



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

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

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DEL ESMALTE, DEL CEMENTO RADICULAR,  
QUERATINAS Y MARCADORES DE CÉLULAS TRONCALES EN EL  
PERIODONTO HUMANO.

T E S I S

QUE PRESENTA:

CARLOS ESTEBAN VILLEGAS MERCADO

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

TUTOR:

DR. HIGINIO ARZATE

MÉXICO D.F.

2012



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:**

Me gustaría agradecer de una forma muy especial al Dr. Higinio Arzate, por haberme aceptado en su laboratorio incluso sin conocerme en absoluto para participar inicialmente en un verano científico, lo que me permitió conocer a magnificas personas con una inmensa calidad humana y académica, este gesto tan significativo me permitió conocer un mundo totalmente nuevo y facilito mi decisión sobre el camino a seguir en mi futuro académico, al llegar el momento el Dr. Higinio nuevamente me brindo su valioso apoyo en esta ocasión para integrarme a su equipo de trabajo como alumno de maestría, durante todo este tiempo siempre ha sido una excelente persona, gran maestro, figura de liderazgo y respeto, así como un gran ejemplo a seguir.

A los miembros del jurado del examen grado y maestros, Dr. Javier Portilla Roberson, Dra. Patricia Tato Zaldivar, Dra. Ana María Fernández Presas, Dra. Elba Rosa Leyva Huerta, por su valiosa opinión, comentarios y sugerencias que, haciendo notar su experiencia enriquecieron este trabajo.

A mi familia, por su decidido apoyo incondicional, por su paciencia, orientación, valiosos consejos, por el sacrificio que implico en todos los aspectos la realización de mis proyectos, pero mas importante aun por ser quiénes son y su gran amor.

A mis amigos y compañeros del laboratorio Meche, Janeth, Anita, Gonzalo, Edmundo, Silvia, Rita, Paty, Enrique, Camen, Lia, Juan Luis, por su amistad sincera y desinteresada, por su ayuda y apoyo en todo momento y circunstancias, por haber compartido sus conocimientos y experiencia, porque con su convivencia, anécdotas y bromas hacen cualquier lugar un sitio ameno y agradable, ni que decir de la hora de la comida. Tengo la fortuna de considerarlos y considerarme como grandes amigos.

MUCHAS GRACIAS A TODOS.

## Índice

1. Resumen.....	5
2. Abstract.....	6
3. Introducción.....	7
A. Periodonto.....	8
a) Encía.....	9
b) Ligamento periodontal.....	10
c) Hueso alveolar.....	13
d) Cemento Radicular.....	14
B. Proteínas de mineralización.....	20
a) Fosfatasa alcalina (ALP).....	20
b) Sialoproteína ósea (BSP).....	20
c) Osteocalcina (OC).....	21
d) Osteopontina (OPN).....	21
e) Osteonectina (ON).....	21
f) Osteoprotegerina (OPG).....	22
C. Factores de crecimiento en tejidos periodontales.....	23
a) Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).....	23
b) Factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF- $\beta$ ).....	24
c) Proteínas morfogenéticas óseas (BMP).....	24
d) Factor de crecimiento insulínico (IGF).....	25
e) Factor de crecimiento derivado del cemento (CGF).....	26
f) Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).....	26
g) Factor de crecimiento epidermal (EGF).....	27
D. Enfermedad periodontal.....	28
E. Células troncales en el ligamento periodontal.....	29
F. Regeneración periodontal.....	31
G. Marcadores moleculares a utilizar.....	34
a) Amelogenina (AMEL).....	34
b) Ameloblastina (AMBN).....	35
c) Proteína del Cemento 1 (CEMP1).....	25
d) Proteína de Adhesión del Cemento (CAP).....	36
e) Citoqueratina (CQ).....	37
f) Vimentina (VIM).....	37
g) STRO-1.....	38

h) CD-146.....	39
4. Planteamiento del problema.....	40
5. Justificación.....	40
6. Hipótesis.....	41
7. Objetivos.....	41
8. Material y Métodos.....	42
A. Cultivo Celular.....	42
B. Inmunohistoquímica.....	42
C. Western Blot.....	43
D. Análisis Estadístico.....	43
9. Resultados.....	44
A. Inmunohistoquímica.....	44
B. Western Blot.....	54
10. Discusión.....	62
11. Conclusiones.....	67
12. Referencias Bibliográficas.....	68

## Resumen

La alta incidencia de la enfermedad periodontal, y la constancia de que los tejidos perdidos se pueden reparar y quizás regenerar, han generado un considerable interés en los factores y células que regulan la formación, desarrollo y el mantenimiento del periodonto. La meta de la terapia periodontal es regenerar y restaurar los tejidos periodontales (encía, ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento radicular) afectados por la enfermedad hasta su forma, función y consistencia original. Los enfoques terapéuticos para lograr estos objetivos incluyen, entre otros la regeneración tisular guiada, la aplicación de factores de crecimiento y proteínas de la matriz del esmalte a las superficies radiculares. Sin embargo, la eficiencia de estas terapias no es predecible, especialmente en la formación de nuevo cemento y el aparato de inserción. Es por esto que uno de los principales objetivos de las investigaciones relacionadas con el periodonto y la regeneración periodontal sea la optimización en la formación de nuevo cemento y la restauración de las fibras de Sharpey. La regeneración de cemento requiere cementoblastos, y su origen así como los factores moleculares que regulan su reclutamiento y diferenciación no han sido completamente comprendidos.

Este trabajo reporta la localización *in vivo* de marcadores moleculares de la matriz del esmalte (amelogenina y ameloblastina), de cemento (CEMP1 y CAP), de células troncales mesenquimales (STRO1 y CD146), de linaje mesenquimal (Vimentina) y de linaje epitelial (citoqueratinas), localizados mediante Inmunofluorescencia en cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$  de grosor, que contienen las estructuras periodontales, utilizando anticuerpos acoplados a FITC y Alexa Rojo. Se realizaron ensayos de Western blot a los 14 días de cultivo de fibroblastos gingivales, células del ligamento periodontal, cementoblastos y osteoblastos para comprobar la expresión *in vitro* de estos marcadores. Nuestros resultados indican que Amelogenina y Ameloblastina se expresan por cementoblastos y células del ligamento periodontal *in vivo* e *in vitro*. También la existencia de subpoblaciones celulares que coexpresan cemento específicos y marcadores de células troncales mesenquimales. Adicionalmente tanto los marcadores de linaje epitelial como mesenquimal fueron coexpresados conjuntamente a los de origen cementoblastico.

## **Abstract**

The widespread prevalence of periodontal disease, and the evidence that lost tissues can be repaired and, perhaps, regenerated, has generated considerable interest in the factors and cells that regulate the formation, development and maintenance of the periodontium. The goal of periodontal therapy is to regenerate and to restore the periodontal components (gingiva, periodontal ligament, alveolar bone and cementum) affected by the disease to their original form, function, and consistency. Therapeutic approaches to achieve these objectives include among others; the use of guided tissue regeneration, the employ of growth factors and enamel matrix derivative to root surfaces. However, the effectiveness of these approaches is not predictable at all, especially on the new cementum and periodontal attachment apparatus formation. This is why one of the major goals of regenerative periodontal therapy is new cementum formation and restoration of Sharpey's fibers. Cementoblast are required for cementum regeneration, but the origin of these cells and also the molecular factors that regulate their recruitment and differentiation are not fully understood.

This study reports the *in vivo* localization of molecular markers of enamel matrix (amelogenin and ameloblastin), cementum (CEMP1 and CAP), mesenchymal stem cells (cd146 and stro1), mesenchymal lineage (vimentin) and epithelial lineage (cytokeratins), localized by immunofluorescence in histological slides of 5  $\mu$ m thick, containing periodontal structures, using antibodies coupled to FITC and Alexa Red. Western blot assays were performed to the 14 days cell cultures of gingival fibroblast, periodontal ligament cells, cementoblast and osteoblasts to check *in vitro* expression of these markers. Our results indicate that amelogenin and ameloblastin are expressed by cementoblasts and periodontal ligament cells *in vivo* and *in vitro*. Also the existence of cell subpopulations coexpressing specific markers of cementum and mesenchymal stem cell markers. Additionally lineage markers for epithelial and mesenchymal origin were coexpressed to cementum markers.

## **Introducción**

Se ha establecido que el ligamento periodontal puede ser una fuente de progenitores de cementoblastos en adultos humanos, al postular que los cementoblastos pueden derivar de células troncales presentes en el ligamento periodontal, encía o hueso alveolar en el caso del periodonto en reparación (Liu *et al.* 1997). Cementoblastos y/o moléculas asociadas a ellos, así como la matriz del cemento parecen participar activamente en el reclutamiento de células troncales para diferenciarse hacia cementoblastos y formar el nuevo cemento que es crítico para el restablecimiento de la estructura y función del aparato de inserción del periodonto. (Grzesik, y Narayanan 2002).

La diferenciación de las células troncales disponibles hacia cementoblastos recapitula los eventos ocurridos durante la cementogénesis. (Ripamonti U 2007). El origen de los cementoblastos no se ha dilucidado completamente de hecho, existen datos controversiales sobre su posible origen. Es ampliamente aceptado que los cementoblastos se diferencian a partir de células del folículo dental que a su vez derivan del ectomesénquima de la cresta neural (Ten Cate *et al.* 1971, Pitaru *et al.* 1994, Cho y Garant 2000, Diekwisch 2001, Luan *et al.* 2006), sin embargo numerosas evidencias de reciente aportación han sugerido que las células de la vaina epitelial de Hertwig tienen una transformación epitelio-mesenquimal que les permite diferenciarse en cementoblastos (Thomas y Kollar 1988, McNeil y Thomas 1993, Thomas 1995, Bosshardt y Schroeder 1996, Bosshardt y Selving 1997). Algunos autores postularon que cada tipo de cemento es producido por una población de cementoblastos con un origen independiente (Zeichner *et al.* 2003). Se ha demostrado la importancia de las proteínas de la matriz del esmalte en el desarrollo del cemento y los tejidos periodontales, así como la actividad secretora de estas proteínas por parte de las células de la vaina epitelial de Hertwig (Hammarström, 1997a, 1997b).

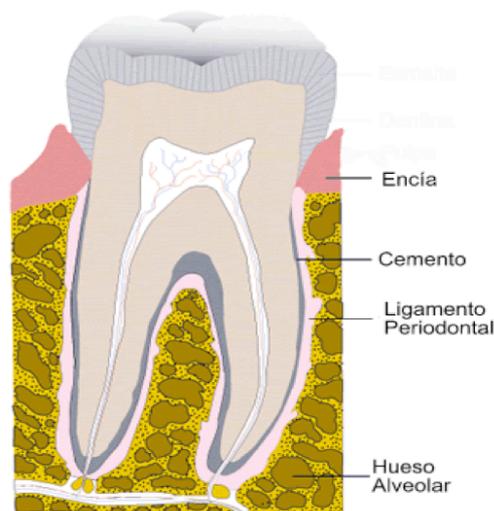
## Periodonto

El periodonto es el conjunto de tejidos que dan soporte estructural y recubren la porción radicular de los órganos dentarios, está compuesto de 4 tipos de tejidos diferentes que varían en su composición celular, tipos y cantidades de proteínas presentes en cada uno de ellos, grado de mineralización, de actividad metabólica y susceptibilidad a enfermedad (Mariotti, 1993).

Está compuesto por dos tejidos blandos, la encía y ligamento periodontal y dos tejidos mineralizados, el cemento y hueso alveolar, como se muestra en la Figura 1 (Hassell 1993, Cho y Garant 2000, Grzesik y Narayanan 2002, Bartold y Narayanan 2006, Bartold *et al.* 2006). A pesar de que cada uno de los tejidos que compone el periodonto tiene una estructura muy especializada y que estas características estructurales definen su función directamente, aun así funcionan como una unidad integrada. El correcto funcionamiento del periodonto solo se logra a través de la integridad estructural y correcta interacción entre sus componentes (Melcher, 1976; Nanci y Bosshardt, 2006).

Dentro de sus principales funciones se encuentran:

- Dar soporte a los órganos dentales dentro de su alveolo.
- Distribuir las fuerzas de oclusión.
- Proteger a la raíz dental.
- Proveer un reservorio de células para la homeostasis y regeneración de tejidos.



**Fig. 1** Estructuras que

forman el periodonto.

**Encía**

La encía es la porción de la mucosa oral que recubre el hueso alveolar y la porción cervical del diente. Está compuesta de una capa de tejido epitelial y un tejido conectivo subyacente llamado lámina propia, la capa epitelial se divide en tres compartimentos funcionales; gingival, del surco, epitelio de unión. El tejido conectivo a su vez se divide en compartimentos superficiales y profundos (Lindhe, 2003).

El epitelio gingival es una barrera física contra los microorganismos; la cual muestra variaciones morfológicas de acuerdo a su ubicación (Carranza y Neuman 1996). Se ha dividido en encía marginal, interdental y adherida o insertada. Es el único tejido periodontal visible clínicamente en una cavidad bucal sana por lo tanto es el indicador más temprano de salud-enfermedad del periodonto (se mide su relación con el diente, se analiza su color, contorno y consistencia), tiene un color rosa (salmón o rosa coral), la encía libre marginal normalmente mide 1.5 mm aproximadamente en sentido coronoapical, rodea a cada diente, es delimitada apicalmente por la línea mucogingival que la separa de la mucosa oral, la superficie de la encía presenta un puntilleo con apariencia de cascara de naranja. (Hassell 1993). La importancia para el periodonto recae en su papel de resistir las agresiones producidas por bacterias (el epitelio de unión esencialmente sella los tejidos periodontales del microambiente oral), químicos y traumas a los que la cavidad oral está sujeta a diario (Nanci y Bosshardt 2006).

En cuanto a la composición bioquímica del tejido conectivo de la encía sana incluye proteínas colágenas, no colágenas, glucosaminoglicanos y proteoglicanos. La colágena compone aproximadamente tres quintas partes del total de proteínas, la colágena tipo I es la más abundante. Las colágenas tipo I, III y V tienen una composición bioquímica diferente a las encontradas en otras partes del cuerpo (piel, etc.), las cuales se ha sugerido se deben a diferentes sitios de escisión en los grupos amino y carboxilo terminal de peptidasas procolágeno (Mariotti 1993).

La organización y función de la encía depende también del grupo heterogéneo de proteínas no colágenas con las que cuenta en su tejido conectivo. Se han identificado proteínas no colágenas en un rango de 15 a 75 kDa, así como el sistema de fibras elásticas en parte responsable de las propiedades elásticas de la encía, y moléculas de adhesión en la matriz extracelular como la Fibronectina (Mariotti 1993). Es un tejido metabólicamente activo con un continuo remodelado del tejido conectivo en respuesta a factores locales y ambientales como la presencia o ausencia de órganos dentales o el proceso inflamatorio cambiando su composición proteica en respuesta a estos (Hassell 1993).

### **Composición bioquímica del tejido conectivo gingival (Mariotti 1993)**

**Colágenas:** Tipo I (más abundante), Tipo III, Tipo IV, Tipo V, Tipo VI.

**Proteínas no colágenas:** Laminina, Fibronectina, Osteonectina, Tenascina, Sistema de Fibras Elásticas.

**Glucosaminoglicanos:** Dermatan sulfato (60%), Condrotín 4 sulfato (28%), Heparán sulfato, Ácido hialurónico.

**Proteoglicanos:** Decorina, Versicano.

### **Ligamento periodontal**

Es un tejido conectivo especializado, suave, altamente vascularizado y celular tiene un grosor 0.15 a 0.38 mm, y forma la interface entre el cemento radicular y el hueso alveolar. Contiene vasos sanguíneos, linfáticos, nervios y células intercaladas en una matriz extracelular de colágena, glicoproteínas y proteoglicanos (Hassell 1993, Mariotti 1993, Nanci y Bosshardt 2006).

Se forma dentro de la región interna del folículo dental, en un principio, el espacio del ligamento periodontal es ocupado por tejido conectivo desorganizado que se extiende entre el cemento y el hueso alveolar, que posteriormente es remodelado y la matriz extracelular se convierte en un sistema de fibras organizado en haces que se extienden entre las superficies del cemento y hueso (Nanci y Bosshardt 2006). Sus funciones consisten en proveer un revestimiento de tejidos blandos para proteger vasos sanguíneos, linfáticos y nervios de lesiones por fuerzas mecánicas, transmitir las fuerzas

oclusales al hueso, anclaje del diente al hueso alveolar, conservar los tejidos gingivales en relación adecuada con los dientes, resistencia contra el impacto de las fuerzas oclusales (amortiguamiento). Funciona como un receptor sensorial fundamental para el posicionamiento de la mandíbula durante la masticación, posee funciones nutritivas y es un reservorio de células para mantener la homeostasis de los tejidos del periodonto y participar en los procesos de reparación/regeneración (Hassell 1993, Mariotti 1993, Lekic y McCulloch 1996, Shimono *et al.* 2003, Nanci y Bosshardt 2006).

