



**Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Odontología
División de Estudios de Posgrado e Investigación**

**Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos
Mineralizados**

**“LA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE ADHESIÓN DEL
CEMENTO RADICULAR (hrCAP) INDUCE LA
DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES DERIVADAS
DEL LIGAMENTO PERIODONTAL HUMANO Y REGULA EL
PROCESO DE MINERALIZACIÓN *IN VITRO*”**

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Odontológicas

PRESENTA

CD. Gonzalo Montoya Ayala

TUTOR

Dr. Higinio Arzate



México D.F.

2011



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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente al Dr. Higinio Arzate, por haberme aceptado en su sitio de trabajo y acercarme al mundo científico. Ofreciéndome su respaldo y ánimo, quien es un pilar fundamental no sólo en la realización de esta tesis sino en mi desarrollo profesional y personal.

A los miembros del jurado de examen Dra. Elba Rosa Leyva Huerta, Dra. Ana María Fernández Presas, Dra. Gabriela Mercado Celis, Dr. Jesús Ángel Arenas Alatorre, por sus valiosas contribuciones en este trabajo.

A Dr. Juan Luis Chávez Pacheco por sus conocimientos y apoyo en la realización de este trabajo.

A I.Q. Ivan Puente Lee por su colaboración en la obtención de las imágenes de microscopía electrónica de barrido y análisis de EDS.

A Fis. Roberto Hernández Reyes, I.Q. Mario Monroy Escamilla por el apoyo técnico en la obtención de las imágenes de microscopía electrónico de transmisión de alta resolución, microscopía de barrido y análisis de EDS

A Dr. J. Arenas por su ayuda y consejos en el análisis de cristalografía.

A mis compañeros de laboratorio Silvia, Mercedes, Janeth, Rita, Anita, Lia, Enrique, Carlos, Edmundo, por haber compartido la cotidianidad, conocimientos, consejos, experiencias, anécdotas e intercambios de opinión.

En general, a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de mis proyectos, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde lo más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

A mis padres y hermana que me brindaron su apoyo, me comprendieron, tuvieron tolerancia e infinita paciencia para permitir así llevar adelante un proyecto que pasó de ser una meta personal a otro emprendimiento más de familia. A ellos, mi eterno amor y gratitud.

A todos ellos Muchas Gracias



ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	5
PERIODONTO	5
ENCÍA	7
HUESO ALVEOLAR	8
CEMENTO RADICULAR	9
CEMENTOGÉNESIS	10
COMPOSICIÓN DEL CEMENTO	11
<i>Fosfatasa Alcalina (ALP)</i>	12
<i>Sialoproteína Ósea (BSP)</i>	12
<i>Osteopontina (OPN)</i>	13
<i>Factor de Crecimiento derivado del Cemento (CGF)</i>	13
<i>Proteína del Cemento 1 (CEMP1)</i>	14
<i>Proteína de Adhesión del Cemento (CAP)</i>	14
LIGAMENTO PERIODONTAL	15
CÉLULAS TRONCALES	16
Células troncales en tejidos dentales	18
Células troncales en pulpa dental	19
Células troncales derivadas de dientes deciduos	19
Células troncales en la papila y folículo dental	20
Células troncales en el ligamento periodontal	21
REGENERACIÓN PERIODONTAL	22
BIOMINERALIZACIÓN	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	28
OBJETIVOS	29
DISEÑO EXPERIMENTAL	30
RESULTADOS	36
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS	53



RESUMEN

El cemento radicular está compuesto por un 50% de matriz orgánica, formada por proteínas colagénicas y no colagénicas; y 50% de matriz inorgánica representada por fosfatos de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita. Se han descrito dos proteínas, que hasta el momento son específicas del cemento, la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento (CAP). CAP se ha inmunolocalizado en la matriz del cemento radicular, en espacios endosteales del hueso alveolar y en zonas paravasculares del ligamento periodontal; así como en cementoblastos putativos *in vitro* e *in vivo*. Tiene una alta afinidad por la hidroxiapatita y participa en el proceso de mineralización, *in vitro*, de cementoblastos putativos humanos.

Objetivos. Determinar *in vitro* la actividad biológica de hrCAP durante los procesos de proliferación, diferenciación y mineralización en células troncales derivadas del ligamento periodontal humano. Determinar el efecto inductor de hrCAP en la formación de cristales de hidroxiapatita.

Metodología. Se emplearon células troncales derivadas del ligamento periodontal humano, para realizar ensayos de proliferación mediante MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol), diferenciación por medio de la actividad específica de fosfatasa alcalina, así como la expresión relativa de CAP, CEMP1 y BSP, ensayo de cierre de la herida. Se realizó la tinción con Alizarina Roja para determinar la formación de nódulos minerales. Se realizaron ensayos con gel de metasilicato, para visualizar la formación de cristales libre de células.



Resultados. La proteína hrCAP a una concentración de 0.5µg/mL actúa como mitógeno de Células Troncales derivadas del Ligamento Periodontal Humano. hrCAP 5µg/mL induce un aumento significativo de la actividad específica de ALP, así mismo promueve la formación de nódulos de calcio. Las imágenes de SEM, HRTEM y los análisis de EDS demostraron que hrCAP está asociada a la formación y composición de cristales de hidroxiapatita, in vitro.

Conclusión. Todos nuestros resultados sugieren que hrCAP juega un papel importante durante el proceso de diferenciación de células troncales del ligamento periodontal humano y en el proceso de mineralización.



ABSTRACT

Cementum is a mineralized tissue composed of 50% of organic matrix, consisting of collagen and non collagenous proteins, and 50% of inorganic matrix represented by calcium phosphate as hydroxyapatite crystals. It's have been described two proteins, which are specific to the cement, cement protein 1 (CEMP1) and cement adhesion protein (CAP). CAP has been immunolocalized in the matrix of cementum in endosteal spaces of alveolar bone and in periodontal ligament paravascular areas as well as in putative cementoblasts *in vitro* and *in vivo*. It has a high affinity for hydroxyapatite and participates in the mineralization process *in vitro* of human putative cementoblasts.

Objective. To study the biological activity of hrCAP, *in vitro* during proliferation, differentiation and mineralization of stem cells obtained from human periodontal ligament. To analyse if hrCAP could induce the formation of hydroxyapatite crystals.

Methods. Stem cells isolated from human periodontal ligament, were studied by MTT proliferation assay. Differentiation assays were used by measuring the alkaline phosphatase activity, and the relative expression of CAP and BSP CEMP1, and the wound healing assay. Alizarin Red staining to determine the mineral nodules formation was used. By metasilicate gel, formation assays were performed cell-free glass.



Results. hrCAP protein at a concentration of 0.5 μ g/mL acts as a mitogen of Stem Cells from Human Periodontal Ligament. hrCAP 5 μ g/mL induces a significant increase in ALP specific activity and promotes the formation of calcium nodules. The images of SEM, HRTEM and EDS analysis showed that hrCAP is associated with the formation and composition of hydroxyapatite crystals in vitro.

Conclusion. All our results suggest that hrCAP plays an important role during the differentiation of stem cells from human periodontal ligament and in the process of mineralization.



INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

PERIODONTO

El periodonto es una unidad compleja, cuyo principal objetivo es brindar la unión del diente al hueso alveolar de la cavidad oral distribuyendo las fuerzas masticatorias y además constituyen un reservorio de células necesarias para la homeostasis. El origen embriológico de las estructuras dentales es a partir de la migración de células ectomesenquimales de la cresta neural y su interacción con el epitelio oral “temprano” para dar lugar al primordio dental. La formación del periodonto inicia con el proceso de la formación de la raíz, donde el mesénquima apical prolifera, mientras el epitelio dental interno y externo se fusionan, a nivel del tercio cervical, para dar lugar a la vaina epitelial de Hertwig. Las células de la vaina epitelial de Hertwig migran apicalmente hacia el ectomesénquima subyacente, dividiendo la papila del folículo dental; hasta la región del futuro ligamento periodontal, donde se re-asocian para formar los restos epiteliales de Malassez. Sin embargo, no todas las células migran hacia el sitio del ligamento periodontal; ya que algunas sufren apoptosis.^{8,13,17,56}

Se cree que las células de la vaina epitelial de Hertwig inducen la diferenciación de odontoblastos para formar la dentina radicular o para diferenciar células del saco dental hacia cementoblastos; también se ha propuesto que las células de la vaina epitelial de Hertwig secretan proteínas quimiotácticas dentro de la membrana basal para dirigir la migración de precementoblastos; aunque todavía no es claro su papel en el desarrollo.^{5,7}

Por otro lado, las células de los restos de Malassez están estrechamente relacionados con el desarrollo de la inervación del ligamento periodontal; así como en la regulación de la resorción radicular y la inducción en la formación de cemento acelular.¹⁷

El desarrollo dental está regulado por un gran número de genes, que incluyen factores de crecimiento, sus receptores y componentes de la matriz extracelular.⁸

Los componentes del periodonto son la encía, hueso alveolar, cemento radicular y ligamento periodontal (fig.1).⁵⁰

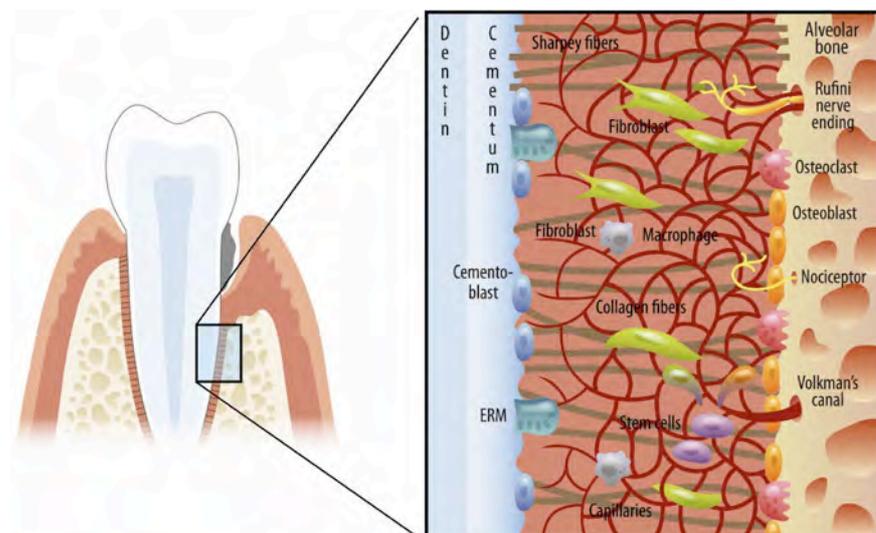


Fig1. Esquema del Periodonto⁵³



ENCÍA

Es una porción de la mucosa oral que recubre al hueso alveolar y rodea el cuello del diente. Se ha dividido en encía marginal, interdental y adherida o insertada. Todas estas estructuras están recubiertas por epitelio.^{17,50}

El epitelio gingival es una barrera física contra los microorganismos; la cual muestra variaciones morfológicas de acuerdo a su ubicación. Se clasifica en epitelio oral, epitelio del surco y epitelio de unión. Estas estructuras epiteliales varían en el grado de queratinización y número de células. El epitelio de unión mantiene una directa adhesión a la superficie del diente.¹³

El tejido conectivo de la encía se denomina lámina propia y consta de dos capas: un estrato papilar subyacente al epitelio, y una capa reticular contigua al periostio del hueso alveolar. El tejido conectivo posee un compartimento celular y otro extracelular compuesto por fibras. Los elementos celulares más abundantes del tejido conectivo son fibroblastos, que se originan a partir del mesénquima perifolicular. Los fibroblastos son responsables de la producción de los elementos del tejido conectivo, tanto en la encía normal como en enfermedad.^{13,50}

La matriz del tejido conectivo está organizada en fibras de colágena que constituyen el aparato fibroso de la encía. Las fibras se clasifican de acuerdo a su localización, origen e inserción. Se han agrupado en fibras dentogingivales, dentoperiostias, alveolingivales, semicirculares, transgingivales, intergingivales y transeptales. Las fibras colágena de la encía están compuestas principalmente por colágena tipo I organizada en fibras densas dentro de la lámina dental y colágena tipo III localizada en fibras delgadas y distribuidas en patrones reticulares cercanas a la membrana adyacente de la unión epitelial.^{8,13,50}



HUESO ALVEOLAR

El proceso alveolar es la porción del maxilar y la mandíbula que forma y sostiene a los alveolos dentarios. Está conformado por una pared externa de hueso cortical formado por laminillas óseas compactadas, la pared interna del alveolo constiuida por hueso compacto delgado llamado hueso alveolar, y las dos láminas óseas separadas por hueso esponjoso. El hueso alveolar está compuesto por matriz orgánica, de la cual la colágena tipo I y III son las más abundantes, además contiene proteínas no colágenas como sialoproteína ósea, osteocalcina, osteopontina, proteínas morfogenéticas de hueso y factores de crecimiento. Los osteoblastos son las células que producen la matriz orgánica del hueso, y se diferencian de células foliculares pluripotentes. El otro componente estructural es matriz inorgánica formada por minerales, principalmente calcio y fósforo en forma de cristales de hidroxiapatita.^{8,13,17,50}

El tamaño, forma y localización del diente determina la morfología del hueso alveolar. El hueso alveolar tiene un grosor de 0.1 a 0.4 mm y consiste de un sistema Harversiano laminar; y de canales de Volkman por donde pasan vasos sanguíneos, linfáticos y las fibras nerviosas. Sufré un proceso de remodelación constante que permite la resistencia a fuerzas, cambios de forma, reparación de heridas y homeostasis de calcio y fósforo.^{8,50}



CEMENTO RADICULAR

Fue descrito por primera vez en 1835 como un tejido conectivo mineralizado avascular y sin inervación que recubre la superficie radicular. No sufre procesos de remodelación pero si de aposición, el cual se mantiene durante toda la vida. Se ha clasificado como celular o acelular dependiendo de la presencia o ausencia de cementocitos en su estructura. Otra clasificación incluye cemento con fibras intrínsecas o extrínsecas, dependiendo de la presencia de fibras colágenas.^{19,30,34}

