a cemento en molares de rata y es posible que estimule la diferenciación de células progenitoras paravasculares a un fenotipo cementoblástico *in vivo*. (Ayanoglou 1998). Mas recientemente, se ha visto que la CsA promueve la diferenciación celular y la mineralización en cementoblastos *in vitro* (Arzate *et al.* 2005). Shen *et al.* (2005) evaluaron el efecto de la CsA en la formación de dentina y cemento celular durante el desarrollo de ratas,

observaron que la tasa de aposición de cemento celular a nivel apical aumentó significativamente cuando se les administraba CsA.

También se ha reportado que el Fk506 y la CsA en combinación con BMP, provoca un incremento en la diferenciación osteoblástica, incrementando la actividad específica de ALP, osteocalcina y Smad6 en células estromales de médula ósea de ratón y en osteoblastos de ratón *in vitro* (Tang *et al.* 2002). Ogawa *et al.* (1998) reportaron que el Fk506 y CsA en combinación con Vitamina D activa incrementa la expresión de OPN, OCN y Col I α e incrementa la actividad específica de la ALP. Se ha visto que la administración de Fk506 y CsA en ratas induce mineralización intratubular corticomedular en riñón (Lothar *et al.* 1997).

Yoshikawa *et al.* 2000 estudiaron el efecto *in vivo* del Fk506, al implantar células de médula ósea en hidroxiapatita subcutáneamente en ratas inmunocomprometidas. Observaron que las ratas tratadas con FK506 aumentaron la actividad específica de ALP y la expresión de OCN en comparación a las ratas a las que se les implantaron las células de médula ósea pero no fueron tratadas con Fk506. Por lo que sugieren que el Fk506 estimula las células mesenquimales y osteoprogenitoras a diferenciarse a osteoblastos.

Sin embargo, *in vivo* los inmunosupresores inhibidores de la calcineurina como la CsA y Fk506 provocan una severa y rápida pérdida ósea en modelos animales y en humanos, el mecanismo por el cual este efecto se lleva a cabo se desconoce. Al parecer los linfocitos T juegan un papel importante en la vía de activación de RANKL (Hirotsu *et al.* 2004., Varanasi & Datta 2005., Tamler & Epstein 2006). En estudios clínicos en humanos se ha visto que causan osteopenia, (Shane 1993.; Mvowowitz 1988., Smallwood 2002) y osteoporosis (Stekelenburg *et al.* 1998.; Hofgauer *et al.* 2001). Fornoni (2001) observó que la CsA altera la síntesis y degradación de la matriz extracelular de osteoblastos *in vitro* disminuyendo la producción de colágena tipo I e incrementando la actividad de la matriz metaloproteínasa 9 (MMP9) así como inhibiendo la proliferación celular.

Varios estudios han demostrado que la administración de CsA incrementa la actividad osteoclástica y la resorción ósea (Mvowowitz *et al.* 1989.; Epstein 1991). Hofbauer *et al.* (2001) proponen que el mecanismo mediante el cual la CsA y el Fk506 provocan pérdida ósea es mediante la disminución de la expresión de los ARNm de la osteoprotegerina (OPG) y aumenta la expresión del ligando activador del receptor de NF- κ B (RANKL). OPG y RANKL. La OPG inhibe la función osteoclástica y neutraliza RANKL. RANKL se une a su receptor RANK en los preosteoclastos y osteoclastos promoviendo su diferenciación y activación.

Las diferencias en los efectos de la CsA y Fk506 en el metabolismo óseo entre estudios *in vitro* e *in vivo* se pueden deber al hecho de que en modelos animales es más representativo la influencia de múltiples y complejas interacciones entre la CsA y el sistema inmune, comparado con los sistemas *in vitro* donde el factor estudiado y sus interacciones son controladas. Sin embargo es importante enfatizar el hecho de que los estudios *in vitro* son el primer acercamiento a lo que puede pasar *in vivo*.

Estas discrepancias del efecto de los inhibidores de la calcineurina en la resorción ósea también pueden explicarse por el uso de diferentes concentraciones y la vía de administración. Se ha visto que a dosis altas, la CsA inhibe la mineralización (Klein *et al.* 1997). Buchinsky *et al.* (1995) sugiere que la supresión sistémica de linfocitos T por CsA es responsable de la osteopenia *in vivo*. Los resultados de los experimentos *in vitro* nos permiten presuponer otro mecanismo por el que estos inmunosupresores tienen efecto sobre el hueso. Es posible que estén afectando la mineralización interfiriendo en el proceso del metabolismo energético de las células osteoprogenitoras (Klein *et al.* 1997).

Por otro lado, el MPA por ser un inmunosupresor relativamente nuevo, ha sido poco estudiado en su participación en hueso y en periodonto. Sin embargo el MPA no parece provocar una pérdida o desmineralización ósea, ni toxicidad esquelética importante tanto experimental como clínicamente (Cunningham 2005., Temler & Epstein 2006) y al parecer *in vivo* no produce osteopenia (Dissanayake 1998). Esto es debido a que el MPA inhibe la transferencia de manosa y fructosa a las moléculas de adhesión glucoproteicas, como selectinas e integrinas, moléculas necesarias para la unión del leucocito al endotelio del injerto. Por ello MPA puede interferir con esta unión y el reclutamiento de leucocitos y monocitos en los sitios de inflamación. En el caso específico del hueso, pudiera interferir en el reclutamiento de los osteoclastos (Budee 2004). Los osteoclastos activos producen óxido nítrico (ON) y superóxidos para llevar a cabo la degradación de la matriz ósea. Se ha visto que el MPA disminuye la producción de ON por la enzima sintasa ON (Allison 2005).

En los últimos años el MPA está siendo muy utilizado en la clínica por tener pocos efectos secundarios y por que al parecer no tiene efectos adversos sobre el hueso.

Planteamiento del problema y justificación

La regeneración de los tejidos periodontales es una de las metas más buscadas en la terapéutica periodontal de la actualidad. Sin embargo, las estrategias hasta ahora utilizadas son poco predecibles y son más reparadoras que regeneradoras. Para lograr la regeneración periodontal es necesario dilucidar los mecanismos celulares y moleculares durante el desarrollo dental, en específico de la cementogénesis; para ello, es necesaria la identificación de proteínas cemento-específicas que pudiesen estar relacionadas en la formación del cemento radicular como la CAP.

Se ha estudiado el efecto de algunas drogas inmunosupresoras en los tejidos mineralizados como la CsA, el Fk506 y el MPA. La CsA reduce la resorción y estimula la formación de hueso alveolar (Burcu *et al.* 2006) y promueve la aposición de cemento celular apical durante el desarrollo dental (Shen *et al.* 2005). El Fk506 estimula las células mesenquimales y osteoprogenitoras a diferenciarse a osteoblastos (Yoshikawa *et al.* 2000). El MPA es un inmunosupresor de reciente uso. No parece provocar una pérdida o desmineralización ósea ni toxicidad esquelética importante experimental o clínicamente (Cunningham 2005., Temler & Epstein 2006)

Por lo que la combinación de la CAP que es una proteína específica del cemento radicular, con inmunosupresores como la CsA, el FK506 y el MPA, que han mostrado tener un papel importante en los tejidos mineralizados, *in vitro*, podría ser utilizado como modelo para el estudio de la formación de cemento y de las estructuras periodontales durante la regeneración periodontal.

Hipótesis

El tratamiento de células derivadas de un cementoblastoma humano con hrCAP + CsA, hrCAP + Fk506 o hrCAP + MPA podría promover los procesos biológicos de proliferación, diferenciación celular y mineralización de la matriz extracelular.

Objetivo general

Determinar los efectos de la hrCAP en combinación con inmunosupresores (CsA, FK506, MPA) en células derivadas de un cementoblastoma humano durante el proceso de biomineralización.

Objetivos específicos

Determinación de los efectos de la hrCAP e inmunosupresores en la:

- Proliferación celular
- Diferenciación celular por medio de RT-PCR para ALP, Col I, CAP, CEMP1, OCN, OPN, BSP, TGF- β y GDF5
- Mineralización: actividad específica de ALP, tinción de alizarina roja y la cuantificación de calcio en cultivo celular.

CAPITULO III

Material y Métodos

Clonación y expresión de la hrCAP

Las clonas recombinantes se construyeron en un vector de clonación direccional pENTR/SD/D-TOPO con la proteína de adhesión del cemento radicular, producto de PCR de extremos romos (Invitrogen, Carlsbad, CA). El gen de la CAP, producto de PCR, se obtuvo diseñando arrancadores sentido adicionando 4 bases (CACC) en el final 5', seguido de un codón inicial ATG para el inicio de la traducción en forma direccional (5' CACC ATG GGC ACA TCA AGC ACT GA 3'). El arrancador antisentido se diseñó eliminando el codón de paro nativo (5' CCC CAT TAG TGT CAT CCT GC 3'), con el objeto de fusionar el producto de PCR en marco de lectura con una cola de 6xHis con el vector de entrada Gateway pMT-DEST 48 vector (Invitrogen). Para la expresión inducible, el vector DEST 48 contiene un promotor metalotioneino (inducible a metales) de alta expresión, para su selección tiene resistencia al cloranfenicol y a la ampicilina y para su purificación e inmunodetección contiene un epítotope V5 y una cola de 6xHis en la terminal COOH. El plásmido resultante pMT-DEST48-CAP que contenía el cassette cDNA de la CAP en el marco de lectura con la secuencia del epítotope terminal V5 y la cola de 6xHis se confirmó con la digestión de endonucleasas de restricción y la secuenciación del DNA.

El plásmido resultante se introdujo en células de expresión *Drosophila melanogaster*. Schneider 2 (S2) (Invitrogen). Las células *Drosophila melanogaster*. S2 conteniendo la construcción DEST48/CAP se crecieron a 28°C en medio Schneider (Invitrogen) que contenía 100 µg/ml ampicilina 34 µg/ml de cloramfenicol. Se hizo la cotransfección del vector de expresión recombinante con el vector de selección pCoHygro. Las clonas se seleccionaron con higromicina a una concentración final de 600 µg/ml. Se indujo la expresión con sulfato de cobre a una concentración final de 750 µM/ml. Se recuperó el medio condicionante y las células S2 que contenían el vector DEST48/CAP.

Inmunodetección

El medio condicionante se concentró utilizando concentradores Amicon Ultra (Millipore, Nyse, Mil) con un tamaño de corte de 10,000 Da. El botón celular se sonicó, y se le adicionó lisozima a una concentración final de 1 mg/ml, DNasa y RNasa a una concentración final de 5 µg/ml. Se recuperó el sobrenadante por medio de centrifugación a 7500 rpm durante 10 minutos.

Las muestras de 5 μ l del medio condicionante concentrado y el extracto celular se cargaron en un gel de SDS PAGE (Electroforesis de Gel de Poliacrilamida) al 12% en condiciones desnaturizantes. Una vez que se terminó la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por 1 h., la membrana se bloqueó con PBS-BSA al 0.01% por 1 h., se incubó con anticuerpos contra el epítipo V5 del vector de expresión y el anticuerpo monoclonal anti-CAP (3G9) a 4 °C toda la noche. Se lavó la membrana con PBST₂₀ al 0.1% 1 h. y se incubó con el segundo anticuerpo peroxidado por 1 h. Se lavó la membrana nuevamente con PBST₂₀ al 0.1% por 1 h. y con PBS por 30 minutos.

La inmunodetección se reveló por quimioluminiscencia siguiendo las indicaciones del fabricante (estuche comercial Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate Millipore) con una placa autoradigráfica (Kodak, Rochester, NY, EU).

Purificación

Se utilizó sefarosa 4B con un flujo de 1 ml/minuto a la que se le acoplaron anticuerpos policlonales anti-CAP. La solución de unión fue PBS, la de elución fue glicina 0.1 M pH 2.5 y la neutralizadora fue PBS con NaCl 1 M. En cada purificación se inyectaron 3 ml de medio condicionante. La solución eluida se llevó a un pH de 7. Esta se concentró y sometió a electroforesis en condiciones desnaturizantes en un gel SDS-PAGE al 12% y se tiñó con plata para observar la proteína purificada. Se realizó inmunodetección de la proteína purificada por medio de Western Blot utilizando anticuerpos anti V5 del vector de expresión y el anticuerpo monoclonal anti-CAP (3G9) para confirmar la identidad de la proteína.

Cultivo celular

Se aislaron células de un cementoblastoma humano a través del método convencional de explante, las células han sido caracterizadas como se ha descrito previamente (Arzate et al., 1998). Los cementoblastos humanos se cultivaron en cajas de cultivo de 75 cm² en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y una solución de antibióticos (100 μ g/ml estreptomycin y 100 U/ml penicilina, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Las células se incubaron en un medio ambiente de 100% de humedad a 37°C en una atmósfera de 95% aire y 5% CO₂. Para los procedimientos experimentales, se utilizaron cementoblastos entre el quinto y sexto pase de subcultivo.

Ensayo de la proliferación celular

La proliferación celular se determinó por medio del ensayo con azul de toluidina. Se sembraron 1.5x10³ cementoblastos/ 0.36 cm² entre el quinto y sexto pasaje y se incubaron 24 hrs. para permitir su adhesión. Los cultivos fueron tratados con 200 ng/ml de hrCAP, 1 mM de MPA, 200 ng/ml de hrCAP con 1 mM de MPA, 0.5 μ g/ml de CsA, 200 ng/ml de CAP con 0.5 μ g/ml de CsA, 0.5 μ g/ml de FK506 y 200 ng/ml de hrCAP con 0.5 μ g/ml de FK506 por 24, 48, 72 ó 96 hrs. Las concentraciones de la CAP e inmunosupresores se determinaron por resultados obtenidos en estudios previos (Arzate et al. 2005) y

estudios clínicos. Al término de cada tiempo, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 3% por 15 minutos y teñidas con 100 μ l/pozo con una solución filtrada de 0.5% de azul de toluidina en 3.7% de formaldehído durante toda la noche a temperatura ambiente. El exceso de colorante se quitó con lavados de PBS, se hizo la extracción del colorante con 100 μ l/pozo de SDS al 2% de 5 a 10 minutos. La absorbancia se leyó a 600 nm.