Los elementos celulares del ligamento periodontal incluyen numerosas células diferenciadas y sus precursores. Las células diferenciadas incluyen células sintéticas como cementoblastos, fibroblastos y osteoblastos; células de reabsorción como osteoclastos, fibroblastos que se caracterizan por el rápido recambio de la matriz extracelular, así como el continuo remodelamiento de los haces de fibras de colágena (Mariotti 1993, Nanci y Bosshardt 2006); células epiteliales o restos de Malassez que son remanentes de la vaina epitelial de Hertwig localizados en el ligamento periodontal cerca del cemento radicular, su función no ha sido bien establecida pero podrían estar involucradas en los procesos de reparación/regeneración periodontal; monocitos y macrófagos (Shimono *et al* 2003, Nanci y Bosshardt 2006).

Las células troncales mesenquimales indiferenciadas, tienen un papel fundamental en la homeostasis y la reparación de heridas del periodonto debido a que no solo reparan el ligamento periodontal sino que además restauran hueso alveolar y cemento, estas células están localizadas perivascularmente en el ligamento periodontal y adyacentes a espacios endosteales del hueso alveolar, las células derivadas de las troncales maduran durante su migración hacia las superficies del cemento o hueso alveolar (Lekic y McCulloch 1996, Cho y Garant 2000, Shimono 2003, Nanci y Bosshardt 2006).

Una de las habilidades asombrosas del ligamento periodontal es su rápida adaptación a los niveles de fuerzas aplicadas sobre él y su remarcable capacidad para autorenovarse y la reparación (Lekic y McCulloch 1996). Además mantiene su grosor a pesar de estar rodeado de tejidos mineralizados, debido a que algunas poblaciones celulares dentro de él secretan moléculas que regulan la extensión de la mineralización y previenen la anquilosis, tanto en el desarrollo como en procesos regenerativos. Es uno de los tejidos más activos metabólicamente puede estar relacionado con la función adaptativa de este tejido a cambios funcionales de las fuerzas de oclusión, soporte etc. Cuando la demanda funcional se incrementa el grosor del ligamento periodontal puede incrementarse hasta un 50% y viceversa (Nanci y Bosshardt 2006).

La colágena es la principal proteína encontrada en el ligamento periodontal, representa del 47% al 52% del peso seco. Las colágenas localizadas en el ligamento periodontal son las de tipo I que representa aproximadamente el 80% y colágenas tipo III, IV, V, VI y XII representando el 20% restante. La mayoría de las fibrillas de colágena se organizan en haces de fibras a los que se llama fibras principales y tienen la capacidad de adaptarse continuamente al estrés que reciben (Hassell, 1993).

Sustancia fundamental: así se le designó al espacio entre células, fibras nerviosas y vasos sanguíneos, agrupa todas las proteínas no colágenas y se estima que representa el 65% del volumen del ligamento periodontal. Las proteínas no colágenas que se encuentran en el ligamento periodontal representan el 10% del total de proteínas e incluyen fosfatasa alcalina, proteoglicanos, y glicoproteínas como undulina, tenascina y fibronectina.

#### **Composición bioquímica del ligamento periodontal (Mariotti 1993).**

**Colágenas:** Tipo I, Tipo III, Tipo IV, Tipo V, Tipo VI, Tipo XII.

**Proteínas no colágenas:** Fosfatasa alcalina, Fibronectina, Laminina, Osteonectina, Tenascina, Undulina, Sistema de fibras elásticas.

**Glucosaminoglicanos:** Ácido hialurónico, Heparán sulfato, Dermatan sulfato, Condroitín 4 sulfato, Condroitín 6 sulfato.

## **Hueso alveolar**

También es llamado proceso alveolar, se define como la parte del maxilar y la mandíbula que forma y soporta los alveolos dentales (Linde et al 2003). Está constituido por el hueso alveolar propio que forma las paredes de los alveolos, las corticales internas y externas y el hueso esponjoso entre el hueso alveolar propio y las corticales (Cho y Garant 2000).

A diferencia del cemento, es un tejido mineralizado, vascularizado e innervado que es capaz de autorepararse y continuamente se remodela, este proceso es asincrónico lo que permite que el ligamento periodontal pierda su anclaje solo focalmente y por periodos de tiempo cortos, esta capacidad cobra relevancia en los procesos de movimientos de órganos dentales como los ortodónticos y en la erupción dentaria (Mariotti 1993, Nanci y Bosshardt 2006).

La formación del hueso alveolar está íntimamente relacionada con el desarrollo del ligamento periodontal y el cemento radicular durante la formación de la raíz y la erupción dental, cuando células del folículo dental se diferencian hacia odontoblastos y forman el hueso alveolar. Otra de sus características, es que se pierde en ausencia del órgano dentario en el alveolo, lo que sugiere la presencia de mecanismos regulatorios particulares muy importantes y demuestra la interdependencia de los tejidos periodontales y subraya el importante hecho de que los tejidos del periodonto funcionan juntos como una unidad (Nanci y Bosshardt 2006). Sus funciones son albergar las raíces dentales y absorber y distribuir las fuerzas oclusales generadas durante la masticación y oclusión, pero su función más importante es anclar las raíces a los alveolos mediante la inserción de fibras de Sharpey en el (Cho y Garant 2000).

La composición del hueso alveolar depende de células (osteoblastos, osteoclastos y osteocitos) cuya actividad es parcialmente gobernada por hormonas (hormona paratiroides, calcitonina, vitamina D, andrógenos, estrógenos, etc), factores de crecimiento (TGF- $\beta$ , PDGF, IGF-I y II, etc), citocinas (interleucinas, linfocinas, factores estimuladores de colonias, etc), factores locales (prostaglandinas, etc), nutrición (aporte de calcio) y las fuerzas mecánicas que recibe (Mariotti 1993).

La composición típica del hueso alveolar aun no es completamente conocida pero se estima que es muy similar a la del hueso encontrado en otras partes del esqueleto. En general está compuesto de una fase mineral y una orgánica u osteoide que representa el 40% del peso y está compuesta por células, fluido y proteínas entre las que destaca la colágena representando un 75%, de estas la colágena tipo I predomina con pequeñas cantidades de colágena tipo III y V. Las proteínas no colágenas representan el 8% de la matriz orgánica y se encuentran osteocalcina, osteonectina, osteopontina, proteína de matriz GLA, sialoproteína ósea, fibronectina, tenascina, decorina, biglicano, condroitín 4 sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato, ácido hialurónico, albumina, proteínas morfogenéticas óseas y osteogenina. La fase inorgánica del hueso es del 60% del peso, está compuesta por fosfatos de calcio y bajo una regulación biológica precisa (Mariotti 1993).

### **Cemento radicular**

El cemento es un tejido mineralizado de 50-200  $\mu\text{m}$  de grosor que recubre por completo las superficies radiculares y forma la interface entre la dentina radicular y el ligamento periodontal. Es un componente del diente pero funcionalmente pertenece al periodonto (Hassell 1993, Cho y Garant 2000). Las funciones del cemento son anclar las fibras de Sharpey de colágena del ligamento periodontal a la superficie radicular, también tiene funciones adaptativas y reparativas jugando un papel crucial para mantener la relación oclusal y proteger la integridad de la superficie radicular y de los túbulos dentinarios subyacentes así como el sellado de pulpas necróticas mediante oclusión apical (Mariotti 1993 Hassell 1993). Posee características que lo hacen único entre las que se encuentran que es avascular y carece de inervación, no tiene remodelación como el hueso pero continua aumentando su grosor durante toda la vida (Mariotti 1993 Nanci y Bosshardt 2006). Este tejido es crítico para la maduración adecuada del periodonto, y tiene una mejor capacidad de adsorción de fluoruros y otros elementos pero también se descalcifica más rápido en presencia de condiciones ácidas.

## **Tipos de cemento**

Se clasifica en celular y acelular dependiendo de la presencia o ausencia de cementocitos en su estructura. Otra clasificación incluye cemento de fibras intrínsecas o extrínsecas, dependiendo de la presencia de fibras de colágeno formadas por cementoblastos o por fibroblastos. Tres tipos de cemento considerando estos aspectos se identifican en humanos (Hassell 1993, Bosshardt y Schroeder 1996, Bosshardt y Selvig 1997, Cho y Garant 2000, Grzesik y narayanan 2002, Furtado *et al* 2005, Nanci y Bosshardt 2006).

**Cemento acelular afibrilar:** recubre áreas pequeñas de esmalte, particularmente a lo largo de la unión cemento-esmalte, sus componentes principales son glucosaminoglicanos y se desconoce su función específica.

**Cemento celular de fibras intrínsecas** (o cemento secundario) contiene cementocitos embebidos en una matriz intrínseca de fibras de colágena, las cuales están orientadas en su mayoría paralelamente a la superficie radicular y se dirigen de forma circular alrededor de la raíz. Este tipo de cemento se encuentra en la zona de furca, en la porción apical, en antiguas lagunas de reabsorción y en sitios de fractura radicular. Tiene un papel importante como tejido adaptativo que mantiene al diente en su posición y también participa en el proceso de reparación aunque no tiene una función inmediata en el anclaje del diente.

**Cemento acelular de fibras extrínsecas** (o cemento primario) se encuentra principalmente en las porciones cervical y media de la raíz, recubre del 40% al 70% de la superficie radicular, su extensión hacia apical aumenta de los dientes posteriores a los anteriores. Realiza la función exclusiva de anclar la raíz al ligamento periodontal. Su matriz consiste en franjas densas de fibras cortas de colágena que se implantan dentro de la matriz de la dentina y se orientan de forma perpendicular a la superficie radicular. El cemento acelular de fibras extrínsecas tiene el potencial de adaptarse a alteraciones funcionales como en los movimientos ortodónticos.

**Cemento celular mixto estratificado:** recibe este nombre cuando las fibras extrínsecas atraviesan y se entremezclan con las del cemento de fibras intrínsecas

### **Origen y desarrollo del cemento**

Algunos autores, basados en que las poblaciones de cementoblastos son fenotípicamente diferentes defienden la posibilidad de que el cemento acelular y celular tienen un origen de desarrollo diferente (Lang *et al.* 1995). Es ampliamente aceptado que células infiltradas del folículo dental reciben una señal inductora de la dentina en formación y se diferencian a cementoblastos. Sin embargo, hay evidencia de que las células de la vaina epitelial de Hertwig pueden atravesar una transformación epitelio-mesénquima hacia cementoblastos durante el desarrollo como ocurre en la cresta neural, el esclerotoma, los cojines de mesénquima cardíaca y el borde de fusión de los procesos palatinos (Bosshard y Selving, 1997). Algunos estudios recientes sugieren que células de la vaina epitelial de Hertwig tienen una transformación epitelio-mesénquima hacia fibroblastos y cementoblastos, que depositan cemento acelular y celular respectivamente (Furtado *et al.* 2005). Mientras que otros, señalan la posibilidad de la existencia de dos tipos de cementoblastos: los que derivan de células de la vaina epitelial de Hertwig que producen el cemento acelular de fibras extrínsecas, y cementoblastos derivados del folículo dental (cresta neural) producirían el cemento celular de fibras intrínsecas (Zeichner, *et al.* 2003).

### **Composición inorgánica**

El cemento tiene una composición similar al hueso, aproximadamente 50% de su masa en seco es inorgánica, y consiste en cristales de hidroxiapatita, el remanente de matriz orgánica contiene mayormente colágenas, glicoproteínas y proteoglicanos (Nanci y Bosshardt 2006). El cemento generalmente es menos mineralizado que la dentina radicular en el mismo diente. El cemento acelular de fibras extrínsecas es el más mineralizado de los tres. El componente mineral principal es la hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) con pequeñas cantidades de fosfatos de calcio amorfos, además contiene iones como Mg, Cu, Zn, Na (Furtado *et al.* 2005).

### **Composición orgánica**

La matriz orgánica del cemento está compuesta principalmente por colágenas tipo I (90%) y tipo III (5%) (Hassell 1993, Bosshardt y Selvig 1997), así como proteínas no colágenas como sialoproteína ósea (BSP) y osteopontina (OPN), las cuales tienen propiedades de adhesión celular por su secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) y se piensa que tienen un rol importante en la diferenciación de células progenitoras de cementoblastos.

Se cree que BSP tiene una función de adhesión de células a la superficie radicular y participa iniciando la mineralización. Es quimiotáctica para pre-cementoblastos y promueve su adhesión y diferenciación. OPN se expresa durante los periodos de actividad cementogénica, regula la migración y diferenciación celular a través de la interacción con integrinas (Grzesik y Narayanan 2002). La fibronectina une células a la matriz extracelular. Tenascina está presente en la vaina epitelial de Hertwig durante la diferenciación de odontoblastos y posteriormente en el sitio de anclaje del ligamento periodontal a la superficie radicular. La fosfatasa alcalina participa en la mineralización del cemento. Osteonectina, osteocalcina y laminina también se encuentran en cemento así como proteoglicanos como condroitín sulfato, dermatán sulfato y ácido hialurónico (Mariotti 1993, Furtado *et al.* 2005, Nanci y Bosshardt 2006), y numerosos factores de crecimiento polipeptídicos con la habilidad de promover la proliferación y diferenciación de los cementoblastos putativos secuestrados en la matriz del cemento como proteínas morfogénicas óseas BMP-2, 3 y 4, factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF-a y -b, factor de crecimiento de fibroblastos FGF, factor de crecimiento transformante  $\beta$  TGF- $\beta$ , factor de crecimiento tipo insulina-I IGF-I (Grzesik y Narayanan 2002).

El cemento contiene moléculas específicas como el factor de crecimiento del cemento (CGF) (Mariotti 1993), una isoforma del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) (Nanci y Bosshardt 2006), la proteína de adhesión al cemento (CAP) (Arzate *et al.* 1992) y la proteína del cemento 1 (CEMP1) (Arzate *et al.* 2002).

**Cuadro 1.-Constituyentes de la matriz extracelular y factores de crecimiento presentes en la matriz mineralizada del cemento radicular (Bosshardt, 2005).**

<b>Molécula</b>	<b>Cemento celular de fibras intrínsecas (ccfi) y/o cementoblastos y/o cementocitos</b>	<b>Cemento acelular de fibras extrínsecas (café) y/o cementoblastos</b>	<b>Tipo de cemento sin especificar o diferente de ccfi y cafe</b>
Colágena tipo I, III, V, VI, XII			Detectada
Sialoproteína ósea (BSP)	Detectada	Detectada	
Osteopontina (OPN)	Detectada	Detectada	
Proteína de la matriz de dentina 1 (DMP1)	Detectada	Detectada	
Sialoproteína dentinaria (DSP)	Detectada	No detectada	
Fibronectina (FN)	Cuestionable	Cuestionable	
Tenascina	Cuestionable	Cuestionable	
Osteocalcina (OC)	Detectada	Detectada	
Proteína GLA ósea (BGP)	Resultados inconsistentes	Resultados inconsistentes	
Glicoproteína ácida ósea-75			Detectada
Proteína de adhesión del cemento (CAP)			Detectada
Proteína del cemento 1 (CEMP1)			Detectada
Vitronectina (VN)	Cuestionable	Cuestionable	Detectada (cemento de reparación)
Lumican	Detectada	No detectado	
Fibromodulina	Detectada	No detectado	
Versicano	Detectada	No detectado	
Decorina	Detectada	No detectado	
Biglicano	Detectada	No detectado	
Osteoadherina (OSAD)			Detectada

Amelogenina (AMEL)	Detectada (intra/perilacunar)	Detectada (extensión de esmalte coronal sobre la raíz)	
Ameloblastina/Amelina (AMBN)	Detectada (intra/perilacunar)	Detectada (extensión de esmalte coronal sobre la raíz)	
Albúmina	Detectada	Detectada	
Glicoproteína alfa 2HS	Detectada	Detectada	
Factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)			Detectada
Proteínas morfo genéticas óseas (BMP)			Detectada
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) a y b			Detectada
Factor de crecimiento de fibroblastos (FGFs)			Detectada
Factor de crecimiento tipo insulina I y II (IGF-I) y (IFG-II)			Detectada
Factor de crecimiento derivado de cemento (CGF)			Detectada

## **Proteínas de mineralización en el periodonto.**

### **Fosfatasa alcalina (ALP)**

Es una proteína glicosilada con actividad enzimática que se localiza en la porción externa de la membrana citoplasmática y en las vesículas de matriz, las cuales contribuyen a la mineralización de la matriz extracelular formando fosfatos de calcio amorfos y cristales de hidroxiapatita (Sela *et al.* 1992). Se cree que participa en el proceso de mineralización del cemento mediante la precipitación de sales de fosfato de calcio. Su actividad aumenta al iniciar el proceso de mineralización de la matriz extracelular, por lo que es un marcador temprano de biomineralización (Whyte y Peck, 1989). Su actividad se ha localizado en placas de crecimiento de cartílago, en células endosteales, células de medula ósea, osteoblastos y cementoblastos. En hueso se ha identificado en el frente de mineralización (Miao y Scutt, 2002). En molares de rata se ha descrito su distribución heterogénea en el ligamento periodontal, con una mayor actividad en las porciones adyacentes al hueso alveolar y el cemento. Su actividad es mayor adyacente al cemento celular de fibras intrínsecas en comparación del cemento acelular de fibras extrínsecas (Groeneveld, 1995).