Cemento Acelular Afibrilar. El área y localización varía de diente a diente, se deposita a nivel de la unión dentino-esmalte, su principal componente son glicosaminoglucanos. Es depositado en áreas aisladas sobre el cemento y la dentina, comienza a formarse al terminar la maduración del esmalte.^{19,30}

Cemento celular de fibras intrínsecas. Contiene cementocitos incluidos en una matriz de colágena y fibras intrínsecas. Las fibras están orientadas paralelamente a la superficie radicular y rodean al diente. La matriz es depositada muy rápidamente, por lo cual se observan cementocitos en el espacio entre las células de la vaina epitelial de Hertwig y la dentina. Se localiza en el tercio apical, en bifurcaciones, en sitios de fractura, juega un papel importante en el proceso de reparación.^{19,30}

Cemento acelular de fibras extrínsecas. Está formado por fibras de colágena secretadas por fibroblastos del ectomesénquima, se localiza desde la región cervical hasta 2/3 de la raíz, con un grosor de 50 a 250 μm . Es un tejido homogéneo,



mineralizado en un 45-60%, siendo la capa más interna la menos mineralizada y la externa un grupo de capas alternadas más o menos mineralizadas que corren paralelas a la superficie de la raíz; aquí se insertan las fibras del ligamento periodontal (fibras de Sharpey). Su formación comienza poco tiempo después de la formación de la raíz y continúa mientras las estructuras adyacentes permanezcan intactas.^{19,30}

Cemento Mixto Celular Estratificado. Estrictamente encontrado en humanos, en las bifurcaciones (después de la erupción) y posteriormente, en el tercio apical de las raíces; está constituido por capas alternadas de cemento acelular con fibras extrínsecas y cemento celular de fibras intrínsecas conocidas como “líneas incrementales” o “resting lines”.^{19,30}

CEMENTOGÉNESIS

Algunos autores consideran que el cemento acelular y el celular tienen un origen embriológico distinto. Algunos estudios sugieren que células progenitoras se originan desde el propio folículo dental, el cual es de origen ectomesénquima (derivado de la cresta neural craneal). Sin embargo, también se ha descrito que podrían derivarse de un origen epitelial; esto es, a partir de células de la vaina epitelial de Hertwig, sufren una transformación epitelio-mesénquima. Aún no es totalmente claro el origen del cemento.^{30,34,35}

La cementogénesis inicia con el depósito de matriz sobre la superficie dentinaria por células de la vaina epitelial de Hertwig, las cuales se desintegran, migran y se organizan como células ectomesenquimales de la papila dental,



y posteriormente se diferencian en cementoblastos. El destino de las células de la vaina epitelial de Hertwig, también es controvertido, ya que tradicionalmente se propone que la vaina epitelial se desintegra y quedan pequeños grupos de células epiteliales que sobreviven indefinidamente en el ligamento periodontal (restos de Malassez).^{35,36,52,64,79}

Estudios recientes sugieren que las células epiteliales de la vaina de Hertwig sufren transformación ectomesenquimal, para diferenciarse en fibroblastos y cementoblastos, que secretan el cemento acelular y celular, respectivamente.^{30,36}

COMPOSICIÓN DEL CEMENTO

Estudios bioquímicos muestran que el cemento es muy similar en composición al hueso. Sin embargo el cemento radicular no es uniforme y difiere además en composición química. Cerca del 50% es matriz inorgánica constituida por fosfatos de calcio que se organizan en forma de cristales de hidroxiapatita, y el resto corresponde a la matriz orgánica consistente principalmente de colágenas tipo I (95%) y tipo III (5%), las cuales en su conjunto desempeñan un papel estructural; así como glicoproteínas, proteoglicanos y proteínas no colagénicas como amelogenina, ameloblastina, enamulina, fosfatasa alcalina (ALP), sialoproteína ósea (BSP), proteína de la matriz dentinaria-1 (DMP-1), osteopontina, fibronectina, osteocalcina, el factor de crecimiento derivado del cemento (CGF). Se han descrito dos proteínas, que hasta el momento son específicas del cemento, la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento (CAP).^{2,3,30,34,36,65,75}



Fosfatasa Alcalina (ALP)

Proteína glicosilada localizada en la porción externa de la membrana citoplasmática y en vesículas de matriz. Regula las concentraciones extracelulares de fosfatos, catalizando la hidrólisis de fosfomonoésteres a un pH alcalino. La actividad específica de esta enzima, es un indicador de desarrollo y diferenciación. Su actividad se ha localizado en placas de crecimiento de cartílago, médula ósea, osteoblastos y cementoblastos. En el hueso se ha localizado en el frente de mineralización.^{8,30,36}

Sialoproteína Ósea (BSP)

Glicoproteína altamente fosforilada de 59 KDa con altos niveles de ácido glutámico. Se expresa durante estadios tempranos del desarrollo de la raíz y en el diente maduro. Posee la secuencia RGD que se encuentra relacionada con funciones de adhesión celular y participa en el inicio de la mineralización. Es una proteína quimioatrayente de pre-cementoblastos, promueve su adhesión y diferenciación. Tiene la capacidad de una proteína nucleadora de cristales de hidroxiapatita, por lo que se le atribuye un papel importante durante las primeras etapas de mineralización.^{8,25,30}



Osteopontina (OPN)

Proteína altamente fosforilada, de 44 KDa, expresada en estadios tempranos del desarrollo de la raíz y está presente dentro del ligamento periodontal del diente maduro. Regula la migración, diferenciación y supervivencia celular a través de su interacción con integrinas. Se ha localizado en el frente de mineralización del hueso, en riñón, células de músculo liso arterial, participa en la inflamación regulando la activación de monocitos hacia macrófagos, fagocitosis y la producción de óxido nítrico. En tejidos mineralizados, se cree puede regular la adhesión y diferenciación de osteoblastos, así como en la mineralización de la matriz, modulando el crecimiento de los cristales.^{8,25,30}

Factor de Crecimiento derivado del Cemento (CGF)

Es una proteína que se encuentra en la matriz mineral del cemento radicular, con movilidad relativa de 23 KDa. Regula la concentración de Calcio, la hidrólisis de fosfatos inorgánicos citosólicos. Induce algunas vías de señalización asociadas con mitogénesis, activa la cascada de señalización de PKC y la expresión de proto-oncogénos.⁷⁸



Proteína del Cemento 1 (CEMP1)

La proteína del cemento 1 es una proteína de aproximadamente 50 KDa, que se ha localizado y expresado en poblaciones celulares del ligamento periodontal, cementoblastos y células de espacios endosteales, por lo que podría ser considerado como un marcador de cementoblastos. Se ha observado que participa regulando la formación de cristales de hidroxiapatita, así como de la expresión de ALP, OPN y BSP en cementoblastos putativos in Vitro, por lo que se cree juega un papel importante en la diferenciación de cementoblastos y en la mineralización de la matriz extracelular de los mismos.^{1,2,3}

Proteína de Adhesión del Cemento (CAP)

El gen de la proteína de adhesión del cemento se localiza en el cromosoma 10p13-p14, se considera un splicing alternativo del gen PTPLA (se expresa mayoritariamente en el desarrollo y etapas posnatales de músculo cardíaco y en menor medida en músculo esquelético). La proteína de adhesión del cemento tiene 140 aminoácidos y un peso molecular de 14.920 KDa, su carga eléctrica es neutra (pI 7.78) y carece de péptido señal. Es una proteína con una movilidad relativa de 54-57 KDa que se ha aislado, caracterizado y purificado a partir de extractos de cemento maduro bovino y humano, mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal anti-CAP bovina (3G9). Se ha inmunolocalizado en la matriz del cemento radicular, en espacios endosteales del hueso alveolar y en zonas paravasculares del ligamento periodontal; así como en cementoblastos putativos in vitro e in vivo.^{2,3,65,75}



El papel biológico de la proteína de adhesión del cemento ha involucrado un papel quimiotáctico de células del ligamento periodontal y del hueso alveolar hacia la superficie radicular. Se sugiere que su papel de adhesión podría estar mediada por el receptor de integrinas $\alpha 5\beta 1$, así como una alta afinidad por la fibronectina, hidroxiapatita, dentina y cemento radicular. Incrementa la actividad de ALP, así como la expresión de proteínas asociadas al proceso de biomineralización. Se ha demostrado que en fibroblastos gingivales, la proteína CAP activa la vía de MAPK, mediada por ERK2 induciendo la expresión de c-fos, el cual es un factor de transcripción que participa en la proliferación celular.^{3,7,46,51,54,59,66}

LIGAMENTO PERIODONTAL

Es tejido conectivo especializado que tiene como función principal dar soporte al órgano dentario, manteniéndolo en su alveolo, soportar las fuerzas de masticación, por medio de fibras de colágena, principalmente tipo I, dispuestas en forma de haces que se insertan en el cemento radicular (fibras de Sharpey) y en el hueso alveolar. El ligamento periodontal es más estrecho a nivel medio de la raíz, lo que le da una conformación de reloj de arena; tiene un grosor de 0.15 a 0.4 mm, el cual disminuye conforme avanza la edad de las personas. Es un tejido fibroso producido principalmente por fibroblastos, que aparecen como células elongadas orientadas a lo largo de las fibras. Dentro del ligamento periodontal se han localizado células troncales con cierto potencial para diferenciarse hacia osteoblastos, cementoblastos y fibroblastos; que se cree participan en el mantenimiento, reparación y regeneración del tejido.



Con estos hallazgos se cree que tanto los osteoblastos, cementoblastos y fibroblastos provienen de un ancestro común.^{8,13,17,50,67}

CÉLULAS TRONCALES

Martin Evans(1981), premio Nobel 2007, identificó, aisló y estableció el cultivo celular de células troncales a partir de un blastocisto de ratón; por medio de modificaciones genéticas, reimplanto las células embrionarias de carcinoma en ratones para obtener quimeras, con estos trabajos concluyó que las células embrionarias de ratón tenían la propiedad de ser clonogénicas y de permanecer en un estado de indiferenciación. Por lo tanto, las células troncales tienen dos características definidas: 1) la capacidad de autorrenovación indefinida para dar lugar a más células troncales hijas idénticas; 2) la capacidad de diferenciarse hacia un fenotipo celular definido con funciones específicas.^{10,21,31,49}

Thompson (1998) aisló células embrionarias humanas de la masa celular interna (ICM) del estadio de 4 a 7 días del blastocisto, estas células expresaban marcadores clásicos de pluripotencialidad como Oct4, Nanog, Sox2, fosfatasa alcalina y altos niveles de actividad de telomerasa.^{62,72} Reubinoff (2000), Henderson (2002), Amit e Itskovits-Eldor (2002), Laslett (2003), observaron que tanto las células embrionarias de ratón y las humanas expresaban genes relacionados con la pluripotencialidad, pero su función y las vías de señalización son distintas.^{10,32,58,62}

Las células troncales embrionarias son planas y tienden a agruparse en colonias esféricas. La capacidad de las células embrionarias para diferenciarse hacia linajes celulares de las 3 capas embrionarias (ectodermo. mesodermo



y endodermo) abrió el panorama en las terapias regenerativas de enfermedades humanas. Sin embargo, el problema del empleo de las células embrionarias radica en que su crecimiento exponencial es paulatino en comparación con las de ratón y el uso de la capa celular alimentadora podría modificarlas genéticamente, causando aberraciones cromosómicas, así como la formación de tumores como teratomas (tumor encapsulado con derivados de las tres capas embrionarias). Los avances científicos han permitido superar algunas de estas desventajas; sin embargo, el aspecto ético para el aislamiento y empleo de las células embrionarias, hace necesario el estudio de otro tipo de células troncales.^{10,31,70}

Las células troncales adultas, también conocidas como células troncales somáticas, comparadas con la naturaleza inmortal y pluripotentes de las células embrionarias, son células más maduras y con capacidad de vida limitada y con una capacidad de diferenciación multipotente, es decir que pueden formar un limitado número de linajes celulares de acuerdo a la capa embrionaria de origen. Todos los tejidos especializados con capacidad de renovación durante toda la vida, contienen células troncales, como el caso del epitelio gastrointestinal, dermis, sangre periférica y en cerebro.^{6,11,22,44,49}

Las células troncales hematopoyéticas de médula ósea fueron el primer tipo de células troncales adultas en ser identificadas, y empleadas en el tratamiento de algunas enfermedades sanguíneas.^{11,49}

Otro tipo de células troncales adultas son las células troncales del estroma de la médula ósea o células troncales mesenquimales; fueron inicialmente identificadas en médula de roedores como unidades formadoras de colonias de



fibroblastos con la capacidad de formar hueso, cartílago y tejido adiposo, así como también reconstruir el microambiente hematopoyético.^{12,15,41}

Las células troncales mesenquimales se encuentran como una célula plana y alargada o elongada. Fenotípicamente, las células troncales mesenquimales expresan marcadores de superficie como CD49a/CD29, CD44, STRO-1, CD90, CD105, CD106, CD146, CD140b, CD166 y CD271. Sin embargo, estudios clonales muestran varias colonias de células mesenquimales con diferentes capacidades de proliferación y desarrollo tanto *in vitro* como *in vivo*, mostrando poblaciones heterogénea de estas células.^{6,12,22,41,49,76}

Las células troncales mesenquimales se han identificado, además del estroma de la médula ósea, en tejido adiposo, músculo, tejido sinovial, sangre periférica, páncreas fetal, hígado, y recientemente en tejidos dentales.^{11,15,22,33,67}