Ensayo de diferenciación celular

Trascrición Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Se sembraron cementoblastos entre el quinto y sexto pasaje, a una densidad de 5×10^4 células/9.6 cm². Los cultivos fueron tratados bajo las mismas condiciones anteriormente descritas (200 ng/ml de hrCAP, 1 mM de MPA, 200 ng/ml de hrCAP con 1 mM de MPA, 0.5 μ g/ml de CsA, 200 ng/ml de CAP con 0.5 μ g/ml de CsA, 0.5 μ g/ml de FK506 y 200 ng/ml de hrCAP con 0.5 μ g/ml de FK506), se cultivaron por 3, 7 ó 14 días con “medio mineralizante”. El ARN total se aisló utilizando un estuche comercial RNeasy (Quiagen, Valencia CA, USA). El cDNA se sintetizó por medio de la transcriptasa reversa Superscript II RNasa H (Invitrogen) utilizando 1.0 mg de ARN total y arrancador Oligo dT₁₈ primer de acuerdo al protocolo de los fabricantes. La mezcla de la reacción (20 μ l) contenía amortiguador de transcriptasa reversa 1X 500 μ M de dCTP, dGTP, dATP, dTTT (cada uno), 20 U de inhibidor de RNasa y 100 U de la enzima M-MLV. EL PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 2 minutos a 55°C y 2 minutos mas a 72°C, con un paso de elongación final por 10 minutos a 72°C. Se utilizó un termociclador (MJ Researcher, Watertown, MA, USA) con 10pmol de arrancadores 5' y 3', amortiguadores 1X de PCR, dCTP, dGTP, dATP y dTTT (cada uno a 0.4 mM), 1.5 mM de MgCl₂ y 5 U de Taq polimerasa (Promega, Madison, WI, USA). Se determinó la expresión de los ARNm de los siguientes genes: Fosfatasa Alcalina (ALP), Colágena tipo I (Col 1), Proteína de Adhesión del Cemento (CAP), Proteína del Cemento (CEMP1), Osteocalcina (OCN), Osteopontina (OPN), Sialoproteína Ósea (BSP), Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β), Factor de crecimiento y diferenciación 5 (GDF5) y Gliceraldehído 3 Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH) (Tabla1). Los productos de la reacción fueron separados y visualizados después de la electroforesis en geles de agarosa (gel TBE 4-20%, invitrogen Carlsbad), se documentaron con una cámara digital Kodak DC290 y se determinó la intensidad relativa de las bandas por medio del programa de computo Kodak 1D Image Analysis Software.

Tabla 1. Secuencia de oligos usados en el RT-PCR (5' → 3')

Nombre	Sentido	Antisentido	Tamaño amplificado (pb)
ALP	ACGTGGCTAAGAATGTCATC	CTGGTAGGCGATGTCCTTA	475
Col-1	CAGAGTCACCCACCGAC	ATGGGACCTGAAGCTCC	354
CAP	CTGGCTCACCTTCTACGA	GCAAGGCAAATGTCTGGA	161
CEMP-1	CAGGATCCACATCCGTC	CTGAACAGCTTCGAGGC	433
OCN	CATGAGAGCCCTCACA	AGAGCGACACCCTAGAC	310
OPN	CCAAGTAAGTCCAACGAAAG	GGTGATGTCCTCGTCTGTA	347
BSP	GCCTGTGCTTTCTCAATG	TTCCTTCCTCTCCTCCTC	201
TGFβ-1	CGGAGTTGTGCGGCAGTGGTTGA	GGCGCCCGGGTTATGCTGGTTGTA	448
GDF-5	ATGAGACTCCCCAAACTCCTCAC	TGTCTGCCTGGTGCCTCCCT	249
GAPDH	CCACCCATGGCAAATTCATGGCA	TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC	600

Determinación de la Actividad específica de la Fosfatasa Alcalina

Se sembraron cementoblastos entre el quinto y sexto pasaje, a una densidad de 2×10^4 células/1.1 cm². Los cultivos fueron tratados bajo las mismas condiciones anteriormente descritas (200 ng/ml de hrCAP, 1 mM de MPA, 200 ng/ml de hrCAP con 1 mM de MPA, 0.5 µg/ml de CsA, 200 ng/ml de CAP con 0.5 µg/ml de CsA, 0.5 µg/ml de FK506 y 200 ng/ml de hrCAP con 0.5 µg/ml de FK506), se cultivaron por 3, 7 ó 14 días con “medio mineralizante”. Al término de cada tiempo se eliminó el medio y se extrajeron las capas celulares adicionando 200 µl de 10 mM Tris-HCl pH 7.4 conteniendo 0.1% de Tritón X-100, se guardaron las muestras a -80 °C posteriormente, se les sonicó para romper las células, se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 minutos y se conservó el sobrenadante. La concentración de proteína se determinó utilizando albúmina sérica bovina como control y de acuerdo al método de Bradford (1976). Se determinó la actividad específica de la fosfatasa alcalina (ALP) de acuerdo al método de Lowry *et al.* (1953) utilizando P- nitrofenil fosfato (PNP) como sustrato para la enzima. Las muestras se ensayaron bajo condiciones que asegurarán la linealidad con respecto al tiempo y la concentración de la proteína y las drogas.

La actividad específica se expresó como nanomoles de p-nitrofenol por minuto por miligramo de proteína.

Ensayos de Mineralización

Se sembraron cementoblastos entre el quinto y sexto pasaje, a alta densidad, 2×10^5 células/1.9 cm² y se incubaron 24 hrs. para permitir su adhesión. Los cultivos fueron tratados bajo las mismas condiciones que el ensayo de proliferación (200 ng/ml de hrCAP, 1 mM de MPA, 200 ng/ml de hrCAP con 1 mM de MPA, 0.5 µg/ml de CsA, 200 ng/ml de CAP con 0.5 µg/ml de CsA, 0.5 µg/ml de FK506 y 200 ng/ml de hrCAP con 0.5 µg/ml de FK506), a todos los cultivos se les adicionó “medio mineralizante” (10 mM β-glicerofosfato y 50 µg/ml de ácido ascórbico). El medio fue reemplazado cada 2 días y las células se cultivaron durante 3, 7 ó 14 días. En cada término correspondiente las células fueron fijadas en alcohol etílico al 96% durante 10 minutos y la deposición de mineral se identificó utilizando una solución saturada de Alizarina Roja S a pH 4.2 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) la cual fue adicionada a los cultivos y estos teñidos durante 5 minutos. El exceso de colorante fue eliminado lavando copiosamente con PBS, y las cajas fueron invertidas para su secado.

Se realizó la extracción del colorante para cuantificar el contenido mineral en los cultivos celulares como se ha descrito previamente (Gregory et al., 2004), cada molécula de Alizarina Roja S (AR S) se une a ~ 2 moléculas de Ca²⁺, las cajas teñidas con AR S se almacenaron a -20°C por 1 hora, a cada pozo se le agregó 800 µl al 10% (v/v) de ácido acético y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en movimiento, los pozos se rasparon y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, se le agitó vigorosamente por 30 segundos, a la mezcla se le agregaron 500 µl de aceite mineral (Sigma-Aldrich), se calentó a 85°C por 10 minutos, e inmediatamente después se le colocó en hielo por 5 minutos. La mezcla se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos y 500 µl del sobrenadante se removieron a un tubo nuevo, al que se le agregaron 200 µl de hidróxido de amonio con ácido acético al 10% (v/v) para neutralizar el ácido y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en movimiento, se leyeron alícuotas de 100 µl por triplicado en cajas de 96 pozos a 405 nm.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y fueron repetidos al menos 3 veces.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos del ensayo de proliferación fueron analizados por medio de la prueba de Dunnett, con un α de 0.05 y 0.001. Utilizando el programa Minitab 14.

Los resultados obtenidos de los ensayos de diferenciación celular, actividad específica de fosfatasa alcalina y de cuantificación de depósito de calcio en cultivo, se compararon entre las células tratadas con los inmunosupresores (CsA, Fk506 y MPA) y las células sin tratamiento (control) y las células tratadas con la combinación de la hrCAP e inmunosupresores (CsA+hrCAP, Fk506+hrCAP y MPA+hrCAP) con las células tratadas con hrCAP, por medio de la prueba de Dunnett con un α de 0.05. Utilizando el programa Minitab 14.

CAPITULO IV

Resultados

Purificación de la hrCAP

Se utilizaron células de *Drosophila melanogaster*, a las que se les inserto el vector de expresión pMT-DEST48 (Invitrogen) con el objetivo de que expresaran la hrCAP.

Se realizó una inmunodetección por la técnica de Western Blot contra el epítipo V5 del vector de expresión y el anticuerpo monoclonal anti-CAP en el extracto celular y en el medio condicionante para determinar su localización. Se determinó que la hrCAP se encuentra en el medio condicionante ya que dió positivo para ambos anticuerpos al nivel de 55KDa. Figura 6.

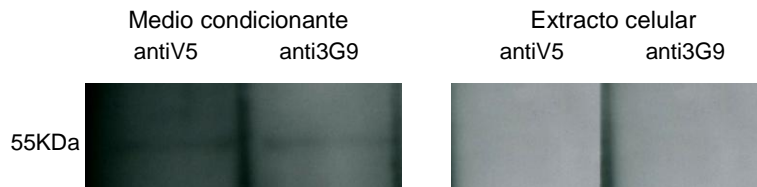


Figura 6. Inmunodetección de la hrCAP en el medio condicionante y en el extracto celular. Las bandas que se observan en el medio condicionante es la hrCAP ya que dio positivo al anticuerpo V5 y 3G9 a nivel de 55kDa.

A partir del medio condicionante de los cultivos de las células transfectadas, se realizó la purificación de la hrCAP con una columna de inmunoafinidad. En la figura 7 se muestra un gel de SDS-PAGE al 12% teñido con plata. Donde se observa que se logró la purificación de la hrCAP.

Con el objetivo de confirmar la identidad de la hrCAP en la purificación. Se hizo una inmunodetección con contra el epítipo V5 del vector y el anticuerpo monoclonal antiCAP (3G9).

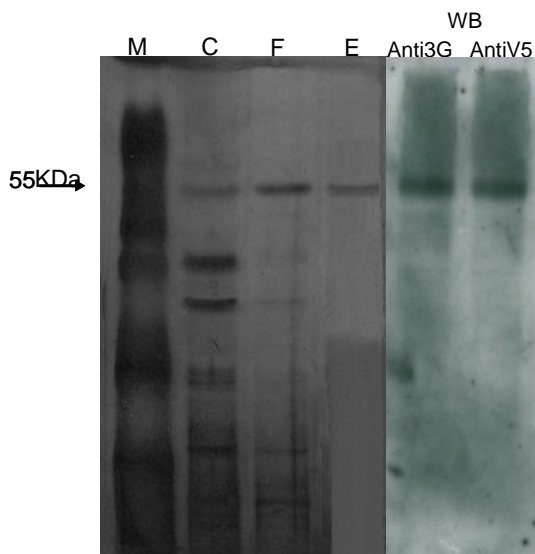


Figura 7. Purificación de la hrCAP. En el carril de extrema izquierda (M) se muestran los marcadores de peso molecular en KDa. En el siguiente carril (C) se muestra la proteína sin purificar. En el tercer carril (FT) se muestra el medio condicionante multiproteico una vez que ha pasado por la columna. Se lavó la columna para deshechar las proteínas que no nos interesaban. En el carril de extrema derecha (E) se muestra la proteína purificada y en el WB se observa una banda única a nivel de 55kDa.

Ensayo de la proliferación celular

La proliferación celular se determinó por medio del ensayo con azul de toluidina. Los cultivos

fueron tratados con 1 mM de MPA, 200 ng/ml de hrCAP con 1 mM de MPA, 0.5 μ g/ml de CsA, 200 ng/ml de CAP con 0.5 μ g/ml de CsA, 0.5 μ g/ml de FK506 o 200 ng/ml de hrCAP con 0.5 μ g/ml de FK506 a los 3, 7 ó 14 días (Figura 8). Se observó que la CsA con la hrCAP incrementa significativamente la proliferación desde las 24 horas de cultivo. El Fk506 con la hrCAP incrementa la proliferación celular de forma significativa a partir de las 48 horas de cultivo. El MPA inhibe significativamente la proliferación celular. Figura 8.

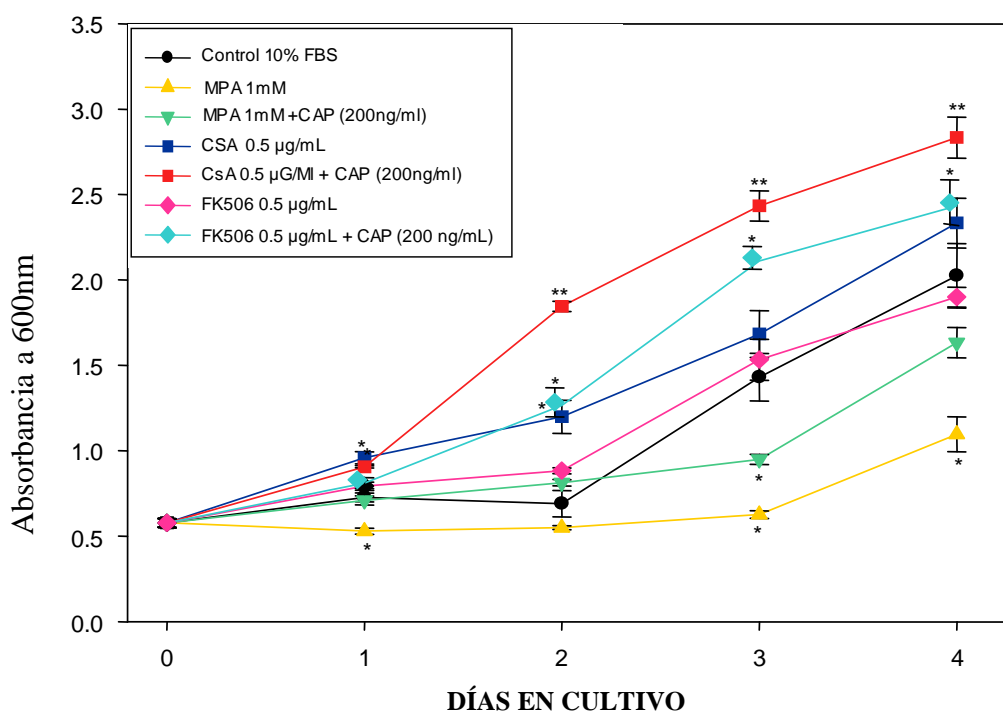


Figura 8. Efecto de la CsA, Fk506, MPA y hrCAP en la proliferación celular. Los asteriscos indican la significancia estadística comparado contra el control (* α <0.05, ** α <0.001). La CsA con la hrCAP y el Fk506 con la hrCAP incrementan significativamente la proliferación.