### **Sialoproteína ósea (BSP)**

Es una glicoproteína fosforilada y sulfatada, encontrada principalmente en hueso de 59-kDa, se une estrechamente a la matriz de colágena e hidroxiapatita, participa en el proceso de mineralización y tiene propiedades de adhesión celular debido a sus secuencias de Arg-Gly-Asp (RGD) de unión a integrinas. El cemento acelular afibrilar y el cemento acelular de fibras extrínsecas parecen contener una mayor cantidad de esta proteína. (Bosshardt y Selvig, 1997). Se expresa en células a lo largo de la superficie radicular durante el desarrollo de la raíz y también en dientes maduros. El papel más destacado que se le atribuye es como nucleador de cristales de hidroxiapatita, por lo que desempeña un papel importante en las etapas iniciales de la mineralización y se le considera como un marcador de diferenciación de osteoblastos y cementoblastos. Es quimiotáctica para pre-cementoblastos y promueve su adhesión y diferenciación (Somerman *et al.* 1990, McNeil *et al.* 1994).

### **Osteocalcina (OC)**

Es una proteína pequeña de 5.8 kDa sintetizada principalmente por los odontoblastos y osteoblastos, es muy específica para tejidos calcificados y es uno de los componentes de la matriz encontrados en el cemento celular de fibras intrínsecas y los cementoblastos asociados a él, está involucrada en el proceso de mineralización de este tejido (Bosshardt y Selvig 1997). Esta proteína se une a calcio y a moléculas de hidroxiapatita. Se ha sugerido que está involucrada en el proceso de mineralización, que es una molécula efectora para el calcitriol (1,25-[OH]<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, regulador de niveles de calcio) e influencia el movimiento y proliferación de osteoclastos (Mariotti 1993).

### **Osteopontina (OPN)**

Es una sialoproteína de 44 kDa de movilidad relativa, encontrada principalmente en hueso así como otros tejidos no esqueléticos como el sistema nervioso central, riñón y placenta. A pesar de que las funciones fisiológicas de la osteopontina no son claras, se ha sugerido, que está involucrada en la adhesión y movimiento de osteoblastos y osteoclastos en hueso vía uniones celulares de integrina (Mariotti, 1993). La osteopontina está presente en la región del ligamento periodontal en dientes maduros, se cree que tiene un papel importante en la diferenciación de células progenitoras de cementoblastos, es expresada durante los periodos de actividad cementogénica, regula la migración, diferenciación y sobrevivencia celular mediante interacciones con integrina  $\alpha_v\beta_3$  y regula el proceso inflamatorio mediante la activación de macrófagos, fagocitosis y la producción de óxido nítrico (Gonçalves, 2004). En dientes y cemento radicular, regula la biomineralización por lo menos por dos mecanismos: regulando la diferenciación de células óseas y la mineralización de la matriz (Grzesik y Narayanan, 2002).

### **Osteonectina (ON)**

Es una proteína glicosilada rica en cisteínas compuesta de 4 dominios, de los cuales al menos dos son regiones de unión a calcio, se encuentra en la matriz extracelular de tejidos mineralizados y caracterizados por un alto recambio metabólico (Mariotti 1993),

es uno de los componentes de la matriz del cemento, es expresada por los cementoblastos que producen el cemento acelular de fibras extrínsecas y el cemento celular de fibras intrínsecas y tiene una relación cercana con la colágena en el proceso de mineralización (Bosshardt y Selving 1997). Ha sido implicada en varias funciones biológicas incluyendo mineralización de hueso y cartílago, inhibición de la mineralización, angiogénesis, diferenciación y proliferación celular. (Mariotti 1993, Grzesik y Narayanan, 2002).

### **Osteoprotegerina (OPG)**

También conocida como factor de inhibición de la osteoclastogénesis (OCIF) o como TNFRSF11B. Es una glicoproteína, miembro de la superfamilia de receptores TNF recientemente identificada que es secretada y no permanece anclada a la membrana a diferencia de los otros miembros de esta superfamilia. Se sintetiza inicialmente como un polipéptido de 401 aminoácidos, y tras la pérdida de un fragmento de 21 aa queda como una proteína madura con 380 aa, momento a partir del cual pierde sus dominios transmembranales y citoplasmáticos y es secretada como proteína soluble. El RNAm de la OPG se expresa en numerosos tejidos humanos además del hueso, en el cual su principal función parece ser la inhibición de la maduración de los osteoclastos y de su activación. Forma parte de un sistema regulador del metabolismo óseo, con un equilibrio muy estrecho entre los procesos de formación y resorción. La OPG actúa como un receptor señuelo secuestrando al ligando de osteoprotegerina (OPG-L) y evitando la activación del receptor activador de NF-KB (RANK). Los osteoblastos maduros producen cantidades importantes de OPG, que bloquean la osteoclastogénesis e impiden la formación de osteoclastos, mientras que los osteoblastos inmaduros mediante descensos en la expresión de OPG e incrementos en el OPG-L son capaces de reclutar a los osteoclastos que remodelarán el tejido óseo viejo (Cañabate y Martínez 2002).

## **Integrinas y factores de crecimiento en el periodonto.**

### **Integrinas**

Las integrinas son proteínas de superficie celular que regulan la unión de células a las proteínas extracelulares y entre célula-célula. Son heterodímeros compuestos por una subunidad- $\alpha$  unida no covalentemente a una subunidad- $\beta$ . Se considera que las integrinas son importantes para la diapédesis de células blancas, interacciones entre células T y macrófagos durante la inflamación, formación de coágulos, migración de fibroblastos y células epiteliales durante la reparación de heridas así como cambios en las adhesiones célula-célula durante la invasión de tumores y metástasis (Ruoslahti, 1990).

### **Factores de crecimiento**

Son las proteínas encargadas de coordinar los eventos celulares de proliferación, migración, quimiotaxis, actividad metabólica y diferenciación de células del epitelio, hueso y tejido conectivo para la reparación tisular. Se unen a receptores específicos de superficie celular tipo tirosina-cinasa presentes en varias células blanco que incluyen osteoblastos, cementoblastos y fibroblastos del ligamento periodontal (Howell *et al.* 1996).

### **Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)**

Es uno de los principales involucrados en la reparación de heridas y posee la capacidad de estimular la regeneración periodontal. Está compuesto por dos cadenas de polipéptidos unidas por puentes disulfuro. El PDGF se puede encontrar como homodímeros (AA o BB) o como heterodímeros (AB). Recientemente se han identificado dos isoformas mas C y D (Dereka *et al.* 2006). Es un importante estimulador de la quimiotaxis celular, proliferación y síntesis de matriz extracelular, también posee actividad anti-apoptótica, promueve la angiogénesis y la regulación positiva de otros factores de crecimiento y células. PDGF estimula la proliferación de células del ligamento periodontal (Raja *et al* 2009). Se han realizado estudios en humanos donde el empleo de PDGF-BB logró la regeneración completa del aparato de

inserción periodontal incluyendo nuevo cemento, ligamento periodontal y hueso en los sitios tratados (Nevins et al. 2003).

### **Factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

Representa a una familia de factores de crecimiento polipeptídicos relacionados con las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) pero funcionalmente diferentes, los mejores caracterizados son TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ . Están involucrados en embriogénesis, inflamación, regulación de la respuesta inmune y reparación de heridas. TGF- $\beta$  actúa como factor de proliferación para fibroblastos, es un regulador importante en la proliferación y diferenciación celular, actúa como mitógeno para los osteoblastos humanos e incrementa la formación de matriz ósea por células de linaje osteoblástico. Este factor de crecimiento es pleiotrópico o bifuncional es decir puede estimular o inhibir el crecimiento celular (Raja *et al.* 2009). Las isoformas del TGF- $\beta$  tienen múltiples efectos regulatorios en la síntesis, mantenimiento y recambio de la matriz extracelular. En tejidos afectados periodontalmente se observan niveles incrementados de TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 comparados con tejidos normales. TGF- $\beta$  interactúa con células blanco durante el desarrollo y maduración del periodonto, también está involucrado en su proceso de reparación. TGF- $\beta$  se expresa durante el desarrollo del hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento durante todos los estadios de la odontogénesis (Dereka *et al.* 2006).

### **Proteína morfogenética ósea (BMP) / Proteína osteogénica (OP)**

Se considera que esta proteína es producida por osteoblastos y es categorizada como miembro de la familia de proteínas de la superfamilia del TGF- $\beta$ . Inducen la osificación endocondral como recapitulación del desarrollo embrionario. BMPs/OPs tienen un papel crucial como mediadores solubles de interacciones epitelio-mesénquima y efectos inductivos no relacionados con la inducción ósea necesariamente (Ripamonti y Renton, 2006). Las actividades pleiotrópicas de BMPs/OPs son vastas e incluyen la inducción de la regeneración de los tejidos periodontales (Ripamonti y Petit, 2009). BMP-2, -3 y -4 se encuentran en la matriz del cemento (Grzesik y Narayanan, 2002, Gonçalves et al. 2004).

Las BMP con una matriz de colágena como vehículo han inducido la regeneración de cemento y hueso alveolar en defectos creados quirúrgicamente en furca de primates, con una notable morfogénesis del ligamento periodontal e inserción fiel de las fibras de Sharpey al cemento (Ripamonti *et al.* 1996, 1997). La aplicación de BMP-2 estimula el reclutamiento celular incrementando la proliferación y migración de células del ligamento periodontal adyacente al área de la herida y así promueve la regeneración periodontal incrementando la formación de nuevo cemento (Shimono *et al.* 2003). La proteína osteogénica 1 recombinante humana (hrOP-1) al ser implantada en defectos de furca clase II en *P. Ursinus* (primate) con matriz dentinaria expuesta quirúrgicamente inicia la inducción de la cementogénesis mientras que hrBMP-2 induce preferentemente la regeneración de hueso alveolar (Ripamonti y Petit, 2009).

#### **Factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF)**

La familia de factores de crecimiento insulínico consiste de insulina y los péptidos IGF-I y IGF-II, los cuales se unen a diferentes receptores. Son mediadores biológicos naturales que regulan muchos eventos celulares y potencializan la reparación y regeneración de heridas periodontales actuando sobre el recambio de células del ligamento periodontal. IGF-I ejerce efectos mitogénicos sobre fibroblastos y es un regulador importante del metabolismo de las células óseas, también tiene la capacidad de inhibir la muerte celular por apoptosis. IGF-I induce la acumulación de numerosos productos génicos específicos del esmalte incluyendo amelogenina y ameloblastina, lo que sugiere que IGF está involucrado en la inducción de la biomineralización del esmalte. (Bennett y Schultz, 1993). Los cementoblastos tratados con IGF-I muestran un rango de proliferación acelerado e incremento en la expresión génica de sialoproteína ósea, mientras que la expresión génica de osteocalcina y osteopontina no se altera (Saygin *et al.* 2000). Se piensa que IGF-I y IGF-II son secretados por osteoblastos durante la formación de hueso para incrementar el número de osteoblastos y de esta forma acelerar la deposición de hueso (Raja *et al.* 2009). IGF-I interactúa de forma sinérgica con otros factores de crecimiento como PDGF-BB, TGF- $\beta$ 1 y bFGF para potencializar la regeneración de los tejidos periodontales duros y blandos, mientras que solo no tiene una influencia significativa sobre las actividades celulares (Dereka *et al.* 2006).

### **Factor de crecimiento derivado del cemento (CGF)**

Es un factor de crecimiento de 14 a 23 kDa contenido en la matriz extracelular del cemento, fue purificado de cemento bovino. Es una isoforma del factor de crecimiento insulínico-I. La actividad del CGF es inhibida por anticuerpos para el (IGF-I) y su receptor. La microsecuenciación determinó que ciertos péptidos de su cadena de aminoácidos tienen homología con IGF-I mientras que otros 4 péptidos no tienen homología aparente con él. Ambos CGF e IGF-I son mitógenos para fibroblastos gingivales humanos y células del hueso alveolar, pero estas últimas responden mejor al CGF (Ikezawa *et al.* 1997). CGF es el mayor mitógeno en el cemento y su actividad es potencializada con pequeñas cantidades de suero derivado de plasma o factor de crecimiento epidermal (Nakae *et al.* 1991, Yonemura *et al.* 1992). Las reacciones de señalización características del CGF parecen ser componentes importantes de los mecanismos que regulan la formación y regeneración del cemento y los tejidos conectivos adyacentes. Induce una batería de eventos de señalización, el tipo de reacciones catalizadas y su grado de estimulación son distintos a los producidos por otro factor de crecimiento conocido (Yonemura *et al.* 1993).

### **Factor de crecimiento de fibroblastos (FGFs)**

Los FGFs son miembros de una larga familia de polipéptidos considerados como potentes reguladores del crecimiento celular y diferenciación, tienen capacidad quimiotáctica y mitogénica sobre células de origen mesodérmico y neuroectodérmico así como efecto angiogénico, lo que los hace muy importantes durante la reparación de los tejidos periodontales. Los miembros de la familia de FGF estimulan la proliferación de la mayoría de los tipos celulares principales involucrados en la reparación de heridas. bFGF aumenta la reparación de heridas y regeneración de los tejidos periodontales (Raja *et al.* 2009), estimula la proliferación de células del ligamento periodontal y osteoblastos (Dereka *et al.* 2006).

### **Factor de crecimiento epidermal (EGF)**

Es un factor de crecimiento polipeptídico involucrado en el control del crecimiento epitelial y la diferenciación de los tejidos periodontales (Nordlund *et al* 1991). Se expresa en altos niveles en el epitelio de unión sano y en fibroblastos del ligamento periodontal. EGF mejora ligeramente la quimiotaxis y suprime la síntesis de matriz extracelular en células del ligamento periodontal y restringe la diferenciación celular. La expresión de los receptores para EFG disminuye cuando las células se diferencian hacia tipos celulares capaces de formar tejidos mineralizados lo que sugiere que pueden participar en la estabilización fenotípica de las células del ligamento periodontal (Matsuda *et al.* 1993).

## **Enfermedad periodontal**

La gingivitis y periodontitis son enfermedades infecciosas, que afectan un alto porcentaje de la población a nivel mundial, incluso desde edades tempranas. La enfermedad periodontal crónica se ha relacionado con enfermedades sistémicas como cardiovasculares y pulmonares (García *et al.* 2001, Dave *et al.* 2004). A pesar de que las bacterias son esenciales para el desarrollo de la periodontitis, el hecho de que se desarrolle en grados variables en diferentes individuos sugiere una etiología multifactorial (Nanci y Bosshardt, 2006). Sin embargo todos los tipos de periodontitis parecen tener una serie de eventos comunes que conducen al colapso de los tejidos y la pérdida del aparato de inserción. En la gingivitis, los patógenos periodontales en particular *Porphyromonas gingivalis*, tienen la capacidad de perturbar la integridad del epitelio de unión permitiendo la propagación subgingival de bacterias y sus antígenos. La consiguiente respuesta inflamatoria conduce a la degradación del tejido conectivo subyacente, en un principio alrededor de los vasos sanguíneos y posteriormente las regiones adyacentes, resultando en una desintegración estructural y funcional de la encía. Uno de los primeros cambios en la periodontitis es la migración del epitelio de unión a lo largo de la superficie radicular, formando un epitelio de unión alargado y una bolsa periodontal. Cuando la gingivitis se establece el tejido conectivo adyacente al epitelio de unión es continuamente alterado por la respuesta inflamatoria, así que necesita migrar en sentido apical a lo largo de la superficie radicular para encontrar un tejido conectivo estructuralmente intacto (Nanci y Bosshardt, 2006). Las bacterias causan la destrucción tisular indirectamente exacerbando la respuesta inmune del huésped. En el contexto de la enfermedad periodontal recientemente se ha revisado la respuesta inmune adquirida involucrando principalmente linfocitos-T, linfocitos-B y mediadores de la inflamación con el progreso de esta enfermedad (Teng, 2003 y Yamazaki *et al.* 2003). Numerosas citocinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento, en particular IL-1 y TNF- $\alpha$  se han asociado con la reabsorción ósea, así como el receptor del factor nuclear kappa (RANK) y su ligando RANK-L que están directamente involucrados en la diferenciación de precursores de osteoclastos y la activación y supervivencia de osteoclastos.

## **Células troncales en el ligamento periodontal**

Desde el descubrimiento y caracterización de las células troncales mesenquimales multipotentes (MSCs) de la médula ósea (BM), poblaciones de MSC de otros tejidos se han caracterizado basándose en los criterios establecidos para las BMMSCs. La búsqueda de células MSC en tejidos específicos ha permitido descubrir una variedad de células troncales en cada órgano y tejido del cuerpo en las últimas décadas (Huang *et al.* 2009). Poblaciones de MSC derivadas de tejidos dentales se encuentran entre las muchas otras células troncales que residen en tejidos especializados que han sido aisladas y caracterizadas.

El primer tipo de célula troncal de origen dental fue aislada del tejido pulpar humano y se les llamó células troncales de la pulpa postnatal (DPSCs) (Gronthos *et al.* 2000). Subsecuentemente, cuatro tipos de poblaciones de MSC dentales adicionales fueron aisladas y caracterizadas: células troncales de dientes deciduos exfoliados (SHED) (Miura *et al.* 2003), células troncales del ligamento periodontal (PDLSCs) (Seo *et al.* 2004), células troncales de la papila apical (SCAP) (Sonoyama *et al.* 2008), y células precursoras del folículo dental (DFPCs) (Morsczeck *et al.* 2005).