Células troncales en tejidos dentales

Las células troncales mesenquimales se han identificado en tejidos dentales, mediante la expresión del marcador STRO-1, el cual se ha utilizado para aislar y purificar células troncales del estroma de la médula ósea; así como, análisis muestran que las células troncales del estroma de la médula ósea, células troncales de la pulpa dental, de los dientes deciduos y del ligamento periodontal expresan el marcador perivascular CD146, marcador de superficie en células troncales mesenquimales que ha permitido aislarlas desde múltiples órganos fetales y adultos, donde su expresión está relacionada con multipotencialidad. Estas observaciones fueron correlacionadas con estudios de co-localización de esos marcadores en células perivasculares *in situ*.^{41,63,68,76}



Células troncales en pulpa dental

Desde la década de los 80's, algunos estudios han demostrado la presencia de células troncales en la pulpa dental. En 2000 Gronthos aisló por primera vez una población celular clonogénica de la pulpa dental humana adulta, llamadas células troncales de la pulpa dental.^{15,33}

Los nichos de estas células se localizan, predominantemente, en un área perivascular en la cavidad pulpar, desde donde migran al sitio de la lesión para proliferar y diferenciarse para reparar la dentina.^{33,41} Son positivas a STRO-1, expresan altas concentraciones de proteínas dentinarias y tienen el potencial para formar nódulos de calcio *in vitro*, así como el potencial para diferenciarse hacia fenotipos adipogénico, neurogénico, osteogénico y condrogénico bajo la influencia de medios de inducción.^{33,41,76}

Células troncales derivadas de dientes deciduos

La transición de la dentición decidua a la dentición permanente es un proceso dinámico que combina la resorción de la raíz del diente deciduo y al erupción del diente permanente. En los restos coronales del diente exfoliado permanecen células troncales que pueden ser aisladas y son distintas a las células troncales de la pulpa dental, por lo que se denominan células troncales de dientes deciduos exfoliados. En estudios *ex vivo*, pueden formar una estructura similar a la dentina, pero incapaces de regenerar el complejo pulpa-dentina. Sin embargo, muestran una expresión de marcadores neuronales, con morfología similar a fibroblastos y con capacidad de inducir la formación de hueso en ratones inmunocomprometidos sin



diferenciarse directamente en osteoblastos. De acuerdo a estas características, los dientes deciduos no solo proveen la guía para la erupción del diente permanente, sino que también están involucrados en la inducción de la formación de hueso durante la erupción de la dentición permanente.^{41,63,67}

Células troncales en la papila y folículo dental

Existe una zona rica de células apicales entre la papila apical y la pulpa dental, las cuales expresan bajos niveles de proteínas dentinarias, sin embargo expresan marcadores relacionados con la regulación en respuesta a estimulación osteogénica. Han mostrado la capacidad de diferenciarse a fenotipos adipogénico y neurogénico. Se ha demostrado que las células troncales de la papila apical son los precursores de la formación de la pulpa radicular dando lugar a odontoblastos para la formación de la dentina coronal, mientras que las células troncales de la pulpa dental cumplen con funciones reparativas.^{41,49,63}

El folículo dental es un tejido de origen ectomesenquimal, que da lugar al órgano del esmalte y a la papila dental durante el desarrollo del germen dental. Este tejido contiene células progenitoras que forman el periodonto (cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar). Las células progenitoras han sido aisladas de folículos dentales de terceros molares impactados. Estas células progenitoras muestran una morfología parecida a los fibroblastos y expresan marcadores de células troncales, con capacidad de diferenciación osteogénica *in vitro*.^{41,49}



Células troncales en el ligamento periodontal

Hay evidencia que el ligamento periodontal contiene poblaciones celulares capaces de diferenciarse en cementoblastos y osteoblastos. La presencia de múltiples tipos celulares en el ligamento periodontal sugiere que este tejido es un nicho de células troncales que mantienen la homeostasis del tejido periodontal. Seo 2004 aisló una población de células troncales a partir del ligamento periodontal positivas a marcadores como STRO-1, escleraxis (factor de transcripción específico de tendón) y varios CD's; así como también marcadores de fenotipos cementoblástico/osteoblástico. Estudios *ex vivo*, muestran que las células troncales del ligamento periodontal pueden regenerar estructuras similares al ligamento periodontal y al cemento después de ser transplantadas en ratones inmunocomprometidos; dichas estructuras son totalmente distintas a las estructuras formadas por otras células troncales dentales.^{41,55,57,67}

Las células troncales del ligamento periodontal humano forman un tejido denso de colágena tipo I, simulando al ligamento periodontal. Las fibras de colágena generadas, *in vivo*, son capaces de conectarse con una estructura similar al cemento que mimetizaba la unión fisiológica de las fibras de Sharpey, dentro de defectos periodontales en ratones inmunocomprometidos. La alta tasa proliferativa, que muestran las células troncales del ligamento periodontal, permiten que sean la mejor opción para la aplicación clínica en el tratamiento de regeneración tisular.^{15,41,67}



REGENERACIÓN PERIODONTAL

La enfermedad periodontal es una entidad infecciosa crónica que trae consigo la pérdida del aparato de inserción y eventualmente la pérdida del órgano dentario; es la enfermedad bucal de mayor prevalencia a nivel mundial. La enfermedad tiene como etiología la placa bacteriana, y si se incluyen otros factores como trauma, enfermedades sistémicas, genéticas, entre otras, pueden contribuir a la gravedad de la misma.¹³

Las distintas modalidades de terapia periodontal convencionales se han establecido como medios efectivos en el tratamiento de la enfermedad periodontal y detener su progresión. La regeneración periodontal se refiere a la neoformación de los tejidos de sostén y recuperar la funcionalidad perdida. Los eventos necesarios para la regeneración periodontal involucran procesos biológicos como proliferación, migración, adhesión y diferenciación celular, de modo coordinado en tiempo y espacio.^{14,16,40}

Debido a la pobre capacidad regenerativa, innata, de los tejidos periodontales dañados se han desarrollado diversos procedimientos clínicos para restaurar la arquitectura y función del periodonto. Hay una gran variedad de opciones de tratamiento como autoinjertos, xenoinjertos bovinos, combinaciones de membranas y rellenos. La terapia periodontal convencional se ha empleado para detener la progresión de la enfermedad, como es el caso del debridamiento de la superficie radicular con la finalidad de eliminar los agentes causales de la enfermedad periodontal. En combinación con el empleo de hueso o sustitutos de hueso, se ha buscado la inducción de neo-formación de las estructuras perdidas por la



enfermedad periodontal. Los distintos injertos óseos utilizados, incluyen injertos autógenos, aloinjertos, xenoinjertos y materiales aloplásticos. El uso de injertos provee un armazón estructural para el desarrollo, maduración y remodelación de los defectos óseos. Sin embargo, estudios histológicos muestran que los injertos, especialmente los aloinjertos y xenoinjertos, tienen poca capacidad osteoinductiva y generalmente llegan a rodearse de tejido conectivo fibroso y denso con regeneración periodontal limitada. Por tanto, la regeneración periodontal implica la formación óptima de hueso alveolar y la inducción de la cementogénesis en la superficie radicular expuesta y denudada con la orientación y neo-inserción de las fibras de Sharpey.^{16,44,50,60,61}

La regeneración tisular guiada, es una técnica clínica basada en el hecho de que el ligamento periodontal contiene células capaces de formar cemento y establecer la nueva inserción de fibras entre el hueso y el cemento. La regeneración tisular guiada incluye el uso de barreras mecánicas (membranas) para promover la re-población selectiva del defecto periodontal por células derivadas del ligamento periodontal. Desde los primeros reportes, el uso de las membranas ha ido evolucionando, se han empleado membranas no reabsorbibles (que después de un periodo de seis semanas se retiraban con un procedimiento quirúrgico), posteriormente aparecieron membranas reabsorbibles que tienen la característica de ser biocompatibles, con menos riesgo en el post-operatorio.^{40,44,50}

Se han combinado varias técnicas que podrían ofrecer un mejor pronóstico ante la enfermedad periodontal, desafortunadamente hasta ahora se ha logrado un limitado potencial regenerativo y con serias restricciones.



En la actualidad, se han creado innovadoras terapias para lograr la completa regeneración periodontal, lo que ha dado lugar a la formación de un campo en la medicina regenerativa e ingeniería tisular. La ingeniería de tejidos se basa en el uso de factores de crecimiento, células y materiales que sirven como andamio para reproducir los eventos secuenciales de la formación y desarrollo de los tejidos; permitiendo que el conocimiento de estos procesos biológicos de lugar a la total regeneración periodontal. Con los nuevos hallazgos de la existencia de células troncales, de factores de crecimiento con capacidad regenerativa in vivo abre la posibilidad de reparar daños periodontales por medio de la capacidad regenerativa periodontal in situ. Esta serie de eventos complejos involucra el reclutamiento local de células progenitoras adyacentes al defecto, la proliferación y migración de células progenitoras en respuesta a señales dentro de los defectos que han sido mantenidos y protegidos por membranas. Posteriormente la células puede diferenciarse hacia fibroblastos y fenotipos mineralizantes (cementoblastos y/u osteoblastos). En conclusión la inducción del reclutamiento celular, las condiciones de crecimiento y diferenciación hacia un linaje específico requiere el control de numerosos factores de crecimiento y citocinas dentro del microambiente de la matriz extracelular. El ambiente en el cual las células y tejidos crecen, es la variable en la que la ingeniería de tejidos se ha enfocado para regular la supervivencia, autorrenovación y multidiferenciación de las células troncales. En este sentido, todas las actividades celulares, como la migración, proliferación, diferenciación y expresión génica son orquestadas por una gran variedad de moléculas, específicamente proteína morfogénica de hueso (BMP)-2-7, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante (TGF)- β , factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento fibroblástico



(FGF), factor de crecimiento insulínico (IGF)-1, entre otros.^{16,18,40,42,,60}

Los factores de crecimiento son producidos, normalmente, por células sanas; sin embargo en un ambiente de enfermedad (como el caso de la enfermedad periodontal), los factores de crecimiento necesarios para la regeneración del tejido requieren una estimulación exógena. Algunos factores de crecimiento han mostrado un gran potencial como agentes terapéuticos en ensayos preclínicos y clínicos con dosis óptimas.¹⁸

Con avances en la tecnología regenerativa endógena, se espera que tejidos con poca capacidad intrínseca de renovación, logren promover y/o aumentar su capacidad regenerativa. Para tal efecto se han empleado múltiples factores de crecimiento, proteínas bioactivas derivadas de pacientes, andamios de biomateriales que pueden ser usados como un complejo que se emplee de una manera sencilla en la práctica clínica. Uno de los agentes bioactivos autógeno empleado es el plasma rico en plaquetas (PRP) ya que contiene múltiples factores de crecimiento (TGF- β , VEGF y PDGF) que juegan un papel importante en la homeostasis de los tejidos. El plasma rico en plaquetas se ha empleado en cirugía máxilofacial y periodontal para potencializar la regeneración del hueso y tejidos blandos. Otro avance en periodoncia, ha sido el descubrimiento y uso del agente bioactivo derivado de la matriz del esmalte (EMD, Emdogain) como un adyuvante en cirugía periodontal, estimulando la regeneración de los tejidos perdidos por la enfermedad periodontal. El EMD es un extracto ácido purificado de la matriz de esmalte cuyo principal componente (>95%) es una familia de proteínas hidrofóbicas, amelogeninas. Algunos estudios sugieren que la acción del EMD, en la regeneración periodontal, es el reclutamiento de células que den lugar a la formación de cemento,



hueso y la inserción de fibras del ligamento periodontal. Al comparar el uso del EMD con la regeneración tisular guiada no se mostraron diferencias significativas; sin embargo, en combinación con otros procedimientos aumentó la efectividad del EMD.^{18,24,40}

BIOMINERALIZACIÓN

El proceso de biomineralización ocurre en los diversos sistemas biológicos, en donde la formación y organización está altamente regulada. En los vertebrados, los cristales de hidroxiapatita constituyen la fase mineral, la cual se deposita en la matriz orgánica.^{4,45}

Para que ocurra la nucleación de los cristales de hidroxiapatita es necesario que haya una fuente de iones de calcio y fosfatos, y la participación de una o varias biomoléculas.^{29,43,73}

En el caso del hueso y dentina, se ha observado que los osteoblastos y odontoblastos, liberan vesículas que mantienen la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, presente en la membrana celular, la cual libera los iones fosfato. Además, proteínas transmembrana, llamadas anexinas, forman canales de calcio que permiten la entrada de dichos iones. Posteriormente, las células forman uniones intercelulares rodeando la matriz en formación, separándola del medio circundante. Con el establecimiento de uniones intercelulares, las células secretan proteínas no colágenas con propiedades acídicas con alta afinidad por calcio. La matriz constituida principalmente por colágena tipo I y proteoglicanos sulfatados, sirve como andamio para la asociación de proteínas no colágenas. Permitiendo,



de esta manera la orientación del crecimiento cristalino.^{29,45,73,74}

Se han realizado varios estudios con diversos sistemas experimentales, libres de células, para determinar el efecto de proteínas de tejidos mineralizados en la formación de hidroxiapatita in vitro. Los sistemas a base de la difusión en gel son comunmente empleados para evaluar la capacidad nucleadora de cristales usando diversas biomoléculas, debido a que simulan a las características de la matriz de los tejidos mineralizados además que se tiene un mejor control de la concentración y la naturaleza de los componentes del gel, difusión de los iones, y en condiciones similares a las fisiológicas (pH, temperatura y presión) que pueden influir en la formación y crecimiento del gel.^{26,43,69}



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La enfermedad periodontal ocasiona la destrucción de las estructuras de soporte del órgano dentario. El objetivo principal de la terapia periodontal no solamente incluye detener el avance de la enfermedad, sino también la regeneración de estructuras perdidas. Se han implementado distintas técnicas terapéuticas, sin embargo, ofrecen un potencial limitado. Por lo cual, el conocimiento de los mecanismos biomoleculares que regulan la formación y desarrollo del periodonto permitirá implementar una técnica con pronóstico predecible. La cementogénesis, es un campo poco estudiado, si se logran elucidar los mecanismos que se llevan a cabo durante la formación del cemento abrirá un panorama para el desarrollo de terapias dirigidas a la completa regeneración del aparato de inserción.