Ensayo de diferenciación celular

Para determinar la diferenciación, se realizó RT-PCR de moléculas relacionadas al proceso de biomineralización. La Col 1, y la ALP se consideran marcadores tempranos de la biomineralización, la CAP y la CEMP-1 son proteínas específicas del cemento; OCN, OPN y BSP son moléculas nucleadoras y moduladoras del crecimiento de los cristales de hidroxiapatita, TGF- β y GDF5 son factores de crecimiento y diferenciación que se ha visto que tienen un papel importante en la diferenciación de osteoblastos. Se usó el gen constitutivo GAPDH como control positivo.

La CsA incrementa la expresión de los ARNm de los marcadores tempranos de la biomineralización y del TGF- β e inhibe la expresión de las moléculas nucleadoras y moduladoras del crecimiento de cristales con respecto al control a los 3 días de cultivo (figura 9).

A los 14 días de cultivo se observa que la CsA incrementa la expresión de las proteínas específicas del cemento (CAP y CEMP-1), así como del GDF5 respecto al control (figura 11).

El Fk506 a los 3 días de cultivo inhibe la expresión de los marcadores tempranos de la biomineralización, de las proteínas cemento específicas y de las nucleadoras y reguladoras del crecimiento de cristales; sin embargo incrementa la expresión de los factores de crecimiento y diferenciación (figura 9). A los 7 días el Fk506 incrementa la expresión de GDF5 y Col-1 (figura 10). A los 14 días de cultivo el Fk506 incrementa la expresión de CAP y GDF-5 con respecto al control (figura 11).

El MPA incrementa la expresión de los marcadores tempranos de la biomineralización, OCN, BSP, y de los factores de crecimiento y diferenciación a los 3 días de cultivo (figura 9). Además aumenta la expresión de CAP a los 7 días de cultivo (figura 10) y de CEMP-1 a los 14 días de cultivo con respecto al control. (figura 11)

La CsA con hrCAP incrementa la expresión de ALP y OPN a los 3 días de cultivo (figura 12), de las proteínas cemento específicas a los 7 (figura 13) y 14 días de cultivo con respecto al control (células tratadas con hrCAP) (figura 14).

El Fk506 con la hrCAP parece tener un efecto inhibitorio en la diferenciación celular hacia un fenotipo mineralizante ya que inhibe la expresión de todas las moléculas estudiadas y en los tiempos estudiados con respecto al control (células tratadas con hrCAP) (figuras 12, 13 y 14).

El MPA en combinación con la hrCAP incrementa la expresión de los marcadores tempranos de la biomineralización a los 3 días de cultivo (figura 12), de CAP y TGF- β a los 7 días (figura 13) y de CEMP-1 a los 14 días de cultivo con respecto al control (células tratadas con hrCAP) (Figura 14).

3 días de cultivo

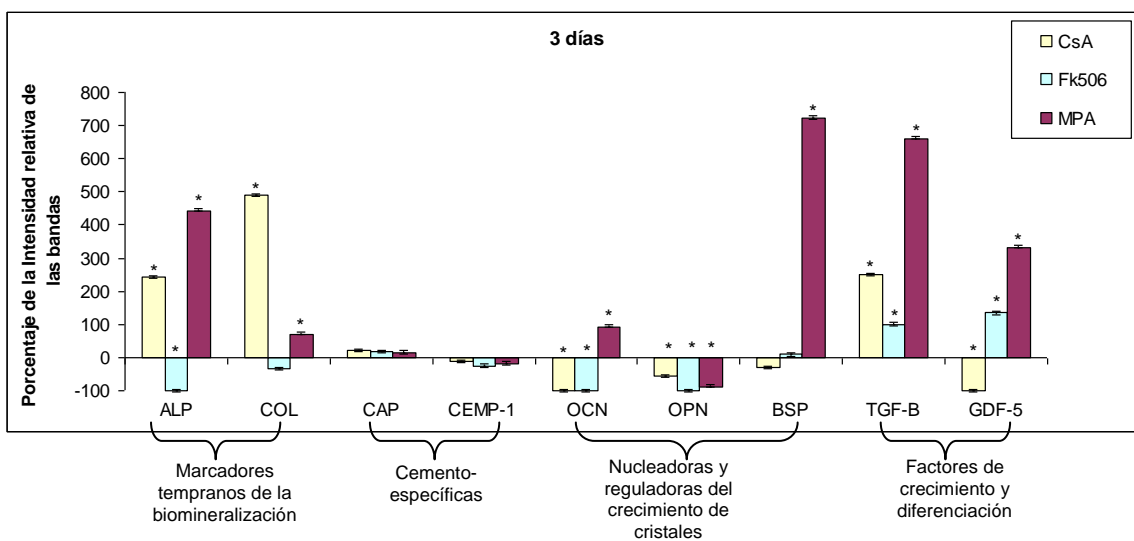
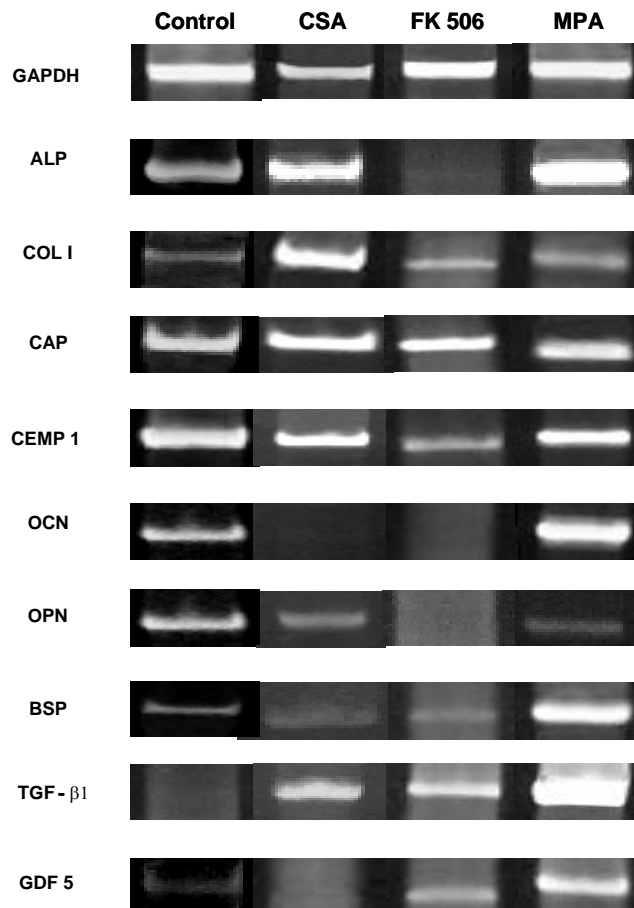
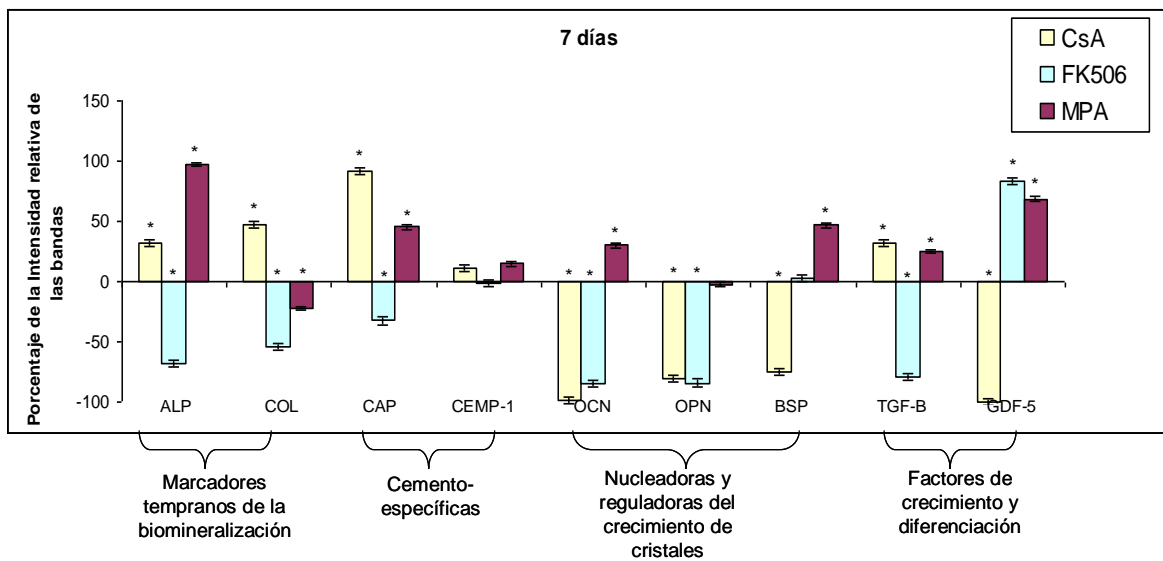
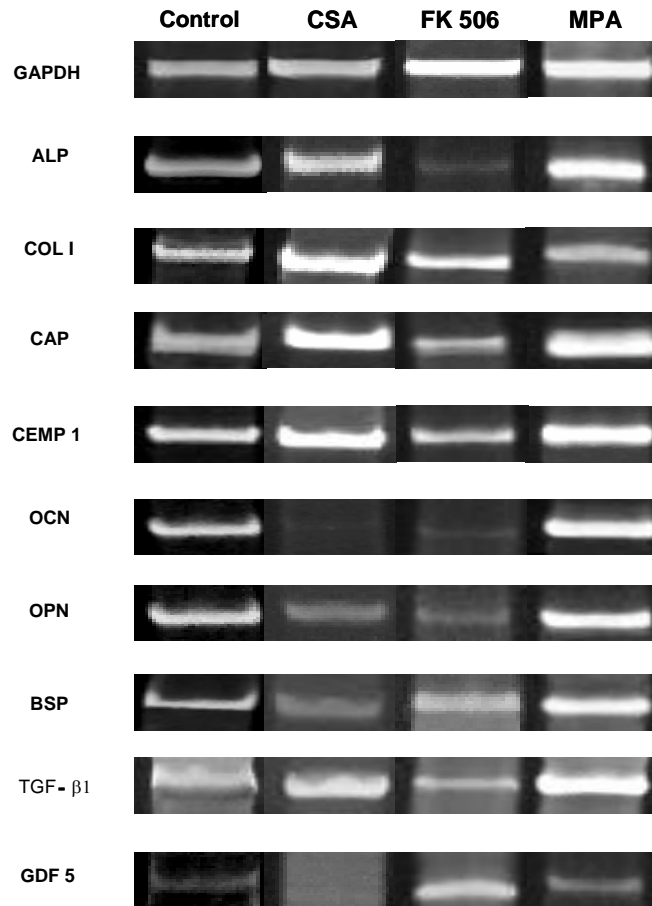


Figura 9. Panel superior: Los productos de la reacción de RT-PCR del ARNm de las células tratadas con CsA, Fk506 y MPA a los 3 días de cultivo fueron separados y visualizados por medio de electrofóresis en geles de agarosa. Panel inferior: Gráfica del porcentaje de la intensidad relativa de las bandas de cada una de las moléculas estudiadas a los 3 días de cultivo. Los resultados se normalizaron con respecto al control. Tomando el control como cero. Los resultados se expresan como cambios con respecto al grupo control (* $\alpha < 0.05$).