El concepto de que células troncales podrían residir en los tejidos periodontales fue propuesto en los 80's por Melcher, (1985) quien cuestionó si las tres poblaciones celulares del periodonto (cementoblastos, células del hueso alveolar y fibroblastos del ligamento periodontal) derivaban de una única población de células ancestrales o células troncales. La evidencia más convincente de que estas células están presentes entre los tejidos periodontales ha sido provista por los estudios *in vivo* e histológicos de McCulloch y sus colaboradores (Lekic *et al.* 1996. McCulloch *et al.* 1985, 1987, 1995, 1996). Las PDLSCs son células clonogénicas, altamente proliferativas y capaces de regenerar tejidos parecidos a cemento/ligamento periodontal, propiedades que las define como células troncales. Las PDLSCs son similares a otras células troncales mesenquimales en la expresión de STRO-1/CD146. Sin embargo por medio de tinciones inmunohistoquímicas y western blot se ha demostrado que PDLSCs en cultivo expresan una serie de marcadores cementoblastico/osteoblásticos incluyendo fosfatasa alcalina, sialoproteína ósea, osteocalcina, escleraxis y el receptor tipo I del

factor de crecimiento transformante- $\beta$ . Además PDLSCs exhibieron características osteogénicas, adipogénicas y condrogénicas bajo condiciones de cultivos definidos.

Las PDLSCs representan una nueva población de células troncales multipotentes por su capacidad de desarrollar células parecidas a cementoblastos y adipocitos *in vitro* y tejidos parecidos a cemento/ligamento periodontal *in vivo*, a diferencia de cualquier otro tipo de células troncales mesenquimales como las BMMSC y las DPSCs contra las que se compararon sus características. Se comprobó que las PDLSCs participan en el proceso de reparación de los tejidos periodontales al trasplantarlas en defectos periodontales creados quirúrgicamente en molares de ratas inmunocomprometidas, a las 6-8 semanas se hicieron evaluaciones histológicas las cuales mostraron que estas células tienen la capacidad de generar una capa delgada de tejido parecido a cemento en la superficie del andamio utilizado (hidroxiapatita/fosfato tricálcico) junto con fibras de colágeno condensadas parecidas a fibras de Sharpey, lo que sugiere que tienen el potencial para regenerar el aparato de inserción periodontal. (Seo *et al.* 2004). Recientemente se ha mostrado su capacidad de diferenciarse hacia precursores neuronales (Coura *et al.* 2008).

La identificación de poblaciones putativas de células troncales mesenquimales en el periodonto ha estimulado el interés en el potencial uso de terapias basadas en células troncales para tratar los daños causados por traumas o enfermedad periodontal.

## **Regeneración periodontal**

La meta principal de los tratamientos periodontales es prevenir la pérdida de inserción y regenerar a los tejidos de soporte dañados debido a la enfermedad periodontal. Regeneración se define como la reproducción o reconstitución de una parte del cuerpo perdida o dañada, de tal manera que la función y arquitectura de estos tejidos sea completamente restaurada.

El objetivo de la terapia periodontal regenerativa es restaurar la estructura y función del periodonto, para lograr una exitosa regeneración periodontal se requiere un epitelio de unión funcional con una nueva unión a la superficie dental, nuevas fibras de tejido conectivo que se inserten en el cemento radicular, la formación de nuevo cemento acelular en la superficie radicular y la restauración de la altura del hueso alveolar (Gonzales *et al.* 2008, Bosshardt y Sculean 2009). Mientras que existe menos preocupación acerca de la inserción del nuevo tejido epitelial, la inserción del nuevo tejido conectivo es más crítica. Estas preocupaciones incluyen predictibilidad y la cantidad de nuevo tejido conectivo insertado, así como la fuerza de la interface regenerada entre la superficie radicular tratada y el nuevo cemento. Como la formación de cemento es esencial para la inserción de las fibras del ligamento periodontal a la superficie radicular, muchas investigaciones se han enfocado en entender la cementogénesis (Schroeder 1992, Bosshardt *et al.* 1996, 1997, 2005 Saying *et al.* 2000, Grzesik y Narayanan, 2002 Zeichner 2006 Foster *et al.* 2007).

Clínicamente los tratamientos periodontales regenerativos son evaluados con parámetros clínicos (sondeo periodontal, radiografías y evaluaciones de reinscripción). Estos métodos sin embargo son inapropiados para demostrar verdaderamente la ganancia en la inserción. La histología continúa siendo el único método confiable para evaluar la eficacia de la terapia dirigida para lograr la regeneración periodontal.

Los requerimientos para considerar como un procedimiento regenerativo a un tratamiento periodontal son: histología humana demostrando nuevo cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar coronal al defecto base, evaluaciones clínicas humanas controladas demostrando mejoras clínicas de inserción y niveles de hueso y estudios

histológicos en animales controlados mostrando nuevo cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar (Bosshardt y Sculean 2009). Se asume que, una vez que una técnica regenerativa haya revelado potencial regenerativo, como el evidenciado por medios histológicos, cualquier hallazgo clínico positivo será comúnmente calificado automáticamente como regeneración periodontal. A la fecha, varias terapias o técnicas han sido utilizadas en la práctica clínica como por ejemplo raspado y alisado de la superficie radicular, la implantación de autoinjertos, aloinjertos, materiales aloplásticos, acondicionamiento químico de la raíz, factores de crecimiento, proteínas de la matriz del esmalte, regeneración tisular guiada y una combinación de estos, sin embargo los resultados clínicos obtenidos con estos métodos varían ampliamente y son impredecibles (Bartold *et al.* 2006, Bosshardt y Sculean 2009).

### **Ingeniería tisular**

Actualmente se han hecho grandes avances en el entendimiento de los eventos moleculares y celulares involucrados en la formación y regeneración de los tejidos periodontales. La ingeniería tisular y la terapia génica han emergido como una alternativa a los tratamientos convencionales (Lin et al. 2009).

Se cree que la regeneración periodontal se puede alcanzar exitosamente mediante la migración de células troncales del ligamento periodontal y que estas células subsecuentemente se diferenciarán en osteoblastos, cementoblastos y fibroblastos, sintetizando la matriz extracelular consistente con los tejidos periodontales. La ingeniería tisular es un área contemporánea de la ciencia basada en los principios de la biología celular, biología del desarrollo y la ciencia de los biomateriales para desarrollar nuevos procedimientos y biomateriales para reemplazar tejidos perdidos o dañados. Los principales requerimientos para la ingeniería tisular son células progenitoras apropiadas, moléculas de señalización, un andamio o vehículo y un adecuado aporte sanguíneo.

## **Factores de crecimiento**

Durante muchos años las investigaciones han intentado usar moléculas biológicamente activas para lograr la regeneración periodontal. Entre estas moléculas se encuentran proteínas de matriz extracelular y factores de adhesión celular; factores mediadores del metabolismo y actividad celular; y factores de crecimiento y diferenciación.

Los factores de crecimiento regulan la proliferación, actividad celular, quimiotaxis y/o diferenciación celular. Numerosos factores de crecimiento, solos o combinados, como el factor insulínico, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento vascular endotelial, hormona paratiroidea, factor de crecimiento transformante  $\beta$  y proteínas morfogenéticas óseas han sido probados para la regeneración periodontal en experimentos animales. Los factores de crecimiento más prometedores parecen ser proteínas morfogenéticas óseas, particularmente, BMP-2 y BMP-7 (Bosshardt y Sculean 2009).

## **Proteínas de la matriz del esmalte**

Muchos estudios clínicos han mostrado efectos positivos en tratamientos para periodontitis con derivados de la matriz del esmalte, y varias revisiones de estudios clínicos e histológicos documentaron estos efectos benéficos (Tonetti *et al.* 2002, Kalpidis y Ruben 2002, Venezia *et al.* 2004, Eposito *et al.* 2005, Sculean *et al.* 2007).

El concepto biológico detrás del uso terapéutico de las proteínas de la matriz del esmalte para la regeneración periodontal se basa en evidencia circunstancial, la idea original sugiere que hay una relación causal entre las proteínas de la matriz del esmalte y la cementogénesis. (Hammarström *et al.* 1997, Hammarström 1997, Bosshardt 2008).

La matriz del esmalte contiene una porción no colágena principalmente compuesta por proteínas hidrofóbicas conocidas como proteínas amelogeninas y no amelogeninas (proteínas aniónicas del esmalte, ameloblastina, enamelina, tuftelina, proteínas sulfatadas y proteasas del esmalte como enamelisina o MMP20 y EMSP1). Se ha sugerido que las proteínas del esmalte funcionan como nucleadoras y moduladoras de la formación de los cristales de hidroxiapatita (Zeichner, 2001).

## **Marcadores moleculares a utilizar**

### **Amelogenina**

La amelogenina es la proteína del esmalte más abundante (90%) de todas las secretadas por los ameloblastos. Son hidrofóbicas, ricas en prolina, glutamina, leucina e histidina, muy conservada evolutivamente entre diferentes especies lo que sugiere un papel crucial en la formación del esmalte y procesos de biomineralización (Hammarström, 1997b, Sire *et al.* 2004, Lyngstadaas *et al.* 2009). En la matriz extracelular del esmalte hay múltiples amelogeninas presentes, producto de splicings alternativos del gen de la amelogenina.

La amelogenina contiene dominios altamente hidrofóbicos e hidrofílicos, y es esa naturaleza bipolar la que le permite a los monómeros de amelogenina el auto-ensamblaje que resulta en la formación de nano-esferas, lo que se asume es crítico para la función de esta proteína estructural durante la formación del esmalte, estabilizando los recién formados cristales de hidroxiapatita y posteriormente influenciando su crecimiento en tamaño. (Hammarström, 1997, Zeichner, 2001, Paine y Snead, 2005, Bosshardt 2008, Lyngstadaas *et al.* 2009).

El gen de la amelogenina está localizado en los cromosomas sexuales X y Y, y es el polimorfismo entre AMGX y AMGY lo que permite el uso del gen de la amelogenina para determinar el sexo en muestras de DNA en ciencias forenses. Basados en experimentos de pérdida de función y observaciones a pacientes con amelogénesis imperfecta, se cree que las funciones de la amelogenina son regular la orientación, forma y longitud de los cristales de hidroxiapatita en el esmalte.

### **Ameloblastina**

También conocida como amelina, representa el 5% de las proteínas no amelogeninas del esmalte, es una proteína aniónica, rica en prolina, glicina y leucina, tiene un dominio DGEA identificado como para integrinas  $\alpha 2\beta 1$ , y dominio de adhesión celular parecido a trombospondina.

Es localizada en el cromosoma humano 4q21, esta proteína está presente en la etapa secretora de la formación del esmalte y es sintetizada como una proteína de 65-70 kDa que rápidamente es procesada hacia numerosas proteínas de bajo peso molecular de 52 a 13 kDa. Es localizada en los procesos de Tomes de los ameloblastos secretores y en el espacio de la vaina y el esmalte, lo que sugiere un rol en la biomineralización del esmalte por esta proteína. También es detectada en células mesenquimales de la pulpa, pre-odontoblastos, odontoblastos y en la vaina epitelial de Hertwig (Zeichner 2001).

### **Proteína del cemento 1 (Cemp1)**

Es una proteína de 247 aminoácidos codificados por 1374 pares de bases, tiene un peso molecular teórico de 25.9 kDa (Alvarez et al. 2005). La proteína recombinante humana (hrCEMP1) tiene una movilidad relativa (Mr) 50 kDa por las modificaciones postraduccionales. La caracterización de esta proteína indica que su estructura secundaria está compuesta principalmente por láminas  $\beta$  (55%), espirales al azar (35%) y  $\alpha$  hélices (10%). Es una proteína glicosilada, fosforilada y con una fuerte afinidad por la hidroxiapatita. (Villarreal et al. 2009).

Es efectiva como marcador biológico del cemento, se expresa y distribuye en los tejidos periodontales humanos, el ligamento periodontal, hueso alveolar, y células derivadas de cementoblastoma. Está distribuida a lo largo de la superficie radicular completa. Reacciona inmunológicamente en la fase cementoide del cemento celular y acelular, cementoblastos, cementocitos, células localizadas en los espacios endosteales del hueso alveolar, y en células del ligamento periodontal localizadas en la periferia de los vasos sanguíneos. La proteína del cemento 1 inmunopurificada promueve la adhesión de células derivadas del ligamento periodontal, hueso alveolar y fibroblastos gingivales.

Se expresa en células del linaje cementoblastico durante su desarrollo y maduración, *in vitro* e *in vivo*. Se asume que Cemp1 es un marcador para el linaje cementoblastico. Cemp1 tiene un papel importante en el proceso de mineralización del cemento, la formación y maduración de la matriz del cemento están asociados con la síntesis y secreción de la proteína del cemento 1 (Arzate et al. 2002). Cemp1 promueve la adhesión y diferenciación celular, rango de deposición, composición y morfología de los cristales de hidroxiapatita formados por cementoblastos, induce la expresión de proteínas relacionadas con la mineralización (Villarreal et al. 2009).

### **Proteína de adhesión del cemento (CAP)**

CAP es una proteína cemento específica que se extrajo de cemento humano y bovino, tiene una movilidad relativa de 56, 000 Da. CAP ha mostrado promover varias actividades biológicas como la adhesión celular, quimiotaxis, diferenciación, así como la expresión de fosfatasa alcalina (McAllister *et al.* 1990, Olson *et al.* 1991, Arzate *et al.* 1992, 2002, Alvarez *et al.* 2003). Es una proteína parecida a colágena, que tiene una homología parcial con las colágenas tipo I y XII, sirve como marcador de progenitores cementoblásticos putativos del ligamento periodontal humano adulto, y tiene la capacidad de regular la capacidad de diferenciación de estos progenitores *in vitro* (Liu *et al.* 1997). CAP parece ser inmunológicamente relacionada con CEMP1, debido a que un anticuerpo monoclonal contra CAP tiene reacción cruzada con la proteína CEMP1 inmunopurificada en 70 kDa. CAP también se ha reportado como una especie de 65 kDa en el germen dental en desarrollo (Arzate *et al.* 2002, Alvarez *et al.* 2005). CAP se une con alta afinidad a la fibronectina e hidroxiapatita pero no a colágenas, la actividad de adhesión celular es selectiva para los diferentes tipos celulares (fibroblastos, osteoblastos, células de músculo liso y células endoteliales, pero no a células epiteliales). Las células óseas migran y se adhieren mejor a superficies cubiertas con CAP que las células del ligamento periodontal y a su vez estas lo hacen mejor que los fibroblastos gingivales. Un patrón similar se observa al evaluar la capacidad de CAP de unirse a estas líneas celulares (Liu *et al.* 1997). Y las células que tienen mayor capacidad de unirse a CAP, forman tejidos mineralizados. CAP podría participar en el reclutamiento de células formadoras de cemento putativas del periodonto y su diferenciación hacia cementoblastos (Komaki *et al.* 2002).

## **Citoqueratina**

Las citoqueratinas son el principal componente del citoesqueleto de las células epiteliales, donde forman los filamentos intermedios. En el humano forman una compleja familia codificada por al menos 20 genes diferentes, cuyo peso molecular varía entre 40 y 70 kDa (Crewther *et al.* 1983, Steinert y Roop 1988) son un grupo de 19 proteínas que se han clasificado en 2 subfamilias: la primera con las proteínas básicas relativamente grandes (56 a 67 kDa) numeradas de la 1 a la 8, mientras que la segunda está constituida por proteínas más pequeñas, ácidas y numeradas de la 9 a 19. Los dos grupos se comportan como heteropolímeros obligados, con excepción de la Citoqueratina 19 (Crewther *et al.* 1983, Steinert y Roop 1988). Se ha establecido que las citoqueratinas de bajo peso molecular (40 kDa) se encuentran en los epitelios simples y glandulares, las de peso molecular intermedio en epitelios estratificados y las de alto peso molecular (~67 kDa) en epitelios queratinizados (Sawaf *et al.* 1991). Las células epiteliales experimentan cambios morfológicos y composicionales a medida que migran desde la capa basal hacia la superficie y aunque, se han encontrado algunas queratinas en tejidos no epiteliales como los órganos linfoides, éstas todavía siguen siendo los mejores marcadores de la diferenciación epitelial (Montenegro *et al.* 1998). Dependiendo del momento del desarrollo hay predominancia de unas citoqueratinas sobre otras; además no son completamente específicos de un tipo celular, pueden coexistir en un mismo sitio, los filamentos de Citoqueratina y los de Vimentina (Martínez y Martínez, 2010).

## **Vimentina**

La Vimentina es una proteína compuesta por 464 aminoácidos con una movilidad relativa ( $M_r$ ) de 58 kDa, el gen que la codifica se encuentra en el cromosoma 10p12. Forma los filamentos intermedios de Vimentina que tienen 10 nm de diámetro. Se encuentra en células mesenquimales, así como en algunas epiteliales, (células de Schwann o células de la glía, astrocitos, células de Sertoli, células vasculares de musculo liso).