OBJETIVOS

- Determinar *in vitro* la actividad biológica de hrCAP durante los procesos de proliferación, diferenciación y mineralización en células troncales derivadas del ligamento periodontal humano.
- Determinar el efecto inductor de hrCAP en la formación de cristales de hidroxiapatita, *in vitro*.



DISEÑO EXPERIMENTAL

Clonación, expresión y purificación de la hrCAP.

A partir del RNAm de células de cementoblastoma humano se construyó la biblioteca de cDNA λ ZAP Express EcoRI/XhoI, por medio de un fago cooperador ExAssit se obtuvieron los insertos de cDNA como plásmido "Bluescript".

Se incubaron células *E. coli* (XL1-Blue MRFa) con el fago ExAssit, se calentó la mezcla y se centrifugó para obtener el sobrenadante e incubar células *E. coli* XL0LR; las colonias que contenían el plásmido se crecieron en condiciones de cultivo. Por medio del método de "Panning", células fibroblásticas COS-7 fueron transfectadas con el plásmido extraído de la biblioteca de cDNA; una vez transfectadas se resuspendieron con un anticuerpo policlonal anti-CP y se incubaron en placas con el anticuerpo hecho en cabra anti-conejo IgG.

Las células que se adhirieron a las placas se rasparon y se aisló el plásmido de DNA. Con el DNA aislado se transformaron células competentes de *E. coli*, para su posterior multiplicación. Las clonas recombinantes se construyeron en un vector de clonación pENTR/SD con el gen de la proteína y una cola de 6xHis en el marco de lectura; con el vector pET-DEST 42 se le añadió un epítipo V5.

El plásmido resultante (DEST-42) se introdujo en células de expresión *E. coli* BL21, se indujo la expresión de la proteína hrCAP y posteriormente se purificó por cromatografía de afinidad de Ni²⁺ y después por afinidad a hidroxapatita (HA).

La detección de la proteína hrCAP en los pasos de purificación se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamidaal 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), e inmunodetección por medio de Western Blot empleando un anticuerpo anti-CAP y un anticuerpo anti-6xHis.



Aislamiento y Cultivo de Células Troncales del Ligamento Periodontal Humano (CTLPH)

Las células del ligamento periodontal fueron separadas cuidadosamente de la superficie radicular y después digeridas en una solución de 3mg/mL de colagenasa tipo I y 4mg/mL de dispasa por 1 hora a 37°C. Las células del ligamento periodontal se cultivaron con medio α -MEM suplementado con suero fetal caprino 15%, 100 μ mol/L de ácido ascórbico 2-fosfato, 2mmol/L de glutamina, 100U/mL de penicilina, y 100 μ g/mL de estreptomina e incubadas a 37°C en 5% de dióxido de carbón. Para identificar las células troncales se emplearon los anticuerpos anti-STRO-1 y anti-CD146/MUC18.

Ensayo de proliferación celular

La proliferación celular se determinó por medio del ensayo con MTT (0.5 mg/mL). Se sembraron 2.5×10^3 CTLPH/0.36 cm² entre el segundo y tercer pasaje y se incubaron 24 hrs. para permitir su adhesión. Los cultivos fueron tratados con 0.1 y 0.5 μ g/ml de hrCAP por 1, 2, 3, 4 y 5 días. Al término de cada tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo y se le agregó 10 μ l de MTT dejándolo incubar por 3 horas; se retiró el MTT y se añadió 100 μ l de DMSO, se incubó por 15 min. La absorbancia se leyó a 570 nm. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas.



Ensayo de diferenciación

Una vez determinada la concentración óptima para promover la proliferación celular se sembraron CTLPH a una densidad de 2×10^4 y se incubaron durante 3, 7, 14 y 21 días. Al grupo experimental se le añadió 5 $\mu\text{g/ml}$ de hrCAP. Una vez transcurrido el tiempo de cultivo, las células se rasparon y se resuspendieron en PBS frío y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos. A los botones celulares se les agregó buffer de lisis (1 mM EDTA pH 8.0; 10 mM HEPES, 50 mM NaCl, 0.5% Tritón X-100, 1 mM fenilmetilsulfonil fluorado, 5 μg leupeptina y 10 $\mu\text{g/mL}$ de aprotinina). Se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford y se cargaron 10 μg , se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Immobilon-P (PVDF) de nitrocelulosa (Millipore Corp. Bedford, MA). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% por 1 hora y después se incubaron con anticuerpos a una dilución de 1:1000 contra hrCAP, BSP, CEMP1 y GAPDH por 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron 2 lavados con PBS durante 10 minutos y después 3 lavados con TBS-Tween durante 5 minutos. Después del lavado, las membranas se incubaron en una dilución de 1:1000 con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa durante 1 hora, y después se lavaron con PBS. Los Western Blots se revelaron usando diaminobenzidina (DAB). Los blots se escanearon y analizaron con un sistema de análisis y documentación Kodak para electroforesis (EDAS) 290. Los niveles relativos de cada proteína se evaluaron para medir el porcentaje de intensidad obtenida en cultivo experimental con respecto al cultivo control.



Determinación de la Actividad Específica de la Fosfatasa Alcalina (ALP)

Se sembraron CTLPH entre el segundo y tercer pasaje, a una densidad 2×10^4 células/1.1 cm². Los cultivos, en medio mineralizante, fueron tratados con 5 µg/ml de hrCAP por 3, 7, 14 y 21 días. Al término de cada tiempo se eliminó el medio y se extrajeron las capas celulares adicionando 250 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 sonicaron para lisar las células, se centrifugaron a 14,000 rpm por 4 min 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.

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

Ensayo “Cierre de la herida”

Se incubaron CTLPH en cajas de 24 pozos a una densidad de 1×10^5 células, en medio libre de suero. Una vez confluyentes, se les hizo una herida con la punta de una pipeta, al grupo experimental se agregó 10 µg/mL de proteína hrCAP. Se tomaron fotografías a 1, 3, 10 y 24 hrs, para observar el cierre de la herida.



Ensayos de Mineralización

Se sembraron CTLPH a una densidad de 2×10^4 células/1.1 cm² y se incubaron por 24 hrs. A los cultivos se les adicionó “medio mineralizante” (10 mM β -glicerofosfato y 50 μ g/mL de ácido ascórbico); al cultivo experimental se agregó 5 μ g/mL de la proteína hrCAP, se incubaron por 3, 7, 14, 21 días. En cada término correspondiente las células fueron fijadas en alcohol al 96% durante 10 minutos y la deposición de los nódulos de calcio se identificó utilizando una solución 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 con PBS, y las cajas fueron secadas. Se tomaron fotografías del campo a 40X.

Formación de cristales de fosfato de calcio

Los cristales de fosfato de calcio fueron cristalizados por reacción química controlada entre los iones de fosfato y calcio en un medio semisólido (2 mL de Metasilicato de sodio 1.06 g/mL, 1.8 mL de HEPES buffer 10 mM pH 7.4, 0.2 mL de HEPES buffer más azida de sodio 1% y 1.08 mL de H₃PO₄ 1 M) en pH y temperatura fisiológica. El medio fue agregado a un casete formado por dos vidrios de 7 cm x 9 cm x 3 mm, separados por un marco de neopreno de 3 mm de grosor y sellados con grasa para vacío. Se preparó 5 mL del medio semisólido para cada casete; adicionando 20 μ g de hrCAP por cada mL de la solución de gel de silicato, se utilizó un grupo control negativo con 20 μ g de albúmina de suero bovino (BSA Sigma St. Louis, MO) por cada mL de la solución de gel y otro grupo control sin proteína. La solución de difusión empleada fue cloruro de calcio a 100 mM preparado en HEPES buffer 10 mM pH 7.4. Se incubaron durante 1, 3 y 7 días.



Recuperación de los cristales

Transcurridos los días de incubación, los cristales fueron separados del gel mediante su visualización en un microscopio estereoscópico (Stemi SV11 Carl Zeiss) y recolectados con MicroMounts de 150 μm (MiteGen Ithaca, NY) y se dividieron para tomar fotografías en microscopía electrónica de barrido (Jeol 5600LV) y análisis químico elemental utilizando espectroscopia por dispersión de energía de Rayos X (EDS), y microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (JEM2010FEG).

Caracterización de los cristales

La morfología y microestructura de los cristales de fosfato de calcio (con y sin proteína) fueron examinados usando un microscopio electrónico de barrido; la composición elemental se determinó por medio de una microsonda y se calculó la proporción Ca/P mediante el análisis de porcentajes atómicos de los elementos identificados en el espectro. La determinación de la fase cristalina se realizó con difracción de electrones en un microscopio electrónico de transmisión.

Todos los experimentos se realizaron por triplicados y fueron repetidos al menos 2 veces.

Análisis estadístico de datos

Los resultados obtenidos del ensayo de proliferación y actividad específica de fosfatasa alcalina fueron analizados por medio de la prueba de t-student pareada, con un $p < .001$. Utilizando el programa SigmaPlot y SigmaStat 11.



RESULTADOS

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

La proliferación celular se determinó mediante el ensayo de MTT (fig.2). Los cultivos tratados con 0.1, y 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de hrCAP, se compararon con un grupo control (SFB al 2%) de los 0 a 5 días. Se observó que las CTLPH con hrCAP al 0.5 $\mu\text{g/mL}$ incrementa significativamente la proliferación celular a partir del día 3 de cultivo.

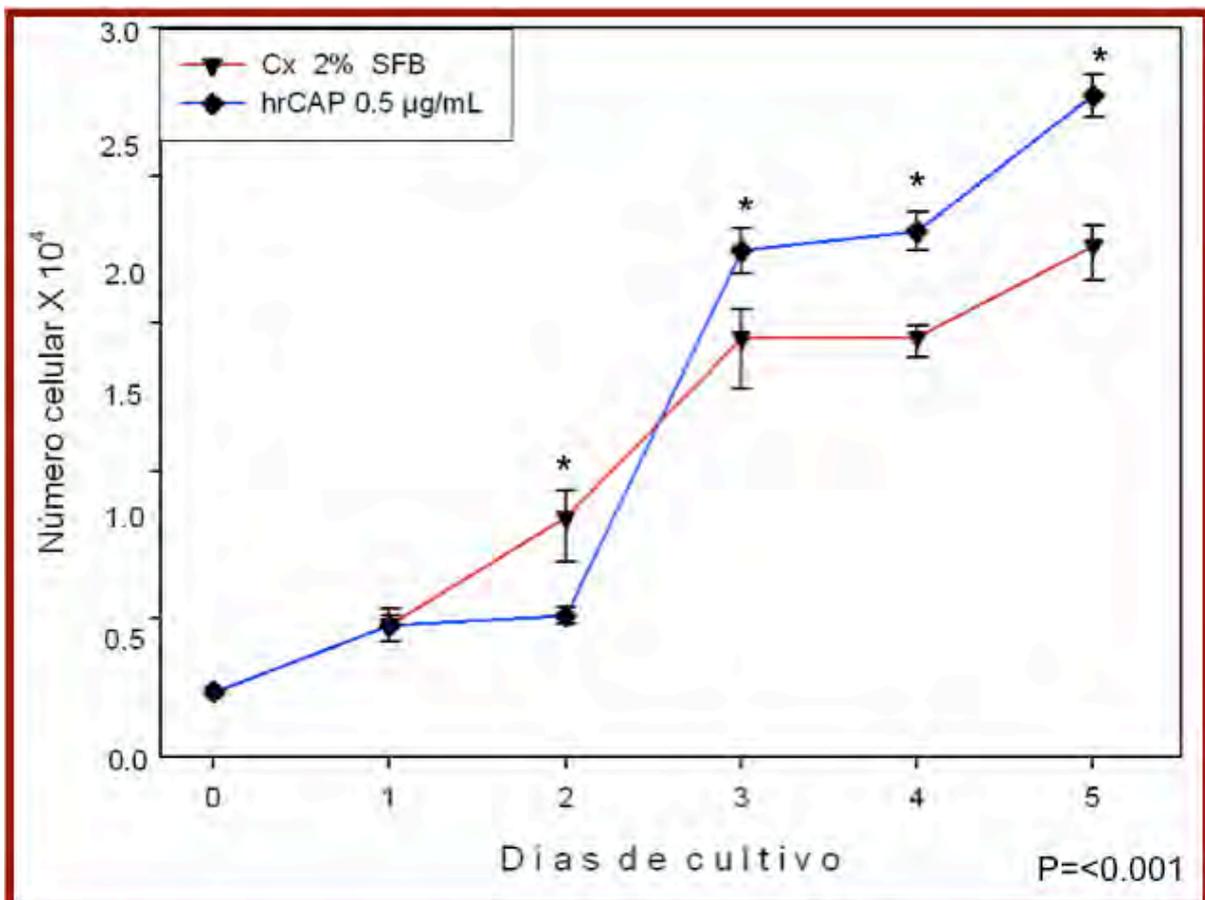


Figura 2. Efecto de hrCAP en la proliferación celular. Los asteriscos indican la significancia estadística comparado con el control ($p<0.001$).

WESTERN BLOT

Los análisis de las inmunotransferencias mostraron que los niveles relativos de la proteína CAP aumentó 10% y 78% a los 14 y 21 días de cultivo, respectivamente. Los niveles de expresión de la proteína CEMP1 aumentó 38, 12, 4 y 2% durante los días de cultivo. La proteína BSP mostró un aumento de 3 y 4% a los 14 y 21 días de cultivo (fig.3,4).