Figura 10. Panel superior: Los productos de la reacción de RT-PCR del ARNm de las células tratadas con CsA, Fk506 y MPA a los 7 días de cultivo fueron separados y visualizados por medio de electrofóresis en geles de agarosa. Panel inferior: Gráfica del porcentaje de la intensidad relativa de las bandas de cada una de las moléculas estudiadas a los 7 días de cultivo. Los resultados

7 días de cultivo



se normalizaron con respecto al control. Tomando el control como cero. Los resultados se expresan como cambios con respecto al grupo control (* $\alpha < 0.05$)

14 días de cultivo

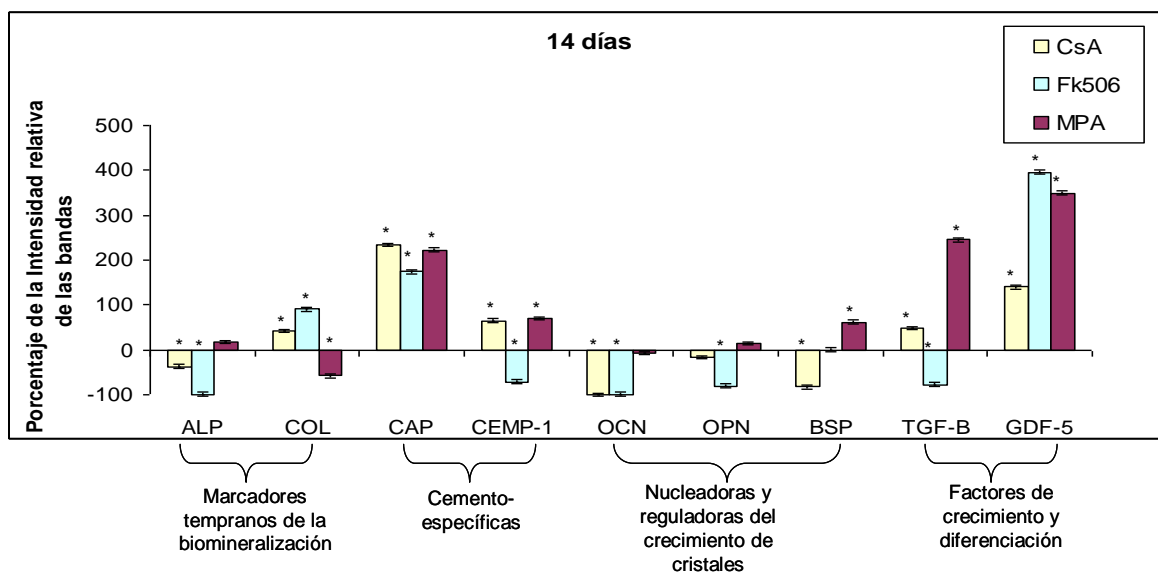
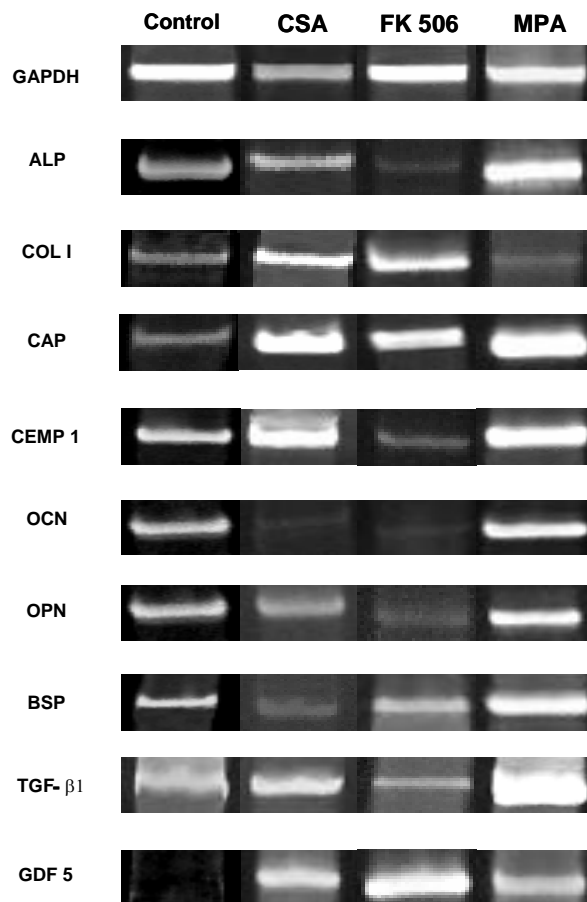


Figura 11. Panel superior: Los productos de la reacción de RT-PCR del ARNm de las células tratadas con CsA, Fk506 y MPA a los 7 días de cultivo fueron separados y visualizados por medio de electroforesis en geles de agarosa. Panel inferior: Gráfica del porcentaje de la intensidad relativa de las bandas de cada una de las moléculas estudiadas a los 14 días de cultivo. Los resultados se normalizaron con respecto al control. Tomando el control como cero. Los resultados se expresan como cambios con respecto al grupo control ($\alpha < 0.05$)

3 días de cultivo

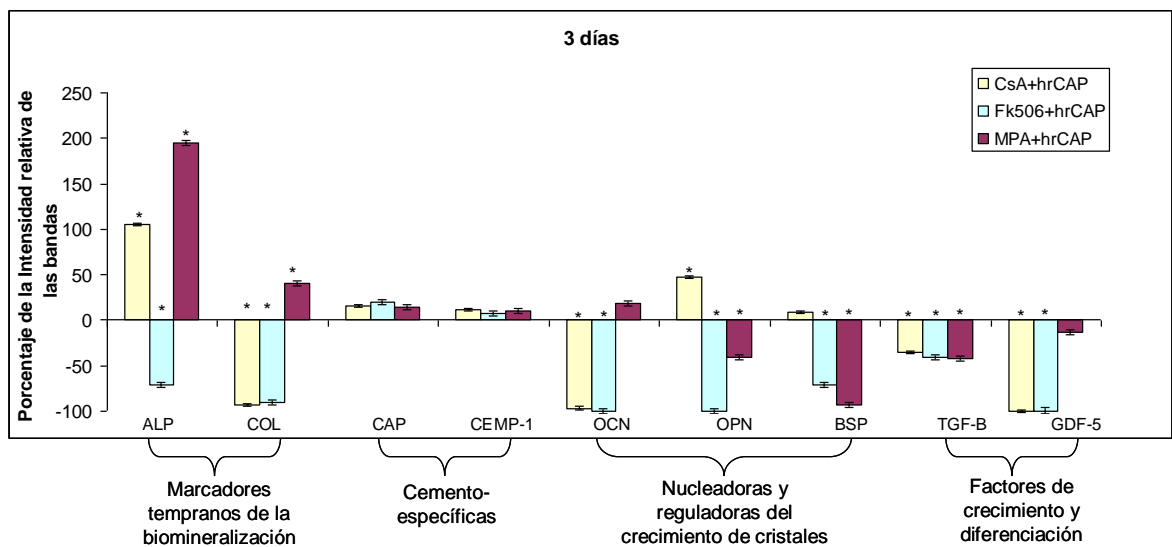
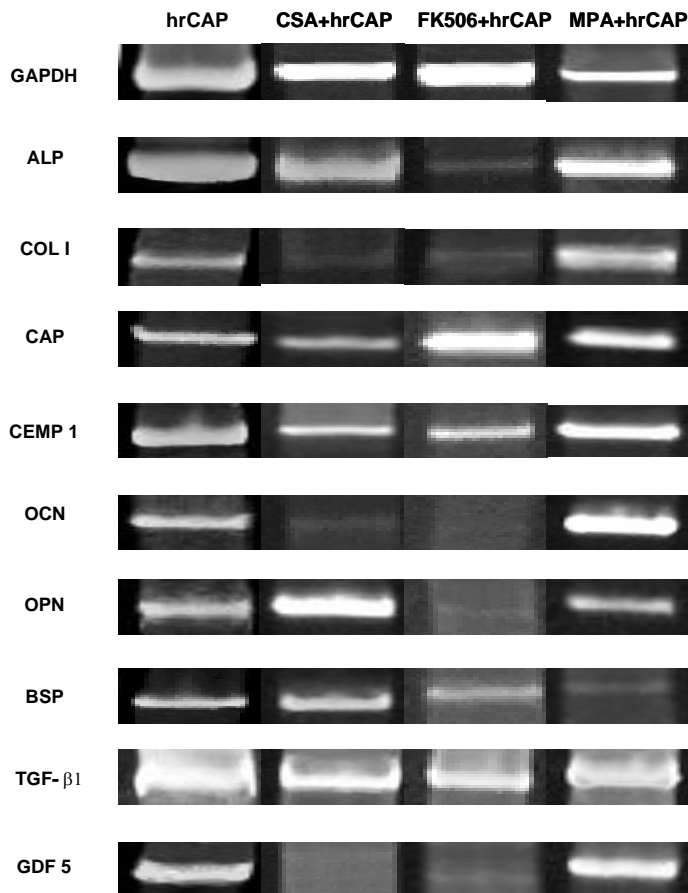


Figura 12. Panel superior: Los productos de la reacción de RT-PCR del ARNm de las células tratadas con CsA+hrCAP, Fk506+hrCAP y MPA+hrCAP a los 3 días de cultivo fueron separados y visualizados por medio de electroforesis en geles de agarosa. Panel inferior: Gráfica del porcentaje de la intensidad relativa de las bandas de cada una de las moléculas estudiadas a los 3 días de cultivo. Los resultados se normalizaron con respecto al control. Tomando el control como cero. Los resultados se expresan como cambios con respecto al grupo control (* $\alpha < 0.05$)

7 días de cultivo

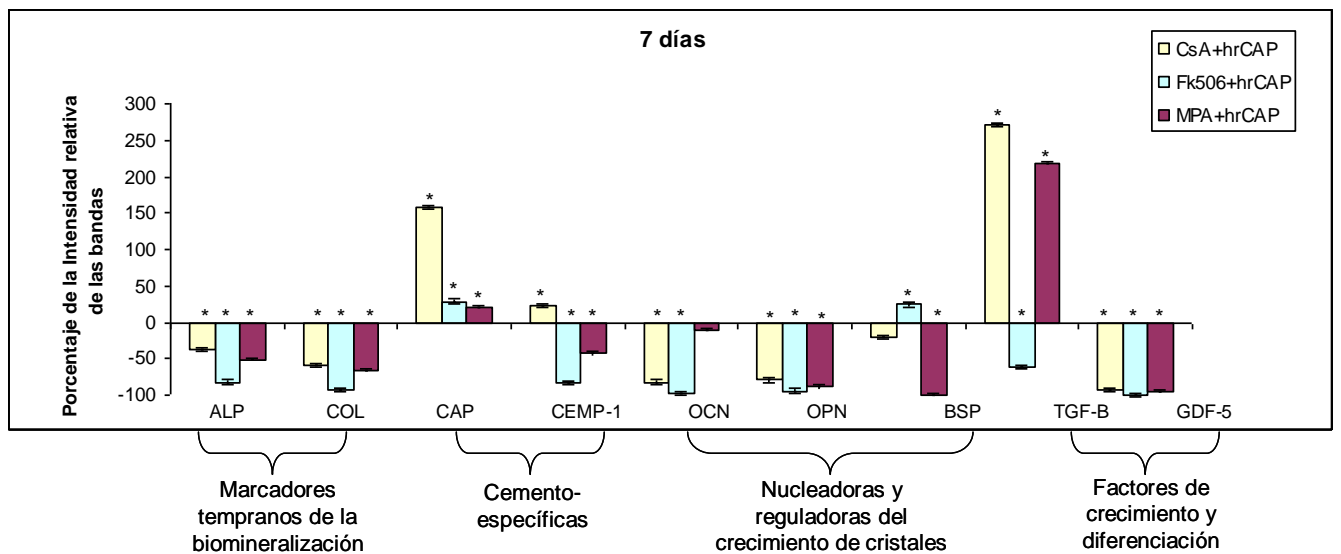
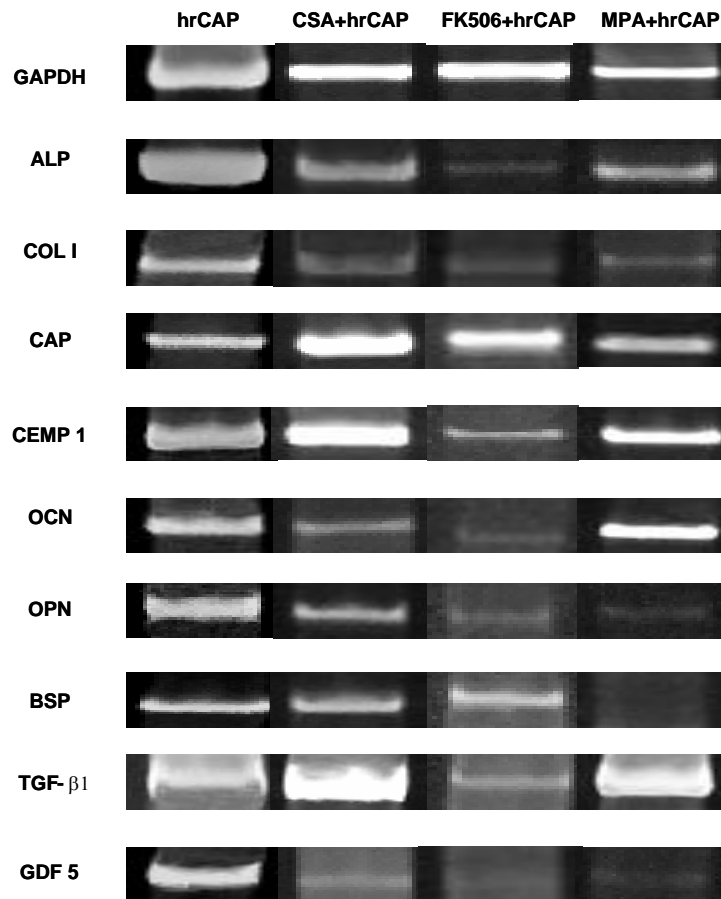


Figura 13. Panel superior: Los productos de la reacción de RT-PCR del ARNm de las células tratadas con CsA+hrCAP, Fk506+hrCAP y MPA+hrCAP a los 7 días de cultivo fueron separados y visualizados por medio de electroforesis en geles de agarosa. Panel inferior: Gráfica del porcentaje de la intensidad relativa de las bandas de cada una de las moléculas estudiadas a los 7 días de cultivo. Los resultados se normalizaron con respecto al control. Tomando el control como cero. Los resultados se expresan como cambios con respecto al grupo control (* $\alpha < 0.05$)