La Vimentina se caracteriza por una expresión transitoria en algunas células precursoras durante el desarrollo. Se expresa en precursores neurales y células mesenquimales antes de la acumulación de los filamentos específicos de tejidos. En pocos casos la coexpresión de dos tipos de filamentos intermedios se mantiene (algunas células de la glía, células de musculo liso vascular y la capa plexiforme de la retina). En la mayoría de los casos filamentos específicos de tejido progresivamente reemplazan la Vimentina, permitiendo así la coexistencia de proteínas de diferentes filamentos intermedios (Duprey y Paulin 1995).

### **STRO-1**

Son moléculas expresadas en la superficie celular, consideradas marcadores de células troncales mesenquimales tempranos, que también están presentes en las células troncales estromales de la médula ósea (BMSSCs) y las células troncales de la pulpa dental (DPSCs) (Seo *et al.* 2004). STRO-1 es un antígeno de superficie celular de la familia de las inmunoglobulinas clase M, que se comenzó a utilizar como marcador de células troncales en médula ósea debido a su expresión en todas las unidades formadoras de colonias, y su ausencia en los progenitores hematopoyéticos, monocitos y linfocitos (Simmons y Torok, 1991). Está presente en precursores de varios tipos celulares estromales, incluyendo fibroblastos de médula ósea, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, y células de músculo liso (Simmons y Torok 1991). Se ha empleado STRO-1 como marcador de poblaciones de precursores osteoblásticos donde la expresión se pierde progresivamente con la diferenciación hacia osteoblastos maduros *in vitro* (Gronthos *et al.* 1999). STRO-1 se ha localizado en las paredes externas de los vasos sanguíneos de médula ósea y pulpa dental así como vasos sanguíneos grandes, pero no en capilares y diferentes tejidos adultos (Bianco *et al.* 2001). STRO-1 parece ser un marcador temprano de diferentes poblaciones de células troncales mesenquimales e infiere un posible nicho perivascular para esas poblaciones de células troncales *in situ* (Shi y Gronthos, 2003).

## **CD146**

CD146 también conocido como MUC-18/Mel-CAM es una glicoproteína de membrana que funciona como molécula de adhesión celular involucrada en interacciones célula-célula, es codificada por un gen en el brazo largo del cromosoma 11 en el humano, la secuencia genómica tiene gran homología con moléculas de adhesión celular de la superfamilia de las inmunoglobulinas. La expresión de CD146 ha demostrado un espectro relativamente limitado en tejidos normales y algunas neoplasias malignas. Está presente en el músculo liso, endotelio, miofibroblastos y células de Schwann *in situ* se expresa predominantemente en paredes de vasos sanguíneos en la médula ósea humana (Shih 1999). Se han caracterizado células progenitoras derivadas del nicho perivascular en los microambientes de la médula ósea y la pulpa dental (Gronthos *et al* 2000, Gronthos *et al*, 2002, Shi y Gronthos 2003,). Seo *et al.* demostró que las células troncales del ligamento periodontal son similares a otras células troncales mesenquimales en la expresión de STRO-1+/CD146+, demostrando que estos marcadores se pueden utilizar para aislar células troncales del ligamento periodontal, a su vez infiere que las células troncales del ligamento periodontal derivan de una población de células perivasculares (Gould *et al.* 1977, McCulloch 1985).

## **Planteamiento del problema**

La cavidad oral tiene un rol fundamental en el equilibrio general del estado de salud y bienestar de cada individuo. La enfermedad periodontal es una de las patologías con mayor incidencia a nivel mundial, ya que se estima que más del 80% de la población cuenta con algún grado de periodontitis, además en su etapa crónica se le ha relacionado con enfermedades sistémicas. Las terapéuticas periodontales actuales detienen el progreso de la enfermedad retirando el agente causal, sin embargo en la regeneración de los tejidos periodontales perdidos se han obtenido resultados limitados e impredecibles. Por lo cual, la identificación y localización de los elementos biomoleculares que participan en la regulación de la formación y desarrollo del periodonto aportarán información esencial para la implementación de una técnica de regeneración periodontal con pronóstico predecible.

## **Justificación**

La identificación de proteínas del esmalte, del cemento radicular, citoqueratinas, vimentina y marcadores de células troncales en el periodonto, ayudarán a determinar el posible origen celular de los tejidos que lo conforman.

## **Hipótesis**

En la población celular heterogénea del ligamento periodontal existen subpoblaciones que expresan y coexpresan marcadores del esmalte, cemento radicular, queratinas, y de células troncales *in vitro* e *in vivo*.

## **Objetivo general**

Determinar la expresión de marcadores moleculares del esmalte, cemento, células troncales y queratinas en el ligamento periodontal *in vivo* e *in vitro*.

## **Objetivos específicos**

Determinar la expresión espacial de amelogenina, ameloblastina, CEMP-1, CAP, STRO-1, CD-146 y queratinas en el periodonto humano *in vitro* en líneas celulares derivadas de encía, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar.

Determinar la expresión y coexpresión espacial de amelogenina, ameloblastina, CEMP-1, CAP, STRO-1, CD-146 y queratinas en el periodonto humano *in vivo* en cortes histológicos.

## **Material y métodos**

### **Cultivo celular**

Los fibroblastos derivados de la encía, fibroblastos derivados del ligamento periodontal humano (PLC), cementoblastos, y osteoblastos que se han aislado y expandido, se usaron en los experimentos (Álvarez et al 2006). Las células se mantuvieron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibiótico (penicilina 100 U/ml.) en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, 95% aire, humedad al 100% y temperatura a 37°C. Se utilizaron células del primer pase para los experimentos.

### **Inmunohistoquímica**

Se utilizaron cortes histológicos de especímenes humanos conteniendo las estructuras periodontales que fueron donados por el Departamento de Patología Bucal del DEPEI de la Facultad de Odontología de la UNAM. Los cortes fueron fijados en formalina al 10% durante 24 h a 4°C y se descalcificaron en EDTA al 10% a 4°C durante 12 semanas, posteriormente se deshidrataron, clarificaron en xileno y embebieron en parafina y se realizaron cortes de 5 µm de grosor y se tiñeron con la tinción Tricrómica de Masson para el análisis histomorfológico. Las laminillas se desparafinaron en xilol y se rehidrataron en concentraciones ascendentes de alcohol etílico y se lavaron con PBS por 5 min. Posteriormente fueron incubadas con los anticuerpos primarios (anti-AMEL, anti-AMBN, anti-CEMP1, anti-CAP, anti-STRO-1, anti-CD146, anti-VIM, y anti-PanKeratin) a una dilución de 1:100 en PBS+ 2 mg/ml de BSA. Se incubaron toda la noche a 4°C, posteriormente se lavaron las laminillas en PBS+Tween20 al 0.01% por 5 min y posteriormente con PBS 2 veces 5 min cada una. Posteriormente, se incubó el anticuerpo secundario acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) a una dilución de 1:15 o Alexa Rojo a una dilución de 1:200, durante 2 h a 4°C, para posteriormente lavar las laminillas con PBS+Tween20 al 0.01% por 5 min y después en PBS 2 veces de 5 min cada una. Las laminillas se montaron y observaron en un microscopio de Inmunofluorescencia indirecta Axiophot II (Zeiss, Alemania).

### **Western blots**

Para los western blots se procesaron cultivos a los 14 días, las células fueron lisadas en amortiguador de lisis (1 mM EDTA, pH 8.0, 10 mM Hepes, 50 mM NaCl, 0.5% Tritón X-100, 1 mM fenil metil sulfonil fluoruro, 5  $\mu$ M leupeptina y 10  $\mu$ g/ml aprotinina). Se determinó la concentración de proteína de acuerdo al método de Bradford, utilizando BSA como estándar y se cargaron cantidades iguales de proteína (10  $\mu$ g/pozo) y fueron corridas en una SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio al 12%). Las proteínas se transfirieron a membranas PVDF (fluoruro de polivinilideno), y fueron bloqueadas con 5% de leche descremada durante una hora, posteriormente se les realizaron 3 lavados con la solución de lavado (amortiguador de fosfoproteínas mas 0.15% de Tween20) de 15 min cada uno, para luego ser incubadas con los anticuerpos primarios (anti-AMEL, anti-AMBN, anti-CEMP1, anti-CAP, anti-STRO-1, anti-CD146, anti-VIM, anti-PanKeratin, y anti-GAPDH) a una concentración de 1:1000 en amortiguador de fosfoproteínas toda la noche a 4°C, después se lavaron 3 veces por 15 min con solución de lavado y se incubaron con el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa a una concentración de 1:2000 por dos horas, se lavaron con solución de lavado y revelaron con la solución de revelado (DAB tetrahidrocloreuro de 3,3'-diaminobenzidina, NiCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PBS).

### **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos de la expresión relativa de Amelogenina, Ameloblastina, CEMP1, CAP, STRO-1, CD146, Citoqueratina y Vimentina en los Western Blots fueron analizados por medio de la prueba de comparaciones múltiples Dunnett, con una  $p \leq$  de 0.01 utilizando el programa GraphPad InStat.

## **Resultados**

### **Inmunohistoquímica**

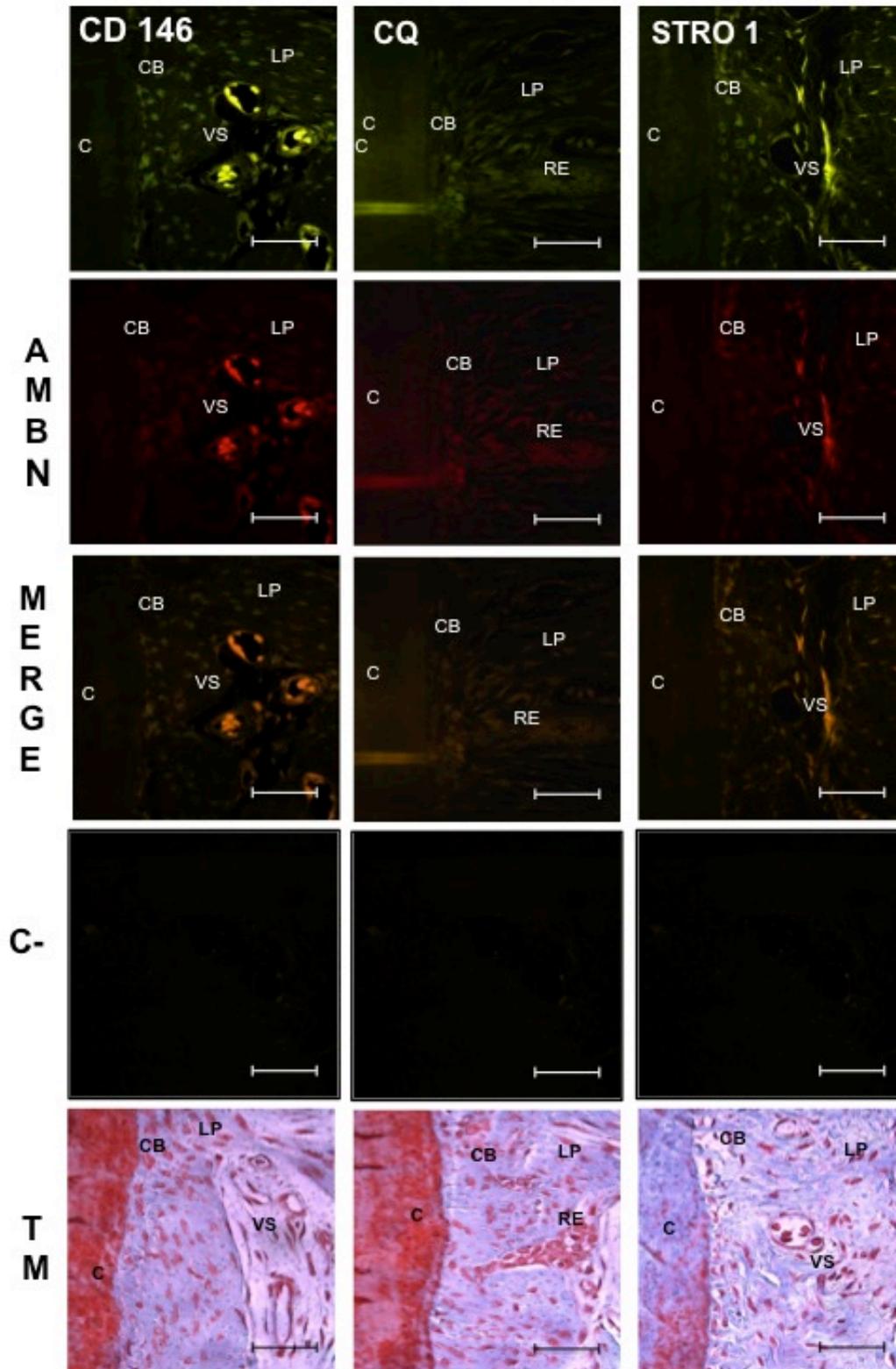
Se utilizó la técnica de inmunohistoquímica en tejidos periodontales a partir de cortes longitudinales de un molar humano para evaluar *in vivo* la expresión y/o coexpresión de los marcadores moleculares relacionados con el linaje cementoblastico, proteínas del esmalte, linaje mesenquimal o epitelial y marcadores de células troncales mesenquimales en tejidos periodontales humanos.

La expresión de Ameloblastina se encontró en subpoblaciones de cementoblastos, restos epiteliales y algunas células de la periferia de vasos sanguíneos y del ligamento periodontal (Fig. 2 B, G, L) por otro lado la expresión de CD146 se observó en subpoblaciones de cementoblastos y en células del ligamento periodontal en la periferia de vasos sanguíneos. Se localizaron subpoblaciones celulares de cementoblastos que coexpresaban AMBN y CD146 (Fig. 2 C).

La expresión de STRO1 se encontró en cementoblastos y células de la periferia de vasos sanguíneos (Fig. 2 K). Así mismo se encontraron subpoblaciones de cementoblastos que coexpresan STRO1 y AMBN así como otras que solo expresan STRO1 (Fig. 2 M).

La expresión de Citoqueratina se observó en subpoblaciones de cementoblastos y restos epiteliales, también se localizaron subpoblaciones que coexpresan ambos marcadores (Fig. 2 H).

Los controles incubando las laminillas en ausencia del anticuerpo primario fueron negativos (Fig. 2 D, I, N). Cortes teñidos con la tinción Tricrómica de Mazón muestran los aspectos anatómicos de las laminillas experimentales descritas arriba (Fig. 2 E, J, O).



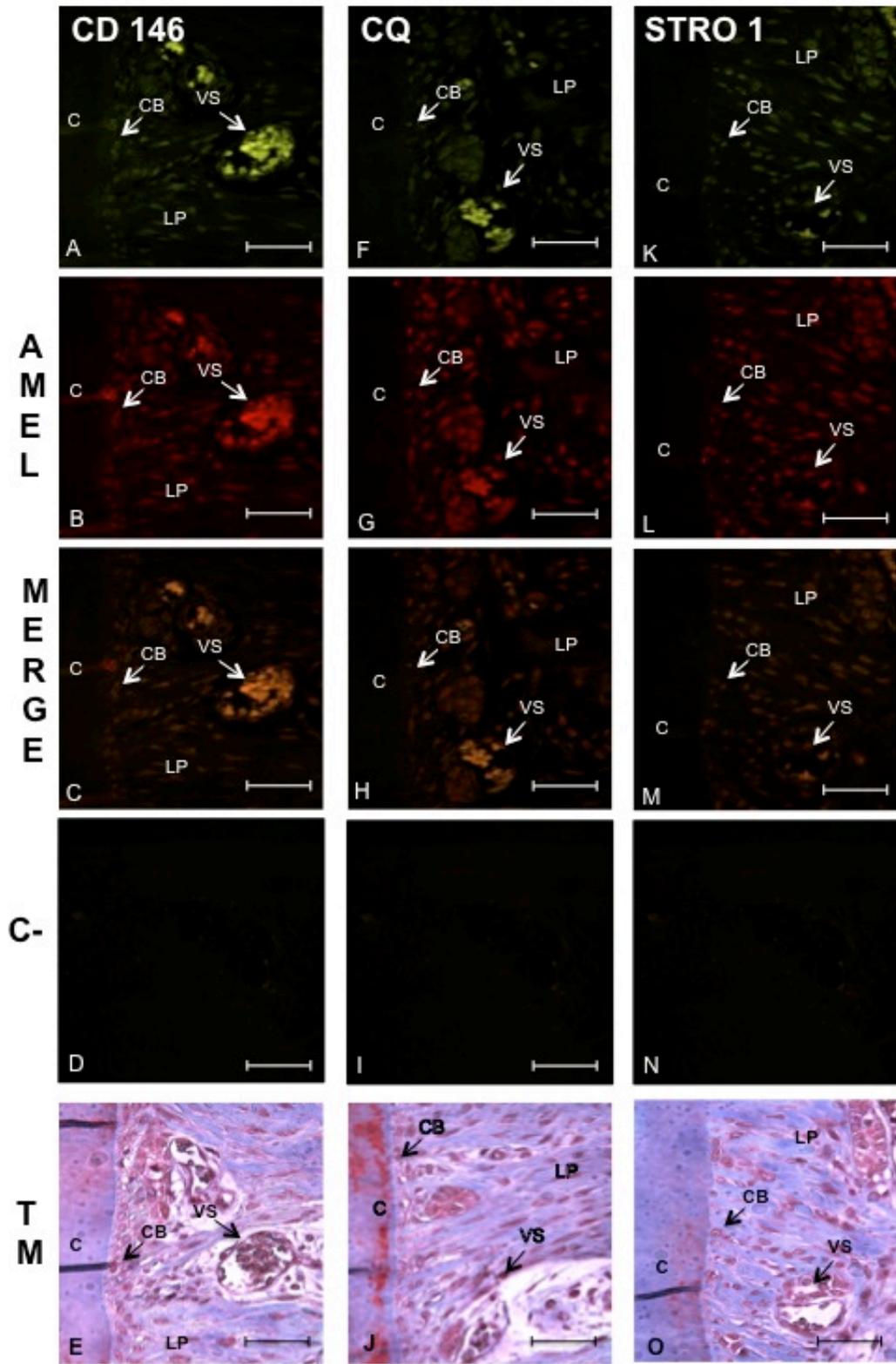
**Fig. 2** Microfotografías de cortes histológicos del periodonto humano incubados con los anticuerpos anti-AMBN, anti-CD146, anti-CQ, anti-STRO1, control negativo y tinción tricrómica de Masson.