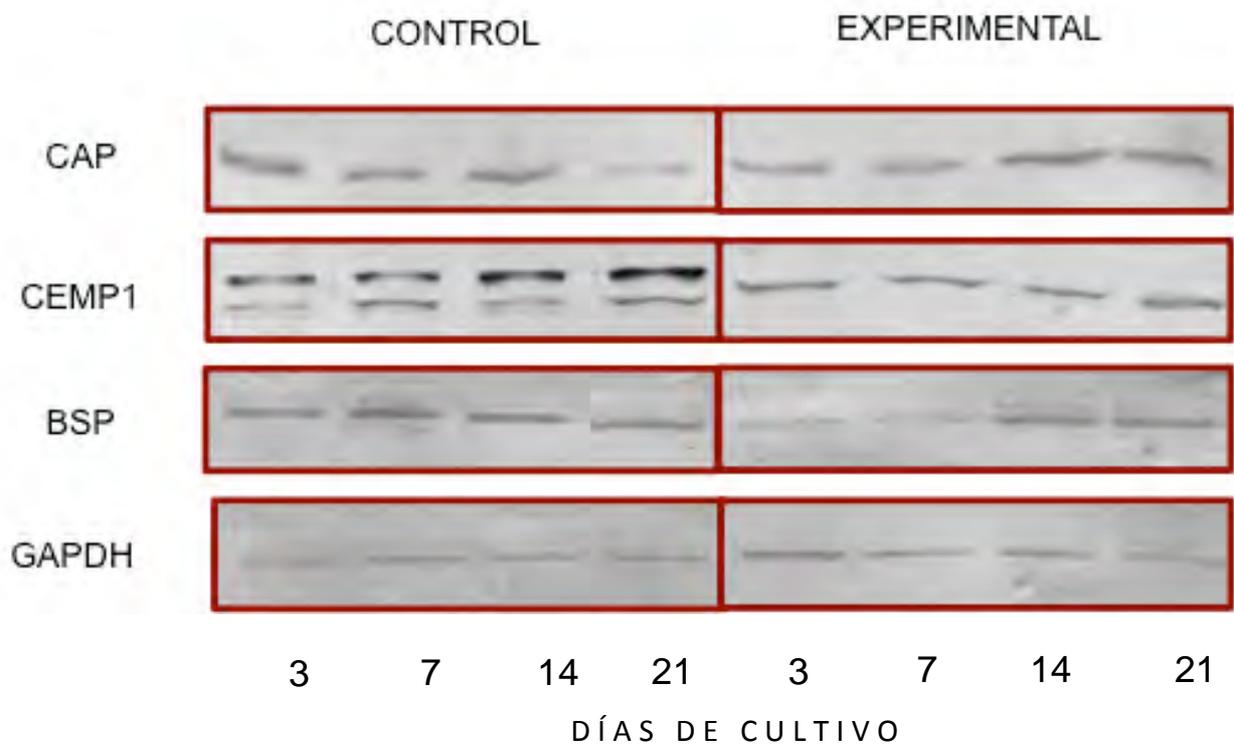


Figura 3. Expresión de los niveles relativos de CAP, CEMP1 y BSP en cultivos experimentales con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hrCAP comparados con el cultivo control; se empleó GAPDH como control consitutivo.

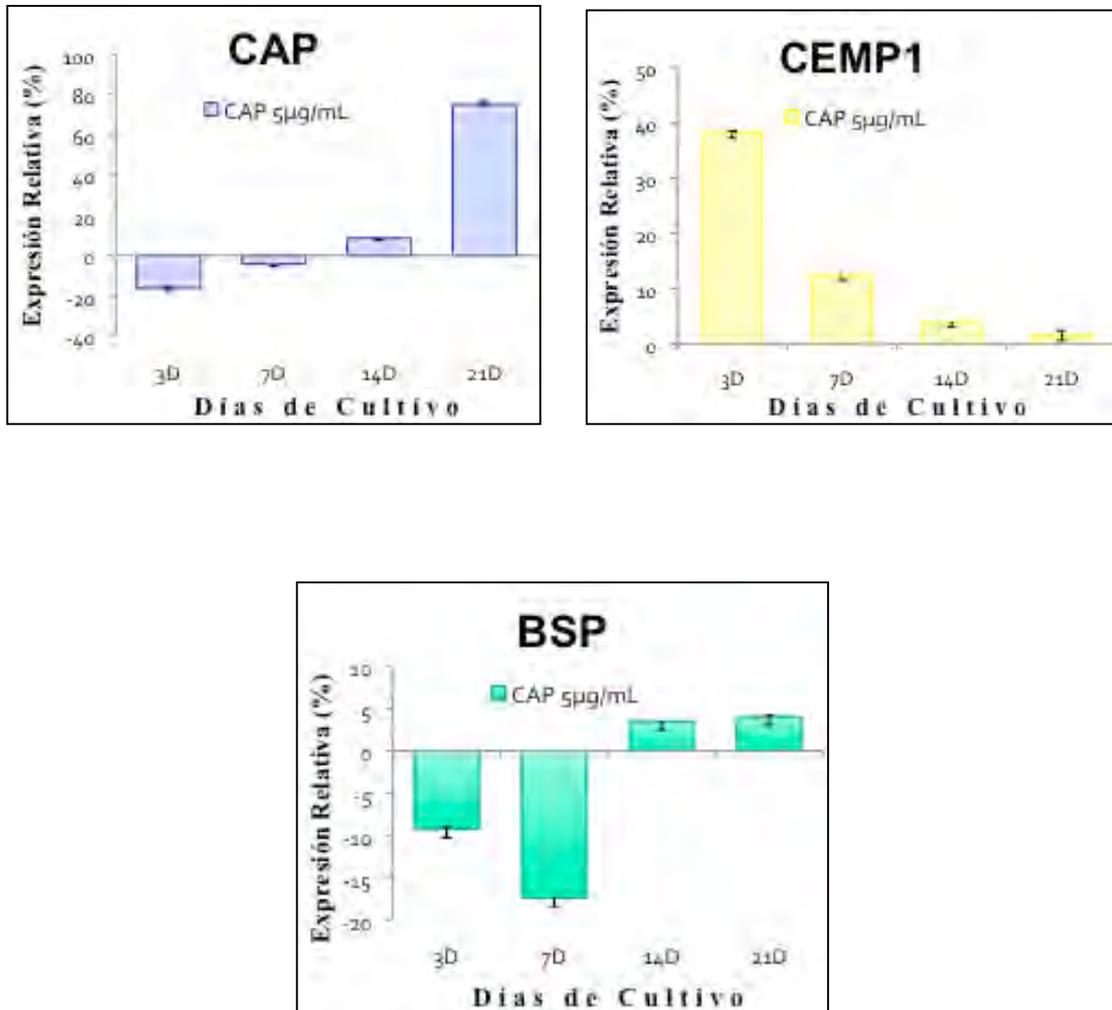


Figura 4. Análisis de la inmunotransferencia en los cultivos celulares. Porcentaje de la expresión relativa de los cultivos experimentales comparados con el cultivo control.



DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA FOSFATASA ALCALINA (ALP)

La fosfatasa alcalina (ALP) se evaluó para determinar el papel de la hrCAP en el proceso de mineralización, ya que la actividad enzimática de ALP incrementa cuando comienza la mineralización de la matriz extracelular. Dicha actividad aumentó significativamente durante todos los días de cultivo, al emplear 5 $\mu\text{g/mL}$ de hrCAP, con respecto al control (fig.5).

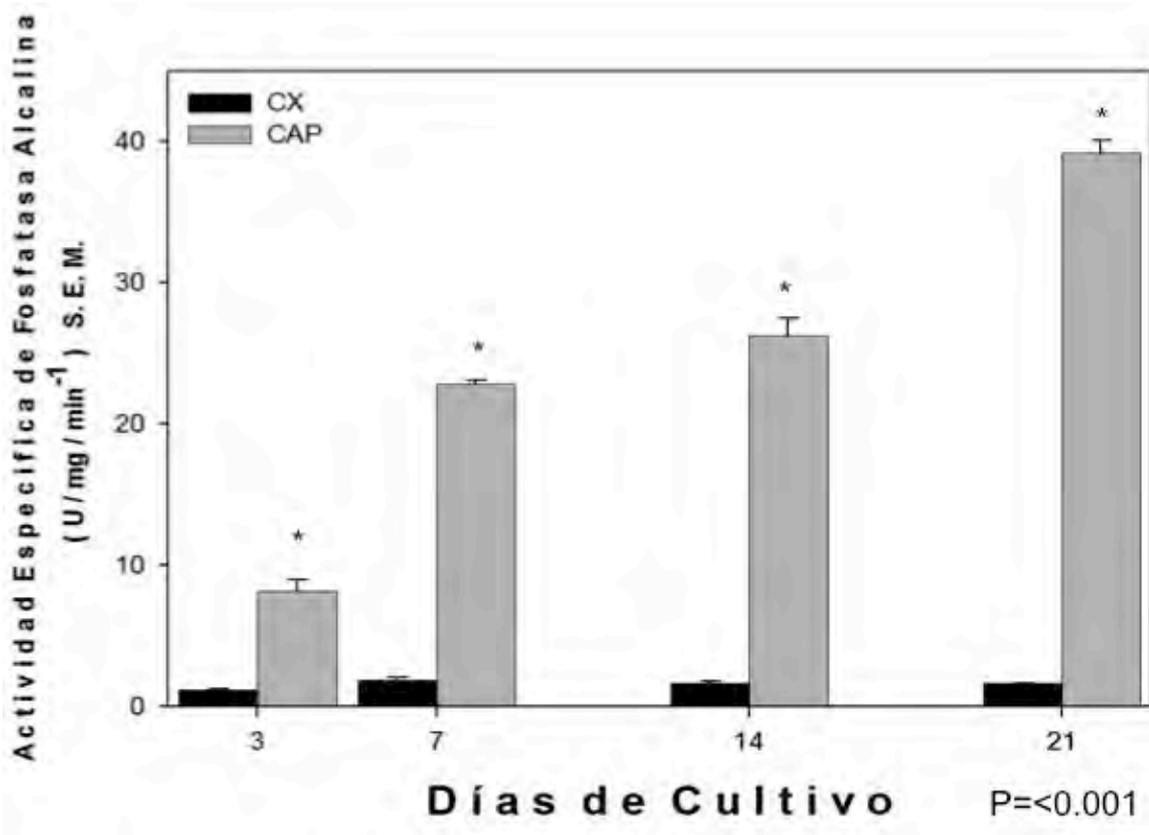


Figura 5. Actividad específica de Fosfatasa Alcalina en cultivo de CTLPH, determinada por el método de Lowry et al. (1953). Los asteriscos indican la diferencia estadística $p < 0.001$

ENSAYO “CIERRE DE LA HERIDA”

Las fotografías con el microscopio estereoscópico, no muestran diferencia significativa, en el “cierre de la herida”, entre el grupo control y experimental al cabo de 1, 3, 10 y 24 hrs (fig. 6).

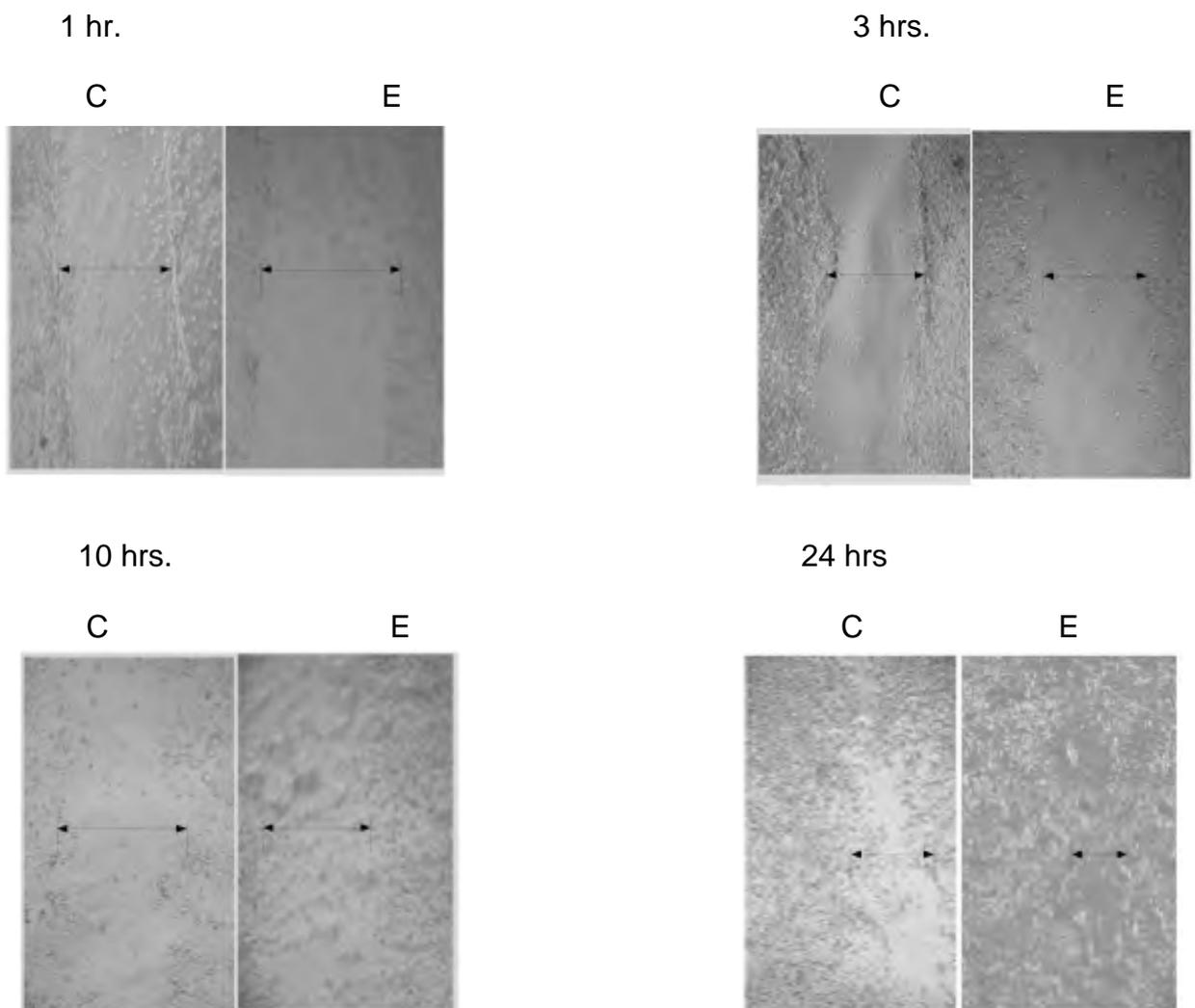


Figura 6. Fotografías de microscopio estereoscópico a 40X de los cultivos control (C) y experimental con 5 µg/mL de hrCAP (E).