14 días de cultivo

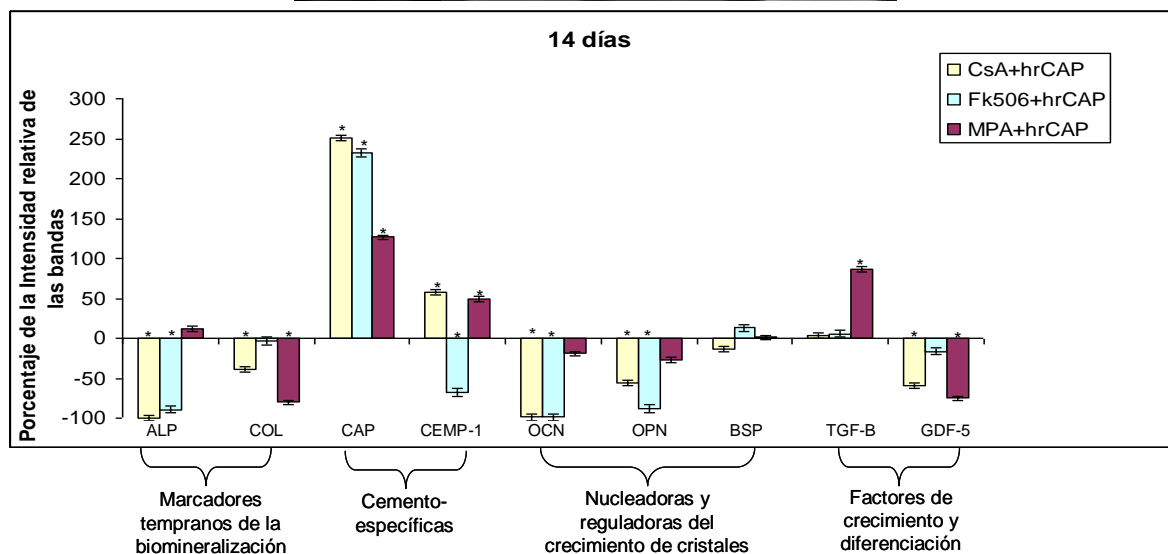
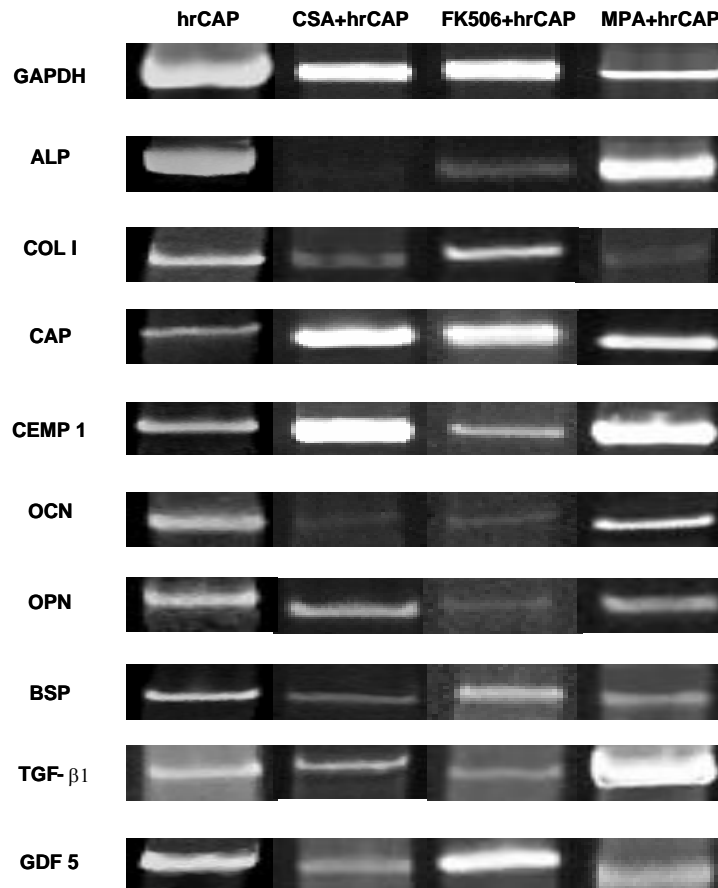


Figura 14. Panel superior: Los productos de la reacción de RT-PCR del ARNm de las células tratadas con CsA+hrCAP, Fk506+hrCAP y MPA+hrCAP a los 14 días de cultivo fueron separados y visualizados por medio de electroforesis en geles de agarosa. Panel inferior: Gráfica del porcentaje de la intensidad relativa de las bandas de cada una de las moléculas estudiadas a los 14 días de cultivo. Los resultados se normalizaron con respecto al control. Tomando el control como cero. Los resultados se expresan como cambios con respecto al grupo control (* $\alpha < 0.05$)

Determinación de la Actividad específica de la Fosfatasa Alcalina

Se evaluó la participación de la hrCAP y las drogas inmunosupresoras en la mineralización por medio del ensayo de la actividad específica de la ALP, determinada por el método de Lowry *et al.* (1953). La ALP es una proteína con actividad enzimática, que se incrementa cuando comienza la mineralización

de la matriz extracelular.

La administración de CsA y la CsA con hrCAP aumenta de forma significativa la actividad de la ALP, a los 3, 7 y 14 días con respecto a su control correspondiente (células control sin tratamiento o células tratadas con hrCAP). La administración de Fk506 y Fk506 con la hrCAP incrementa la actividad específica de esta enzima a los 3, 7 y 14 días de cultivo respecto a su control correspondiente. Lo contrario ocurre con el tratamiento con MPA, inhibe la actividad de la ALP aun con la presencia de hrCAP de forma significativa a los 3, 7 y 14 días con respecto al control correspondiente. (Figura 15)

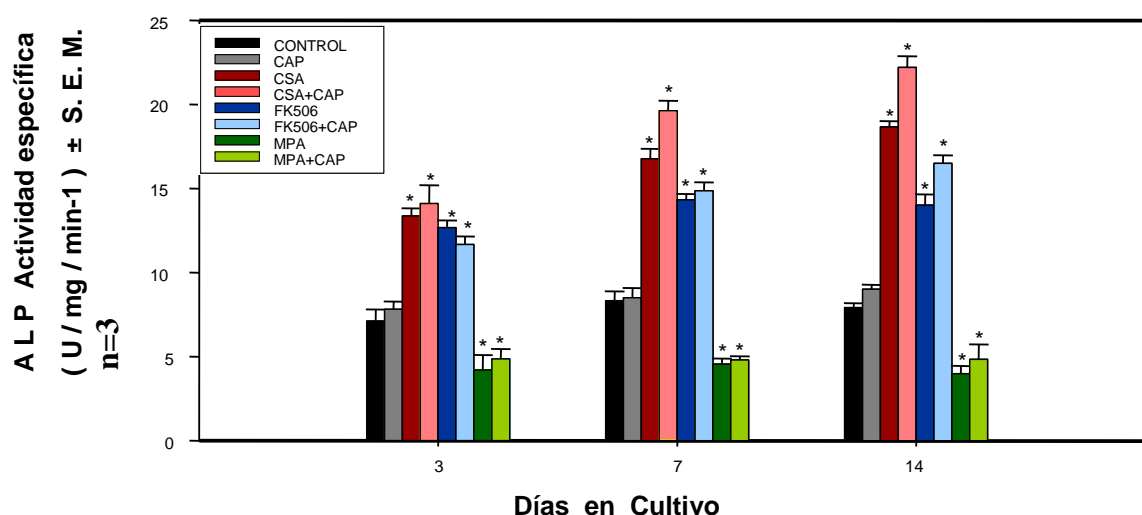


Figura 15. Actividad específica de la Fosfatasa Alcalina determinada por el método de Lowry *et al.* (1953). (* $\alpha < 0.05$ Comparado contra el control correspondiente)

Ensayos de biomineralización

Para determinar la participación de la hrCAP con las drogas inmunosupresoras durante la biomineralización en cultivo celular, al término de cada tiempo (3, 7 ó 14 días), las células fueron fijadas y teñidas con alizarina roja que tiene afinidad con el calcio.

Posteriormente, se hizo la cuantificación de calcio en los nódulos de mineralización *in vitro*. Tomando en cuenta que cada molécula de AR S se une a ~ 2 moléculas de Ca^{2+} .

Se determinó que la CsA, el Fk506, la CsA con la hrCAP y el Fk506 con la hrCAP incrementan significativamente la cantidad de Ca^{2+} *in vitro* a los 3, 7 y 14 días de cultivo. La administración del MPA inhibe el depósito de Ca^{2+} en cultivo aun en presencia de la hrCAP a los 3, 7 y 14 días de cultivo. (Figura 16)

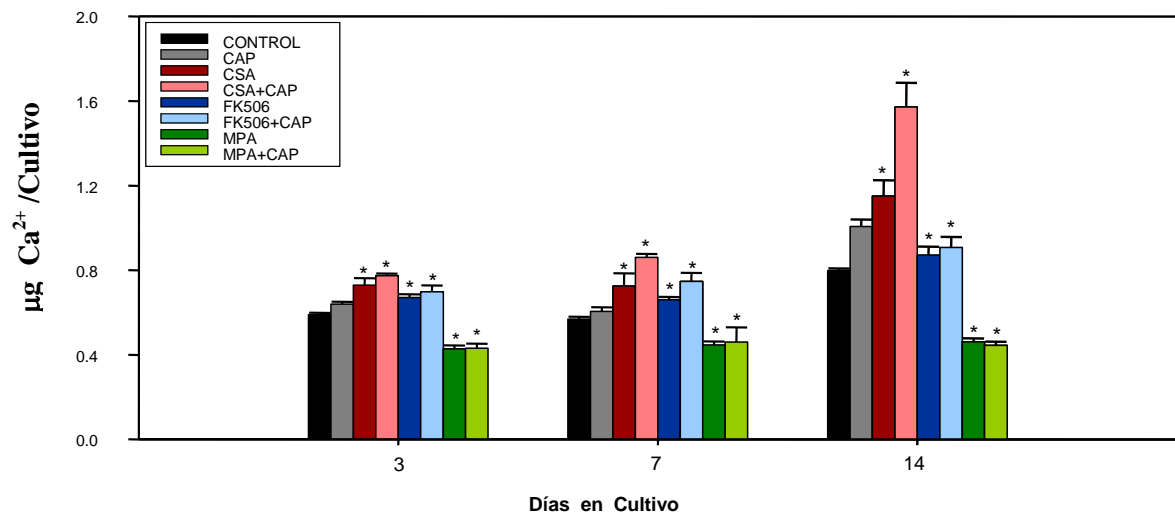


Figura 16. Cuantificación de Ca^{2+} a los 3, 7 y 14 días de cultivo ($*\alpha < 0.05$ Comparado contra el control correspondiente).

Discusión

En este estudio se describe la respuesta biológica *in vitro* de cementoblastos putativos tratados con hrCAP y tres inmunosupresores, (CsA, Fk506 y MPA) a diferentes tiempos de cultivo con la finalidad de evaluar si la combinación de estos factores favorecía la biomineralización.

Se sabe que en la biomineralización se requieren una serie de procesos complejos que deben estar perfectamente regulados a favor de que ocurran en espacio y tiempo adecuados. Estos eventos se pueden dividir en 3 fases: la proliferación celular con un fenotipo mineralizante, la formación y modificación de la matriz extracelular y finalmente la precipitación de hidroxiapatita cuyo componente principal es el calcio.

Los resultados que obtuvimos de los ensayos de proliferación celular, muestran que la CsA incrementa significativamente la proliferación de células derivadas del cementoblastoma *in vitro*. Estos resultados son consistentes con otros estudios donde han evaluado la capacidad mitogénica de la CsA en osteoblastos (Klein 1997., Tang *et al.*, 2002). El incremento de la proliferación celular con la administración de CsA puede explicarse con el experimento de Cotrin *et al.* (2003). En él, observaron que la CsA promueve la proliferación de los fibroblastos gingivales a través de la estimulación autócrina de TGF- β 1. En el mismo sentido, Suthathiran *et al.* (1996) postularon que la CsA en osteoblastos induce la proliferación celular mediante la inducción de TGF- β 1.

El Fk506 por si mismo no provocó cambios en la proliferación celular con respecto al control. En estudios previos se ha reportado que en cultivos de osteoblastos el Fk506 inhibió su proliferación celular (Varanasi y Datta 2005). Sin embargo, el Fk506 en combinación con la hrCAP incrementa la proliferación en forma significativa, esto puede ser debido a que la hrCAP promueve la proliferación al mismo tiempo que la adhesión celular (Yokokoji y Narayanan, 2001), por lo que la combinación de la hrCAP con el Fk506 pudiera potenciar la proliferación celular.

En nuestros ensayos de proliferación celular se observa que el MPA inhibe la proliferación celular de forma significativa en comparación con el control. Nuestros resultados concuerdan con los estudios de Mehling *et al.*, (2000) y Sintchak *et al.*, (1996). En los que estudiaron el efecto del MPA sobre los linfocitos T, B y células dendríticas. En estos estudios se observó una inhibición celular vía inhibición de la IMPDH. Además, aunque los mayores efectos citostáticos sean sobre linfocitos, el MPA también es capaz de inhibir *in vitro* la proliferación de células de músculo liso humano (Allison y Eugui 1996) y de células mesangiales (Hauser *et al.*, 1997).

También se ha visto que el MPA retarda la maduración de células dendríticas y reduce de forma dosis dependiente su capacidad para estimular la proliferación de las células T *in vitro* posiblemente a través de una reducción de la expresión de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86, ICAM-1 e I-A) en las células dendríticas (Mehling *et al.*, 2000).

Hasta la fecha no existen evidencias previas que reporten este fenómeno en cultivos

osteoblásticos o cementoblásticos. Aunque se ha estudiado el efecto del MPA en el metabolismo óseo *in vivo*. Los investigadores concluyen que el MPA no provoca una pérdida de mineral importante (Dissanayake *et al.*, 1998).

Inferimos que el MPA pudiera estimular la diferenciación celular de subpoblaciones *in vitro*. Para comprobar el efecto de la CsA en la proliferación celular vía TGF- β y ver el efecto de la MPA sobre la diferenciación celular. Se determinó la expresión de los ARNm de algunas moléculas involucradas en la diferenciación celular hacia un fenotipo mineralizante-cementoblástico. En nuestros ensayos de diferenciación celular se observa que la CsA promueve la expresión de los ARNm de los marcadores específicos del cemento radicular (CAP y CEMP-1), así como de GDF5. El GDF5 se han detectado durante el desarrollo periodontal, en la superficie del hueso alveolar, cemento y en las fibras del ligamento periodontal (Slavkin *et al.* 1974). La CsA incrementa la expresión del ARNm del TGF- β 1 desde el 3er día de cultivo. Por lo que en esta línea celular la CsA pudiera promover la actividad mitogénica por medio de la estimulación del TGF- β 1. A los 14 días de cultivo, con la hrCAP incrementa la expresión de CAP, CEMP-1 y TGF- β 1. Ya se ha reportado que la CsA regula la transcripción de varias citocinas, incluyendo el TGF- β 1, elevando su expresión (Cotrin *et al.*,2003, Suthathiran *et al.*,1996) y que la hrCAP favorece la diferenciación de células mesenquimatosas indiferenciadas hacia un fenotipo mineralizante (Arzate *et al.* 1996), lo que indica que la combinación de CsA y hrCAP induce la diferenciación celular hacia un fenotipo cementoblástico.