La expresión de Amelogenina se encontró en subpoblaciones de cementoblastos y células del ligamento periodontal (Fig. 3 B, G, L). La expresión de CD146 se encontró en subpoblaciones de cementoblastos y células del ligamento periodontal en la periferia de vasos sanguíneos (Fig. 3 A). También se encontraron tanto subpoblaciones de cementoblastos y células del ligamento periodontal que coexpresan ambos marcadores, como algunas que solo expresan AMEL (Fig.3 C).

La expresión de Citoqueratina se localizó en subpoblaciones de cementoblastos y células del ligamento periodontal (Fig. 3 F). Se encontraron subpoblaciones de cementoblastos y células del ligamento periodontal que coexpresaban CQ y AMEL (Fig. 3 H).

Se encontró que subpoblaciones de cementoblastos y células del ligamento periodontal que expresan STRO1 (Fig. 3 K). Se encontraron algunas subpoblaciones que coexpresaban STRO1 y AMEL (Fig. 3 M).

Los controles incubando las laminillas en ausencia del anticuerpo primario fueron negativos (Fig. 3 D, I, N). Cortes teñidos con la tinción Tricrómica de Masson muestran los aspectos anatómicos de las laminillas experimentales descritas arriba (Fig. 3 E, J, O).



**Fig. 3** Microfotografías de cortes histológicos del periodonto humano incubados con los anticuerpos anti-AMEL, anti-CD146, anti-CQ, anti-STRO1, control negativo y tinción Tricrómica de Masson.

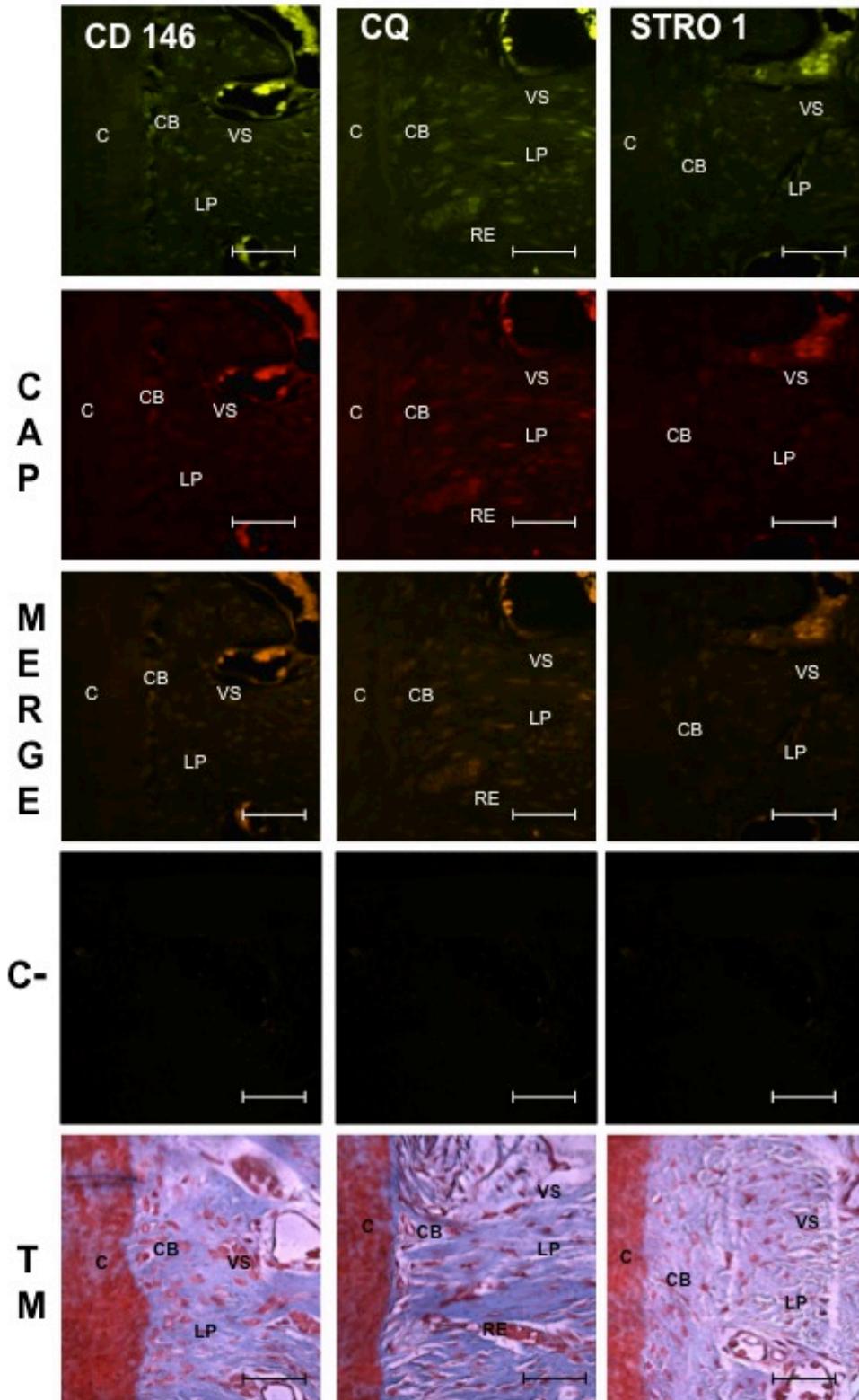
La expresión de la proteína de adhesión del cemento (CAP) se localizó en subpoblaciones de cementoblastos, células del ligamento periodontal principalmente en la periferia de vasos sanguíneos y restos epiteliales (Fig. 4 B, G, L)

CD 146 se expresó en subpoblaciones de cementoblastos y células del ligamento periodontal adyacentes al cemento y vasos sanguíneos respectivamente (Fig. 4 A), se encontraron subpoblaciones de cementoblastos que coexpresan CAP y CD146 (Fig. 4 C).

Se observó expresión de citoqueratina en subpoblaciones celulares de cementoblastos y restos epiteliales (Fig. 4 F). La microfotografía de la Fig. 4 H muestra la coexpresión de CQ y CAP por parte de subpoblaciones de cementoblastos, células del ligamento periodontal y restos epiteliales.

Subpoblaciones de cementoblastos y células del ligamento periodontal en la periferia de vasos sanguíneos expresan STRO1 (Fig. 4 K), La coexpresión de STRO1 y CAP por parte de subpoblaciones de cementoblastos y células del ligamento periodontal se muestra en la Fig. 4 M.

Los controles incubando las laminillas en ausencia del anticuerpo primario fueron negativos (Fig. 4 D, I, N). Cortes teñidos con la tinción Tricrómica de Masson muestran los aspectos anatómicos de las laminillas experimentales descritas arriba (Fig. 4 E, J, O).



**Fig. 4** Microfotografías de cortes histológicos del periodonto humano incubados con los anticuerpos anti-CAP, anti-CD146, anti-CQ, anti-STRO1, control negativo y tinción tricrómica de Masson.

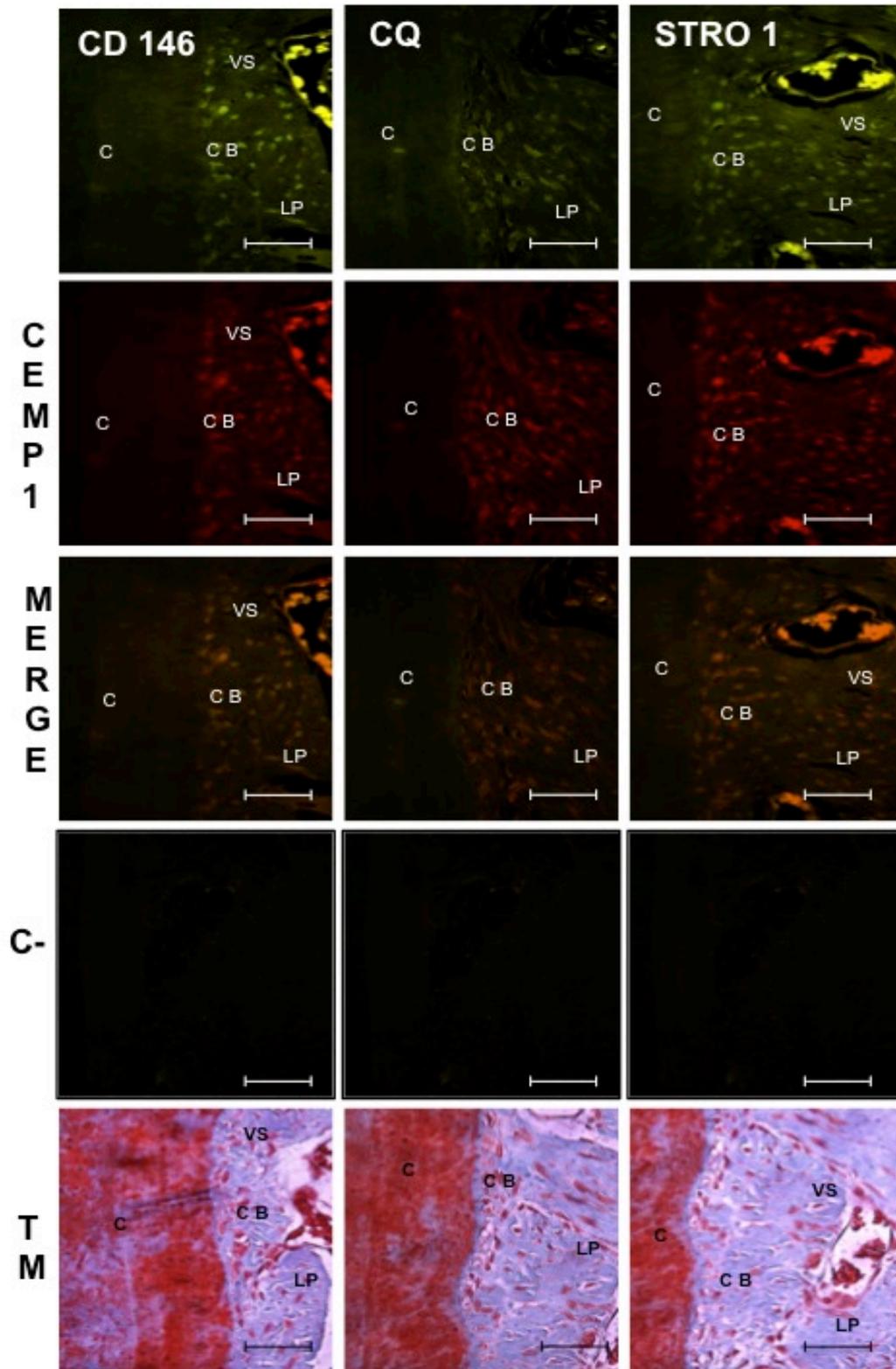
La expresión de la proteína del cemento 1 (CEMP1), en cortes histológicos del periodonto humano se encontró en subpoblaciones de cementoblastos, células en la periferia de vasos sanguíneos y algunas células del ligamento periodontal (Fig. 5 B, G, L).

La expresión de CD146 se observó en subpoblaciones de cementoblastos y algunas células de la periferia de vasos sanguíneos (Fig. 5 A). Se encontraron cementoblastos que coexpresan CEMP1 y CD146 (Fig. 5 C).

Se localizaron subpoblaciones de cementoblastos con expresión de CQ, así como células del ligamento periodontal (Fig. 5 F). La coexpresión de los marcadores CEMP1 y CQ por parte de subpoblaciones de cementoblastos y de células del ligamento periodontal se muestra en la Fig. 5 H.

La expresión del marcador molecular STRO1 se localizó en subpoblaciones de cementoblastos y células del ligamento periodontal principalmente en la periferia de vasos sanguíneos (Fig. 5 K). Además se encontraron subpoblaciones de cementoblastos y células del ligamento periodontal que coexpresan CEMP1 y STRO1 principalmente en la periferia de vasos sanguíneos (Fig. 5 M).

Los controles incubando las laminillas en ausencia del anticuerpo primario fueron negativos (Fig. 5 D, I, N). Los cortes teñidos con la tinción Tricrómica de Masson muestran los aspectos anatómicos de las laminillas experimentales descritas arriba (Fig. 5 E, J, O).



**Fig. 5** Microfotografías de cortes histológicos del periodonto humano incubados con los anticuerpos anti-CEMP1, anti-CD146, anti-CQ, anti-STRO1, control negativo y tinción tricrómica de Masson.

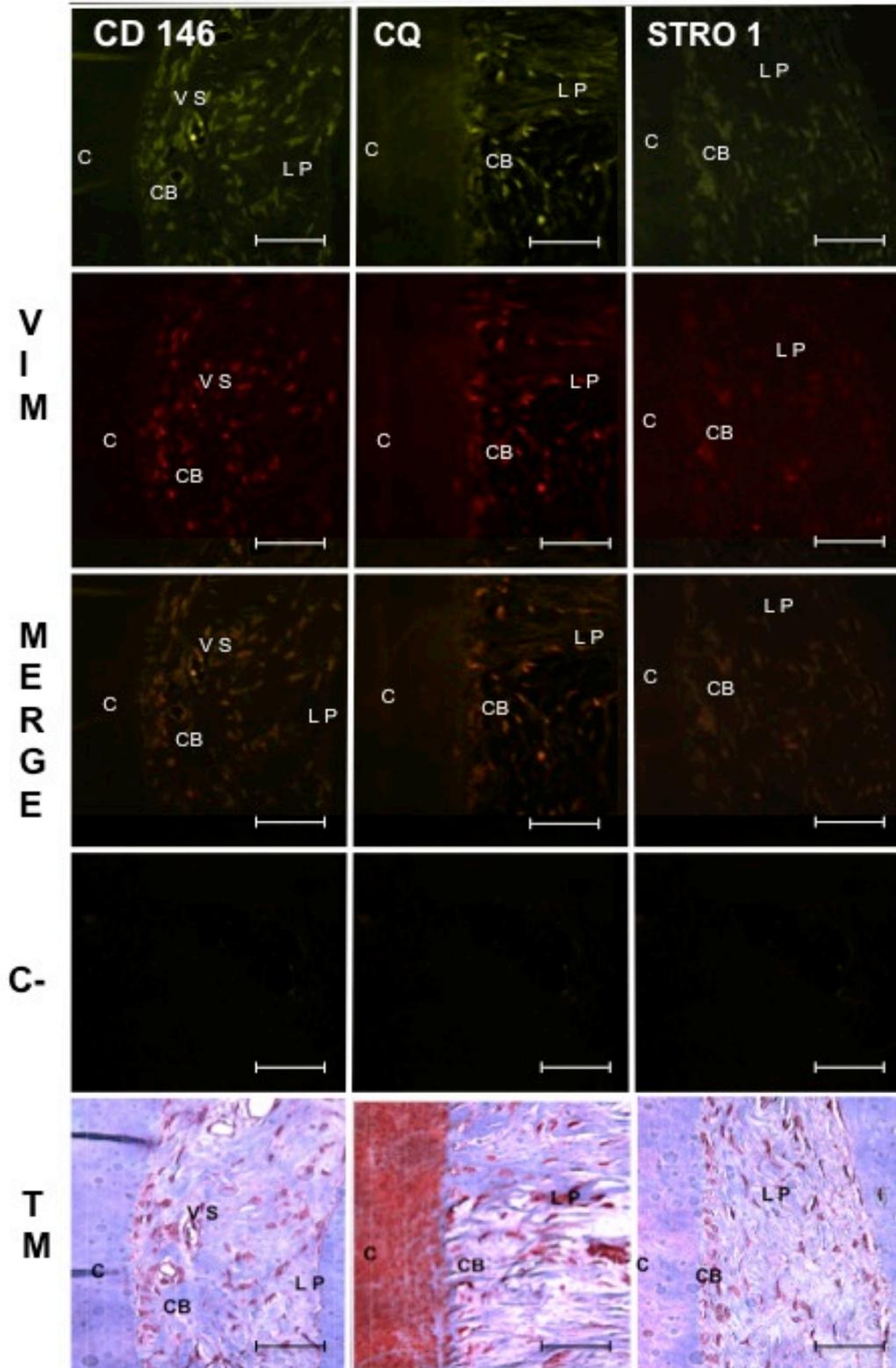
Se busco la expresión de vimentina en cortes histológicos del periodonto humano y se encontró en subpoblaciones de cementoblastos y células del ligamento periodontal (Fig. 6 B, G, L).