ENSAYOS DE MINERALIZACIÓN

Para determinar la participación de hrCAP durante la biomineralización en cultivo celular, al término de cada periodo de tiempo (3, 7, 14 y 21 días), las células se fijaron y tiñeron con Alizarina roja. El grupo experimental con hrCAP 5µg/ml mostró un aumento en la formación de nódulos de calcio durante los días de cultivo con respecto al control, tal como se muestra en la figura 7.

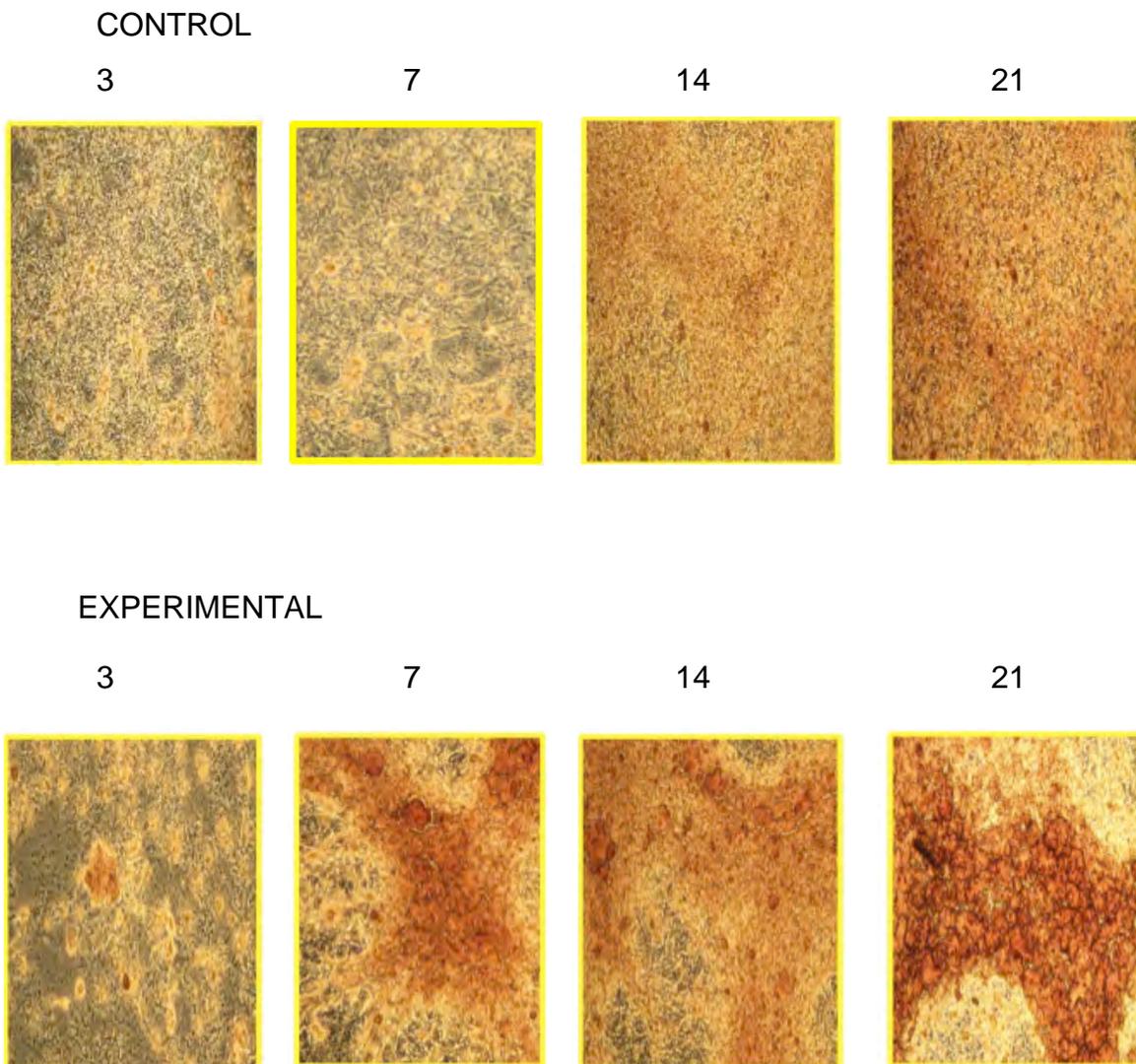


Figura 7. Tinción con Alizarina roja 2% en cultivos de CTLPH en los distintos periodos de cultivo. Panel superior control e inferior experimental (hrCAP 5µg/ml).

CARACTERIZACIÓN DE LOS CRISTALES

Para determinar la morfología de los cristales del ensayo de contradifusión en gel, se analizaron los cristales mediante Microscopia Electrónica de Barrido (SEM). Las microfotografías fueron tomadas mediante la técnica de electrones retrodispersados, mostrando contrastes homogéneos, lo cual indica que los cristales en su superficie son de estructura química homogénea..

Las imágenes con apariencia tridimensional muestran que en el grupo control sin proteína y con albúmina sérica (BSA), se formaron estructuras laminares de distintos tamaños con defectos en sus superficies (fig.8). Mientras, los cristales con hrCAP, se observan estructuras aciculares de distribución radial a partir de un núcleo, y en conjunto forman esférulas (fig.9). Este crecimiento y distribución se observa en los distintos días de cultivo.

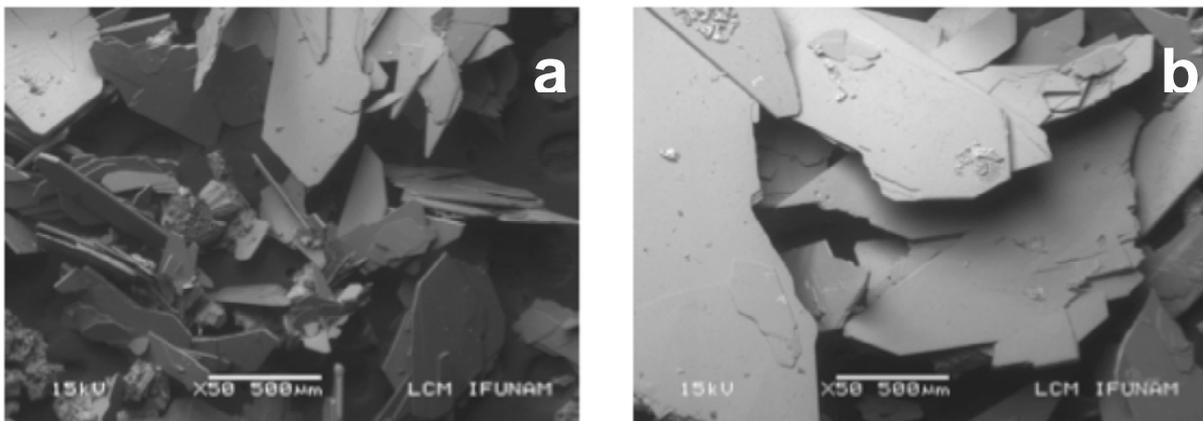


Figura 8. Imágenes obtenidas por medio de SEM de bajo vacío a 15Kv, con aumento de 50X. a imagen de cristales del control; b cristales de BSA.

CAP

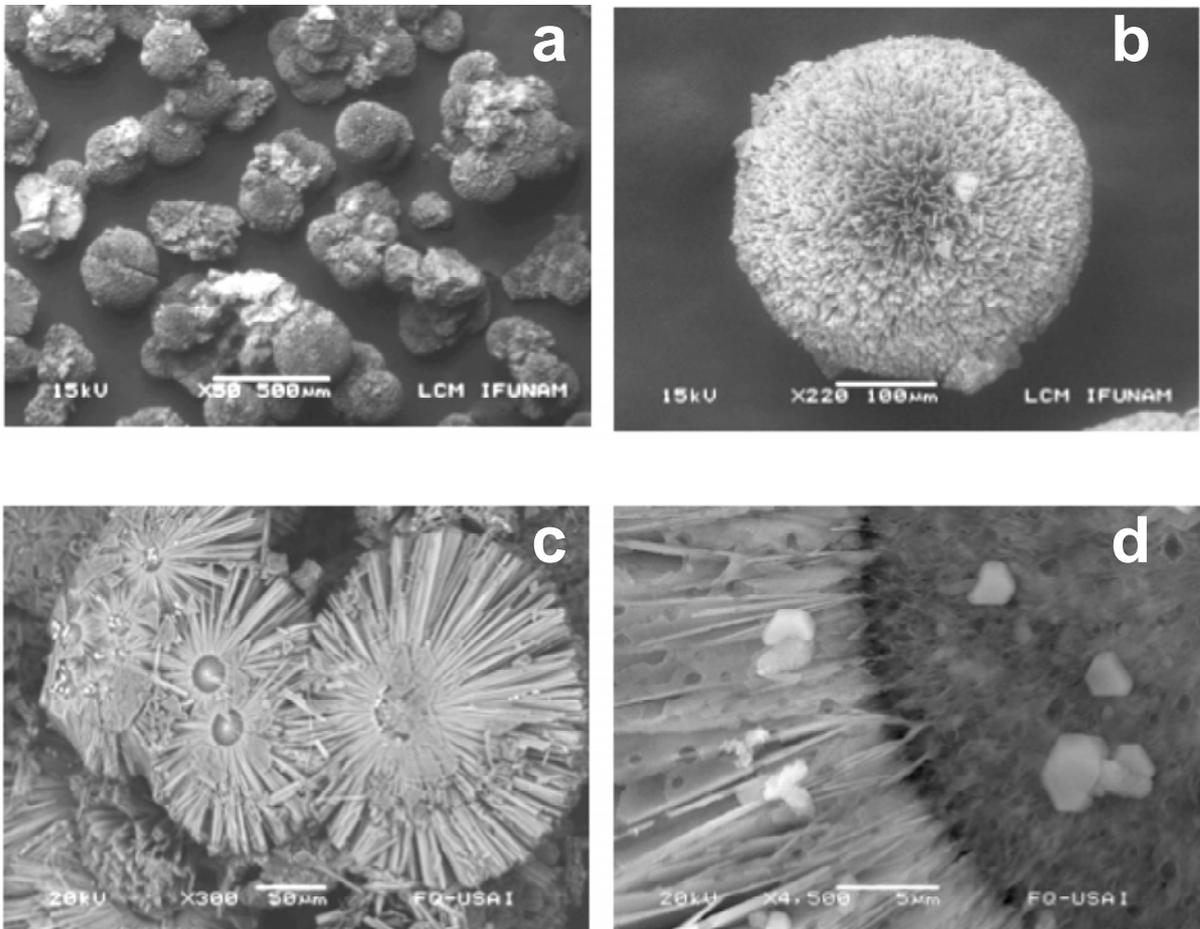


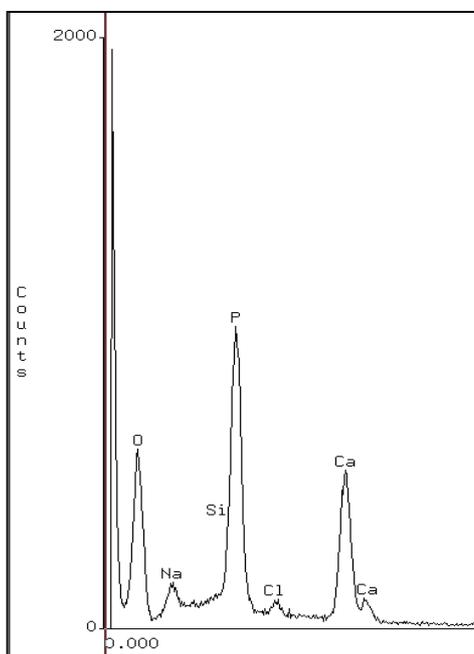
Figura 9. Imágenes de SEM a partir de electrones secundarios de los cristales formados con CAP. a) Imagen a 50X de cristales con morfología esférica de 200-360 μ m. b) Vista de un cristal a 220X donde se observa composición química homogénea. c) Corte transversal de cristales con estructuras aciculares que parten de un núcleo a 300X. d) Vista de un núcleo del cristal a 4500X.