El Fk506 incrementa la expresión de TGF- β 1 a los 3 días de cultivo. Bennett *et al.* (1998) reportaron que la inmunofilina FKBP tiene un dominio citoplasmático que se une a los receptores de TGF- β tipo I. En donde la unión de FKBP inhibe la vía de señalización de los ligandos de la familia de los TGF- β , por lo que la unión de Fk506 con FKBP pudiera inducir la expresión de TGF β -1 y de GDF5.

Varanasi y Datta (2005), reportaron que el Fk506 en una concentración de 25 nmol/L en cultivos de osteoblastos, inhibe la expresión del mensajero del Cbfa1 (factor de unión α 1) y osterix, factores de transcripción involucrados en la diferenciación osteoblástica, y el Fk506 no altera la expresión del ARNm de la ALP ni su actividad específica. Esta observación está sustentada por otro estudio en el que se demostró que las células heterocigotas osteoblásticas knock out para Cbfa-1 de ratón retienen su potencial formador de colonias positivas a ALP. Ogawa *et al.*, 1998 observaron que el Fk506 inhibe la osteopontina y no tiene efecto en la expresión del ARNm de la OCN en osteoblastos. También se ha visto que el Fk506 no afecta la expresión del ARNm de la SMAD5 (Rodan y Harada 1997). Koga *et al.*, (2004) examinaron el efecto del Fk506 en la formación de hueso en cultivo de células precursoras osteoblásticas de calvaria. El Fk506 suprimió la expresión del ARNm de los genes colágena I α I y BSP, a los 3 días de cultivo. Koga *et al.*, (2004) sugirieron que la diferenciación osteoblástica es inhibida por el Fk506 vía inhibición de NFAT y Osterix. En contraste, en nuestro estudio, a los 14 días de cultivo el Fk506 incrementa la expresión de Col-I, CAP y GDF5. Lo que nos sugiere que el Fk506 pudiera estar participando en la diferenciación

celular. La combinación de FK506 y hrCAP induce un mecanismo aun desconocido de la inhibición para la diferenciación de esta línea celular.

El MPA promueve la expresión de ARNm de los marcadores tempranos de la biomineralización, OCN, BSP, y los factores de crecimiento y diferenciación a los 3 días de cultivo, además de CAP y CEMP-1 a los 7 y 14 días de cultivo. Estos resultados muestran que el MPA promueve la diferenciación celular hacia un fenotipo mineralizante-cementoblástico como anteriormente lo habíamos sugerido.

Los resultados de los ARNm expresados en las células tratadas con la combinación del MPA con la hrCAP. Apuntan a que MPA+hrCAP inducen una diferenciación celular mas específica hacia un fenotipo cementoblástico, ya que favorece de modo importante la expresión de proteínas cemento específicas, esto puede explicarse con el experimento de Arzate *et al.* (1996), en el que se observó que la CAP es capaz de inducir la expresión de fosfatasa alcalina (ALP) y favorece la diferenciación celular de células mesenquimatosas indiferenciadas hacia un fenotipo mineralizante. Al mismo tiempo, nuestros resultados señalan que la CAP pudiera actuar como un factor autócrino.

Para comprobar que efectivamente, las células tratadas con los inmunosupresores y la hrCAP se diferenciarán a un fenotipo mineralizante. Se determinó la actividad específica de la ALP. Nuestros resultados muestran que la CsA incrementa significativamente su actividad específica en comparación con el control. El mecanismo exacto que produce este aumento en la actividad específica de la ALP por la CsA aun no es claro. Además de la vía de acción de la inmunociclina, la CsA pudiera tener otro mecanismo de acción vía otras cascadas de señalización (Ogawa *et al.*, 1998). Nosotros creemos que esta vía de señalización pudiera estar involucrada la cascada de la superfamilia de los TGF- β . Mattabhorn *et al.* (2006) evidenciaron que la vía de señalización de las BMPs (pertenecientes a la superfamilia de los TGF- β), es necesaria para activar la diferenciación osteoblástica. En específico para el incremento de la actividad específica de la ALP. Además, Mattabhorn *et al.* concluyen que las BMPs actúan de forma autócrina. En nuestros resultados evidenciamos que la CsA incrementa la expresión de TGF- β y GDF5. Es necesario hacer estudios respecto a esta vía de señalización.

También en nuestros resultados se observa que la CsA cuando se le administra con la hrCAP, ambas incrementan la actividad específica de la ALP. En este sentido, Pitaru *et al.* (2002) probaron que la BMP-2 induce la expresión de la CAP en células del ligamento periodontal. Nosotros hipotetizamos que la conjugación de la CsA que estimula la expresión de TGF- β y GDF5, a su vez estimula la expresión de CAP y ALP. Es necesario hacer estudios sobre la expresión de las BMPs en células estimuladas con CsA y hrCAP.

El Fk506 incrementa significativamente la actividad específica de la ALP a los 3, 7 y 14 días de cultivo con respecto al control. En contraste, Hogaza *et al.* (1998) reportaron que en cultivo de osteoblastos el Fk506 no afecta la expresión ni actividad enzimática de la ALP, esta diferencia puede deberse a las características propias de las líneas celulares. Los osteoblastos son células alargadas, cúbicas, su núcleo es redondo y su citoplasma esta ocupado por el complejo de golgi y un abundante retículo endoplásmico rugoso. Los osteoblastos producen sustancia osteoide por medio de la síntesis una matriz extracelular

rica en proteínas colágenas (I, III, IV) y no colágenas (OPN, BSP, OCN, ALP) (Bosshardt, 2005). Mientras que los cementoblastos son células mas pequeñas cuboidales. El núcleo de los cementoblastos es rico en eucromatina, contiene un aparato de golgi poco desarrollado. Los cementoblastos sintetizan sustancia cementoide a base predominantemente de colágena tipo I y otras proteínas no colágenas al igual que el hueso. Se ha reportado que en el cemento parecen expresarse predominantemente dos proteoglicanos, (fobromodulina y el lumican) en comparación con el tejido óseo (Bosshardt, 2005; Cheng *et al.*, 1996). Además los cementoblastos expresan proteínas específicas de cemento. La CAP y la CEMP-1 (Bosshardt, 2005; Arzate *et al.*, 1992b, 2005).

El Fk506 con la hrCAP incremento significativamente en la actividad específica de la ALP a los 3, 7 y 14 días de cultivo. Aunque a la fecha se desconocen los mecanismo que regulan el aumento de la ALP.

La administración de MPA al cultivo de células derivadas del cementoblastoma humano inhibió la actividad específica de la ALP a los 3, 7 y 14 días de cultivo aun cuando se le administra con la hrCAP. Reafirmando que el MPA pudiera estar seleccionando subpoblaciones celulares para llevar a diferenciación una línea celular homogénea por medio de la estimulación de la expresión de los factores de crecimiento y diferenciación vía TGF- β . El proceso biológico de selección de subpoblaciones celulares estaría favorecido, *in vivo*, por la hrCAP, ya que se ha inmunolocalizado en las zonas donde se sugiere se encuentran las células progenitoras del ligamento periodontal (Arzate *et al.* 1992).

Asimismo, se cuantificó el Ca²⁺ en los cultivos tratados con inmunosupresores y hrCAP para evidenciar la mineralización de la matriz extracelular. La CsA y la CsA con hrCAP, incrementan la deposición de este mineral a los 3, 7 y 14 días de cultivo. Esto concuerda con nuestros resultados obtenidos en los ensayos de la actividad específica de la ALP y los resultados anteriormente publicados de Arzate *et al.* (2005), en los que se demuestra que la CsA induce la mineralización en cementoblastos *in vitro*. Koga *et al.* (2004) examinaron el efecto del Fk506 en la formación de hueso en cultivo de células precursoras osteoblásticas de calvaria. El Fk506 suprimió substancialmente la formación de nódulos óseos aun en presencia de la BMP-2 a los 7 días. En contraste; nuestros resultados muestran que en cementoblastos putativos el Fk506 y el Fk506 con hrCAP incrementan la deposición de Ca²⁺ a los 3, 7 y 14 días de cultivo con respecto al control correspondiente. Inferimos que el Fk506 con la hrCAP pudieran promover la mineralización de subpoblaciones celulares más que la diferenciación celular porque promueve el depósito de calcio en cultivo e incrementa la actividad específica de la ALP, pero inhibe la expresión de los ARNm de las proteínas que se expresan en células diferenciadas (OCN, OPN, BSP, TGF- β , GDF5). El mecanismo por el cual el Fk506 lleva a cabo esta acción no es conocido.

El MPA inhibe el depósito de Ca²⁺, aun en combinación con la hrCAP en los tiempos de cultivo estudiados. Es necesario el estudio de este inmunosupresor con la hrCAP a tiempos mas prolongados de cultivo, para observar los efectos de la diferenciación celular de una línea celular homogénea en la mineralización de la matriz extracelular.

Conclusiones

El Fk506 con la hrCAP promueve la proliferación celular y la mineralización de la matriz extracelular por medio del incremento de la actividad específica de la ALP y el depósito de calcio en cultivo de células derivadas del cementoblastoma humano. Sin embargo, inhibe la diferenciación celular.

El MPA con la hrCAP inhibe la proliferación celular y la mineralización de la matriz extracelular. Contrariamente, promueve fuertemente la diferenciación celular hacia un fenotipo mineralizante-cementoblástico.

Las células derivadas del cementoblastoma mostraron sensibilidad particular a la CsA con la hrCAP promoviendo los procesos biológicos de proliferación, diferenciación celular a un fenotipo cementoblástico y mineralización de la matriz extracelular

La combinación de la CsA con la hrCAP pudiera ser usada como modelo para promover la formación de cemento en un sistema *in vitro* y estudiar los mecanismos celulares y moleculares de la cementogénesis y proponer la utilización de hrCAP+CsA como una alternativa terapéutica local para lograr la regeneración de las estructuras periodontales.

Referencias

- Allison AC, Eugui EM. Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immunol Rev.* 1993; 136; 5-28.
- Allison AC. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil. *Lupus.* 2005;14 Suppl 1; 2-8.
- Alvarez-Pérez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Carmona-Rodríguez C, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP23). *Bone.* 2006; 38; 409-419.
- Alvarez-pérez MA, Pitaru S, Alvarez FO, Gasga RJ, Arzate H. Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line. *J Struct Biol.* 2003;143; 1-13.
- Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999; 14; 529-535.
- Arzate H, Alvarez-Pérez MA, Aguilar Mendoza ME, Alvares-Fregoso O. Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells *in vitro*, *J Periodont Res.* 1998; 33; 249-258.
- Arzate H, Alvarez-Perez MA, Alvarez-Fregoso O, Wusterhaus-ChávezA, Reyes-Gasga J, Ximénez-Fyvie LA. Electron Microscopy, microanalysis and X ray diffraction characterization of mineral-like tissue deposited by human cementum tumor-derived cells. *J Dent Res.* 2000; 79; 28-34.
- Arzate H, Alvarez-Perez MA, Narayanan AS. Cyclosporin A promotes mineralization by human cementoblastoma-derived cells in culture. *J Periodont Res.* 2005; 40; 218-224.
- Arzate H, Jiménez-García LF, Alvarez-Pérez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. Immunolocalization of human cementoblastoma-conditions medium derived protein. *J Dent Res.* 2002; 81; 541-6.
- Arzate H, Olson SW, Page RC & Narayanan AS. Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in culture. *Bone and Mineral Res.* 1992; 18; 15-30.
- Arzate H, Portilla-Robertson J, Aguilar-Mendoza ME. Recombination of epithelial root sheath and dental papilla cells *in vitro*. *Arch Med Res.* 1996; 27; 573-577.
- Arzate H. Preliminary characterization of epithelial root sheath cells *in vitro*. *Biol Est Med Biol Mex.* 1994; 42; 27-30
- Ayanoglou CM, Godeau G, Lesty C, Septier D, Goldberg M. Cyclosporine A induced alterations of dentinogenesis in rat molar. *J. Oral Pathol Med.* 1997; 26; 129-34.
- Ayanoglou CM. Evidence that cyclosporine A administration induces the formation of new cementum-like islets inside the gingival connective tissue. *J Periodontal Res.* 1998; 33; 166-171.
- Bar Kana I, Savion N, Narayanan AS, Pitaru S. Cementum attachment protein manifestation is restricted to the mineralized tissue forming cells of the periodontium. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106 Suppl 1; 357-64.
- BarKana I, Narayanan AS, Grosskop A, Savion N, Pitaru S. Cementum attachment protein enriches putative cementoblastic populations on root surfaces *in vitro*. *J Dent Res.* 2000; 79; 1482-88.
- Bartold PM, Songtao S, Stan G. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontology 2000.* 2006; 40; 1664-72.
- Beertsen W, McCulloch CAG, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissues. *Periodontol 2000.* 1997; 13; 20-40.
- Bennet JA, Clancy YC, Mc Neish JD. Identification and characterization of the murine Fk506 binding protein (FKBP) 2.6 gene. *Mamm Genome.* 1998; 9; 1069-71.
- Birkedal-HansenH, Butler WT, Taylor RE. Proteins from the periodontium. characterization of the insoluble collagens of bovine cementum. *Calcif Tiss Res.* 1977; 23; 39-44.
- Bonucci E. Calcification in biological systems, Florida, Estados Unidos. CRC press. 1992.
- Bornhäuser M., Schuller U., Pörksen G., Naumann R., Geissler G., Thiede C., Schwerdtfeger R., Ehninger G., Thiede H. Mycophenolate Mofetil and cyclosporine as graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic blood stem cell transplantation. *Transplantation.* 1999; 67; 499-504.
- Bosshardt DD. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *J Dent Res.* 2005; 84; 390-406.
- Boyan BD, Lohmann CH, Dean DD, Sylvia VL, Cochran DL, Schwartz Z. Mechanismos involved in osteoblast response to implant surface morphology. *Annu Rev Mater Res.* 2001; 31; 357-371.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation or microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Annal Biochem.* 1976; 72; 248-54.
- Bronkers ALJJ, Farach-Carson MC, Waveren EV, Butler WT. Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin and dentin sialoprotein during root formation and early cementogenesis in the rat. *J Bone Miner Res.* 1994; 9; 833-841.
- Buchinsky FJ, Ma Y, Mann GN, Rucinski B, Bryer HP, Paynton BV, Jee WS, Hendy GN, Epstein S. Bone mineral metabolism in T lymphocyte-deficient and repete strain of rat. *J Bone Miner Res.* 1995; 10; 1556-65.
- Budde K, Glander P, Diekmann F, Waiser J, Fritsche L, Dragun D, Neumayer HH. Review of the immunosuppressant enteric- coated mycophenolate sodium. *Expert Opin Pharmacother.* 2004; 5; 1333-1345.
- Burcu OC, Gokhan A, Gonca CK, Bulent A, Adnan K. The effect of cyclosporine A on alveolar bone in rats subjected to experimental periodontal disease. *Toxicologic Pathology.* 2006; 34; 716-722.
- Butler R, Allen M, Chandra L, Lettington AH, Rushton N. *In vitro* studies of DLC coatings with silicon intermediate layer. *Diamond Relat Mater.* 1994; 4; 857-861.
- Cheng H, Caterson B, Neame OJ, Lester G, Yamauchi M. Differential distribution of lumican and fibromodulin in tooth cementum. *Connect Tissue Res.* 1996; 34; 87-90.
- Chistner P, Robinson P, Clark CC. A preliminary characterization of human cementum collagen. *Calcif Tissue Int.* 1997; 23; 147-150.