Se encontraron subpoblaciones de cementoblastos y células del ligamento periodontal que expresan CD146 (Fig. 6 A). Y subpoblaciones de cementoblastos y de células del ligamento periodontal con una coexpresión de CD146 y VIM (Fig. 6 C).

La expresión de citoqueratina se encontró en subpoblaciones de cementoblastos (Fig. 6 F), aunado a esto en la Fig. 6 H se muestran subpoblaciones de cementoblastos y de células del ligamento periodontal que coexpresan CQ y VIM.

Se encontraron subpoblaciones de cementoblastos y algunas células del ligamento periodontal que expresan STRO1 (Fig. 6 K), así como la coexpresión de STRO1 y VIM por parte de subpoblaciones de cementoblastos y células del ligamento periodontal (Fig. 6 M).

Los controles incubando las laminillas en ausencia del anticuerpo primario fueron negativos (Fig. 6 D, I, N). Los cortes teñidos con la tinción Tricrómica de Masson muestran los aspectos anatómicos de las laminillas experimentales descritas arriba (Fig. 6 E, J, O).

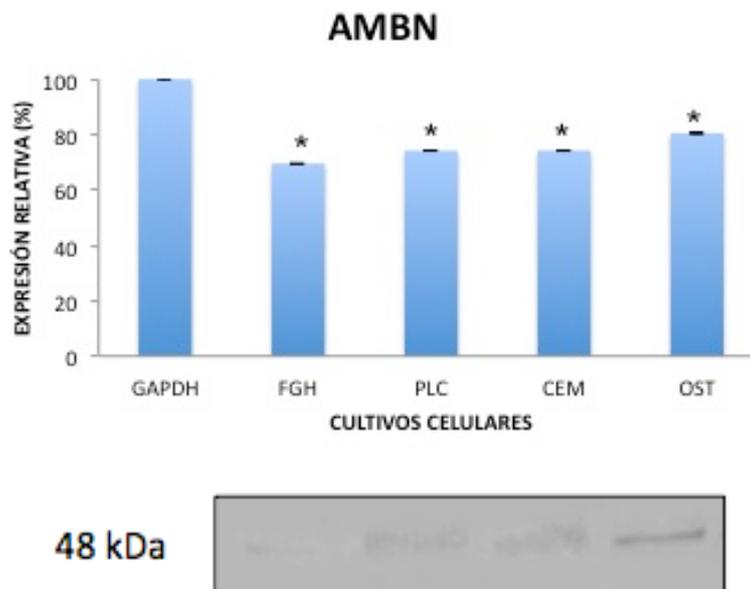


**Fig. 6** Microfotografías de cortes histológicos del periodonto humano incubados con los anticuerpos anti-VIM, anti-CD146, anti-CQ, anti-STRO1, control negativo y tinción tricrómica de Masson.

## Western blot

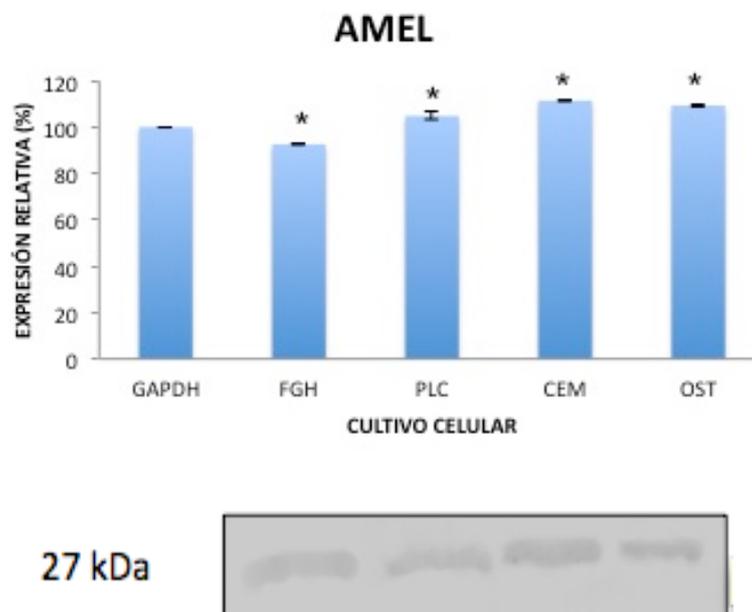
Se utilizó la técnica de western blot para evaluar *in vitro* la expresión de los marcadores moleculares relacionados con el linaje cementoblastico, proteínas del esmalte, linaje mesenquimal o epitelial y marcadores de células troncales mesenquimales en cultivos celulares de fibroblastos gingivales humanos (FGH), células del ligamento periodontal (PLC), Cementoblastos (CEM), y Osteoblastos (OST).

Se determinó la expresión de Ameloblastina por medio de Western blot (Fig. 7), en cultivos celulares de fibroblastos gingivales (FGH), células del ligamento periodontal (PLC), cementoblastos (CEM), y osteoblastos (OST). Los niveles relativos para la proteína se determinaron midiendo la intensidad de los píxeles en cada banda, excluyendo el fondo local. El porcentaje de expresión relativa se compara con la de Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), se realizó el mismo procedimiento para todos los Western blot. Las líneas celulares que mostraron una mayor expresión fueron osteoblastos (80.47%) y cementoblastos (74.22%). Sin embargo la expresión de ameloblastina en las cuatro líneas celulares fue menor a la de GAPDH.



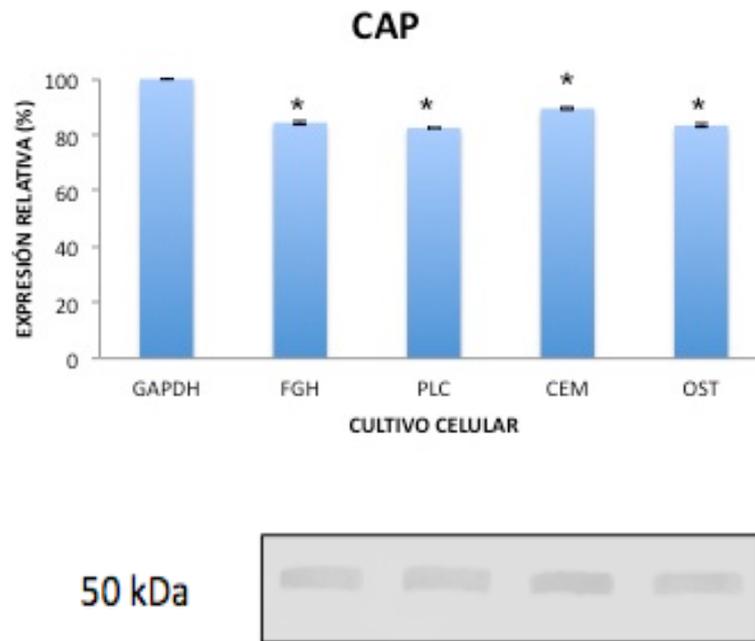
**Fig. 7.-** Arriba, grafica de densidad relativa de las bandas (las diferencias significativas son mostradas con un asterisco). Abajo, detección de Ameloblastina por medio de Western blot.

Se determinó la expresión relativa de Amelogenina en cultivos celulares de FGH, PLC, CEM y OST por medio de Western blot (Fig. 8). Los cementoblastos y los osteoblastos fueron las líneas celulares que mostraron una mayor expresión. Las células del ligamento periodontal (104.8 %), cementoblastos (111.4 %) y osteoblastos (109.3 %) tuvieron una expresión de amelogenina mayor a la expresión de GAPDH. En general los cuatro cultivos celulares tuvieron una mayor expresión de amelogenina que de ameloblastina, resultado que concuerda con lo observado en las inmunohistoquímicas de tejidos periodontales *in vivo*.



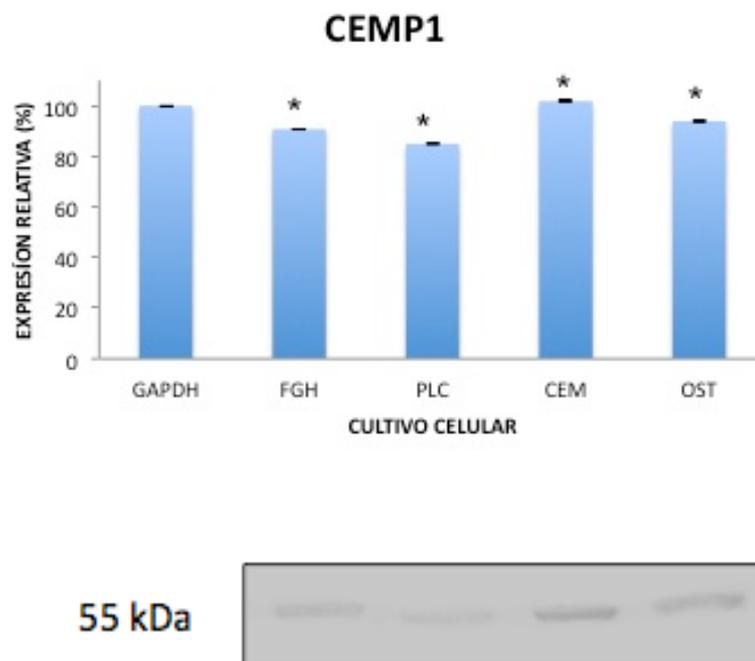
**Fig. 8.-** Arriba, grafica de densidad relativa de las bandas (las diferencias significativa son mostradas con un asterisco). Abajo, detección de Amelogenina por medio de Western blot.

Se determinó la expresión relativa de la proteína de adhesión del cemento (CAP) en los cultivos celulares por medio de Western blot (Fig. 9). El cultivo celular de cementoblastos fue el que mostró una mayor expresión de los linajes evaluados (89.4%), sin embargo la expresión relativa de CAP en los cuatro linajes (FGH 84.36%, PLC 82.49%, OST 83.34%) fue menor a la expresión de GAPDH



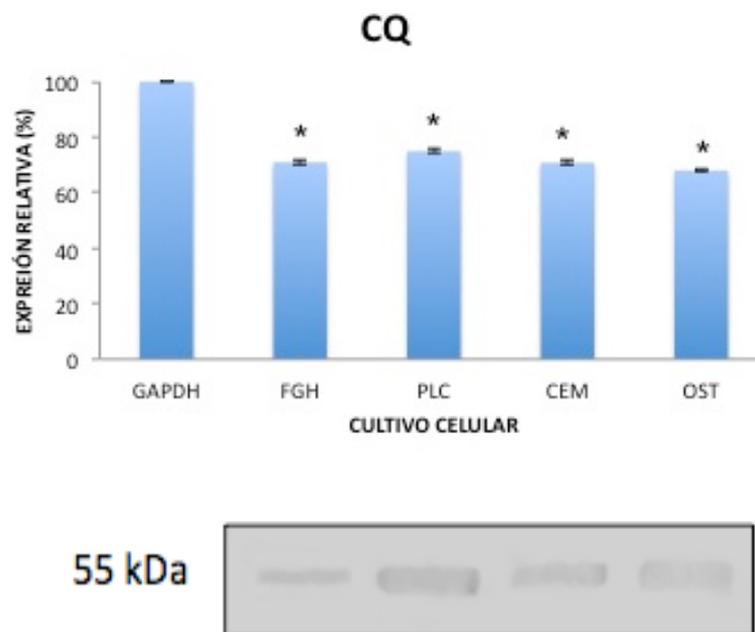
**Fig. 9** Arriba, grafica de densidad relativa de las bandas (las diferencias significativa son mostradas con un asterisco). Abajo, detección de CAP por medio de Western blot.

Para determinar la expresión relativa de la proteína del cemento 1 (CEMP1) en los cuatro cultivos celulares se empleó la técnica de Western blot (Fig. 10). El cultivo celular de cementoblastos fue el que mostró una mayor expresión, (101.8%) de los linajes evaluados, por encima del nivel de expresión de GAPDH. Los cultivos celulares de FGH, PLC y OST mostraron un nivel de expresión por debajo del de GAPDH con 90.75%, 84.97% y 93.87% respectivamente.



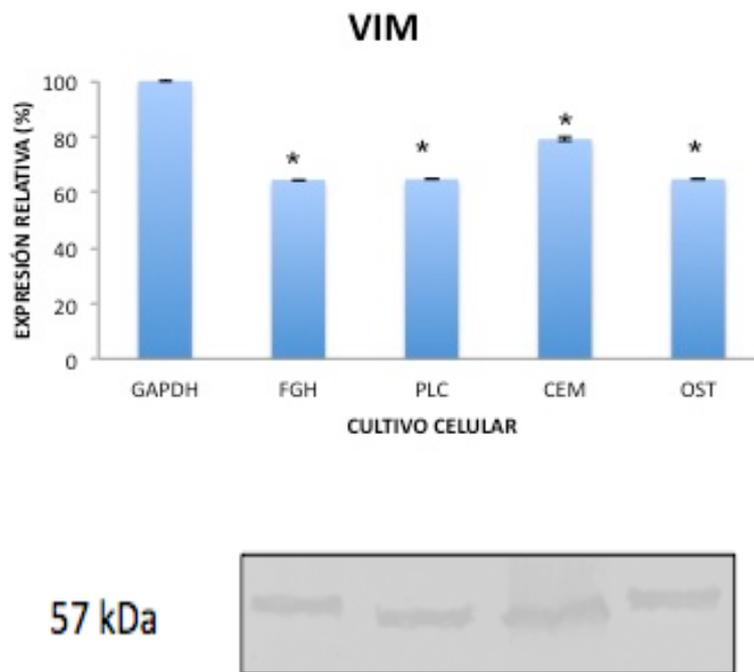
**Fig. 10.-** Arriba, grafica de densidad relativa de las bandas (las diferencias significativa son mostradas con un asterisco). Abajo, detección de CEMP1 por medio de Western blot.

Se determinó la expresión relativa de Citoqueratina en los cultivos celulares por medio de Western blot (Fig. 11). El cultivo celular de células del ligamento periodontal (74.93 %), seguido de cementoblastos (70.82 %), fueron los que mostraron mayor expresión de los linajes evaluados. La expresión de citoqueratinas en los cuatro linajes celulares fue menor a la expresión de GAPDH.



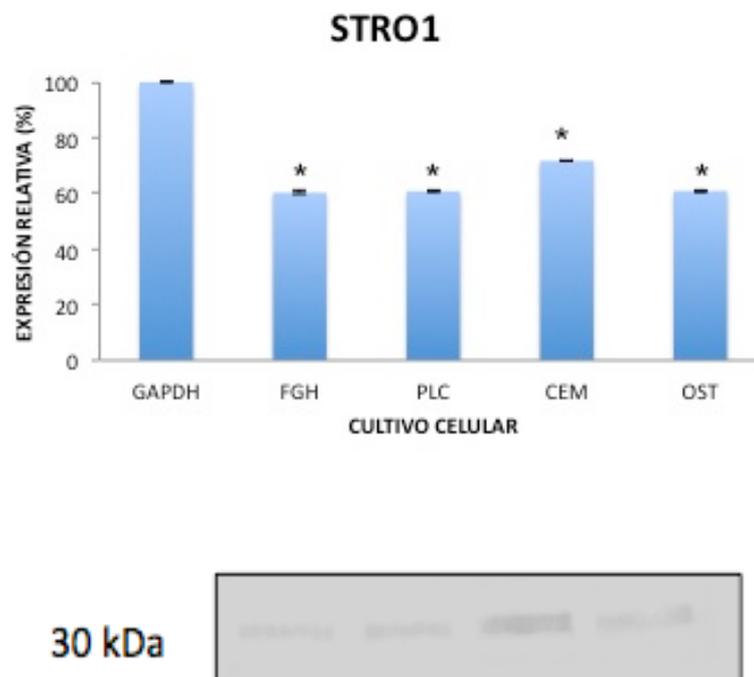
**Fig. 11.-** Arriba, grafica de densidad relativa de las bandas (las diferencias significativa son mostradas con un asterisco). Abajo, detección de Citoqueratina por medio de Western blot.

Se determinó la expresión relativa de Vimentina en los cultivos celulares por medio de Western blot (Fig. 12). El cultivo celular de cementoblastos fue el que mostró una mayor expresión de los linajes evaluados (79.08 %), sin embargo no alcanzó la expresión relativa de GAPDH. En los cuatro linajes celulares la expresión relativa de vimentina fue menor a la expresión de GAPDH (FGH 64.38%, PLC 64.66%, OST 64.64 %).