ESPECTROSCOPIA POR DISPERSIÓN DE ENERGÍA DE RAYOS X (EDS)

La composición química elemental y la razón de los cristales formados en los distintos grupos de estudio, fue evaluado mediante microanálisis de dispersión de energía de Rayos X. El EDS de los cristales inducidos con CAP reveló que están formados predominantemente por calcio y fósforo; siendo el calcio el elemento más abundante, seguido del fósforo (fig.10). A partir de los conteos del EDS, se calculó mediante el análisis de porcentajes atómicos, la proporción de Ca/P de todos los grupos de estudio y se comparó con una tabla de referencia de fases minerales de relevancia biológica donde la hidroxiapatita tiene una relación Ca/P 1.67.⁴

Control

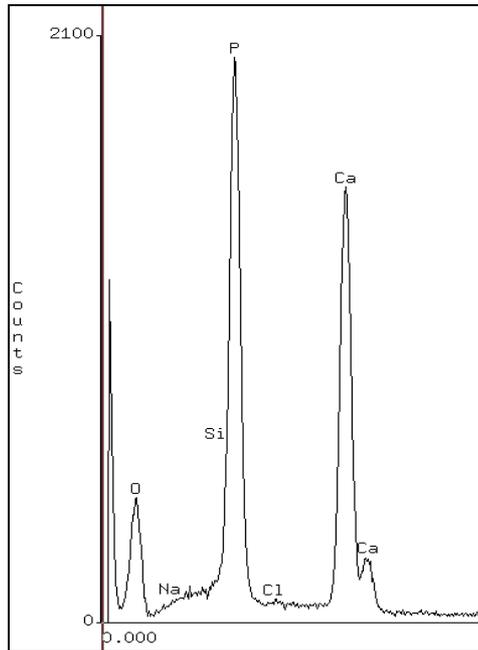


Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element Wt %
O -K	0.1836	2.339	62.37	42.94
Si-K	0.0000	1.051	0.00	0.00
Ca-K	0.2933	1.095	18.62	32.13
P -K	0.1941	1.102	16.04	21.38
Na-K	0.0123	1.469	1.83	1.81
Cl-K	0.0154	1.134	1.15	1.75
Total			100.00	100.00

Figura 10. Análisis químico realizado por EDS de la muestra control, donde la relación Ca/P es de 1.16. Otros elementos fueron identificados en menor porcentaje.



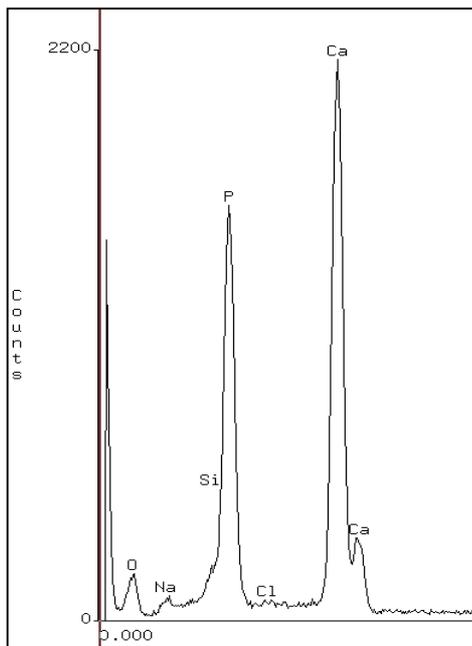
BSA



Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element Wt %
O -K	0.1117	4,821	72.24	53.85
Si-K	0.0006	1,291	0.06	0.08
Ca-K	0.2392	1,118	14.31	26.73
P -K	0.1549	1,224	13.14	18.96
Na-K	0.0002	2,753	0.05	0.06
Cl-K	0.0026	1,251	0.19	0.32
Total			100.00	100.00

Figura 11. Análisis químico realizado por EDS de la muestra BSA, donde la relación Ca/P es de 1.08. Otros elementos fueron identificados.

CAP



Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element Wt %
O -K	0.0576	6,671	58.70	38.45
Si-K	0.0065	1,276	0.72	0.83
Ca-K	0.3841	1,094	25.61	42.03
P -K	0.1442	1,212	13.78	17.48
Na-K	0.0035	2,691	0.99	0.93
Cl-K	0.0023	1,212	0.19	0.28
Total			100.00	100.00

Figura 12. Análisis químico realizado por EDS de la muestra CAP, donde la relación Ca/P es de 1.85. Otros elementos fueron identificados.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE ALTA RESOLUCIÓN (HRTEM).

El análisis de los cristales inducidos con CAP realizado mediante HRTEM, muestra imágenes de alta resolución con valores que corresponde a distancias interatómicas de 2.33, 2.27; 1.39, 3.55; 1.19 y 1.32 que corresponden a los planos cristalinos (220), (-212); (1-12), (201); (225) y (11-5), respectivamente. Los patrones obtenidos se compararon con los estándares de la hidroxiapatita JCPDS 44-0778.

Las reflexiones cristlinas se muestran a través de la transformada de Fourier, la cual nos permite identificar que la fase cristalina de la muestra es hidroxiapatita.

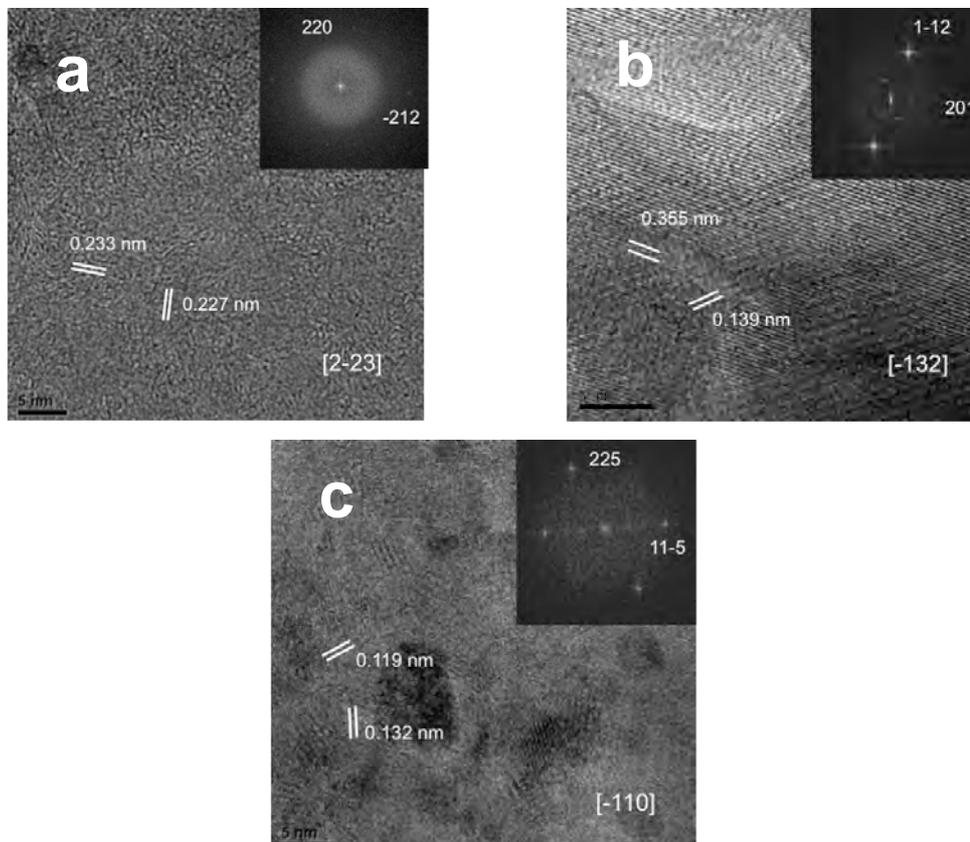


Figura 13. Imágenes obtenidas de 3 muestras de CAP (a,b,c) con HRTEM que muestra resolución atómica, donde a partir de la transformada de Fourier (recuadros superior derechos) se midieron distancias interplanares. A) 220, -212 correspondientes a la dirección cristalina [2-23]; b) 1-12, 201 [-132]; c) 225, 11-5 [-110] respectivamente de Hidroxiapatita.



DISCUSIÓN

Las células del ligamento periodontal juegan un papel importante, no solo en el mantenimiento del periodonto sino en promover la regeneración periodontal. Los trabajos de Melcher y McCulloch (1983) indicaron la existencia de células progenitoras dentro del ligamento periodontal con una localización paravascular, desde donde migran hacia el cemento, hueso alveolar y ligamento periodontal. Sin embargo, las células del ligamento periodontal son heterogéneas e incluyen células en distintos estadios de diferenciación y de linaje celular.^{51,67} Seo et. al. reportó que las células troncales del ligamento periodontal tienen una capacidad más proliferativa que las derivadas de la médula ósea.⁶⁷ STRO-1 originalmente fue identificado como precursor osteogénico formador de colonias aislado de la médula ósea. Se ha reportado que STRO-1/CD146 están presentes en células del ligamento periodontal con un alto potencial de replicación y en la formación de colonias. Seo et. al. (2004) demostró que las células del ligamento periodontal tienen el potencial de regenerar tejidos periodontales como cemento y tejido similar a ligamento periodontal.^{51,76}

Nuestros hallazgos demuestran que CAP induce el aumento de la proliferación celular en células troncales derivadas del ligamento periodontal humano. Los estudios hechos por Yokokoji y Narayanan (2001), muestran que CAP como componente de la matriz, induce el ciclo celular mediante mecanismos comunes a otras moléculas.⁷⁷ Saito y Narayanan (1999) demostraron que la adhesión mediada por CAP induce eventos en la fase G1, mediante el aumento de la expresión de ciclina D1. La transición de la fase G1 a S del ciclo celular no solo depende del acúmulo de ciclinas sino también de la regulación de inhibidores Cdk como p21 y



p27. CAP regula los niveles de la proteína p21, contribuyendo a la progresión del ciclo celular. Saito y Narayanan (1999) demostraron que la adhesión mediada por CAP, en fibroblastos gingivales, induce la activación sostenida de ERK-2, la cual es necesaria para la expresión de AP-1, c-fos, c-jun y la expresión de la proteína reguladora ciclina D1.^{46,66}

En la regeneración periodontal, se han propuesto técnicas clínicas que puedan proveer las condiciones conductivas para la migración de células progenitoras de cementoblastos para formar el tejido conectivo de inserción en superficies radiculares. El origen y naturaleza de las células progenitoras cementoblasticas aún no han sido caracterizadas, y esto no ha permitido la formación de nuevo cemento en las terapias regenerativas periodontales con pronóstico predecible. Las células troncales pueden ser inducidas a un cambio de fenotipo con el empleo de medios condicionantes o con el empleo de biomoléculas específicas.

Saito y Narayanan(1998) mostraron que CAP induce la expresión de proteínas relacionadas con diferenciación celular.⁶⁶ Pitaru et al 1995 demostró que CAP, a partir de una población celular heterogénea del ligamento periodontal, es capaz de reclutar células progenitoras, con capacidad clonogénica, alta actividad de fosfatasa alcalina y formación de tejido mineralizante en cultivo.^{7,51,59} Los resultados de Barkana et al 2000 indican que CAP es un instrumento para reclutar poblaciones progenitoras de cementoblastos, así como de aumentar su diferenciación. Todos estos resultados corroboran nuestros hallazgos ya que las células troncales aisladas del ligamento periodontal pueden ser inducidas con la proteína de adhesión del cemento CAP a un cambio de fenotipo mineralizante, osteoblastio/cementoblástico, donde muestran un aumento en la actividad de fosfatasa alcalina, así como de la formación de nodulos de calcio, y donde CAP modula la expresión de



proteínas asociadas al proceso de mineralización. Nuestros resultados muestran que CEMP1 se encuentra mayormente expresada durante los primeros días del proceso de mineralización, mientras que BSP y CAP lo hacen a partir del día 14, las cuales juegan un papel importante en la maduración de la matriz. Recientemente, se ha reportado que el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), proteínas morfogénicas de hueso (BMPs) y la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) podrían ser candidatos para regular la diferenciación cementoblástica. (cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells). La actividad específica de ALP se ha identificado asociada con osteogénesis y cementogénesis,³² y empleada como un marcador temprano de diferenciación de células progenitoras a un fenotipo mineralizante.⁵¹

El ensayo de “cierre de la herida” in vitro es un método sencillo y económico para estudiar la migración celular. Este método se basa en la observación de que, en la creación de una “herida artificial”, sobre una monocapa de células confluentes, las células en el borde de se moverán para cerrar la “herida” hasta alcanzar nuevos contactos célula-célula.^{28,48}

En comparación con otros métodos, este ensayo es particularmente adecuado para los estudios sobre los efectos de las interacciones célula-célula y célula-matriz en la migración celular.⁴⁶ La composición de la matriz extracelular juega un papel importante en la regulación de la migración celular.⁴⁷

En este trabajo, se empleo el ensayo de cierre de la herida y se analizó mediante fotografías en intervalos de tiempo para valorar la migración de células troncales del ligamento periodontal humano.



Los resultados mostraron que las células troncales tuvieron un comportamiento semejante a las tratadas con la proteína CAP. Metzger 1998 comprobó los estudios de Pitaru 1995, donde la proteína CAP expresa una capacidad atrayente selectiva de células del ligamento periodontal a la superficie radicular.^{54,59}

En general, los procesos de mineralización son controlados por proteínas de la matriz extracelular que podrían actuar como nucleadoras o inhibidoras, modificando el crecimiento, sirviendo como moléculas de anclaje o como andamios para el depósito mineral.

Para que ocurra la nucleación de los cristales de hidroxiapatita se requiere de concentraciones saturadas de calcio y fósforo en el medio, lo cual impide la solubilidad del mineral. El sistema de contradifusión en gel permite el control de las condiciones fisico-químicas necesarias para el estudio de macromoléculas que participan en el proceso de biomineralización; el gel proporciona la matriz en donde se alojará la proteína, permite el uso de soluciones con pH y temperatura de incubación fisiológicas, la reacción química y cinética de precipitación son controlados, y más importante aún, el gel no interfiere con el proceso.^{69,74}

La unión a calcio es un requisito imprescindible para las proteínas involucradas en la mineralización de hidroxiapatita. Se ha demostrado que las proteínas asociadas a la formación de cristales, son proteínas ricas en aminoácidos ácidos (ácido aspártico, ácido glutámico y serina), con alta afinidad por la hidroxiapatita. Los resultados de Eiden-Abmann 2002 mostraron en un sistema de contradifusión en gelatina, que el ácido glutámico y aspártico al ser más ácidos que la serina interactúan más fuertemente con la hidroxiapatita, de tal manera que inducen la formación de esférulas que se originan desde un centro común, mientras



que la serina posiblemente interactúe formando esférulas más densas.²⁰ Por otro lado, Gen He 2003 localizó regiones ácidas en la secuencia de la proteína DMP1, ESNES (residuos 376-380), ESQUES (residuos 386-390), DSQDS (residuos 431-435) y QESQSEQDS (residuos 414-422); las cuales posiblemente están estrechamente relacionadas con la formación de esférulas, cuya composición fue de hidroxiapatita.^{4,20,43}

La proteína CAP tiene regiones acídicas y ricas en serina, SSDED (42-46), SEAGEDRE (53-60), y EVSFPS (125-130). Es una proteína de 140 aminoácidos de los cuales 4 son residuos ácido aspártico (2.9%), 8 residuos de ácido glutámico (5.7%) y 12 serina (8.6%); y su carga eléctrica es neutra (pI 7.72). Pitaru y cols demostraron que CAP tiene alta afinidad por la hidroxiapatita y a la fase mineral de la superficie radicular. Los resultados muestran que CAP, es capaz de inducir la formación de cristales de calcio desde el día 1 de cultivo. Las esférulas formadas tienen una relación de Ca/P que indican una fase mineral estable, hidroxiapatita, la cual se corroboró con la transformada de Fourier de HRTEM.