- Cho MI, Lin WL, Genco RJ. Platelet-derived growth factors modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodontol.* 1995; 66; 522–530.
- Chowdhury MH, Shen V, Dempster DW. Effects of cyclosporine A on chick osteoclasts *in vitro*. *Calcif Tissue Int.* 1991; 49; 275-379.
- Cotrin P, Martelli-Junior H, Graner E, Sauk JJ, Coletta RD. Cyclosporin-A induces proliferation in human gingival fibroblasts via induction transforming growth factor- β 1. *J Periodontol.* 2003; 74; 1625-1633.
- Cowles EA, De Dome ME, Pastizzo G, Brailey LL, Gronowicz GA. Mineralization and the expression of matrix proteins during *in vivo* bone development. *Calcif. Tissue Int.* 1998; 62; 74-82.
- Cunningham, John. Posttransplantation Bone Disease. 2005; 6; 629-634.
- D'Errico JA, Macneil RL, Takata T, Berry J, Strayhorn C, Somerman MJ. Expression of bone associated markers by tooth root lining cells, *in situ* and *in vitro*. *Bone.* 1997; 20; 117–126.
- De Obarrio JJ, Arauz-Dutari JI, Chamberlain TM, Croston A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology – case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2000; 20; 486–497.
- Dissanayake I R, Goodman G R, Bowman A R, Yanfei Ma, Pun S, Jee W S S, Epstein S. Mycophenolate Mofetil: a promising new immunosuppressant that does not cause bone loss in the rat 1,2. *Transplantation.* 1998; 62; 275-278.
- Ducey P, Desbois C, Boyce B, Pinerio G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature.* 1996; 382; 448-452.
- Epstein S. Cyclosporin A: friend or foe?. *Calcif Tissue Int.* 1991; 49; 232-4.
- Espevik T, Figari IS, Shalaby MR, Lackides GA, Lewis GD, Shepard HM, Palladino MA. Inhibition of cytokine production by cyclosporine A and transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 1987; 166; 572-576.
- Fornoni Alessia, Cornacchia F., Howard G. A., Roos B.A., Striker G.E. and Striker L.J. Cyclosporin A affects extracellular matrix synthesis and degradation by mouse MC3T3-E1 osteoblasts *in vitro*. *Nephrology Dialysis Trans.* 2001; 16; 500-505.
- Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999; 10; 79-98.
- Gao J, Symons AL, Bartold PM. Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) in the developing periodontium of rats. *J Dent Res.* 1998; 77; 1708–1716.
- Garraway R, Young WG, Daley T, Harbrow D, Bartold PM. An assessment of the osteoinductive potential of commercial demineralized freeze-dried bone in the murine thigh muscle implantation model. *J Periodontol.* 1998; 69; 1325–1336.
- Gehron P. Cell-mediated calcification *in vitro*. En: Bonucci E. *Calcification in biological systems.* Florida, Estados Unidos. CRC press. 1992.
- Gestrelius S, Lyngstadaas SP, Hammarstrom L. Emdogain– periodontal regeneration based on biomimicry. *Clin Oral Invest.* 2000; 4; 120–125.
- Giachelli CM, Schwartz SM, Liaw L. Molecular and cellular biology of osteopontin: Potential role in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* 1995; 5; 88-95.
- Giannobile WV, Finkelman RD, Lynch SE. Comparison of canine and nonhuman primate animal models for periodontal therapy. Results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J Periodontol.* 1994; 65; 1158–1168.
- Giannobile WV, Somerman MJ. Growth and amelogeninlike factors in periodontal wound healing. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003; 8; 193–204.
- Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennstrom J. New attachment formation in human periodontium by guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol.* 1986; 13; 604–616.
- Greenstein G. Emdogain: evidence of efficacy. *Compend Contin Educ Dent.* 2000; 21; 299–305.
- Gregory CA., Gunn WG., Peister A., Prockop DJ. An Alizarine red based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem.* 2004; 329; 77-84.
- Grzesik WJ and Narayanan AS. Cementum and periodontal Wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13; 474-484.
- Haase HR, Bartold PM. Enamel matrix derivative induces matrix synthesis by cultured human periodontal fibroblast cells. *J Periodontol.* 2001; 72; 341–348.
- Hammarström L, Heijl L, Gestrelius S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol.* 1997; 24; 669–677.
- Hauser IA, Johnson DR, Thevenod F, Goppelt-Strube M. Effect of mycophenolic acid on TNF alpha-induced expression of cell adhesion molecules in human venous endothelial cells *in vitro*. *J Pharmacol.* 1997; 122; 1315-1322.
- Heard RH, Mellonig JT. Regenerative materials: an overview. *Alpha Omegan.* 2000; 93; 51–58.
- Helder MN, Karg H, Bervoets TJ, Vukicevic S, Burger EH, D'Souza RN, Woltgens JH, Karsenty G, Bronckers AL. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1, OP-1) and tooth development. *J Dent Res.* 1998; 77; 545–554.
- Hirotani H, Tuohy NA, Woo JT, Stern PH, Clipstone NA. The calcineurin/nuclear factor of activated T cells signaling pathway regulates osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *J Biol Chem.* 2004; 279; 13984-992.
- Ho SP, Sulyanto RM, Marshall SJ, Marshall GW. The cementum-dentin junction also contains glycosaminoglycans and collagen fibrils. *J Struct Biol.* 2005; 151; 69–78.
- Howell TH, Fiorellini JP, Paquette DW, Offenbacher S, Giannobile WV, Lynch SE. A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulinlike growth factor-I in patients with periodontal disease. *J Periodontol.* 1997; 68; 1186–1193.
- Huang KK, Shen C, Chiang CY, Hsieh YD, Fu EJ. Effects of bone morphogenetic protein-6 on periodontal wound healing in a fenestration defect of rats. *J Periodontal Res.* 2005; 40; 1–10.

- Hunter GK, Kyle CL, Golberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of osteopontin mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *J Biochem.* 1994; 300; 723-728.
- Ivanovski S, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. Stem cells in the periodontal ligament. *Oral Diseases.* 2006; 12; 358-363
- Ivanovski S, Li H, Haase HR, Bartold PM. Expression of bone associated macromolecules by gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2001; 36; 131–141.
- Jin QM, Anusaksathien O, Webb SA, Rutherford RB, Giannobile WV. Gene therapy of bone morphogenetic protein for periodontal tissue engineering. *J Periodontol.* 2003; 74; 202–213.
- Jonsson CA, Carlsten H: Mycophenolic acid inhibits inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and suppresses immunoglobulin and cytokine production of B cells. *Int Immunopharmacol* 2003; 3; 31-37.
- Kagayama M, Li HC, Zhu J, Sesano A, Htakeyama Y, Mizoguchi I. Expression of osteocalcin in cementogenesis in cementoblast forming acellular cementum. *J periodontal Res.* 1997; 32; 273-278.
- Kagayama M, Sasano Y, Zhu JX, Hirata M, Mizoguchi I, Kamakura S. Epithelial rest colocalize with cementoblasts forming acellular cementum but not with cementoblasts forming cellular cementum. *Acta Anat.* 1998; 163; 1–9.
- Kaneko H, Hashimoto S, Enokiya Y, Ogiuchi H, Shimono, M. Cell proliferation and death of Hertwig's epithelial root sheath in the rat. *Cell Tissue Res.* 1999; 298; 95-103.
- Karting T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration –animal and human studies. *Periodontol* 2000. 1993; 1; 26–35.
- Kimab JY, Yoona SY, Parka J, Kimab YS. Mycophenolic Acid Induces Islet Apoptosis by Regulating Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. *Transplantation Proc.* 2006; 38; 3277-3279.
- King GN, King N, Hughes FJ. Effect of two delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 on periodontal regeneration *in vivo*. *J Periodontal Res.* 1998; 33; 226–236.
- Klein BY, Gal I, Mosheif R, Liebergall M, Ben-Bassat H. Cyclosporin A and its non-immunosuppressive derivative exhibit a differential effect on cell-mediated mineralization in culture. *J Cellular Biochem.* 1997;64; 209-216.
- Kobayashi M, Takiguchi T, Suzuki R, Yamaguchi A, Deguchi K, Shionome M, Miyazawa Y, Nishihara T, Nagumo M, Hasegawa K. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic differentiation in cells isolated from human periodontal ligament. *J Dent Res.* 1999; 78; 1624–1633.
- Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, Iwata T, Ohnishi H, Matozaki T, Kodama T, Taniguchi T, Takayanagi H and Takai T. Costimulatory signals mediated by ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature.* 2004; 428; 758-763.
- Kostopoulos L, Karring T. Susceptibility of GTR-regenerated periodontal attachment to ligature-induced periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004; 31; 336–340.
- Lindskog S, Hammarstrom L. Formation of intermediate cementum III. 3H-tryptophan and 3H-proline uptake into the epithelial root sheath of Hertwig *in vitro*. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1982; 2; 171–177.
- Liu HW, Yacobi R, Savion N, Narayanan AS, Pitaru A. A collagenous cementum derived attachment protein is a marker for progenitors of the mineralized tissue forming cell lineage of the periodontal ligament. *J Bone Miner Res.* 1997; 12; 1691-99.
- Lowry OH, Roberts NR, Wu ML, Hixon WS, Crawford EJ. The quantitative histochemistry of brain I. Enzyme measurement. *J Biol Chem.* 1953; 207; 19-37.
- Lothar A, Meier G, Norcross AJ, Jakubowski J, Varela MC, Cordier A, Steiner S. Decrease in Kidney Calbindin D 28kDa as a possible mechanism mediating cyclosporine A and Fk506 induced calciuria and tubular mineralization. *Biochemical Pharmacology.* 1997; 53; 723-31.
- Low MG. The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1989; 988; 427-454
- Lynch SE, Ruiz de Castilla G, Williams RC, Kiritsy CP, Howell TH, Reddy MS, Antoniadis HN. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol.* 1991; 62; 458–467.
- Lysaght MJ, Nguy NA, Sullivan K. An economic survey of the emerging tissue engineering industry. *Tissue Eng.* 1998; 4; 231–238.
- Mac Neil RL, Berry JE, D'errico J, Strayhorn CI, Piotrowski B, Somerman MJ. Role of two mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein during cementogenesis. *Connect Tissue Res.* 1995; 33; 17-22.
- MacNeil RL, Berry J, Strayhorn C, Somerman MJ. Expression of bone sialoprotein mRNA by cells lining the mouse tooth root during cementogenesis. *Arch Oral Biol.* 1996; 41; 827–835.
- MacNeil RL, Thomas HF. Development of the murine periodontium. I. Role of basement membrane in formation of a mineralized tissue on the developing root dentin surface. *J Periodontol.* 1993; 64; 95–102.
- MacNeil RL, Thomas HF. Development of the murine periodontium. II. Role of the epithelial root sheath in formation of the periodontal attachment. *J Periodontol.* 1993; 64; 285–291.
- Matias MA, Li H, Young WG and Bartold PM. Immunohistochemical localization of fibromodulin in the periodontium during cementogenesis and root formation in the rat molar. *J Periodont Res.* 2003; 38; 502-507.
- Matsuura M, Herr Y, Han KY, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components of normal and healing periodontal tissues in the beagle dog. *J Periodontol.* 1995; 66; 579–593.
- Mattedhorn P, Zhouran Z, Heidi B, Hernana R, Renny TF. BMP signalling is required for RUNX2-Dependent induction of osteoblast phenotype. *J. Bone and Mineral Res.* 2006. 21; 637-646.
- Mc Allister B, Narayanan SA, Miki Y. Isolation of a fibroblast protein attachment from cementum. *J Periodont Res.* 1990; 25; 95-105.
- Mc Cauley Laurie K, Thomas J, Rosol & Charles C Capen. Effects of Cyclosporin A on Rat Osteoblasts (ROS 17/2.8 Cells) *in vitro*. *Calcif Tissue Int.* 1992; 51; 291-297.

- McCulloch CAG. Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontology* 2000. 1993; 1; 16-25.
- McCulloch CA. Origins and functions of cells essential for periodontal repair: the role of fibroblasts in tissue homeostasis. *Oral Dis.* 1995; 1; 271–278.
- McCulloch CA, Lekic P, McKee MD. Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament. *Periodontol* 2000. 2000; 24; 56–72.
- Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol.* 1976; 47; 256–260.
- Melcher AH. Cells of periodontium: their role in the healing of wounds. *Ann R Coll Surg Engl.* 1985; 67; 130–131.
- Mehling A, Grabbe S, Voskort M, Schwarz T, Luger TA, Beissert S. Mycophenolate mofetil impairs the maturation and function of murine dendritic cells. *J Immunol.* 2000; 165; 2374-2381.
- Metzger Z, Weinstock B, Dotan M, Narayanan AS, Pitaru S. Differential chemotactic effect of cementum attachment protein on periodontal cells. *J Periodontal Res.* 1998; 33; 126–129.
- Mina M, Kollar EJ. The introduction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol.* 1997; 32; 123-127.
- Movsowitz C, Epstein S, Fallon M, Ismail F, Thomas S. Cyclosporin-A *in vivo* produces severe osteopenia in the rat: effect of dose and a duration of administration. *Endocrinology.* 1998; 123; 2571-2577.
- Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nature biotechnology.* 2003; 21; 1025-32.
- Natsumeda Y, Carr SF. Human type I and II IMP dehydrogenase as targets. *Ann NY Acad Sci.* 1993; 696; 88-93.
- Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol.* 1982; 9; 257–265.
- Newman M G, Takei HH. Carranza. *Periodontología clínica.* 2003. Ed. McGraw-Hill, 9ª ed.
- Ogawa T, Tokuda M, Tomizawa K, Matsui H, Itano T, Kinishi R, Nagahata S, Hatase O. Osteoblastic differentiation is enhanced by rapamycin in rat osteoblast-like osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells. *Biochemical and biophysical Res Com.* 1998; 249; 226-230.
- Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells *in vitro*. *J Periodontol.* 2003; 74; 849–857.
- Olson S, Arzate H, Narayanan AS, Page RC. Cell attachment activity of cementum proteins and mechanism of endotoxin inhibition. *J Dent Res.* 1991; 70; 1272-7.
- Orban B. The epithelial network in the periodontal membrane. *J Am Dent Assoc.* 1952; 44; 632–635.
- Orsel P, Bielakoff J, Modrowski c, Miravet L, De Vernejoul MC. Cyclosporine A induces *in vivo* inhibition of resorption and stimulation of formation in rat bone. *J. Bone Miner Res.* 1989; 4; 387-391.
- Owens PDA. Ultrastructure of Hertwig's epithelial root sheath during early root development in premolar teeth in dogs. *Arch Oral Biol.* 1978; 23; 91–104.
- Park JB, Matsuura M, Han KY, Norderyd O, Lin WL, Genco RJ. Periodontal regeneration in class III furcation defects in beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. *J Periodontol.* 1995; 66; 462–477.
- Patarca R, Saavedra RA, Cantor H. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: The role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit Rev Immunol.* 1993; 13; 225-246.
- Paynter KJ, Pudy G. A study of the structure, chemical nature, and development of cementum in the rat. *Anat Rec.* 1958; 131; 233–251.
- Pitaru S, McCulloch CA, Narayanan AS. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodontal Res.* 1994; 29; 81–94.
- Pitaru S, Narayanan SA, Olsen S, Avion N, Hekmati H, Alt I, Metzger Z. Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces. *J Periodontal Res.* 1995; 30; 360–368.
- Pitaru A, Pritzki I, Bar Kana A, Grosskopf NS, Narayanan AS. Bone Morphogenetic protein1 induces the expression of cementum attachment protein in human periodontal ligament clones. *C. Tissue Res.* 2002; 43; 257-264.
- Pitaru S, Savion N, Hkemat M. Molecular and cellular interaction of a cementum attachment protein with periodontal cells and cementum matrix components. *J Perioront Res.* 1993; 28; 560-62.
- Plemons JM, Dill RE, Rees TD, Dyer BJ, Ng MC, Iacopino AM. PDGF- β producing cells and PDGF-B gene expression in normal gingival and cyclosporine A-induced gingival overgrowth. *J Periodontol.* 1996; 67; 264–270.
- Rincon JC, Bartold PM. The epithelial cell rests of Malassez—a role in periodontal regeneration?. *J Periodontal Res.* 2006; 41; 245-252.
- Ripamonti U, Reddi AH. Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997; 8; 154–163.
- Rittling SR, Denhardt DT. Osteopontin (OPN) function in pathology: Lessons from OPN-deficient mice. *Exp Nephrol.* 1999; 7; 103-113.
- Rodan G, and Harada S. The missing bone. *Cell.* 1997; 89; 677-680.
- Rutherford RB, Niekrash CE, Kennedy JE, Charette MF. Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *J Periodontal Res.* 1992; 27; 285–290.
- Rutherford RB, Ryan ME, Kennedy JE, Tucker MM, Charette MF. Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys. *J Clin Periodontol.* 1993; 20; 537–544.

- Saito M and Narayanan S. Signaling reactions induced in human fibroblast during adhesion to cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res.* 1999; 14; 65-72.
- Saito M, Iwase M, Maslan N, Nozaki N, Yamamuchi M, Handa K, Takahashi O, Sato S, Kawase T, Teranaka T, and Narayanan S. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone.* 2001; 29; 242-248.
- Schlosberg M, Movsowitz C, Epstein S, Ismail F, Fallon M, Thomar S. The effect of cyclosporine A administration and its withdrawal on bone mineral metabolism in the rat. *Endocrinology.* 1989; 124; 2179-2184.
- Schoroeder HE. Human cellular mixed stratified cementum: a tissue with alternating layers of acellular extrinsic-and cellular intrinsic fiber cementum. *Scweiz Monatsshr Zahnmed.* 1993; 103; 550-57.
- Sculean A, Donos N, Brex M, Reich E, Karring T. Treatment of intrabony defects with guided tissue regeneration and enamel-matrix-proteins. An experimental study in monkeys. *J Clin Periodontol.* 2000; 27; 466-472.
- Sculean A, Windisch P, Keglevich T, Gera I. Clinical and histologic evaluation of an enamel matrix protein derivative combined with a bioactive glass for the treatment of intrabony periodontal defects in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2005; 25; 139-147.
- Sela J, Schwartz Z, Swain LD, Boyan BD. The role of matrix vesicles in calcification. En: Bonucci E. *Calcification in biological systems.* Florida, Estados Unidos CRC press. 1992.
- Selvig KA. Electron microscopy of Hertwig's epithelial sheath and of early dentin and cementum formation in the mouse incisor. *Acta Odontol Scand.* 1963; 21; 175-186.
- Sena K, Morotome Y, Baba O, Terashima T, Takano Y, Ishikawa I. Gene expression of growth differentiation factors in the developing periodontium of rat molars. *J Dent Res.* 2003; 82; 166-71.
- Shane E, Rivas MC, Silverberg SJ, Kim TS, Ataron RB, Bilesikian JP. Osteoporosis alter cardiac transplantation. *Am. J. Med.* 1993; 94; 257-264.
- Shen E, Fu E, Gau CH, Hsieh YD, Chiand CHY. Effect of cyclosporine A on the Mineral Apposition Rate of cementum and Dentin in Growing Rats. *J Periodontol.* 2005; 76; 936-40.
- Shroff B, Kashner JE, Keyser JD, Hebert C, Norris K. Epidermal growth factor and epidermal growth factor-receptor expression in the mouse dental follicle during tooth eruption. *Arch Oral Biol.* 1996; 41; 613-617.
- Sintchak MD, Fleming MA, Futer O, Raybuck SA, Chambers SP, Caron PR, Murcko MA, Wilson KP. Structure and mechanism of inosin monophosphate dehydrogenase in complex with the immunosuppressant mycophenolic acid. *Cell.* 1996; 85; 921-930.
- Slavkin HC, Bessem C, Fincham AG, Bringas P, Santos V, Snead ML, Zeichner-David M. Human and mouse cementum proteins immunologically related to enamel proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1989; 991; 12-18.
- Slavkin HC, Boyd A. Cementum: an epithelial secretory product? *J Dent Res.* 1974; 53; 157-63.
- Slavkin HC, Bringas P, Bessem C, Santos V, Nakamura M, Hsu M, Snead ML, Zeichner-David M, Fincham AG. Hertwig's epithelial root sheath differentiation and initial cementum and bone formation during long-term organ culture of mouse mandibular first molars using serumless, chemically-defined medium. *J Periodontal Res.* 1988; 23; 28-40.
- Slavkin HC. Towards a cellular and molecular understanding of periodontics: cementogenesis revisited. *J Periodontol.* 1976; 47; 249-255.
- Smallwood G.A., Wickman J.M., Martinez E., Stieber A.C. and Heffron T.G. Osteoporosis Screening in an Outpatient liver transplant Clinic: Impact of primary Immunosuppression. *Transplantation Proceedings.* 2002; 34; 1569-1570.
- Somerman MJ, Perez-Mera M, Merkhofer RM, Foster RA. *in vitro* evaluation of extracts of mineralized tissues for their application in attachment of fibrous tissue. *J Periodontol.* 1987; 58; 349-351.
- Somerman MJ, Sauk JJ, Agraves WS, Morrison G. Expression of attachment protein during cementogenesis *J Biol Buccale.* 1990; 18; 207-214.
- Somerman MJ, Sauk JJ, Foster RA, Norris K, Dickerson K, Agraves WS. Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum. *J Periodontal Res.* 1991; 26; 10-16.
- Stekelenburg J, Klein BY, Ben-Bassat H, Rojansky N. Opposing effects of cyclosporin A and tyrphostin AG-1478 indicate a role for Src protein in the cellular control of mineralization. *J Cell Biochem.* 1998; 71; 116-26.
- Suthathiran M, Morris RE, Strim TB. Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action. *Am J Kidney Dis.* 1996; 28; 159-172.
- Suttie JW. Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Biochem.* 1985; 54; 459-477.
- Tamler R, Epstein S. Nonsteroid immune modulators and bone diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1068; 284-96.
- Tang Lin, Sohei Ebara, Satoshi Kawasaki, Shinji Wakabayashi, Toshio Nikaido & Kinio Takaoka. FK506 enhanced osteoblastic differentiation in mesenchymal cells. *Cell Biology International.* 2002; 26; 75-84.
- Ten Cate AR. A fine structural study of coronal and root dentinogenesis in the mouse. Observations of the so called von korff fibers and their contribution to mantle dentine. *J Anat.* 1978; 125; 183-197.
- Tenorio D, Cruchley A, Hughes FJ. Immunocytochemical investigation of the rat cementoblast phenotype. *J Periodontal Res.* 1993; 28; 411-419.
- Thesleff I. Developmental biology and building a tooth. *Quintessence Int.* 2003; 34; 613-620.
- Thomas HF. Root formation. *Int J Dev Biol.* 1995; 39; 231-237.
- Vasanasi SS, Datta HK. Characterisation of cytosolic FK506 binding protein 12 and its role in modulating expression of Cbfa1 and osterix in ROS 17/2.8 cells. *Bone.* 2005; 36; 243-53.
- Wada K, Takada M, Ueda T, Ochi H, Kotake T, Morishita H, Hanatani A, Natakani T. Relationship between acute rejection and cyclosporine or mycophenolic acid levels in Japanese heart transplantation. *Circ J.* 2007; 72; 289-293.
- Weiner S, Traub W. Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils. *FEBS Lett.* 1986; 206; 262-266.

- Whyte MP. Alkaline phosphatase: physiological role explored in hypophosphatais. Peck WA. Bone and Mineral Research. Amsterdam. Holanda Elsevier. 1989: 6; 175-218.
- Wilson TG. Periodontal regeneration enhanced: clinical applications of enamel matrix proteins. Chicago: Quintessence Books. 1999.
- Wu D-Y, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan A-S. Characterization of a collagenous cementum-derived attachment. J Bone Mineral Res. 1996: 11; 686-692.
- Yamamoto H, Cho SW, Kim EJ, Kim JY, Fujiwara N, Jung HS. Developmental properties of the Hertwig's epithelial root sheath in mice. J Dent Res. 2004: 83; 688-692.
- Yamamoto T, Domon T, Takahashi S, Arambawatta AK, Wakita M. Immunolocalization of proteoglycans and bonerelated noncollagenous glycoproteins in developing acellular cementum of rat molars. Cell Tissue Res. 2004: 317; 299-312.
- Yamashiro T, Tummers M, Thesleff I. Expression of bone morphogenetic proteins and Msx genes during root formation. J Dent Res. 2003: 82; 172-176.
- Yokokoji T, Narayanan AS. Role of D1 and cyclins in cell cycle progression of human fibroblasts adhering to cementum attachment protein. J. Bone and Mineral Res. 2001:16; 537-542.
- YoshikawaT, NakajimaH, YamadaE, Akahane M, Dohi Y, Ohgushi H, Tamai S, IchijimaK. In vivo osteogenic capability of cultured allogenic bone in porous hydroxyapatite: immunosuppressive and osteogenic potential of Fk506 in vivo. J Bone Miner Res. 2000: 15;11147-57.
- Zeichner-David M, Oishi K, Su Z, Zakartchenko V, Chen LS, Arzate H, Bringas P Jr. Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. Dev Dyn. 2003: 228; 651-663.
- Zeichner-David M. Regeneration of periodontal tissue: cementogenesis revisited. Periodontology 2000. 2006: 41; 196-217.
- Zhao M, Berry JE, Somerman MJ. Bone morphogenetic protein-2 inhibits differentiation and mineralization of cementoblasts *in vitro*. J Dent Res. 2003: 82; 23-27.