La Microscopía Electrónica de Barrido es una herramienta valiosa para la caracterización de moléculas, brindando información importante sobre la estructura y composición de los cristales, a partir, de un sistema libre de células. El EDS es un análisis semicuantitativo que proporciona información acerca de los elementos que componen la muestra, sin embargo, se debe tener mucho cuidado de las restricciones que trae consigo este tipo de análisis. La corrección ZAF disminuye el rango de error en la cuantificación de los elementos, pero al ser análisis puntual, hay que emplear otras técnicas como Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución para identificar la fase mineral, de la muestra en estudio.



CONCLUSIONES

La proteína hrCAP a una concentración de 0.5µg/mL actúa como mitógeno de Células Troncales derivadas del Ligamento Periodontal Humano.

hrCAP 5µg/mL induce un aumento significativo de la actividad específica de ALP, así mismo promueve la formación de nódulos de calcio.

El análisis de las imágenes de SEM, HRTEM y de EDS demostraron que hrCAP está asociada a la formación y composición de cristales de hidroxiapatita, *in vitro*.

Todos nuestros resultados sugieren que hrCAP juega un papel importante durante el proceso de diferenciación de células troncales del ligamento periodontal humano y en el proceso de mineralización.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarez Pérez MA, Pitaru S, Alvarez Fregoso O, Reyes Gasga J, Arzate H. Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line. *J Struct Biol.* 2003 Jul;143(1):1-13.
2. Arzate H, Jiménez-García LF, Alvarez-Pérez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein. *J Dent Res.* 2002 Aug;81(8):541-6.
3. Arzate H, Olson SW, Page RC, Gown AM, Narayanan AS. Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J.* 1992 Aug;6(11):2990-5.
4. Behrens P, Bäuerlein E. Handbook of biomineralization: Biomimetic and bioinspired chemistry. Wiley-VCH 2007
5. Bai Y, Matsuzaka K, Hashimoto S, Fukuyama T, Wu L, Miwa T, Liu X, Wang X, Inoue T. Cementum- and periodontal ligament-like tissue formation by dental follicle cell sheets co-cultured with Hertwig's epithelial root sheath cells. *Bone.* 2011 Mar 1. [Epub ahead of print]
6. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 2004 Jul-Sep;8(3):301-16.
7. 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 Jul;79(7):1482-8.
8. Bartold PM, Narayanan AS. Biology of the periodontal connective tissues. Quintessence Publishing Co, Inc. 1998 Carol Stream, Illinois, USA.
9. Beniash E, Simmer JP, Margolis HC. The effect of recombinant mouse amelogenins on the formation and organization of hydroxyapatite crystals in vitro. *J Struct Biol.* 2005 Feb;149(2):182-90.
10. Burdon T, Smith A, Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* 2002 Sep;12(9):432-8.
11. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.* 2001 Oct 15;98(8):2396-402.
12. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007 Nov;213(2):341-7.



13. Carranza FA, Neuman MG. Clinical periodontology. 8th Edition. Section one. The Norma Periodontum. W.B. Saunders Company 1996 USA
14. Catón J, Bostanci N, Remboutsika E, De Bari C, Mitsiadis TA. Future dentistry: cell therapy meets tooth and periodontal repair and regeneration. *J Cell Mol Med*. 2010 Dec 28. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01251.
15. Chadipiralla K, Yochim JM, Bahuleyan B, Huang CY, Garcia-Godoy F, Murray PE, Stelnicki EJ. Osteogenic differentiation of stem cells derived from human periodontal ligaments and pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Cell Tissue Res*. 2010 May;340(2):323-33. Epub 2010 Mar 23.
16. Chen FM, Zhang J, Zhang M, An Y, Chen F, Wu ZF. A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. *Biomaterials*. 2010 Nov;31(31):7892-927. Epub 2010 Aug 4.
17. Cho MI, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol 2000*. 2000 Oct;24:9-27.
18. Cochran DL, Wozney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol 2000*. 1999 Feb;19:40-58
19. Diekwisch TG. The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol*. 2001 Sep;45(5-6):695-706.
20. Eiden-Assmann S, Viertelhaus M, Heiss A, Hoetzer KA, Felsche J. The influence of amino acids on the biomineralization of hydroxyapatite in gelatin. *J Inorg Biochem*. 2002 Aug 30;91(3):481-6.
21. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul 9;292(5819):154-6.
22. Fickert S, Fiedler J, Brenner RE. Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003 Nov;11(11):790-800.
23. Fleischmannova J, Matalova E, Sharpe PT, Misek I, Radlanski RJ. Formation of the tooth-bone interface. *J Dent Res*. 2010 Feb;89(2):108-15. Epub 2009 Dec 30.
24. Flores MG, Hasegawa M, Yamato M, Takagi R, Okano T, Ishikawa I. Cementum-periodontal ligament complex regeneration using the cell sheet technique. *J Periodontal Res*. 2008 Jun;43(3):364-71. Epub 2008 Jan 17.
25. Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(1):79-98.



26. García-Ruiz JM. Counterdiffusion methods for macromolecular crystallization. *Methods Enzymol.* 2003;368:130-54.
27. George A, Veis A. Phosphorylated proteins and control over apatite nucleation, crystal growth, and inhibition. *Chem Rev.* 2008 Nov;108(11):4670-93. Epub 2008 Oct 3.
28. Goetsch KP, Niesler CU. Optimization of the scratch assay for in vitro skeletal muscle wound healing analysis. *Anal Biochem.* 2011 Apr 1;411(1):158-60. Epub 2010 Dec 10.
29. Golub EE. Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Dec;1790(12):1592-8. Epub 2009 Sep 26.
30. Gonçalves PF, Sallum EA, Sallum AW, Casati MZ, Toledo S, Nociti FH. Dental cementum reviewed: development, structure, composition, regeneration and potential functions. *Braz J Oral Sci.* January/March 2005 - Vol.4 - Number 12
31. Graf T, Stadtfeld M. Heterogeneity of embryonic and adult stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008 Nov 6;3(5):480-3.
32. Groeneveld MC, Everts V, Beertsen W. Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingiva of the rat molar: its relation to cementum formation. *J Dent Res.* 1995 Jul;74(7):1374-81.
33. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 5;97(25):13625-30.
34. Grzesik WJ, Cheng H, Oh JS, Kuznetsov SA, Mankani MH, Uzawa K, Robey PG, Yamauchi M. Cementum-forming cells are phenotypically distinct from bone-forming cells. *J Bone Miner Res.* 2000 Jan;15(1):52-9.
35. Hammarström L, Alatli I, Fong CD. Origins of cementum. *Oral Dis.* 1996 Mar;2(1):63-9.
36. Handa K, Saito M, Yamauchi M, Kiyono T, Sato S, Teranaka T, Sampath Narayanan A. Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. *Bone.* 2002 Nov;31(5):606-11.
37. He G, Dahl T, Veis A, George A. Dentin matrix protein 1 initiates hydroxyapatite formation in vitro. *Connect Tissue Res.* 2003;44 Suppl 1:240-5.
38. He G, Dahl T, Veis A, George A. Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1. *Nat Mater.* 2003 Aug;2(8):552-8.



39. He H, Cao J, Wang D, Gu B, Guo H, Liu H. Gene-modified stem cells combined with rapid prototyping techniques: a novel strategy for periodontal regeneration. *Stem Cell Rev.* 2010 Mar;6(1):137-41.
40. <http://www.perio.org/resources-products/pdf/50-regeneration.pdf>
41. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009 Sep;88(9):792-806.
42. Hughes FJ, Ghuman M, Talal A. Periodontal regeneration: a challenge for the tissue engineer? *Proc Inst Mech Eng H.* 2010 Dec;224(12):1345-58.
43. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J.* 1996 Jul 1;317 (Pt 1):59-64.
44. Ivanovski S. Periodontal regeneration. *Aust Dent J.* 2009 Sep;54 Suppl 1:S118-28.
45. Kawasaki K, Buchanan AV, Weiss KM. Biomineralization in humans: making the hard choices in life. *Annu Rev Genet.* 2009;43:119-42.
46. Komaki M, Kang M, Narayanan AS. Role of MAP kinases p42erk-2/p44erk-1 in cementum-derived attachment-protein-mediated cell attachment. *J Dent Res.* 2000 Oct;79(10):1789-93.
47. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process, *Cell* 84 (1996) 359–369.
48. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2(2):329-33.
49. Lin NH, Gronthos S, Mark Bartold P. Stem cells and future periodontal regeneration. *Periodontol 2000.* 2009;51:239-51.
50. Lindhe J, Perioodontología clínica e implantología odontológica. En: Karting K, Lang KP. Editorial Médica Panamericana. España 2003.
51. Liu HW, Yacobi R, Savion N, Narayanan AS, Pitaru S. 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 Oct;12(10):1691-9.



52. MacNeil RL, Somerman MJ. Molecular factors regulating development and regeneration of cementum. *J Periodontal Res.* 1993 Nov;28(6 Pt 2):550-9.
53. Marchesan JT, Scanlon CS, Soehren S, Matsuo M, Kapila YL. Implications of cultured periodontal ligament cells for the clinical and experimental setting: A review. *Arch Oral Biol.* 2011 Apr 4.
54. Metzger Z, Weinstock B, Dotan M, Narayanan AS, Pitaru S. Differential chemotactic effect of cementum attachment protein on periodontal cells. *J Periodontal Res.* 1998 Feb;33(2):126-9.
55. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, Muneta T, Ishikawa I. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2006 Aug;41(4):303-10.
56. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000.* 2006;40:11-28.
57. Park JC, Kim JM, Jung IH, Kim JC, Choi SH, Cho KS, Kim CS. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *J Clin Periodontol.* 2011 Mar 30. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01716.
58. Pera MF, Tam PP. Extrinsic regulation of pluripotent stem cells. *Nature.* 2010 Jun 10;465(7299):713-20.
59. Pitaru S, Narayanan SA, Olson S, Savion 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 Sep;30(5):360-8.
60. Polimeni G, Xiropaidis AV, Wikesjö UM. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol 2000.* 2006;41:30-47.
61. Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Jun;21(6):567-76.
62. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol.* 2000 Apr;18(4):399-404.
63. Rimondini L, Mele S. Stem cell technologies for tissue regeneration in dentistry. *Minerva Stomatol.* 2009 Oct;58(10):483-500.



64. Ripamonti U, Petit JC, Teare J. Cementogenesis and the induction of periodontal tissue regeneration by the osteogenic proteins of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Periodontal Res.* 2009 Apr;44(2):141-52. Epub 2008 Oct 7.
65. Saito M, Iwase M, Maslan S, Nozaki N, Yamauchi M, Handa K, Takahashi O, Sato S, Kawase T, Teranaka T, Narayanan AS. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone.* 2001 Sep;29(3):242-8.
66. Saito M, Narayana AS. Signaling reactions induced in human fibroblasts during adhesion to cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res.* 1999 Jan;14(1):65-72.
67. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004 Jul 10-16;364(9429):149-55.
68. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res.* 2005 Aug;8(3):191-9.
69. Silverman L, Boskey AL. Diffusion systems for evaluation of biomineralization. *Calcif Tissue Int.* 2004 Dec;75(6):494-501. Epub 2004 Oct 7.
70. Stojkovic M, Lako M, Strachan T, Murdoch A. Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells. *Reproduction.* 2004 Sep;128(3):259-67.
71. Tarasevich BJ, Howard CJ, Larson JL, Snead ML, Simmer JP, Paine M, Shaw WJ. The nucleation and growth of calcium phosphate by amelogenin. *J Cryst Growth.* 2007 Jun 15;304(2):407-415.
72. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-1147.
73. Wang L, Nancollas GH. Pathways to biomineralization and biodeminalization of calcium phosphates: the thermodynamic and kinetic controls. *Dalton Trans.* 2009 Apr 21;(15):2665-72. Epub 2009 Feb 7.
74. Weiner S. Biomineralization: a structural perspective. *J Struct Biol.* 2008 Sep;163(3):229-34. Epub 2008 Mar 7.



-
75. Wu D, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan AS. Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res.* 1996 May;11(5):686-92.
76. Xuechao Yang Dental Pulp Stem Cells for Tissue Engineering; STRO-1 selection and transfection strategies Doctoral thesis 7 September 2009
77. Yokokoji T, Narayanan AS. Role of D1 and E cyclins in cell cycle progression of human fibroblasts adhering to cementum attachment protein. *J Bone Miner Res.* 2001 Jun;16(6):1062-7.
78. Yonemura K, Raines EW, Ahn NG, Narayanan AS. Mitogenic signaling mechanisms of human cementum-derived growth factors. *J Biol Chem.* 1993 Dec 15;268(35):26120-6.
79. Zeichner-David M. Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited. *Periodontol 2000.* 2006;41:196-217.
80. Zhang J, Tu Q, Chen J. Applications of transgenics in studies of bone sialoprotein. *J Cell Physiol.* 2009 Jul;220(1):30-4.