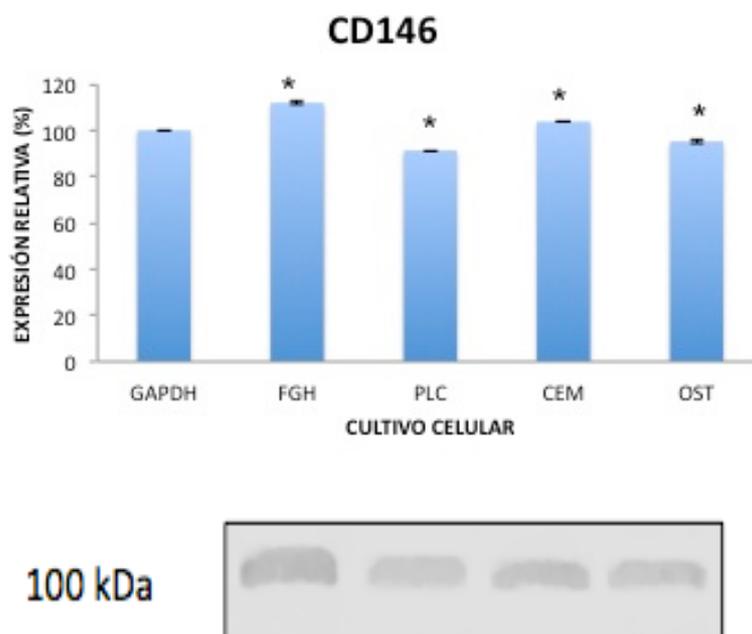
**Fig. 12.-** Arriba, grafica de densidad relativa de las bandas (las diferencias significativas son mostradas con un asterisco). Abajo, detección de Vimentina por medio de Western blot.

Para determinar la expresión relativa de STRO1 en los cuatro cultivos celulares se empleo la técnica de Western blot (Fig. 11). El cultivo celular de cementoblastos (71.73 %) fue el que mostró una mayor expresión de STRO1 en los linajes evaluados. Sin embargo la expresión relativa de STRO1 en los cuatro linajes (FGH 60.29%, PLC 60.77 % y OST 60.90 %) fue menor a la expresión de GAPDH.



**Fig. 13.-** Arriba, grafica de densidad relativa de las bandas (las diferencias significativa son mostradas con un asterisco). Abajo, detección de STRO1 por medio de Western blot.

Se determinó la expresión relativa del marcador molecular (CD146) en los cultivos celulares por medio de Western blot (Fig. 9). Los cultivos celulares de fibroblastos gingivales (111.89 %) y cementoblastos (103.78 %) mostraron una expresión de CD146 superior a la de GAPDH. El nivel de expresión de células del ligamento periodontal (91.29 %) y osteoblastos (95.21 %) fue inferior al del control GAPDH.



**Fig. 14.-** Arriba, grafica de densidad relativa de las bandas (las diferencias significativa son mostradas con un asterisco). Abajo, detección de CD146 por medio de Western blot.

## Discusión

La meta principal de la terapia periodontal es la restauración de los tejidos dañados o perdidos debido a la enfermedad periodontal o traumas hasta su forma y función original. La regeneración periodontal es uno de los procesos más complejos que ocurren en el cuerpo humano. Se requiere la colaboración e interacción de varios tipos celulares, incluyendo fibroblastos gingivales, fibroblastos del ligamento periodontal, cementoblastos, osteoblastos, células endoteliales, macrófagos y posiblemente los restos epiteliales de Malassez (Rincon *et al*, 2006) para restablecer el aparato de inserción mediante la formación de nuevo cemento, nuevo hueso alveolar y el anclaje de nuevas fibras de tejido conectivo. Se añade más complejidad a este proceso debido a que debe ocurrir en un sistema abierto, permanentemente contaminado y sujeto a una carga bacteriana significativa, así como a las fuerzas oclusales que recibe el diente en planos axiales y transversales, lo cual afecta la estabilidad de la reparación del daño (Nymphaea *et al*. 2011). Una variedad de terapias regenerativas, como injertos óseos, tratamientos de regeneración tisular guiada y la aplicación de derivados de la matriz del esmalte entre otras han sido utilizadas sin lograr resultados predecibles que demuestren una regeneración periodontal verdadera. El incompleto entendimiento del desarrollo radicular y el poco conocimiento de los mecanismos de señalización y las moléculas involucradas en este proceso son unas de las principales limitantes para lograr una efectiva regeneración periodontal, debido a que es necesario replicar eventos celulares claves del desarrollo periodontal y entender los tipos celulares específicos, factores inductores y los procesos celulares involucrados en la formación del periodonto y en su funcionamiento en estado adulto. (Lin *et al*. 2009). Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron Amelogenina y Ameloblastina, dos proteínas del esmalte las cuales se ha postulado que podrían desempeñar papeles importantes en la homeostasis y desarrollo del periodonto, la proteína de adhesión del cemento (CAP) y la proteína del cemento 1 (CEMP1), las cuales hasta la fecha son los únicos marcadores cemento específicos. STRO1 y CD146, son los marcadores moleculares utilizados para detectar y aislar células troncales mesenquimales en el ligamento periodontal humano (Seo *et al*. 2004, Ivanovski *et al* 2006, Lin *et al* 2008, Fujii *et al* 2008), así como también Vimentina es un marcador de células de origen mesenquimal y Citoqueratina de células de origen epitelial. Estos marcadores moleculares se utilizaron in vivo en estudios de

inmunofluorescencia para determinar su expresión espacial y mediante la técnica de doble marcaje se evaluó la coexpresión de los marcadores. Además por medio de ensayos de western blot se evaluó la expresión *in vitro* en cultivos celulares de fibroblastos gingivales humanos, células del ligamento periodontal, cementoblastos y osteoblastos.

Las proteínas del esmalte analizadas en este trabajo se seleccionaron debido a que en estudios previos se ha reportado que estas proteínas inducen diferenciación y mineralización en una variedad de células mesenquimales que incluyen odontoblastos, osteoblastos y cementoblastos lo que se ha revisado en trabajos como el de Kunimatsu et al (2011) que postula que productos de origen epitelial pueden regular la actividad de células de origen mesenquimal. También se ha reportado que inducen la expresión de moléculas como la sialoproteína ósea (BSP) considerada marcador específico de tejidos mineralizados y crítica para promover la biomineralización, además se ha observado que se expresan durante el depósito de cemento radicular, (Viswanathan *et al.* 2003). Durante nuestro estudio en las microfotografías obtenidas a partir de las inmunofluorescencias de los cortes histológicos de las estructuras periodontales encontramos expresión de amelogenina y ameloblastina en células que por su localización adyacente al cemento radicular y sus características histológicas podemos considerar como cementoblastos. Diversas células del ligamento periodontal y células en la periferia de vasos sanguíneos mostraron expresión de ambas proteínas del esmalte, principalmente en el tercio cervical del ligamento periodontal. Cabe destacar que tanto en la intensidad de la expresión *in vivo* en los tejidos periodontales como en la expresión *in vitro* en los cultivos celulares fue constante una mayor expresión de Amelogenina en comparación a la Ameloblastina, lo que posiblemente se deba a una participación mayor o en más procesos que la Amelogenina. Al momento de comparar la coexpresión de AMEL y AMBN con CD146 y STRO1 encontramos subpoblaciones celulares que coexpresan los marcadores de células troncales mesenquimales y las proteínas del esmalte tanto en células del ligamento periodontal en la periferia de vasos sanguíneos como cementoblastos, lo que nos permite sugerir que se expresan células troncales putativas del ligamento periodontal y/o tienen un papel en la diferenciación hacia cementoblastos como ha sido sugerido por autores como Hammarström *et al* 1996

y 1997b, Tokiyasu *et al* 2000, Viswanathan *et al.* 2003, Gruenbaum-Cohen *et al* 2009. La expresión de ambas proteínas del esmalte en los western blots se encontró en los cuatro linajes celulares utilizados, a diferencia de los resultados obtenidos de las muestras de tejido *in vivo* donde solo se encontraron en cementoblastos y células del ligamento periodontal. Recientemente se ha comprobado que las proteínas del esmalte no solo participan en la mineralización del esmalte, sino que además modulan procesos como la proliferación, diferenciación, adhesión y migración celular (Hakki *et al*, 2001, Mizuno *et al*, 2004, Li *et al*, 2010). Una posible explicación para esto es que, debido a que los linajes celulares utilizados corresponden a los tejidos que conforman el periodonto, es probable que estas células tengan la capacidad de producir las proteínas del esmalte dado que están involucradas en los procesos de desarrollo y homeostasis del periodonto (Boabaid *et al* 2004, Swanson *et al* 2006, Barkana *et al* 2007) pero los diversos factores de crecimiento y moléculas reguladoras así como estímulos de señalizaciones paracrinas y endocrinas que reciben *in vivo* regulan su expresión, se sugiere que quizá la falta de estas señalizaciones *in vitro* da como resultado que se expresen en cultivo estas proteínas. Aunado a esto Chou y colaboradores han reportado que fibroblastos gingivales en cultivo expresan fosfatasa alcalina (ALP), Osteonectina (ON) y osteopontina (OPN), atribuyéndolo a que se ha demostrado que estas moléculas no solo tienen un papel en procesos de mineralización si no también están involucradas en la proliferación y migración de poblaciones celulares osteogénicas y cementogénicas, y que debido a la consistencia del periodonto en compartimientos abiertos, existe la posibilidad de que células troncales inmaduras migraran hacia el tejido conectivo gingival (Chou *et al.* 2002).

El análisis las inmunohistoquímicas con los anticuerpos de CEMP-1 y CAP mostró que estas se expresaron en cementoblastos y células del ligamento periodontal en la periferia de vasos sanguíneos. La evaluación de la coexpresión de los marcadores de células troncales mesenquimales establecidos por Seo y colaboradores (2004) y las proteínas cemento específicas es importante por el hecho de encontrar subpoblaciones celulares que coexpresan tanto los marcadores de células troncales como los marcadores cemento específicos ya que sugiere que podrían ser células troncales con la capacidad de diferenciarse hacia cementoblastos. Recientemente, un grupo de investigadores

utilizó STRO1 y CD146 para aislar células troncales del ligamento periodontal y posteriormente inmunofluorescencia con STRO-1 y CEMP-1 para evaluar la regeneración periodontal de su modelo experimental, localizando también por inmunofluorescencia subpoblaciones celulares que coexpresan STRO-1 y CEMP-1 (Park et al, 2011). Estudios previos han establecido la importancia del cemento radicular para lograr regeneración periodontal, es crucial la nueva formación de cemento y la re inserción de las fibras de Sharpey en la superficie radicular, además evidencias recientes indican que la formación de cemento es crítica para la maduración del periodonto tanto en el desarrollo, como en procesos de regeneración (Pitaru *et al* 1995, Saygin *et al* 2000). La utilización de STRO-1, CD146, CEMP-1 y CAP podría ser una estrategia prometedora con el fin de optimizar el aislamiento y selección de células troncales con capacidad de diferenciación a cementoblastos, para obtener mejores resultados en la regeneración periodontal.

Durante el análisis de nuestros resultados encontramos subpoblaciones celulares que coexpresan marcadores cemento específicos y marcadores de origen epitelial (Citoqueratina), además de subpoblaciones que coexpresan marcadores cemento específicos y marcadores relacionados a un origen mesenquimal (CD146 y STRO-1). El origen de los precursores de cementoblastos y los factores moleculares que regulan su diferenciación no son completamente entendidos. La teoría clásica propone que el folículo dental y quizás también el mesénquima perifolicular dan origen a fibroblastos del ligamento periodontal, osteoblastos y cementoblastos. Esta teoría está basada principalmente en estudios de marcaje con H3-timidina, la detección del marcaje en cementoblastos fue interpretado como evidencia de un origen del folículo dental propio, sin embargo como fue señalado por investigadores como Thomas y Kollar (1998) y Bosshardt y Selvig (1997), los cementoblastos marcados podrían originarse de la vaina epitelial de Hertwig (HERS) dado que estas células también incorporaron H3-timidina. Una alternativa es que células de la vaina epitelial de Hertwig realicen una transformación epitelio-mesénquima para diferenciarse a cementoblastos. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo en relación a la coexpresión de marcadores cementoblásticos y de linaje epitelial así como otras subpoblaciones celulares que coexpresan marcadores cementoblásticos y marcadores relacionados a un origen

mesenquimal, apoyan dos de las principales teorías acerca del posible origen de los cementoblastos; es posible la existencia de diferentes precursores para cementoblastos, unos provenientes de origen epitelial y otros de origen mesenquimal como han sugerido diversos autores (Webb *et al* 1996, Chai *et al* 2000, Lézot *et al* 2000, Bosshardt 2005, Zeichner, *et al.* 2003, Zeichner 2006). O que el origen de los precursores de cementoblastos sea a través de transición epitelio-mesenquimal y sean células en diferentes etapas de esta transición, lo cual también ha sido postulado por diversos autores (Thomas 1995, Bosshardt y Nanci 1996, Bosshardt y Selvig 1997, Bosshardt y Nanci 2004). Nuestros resultados sugieren que ciertas subpoblaciones celulares realizan la transición epitelio-mesénquima debido al hallazgo de células que coexpresan tanto Citoqueratina como Vimentina (marcadores moleculares para origen epitelial y mesenquimal respectivamente) *in vivo*. Aunado a esto, los cultivos celulares también expresaron ambos marcadores. Diversos estudios han reportado la coexpresión de Citoqueratina y Vimentina, en el epitelio del retículo estrellado del órgano del esmalte, en el ojo humano, en el plexo coroideo humano y en células mesenquimales como los condrocitos del cartílago de pescado, rata, en blastema en regeneración de extremidades de salamandras y células en desarrollo del miocardio (Webb *et al* 1996).

Se requieren estudios adicionales para poder determinar él o los orígenes de los precursores de los cementoblastos, un punto clave para poder lograr la formación de novo de cemento radicular y restablecer el aparato de inserción periodontal y así lograr una regeneración periodontal adecuada. Una de las principales limitantes en este sentido era la falta de marcadores cemento específicos, pero el uso de la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento (CAP) permitirían grandes avances en este tema.

## Conclusiones

- Se determinó la expresión y coexpresión de los marcadores moleculares utilizados *in vivo* en el ligamento periodontal humano, e *in vitro* en los linajes celulares que conforman el periodonto.
- El uso de CEMP1/CAP en combinación con los marcadores de células troncales STRO-1 y CD146, permiten la identificación de subpoblaciones de posibles células troncales con un destino de diferenciación hacia el fenotipo cementoblastico.
- La subpoblación celular STRO-1+, CD146+, CEMP1+ y/o CAP+ se propone como la indicada para la reactivación de la cementogénesis.
- El uso de inmunohistoquímica y los marcadores moleculares de células troncales en el ligamento periodontal nos permiten describir el nicho perivascular de estas subpoblaciones celulares, similar al de las células troncales mesenquimales en médula ósea.
- Los hallazgos de proteínas del esmalte en las muestras analizadas por inmunohistoquímica, así como su expresión por los linajes celulares del periodonto apoya el papel de estas moléculas en la homeostasis del periodonto y particularmente en el proceso de la cementogénesis.
- La expresión de Citoqueratina y Vimentina apoya la teoría de que al menos una subpoblación específica de cementoblastos realiza la transición epitelio mesenquimal, aunque a su vez también podría apoyar la teoría que habla de que cada tipo de cemento es producido por una población de cementoblastos independiente.

## Referencias bibliográficas

- Alvarez PMA, Pitaru S, Alvarez FO, Reyes GJ, Arzate H, Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line, *J Struc. Biol.* 2003; 143:1-13.
- Arzate H, Jiménez GLF, Álvarez PMA, Landa A, Bar KI, Pitaru S, Immunolocalization of a human cementoblastoma conditioned médium derived protein. *J Dent Res.* 2002; 81: 541-546.
- Arzate H, Olson WO, Page RC, Gown AM, Narayanan S, Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J.* 1992; 6: 2990-2995.
- Barkana I, Alexopoulou E, Ziv S, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Pitaru S, Vardimon AD, Nencovsky CE, Gene profile in periodontal ligament cells and clones with enamel matrix proteins derivative. *J Clin Periodontol.* 2007; 34: 599-609.
- Bartold PM, Narayanan AS, Molecular and cell biology of health and diseased periodontal tissues. *Periodontol 2000.* 2006; 40; 29-49.
- Bartold PM, Shi S, Gronthos S, Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontol 2000.* 2006; 40: 166-172.
- Bennett NT, Schultz GS, Growth factors and wound healing: biochemical properties of Growth factors and their receptors. *Am J Surg.* 1993; 165: 728-737.
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG, Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology and potential applications. *Stem Cells.* 2001; 19:180-192.
- Boabaid F, Gibson CW, Kuehl MA, Berry JE, Snead ML, Nociti FH, Katchburian E, Somerman MJ, Leucine-rich amelogenin peptide: a candidate signaling molecule during cementogenesis. *J Periodontol.* 2004; 75: 1126-1136.
- Bosshard DD, Selvig KA, Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000.* 1997; 13: 41-75.
- Bosshardt D, Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *J Dent Res.* 2005; 84: 390-406.
- Bosshardt DD, Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol.* 2008; 35: 87-105.
- Bosshardt DD, Nanci A, Immunolocalization of epithelial and mesenchymal matrix constituents in association with inner enamel epithelial cells. *J Histochem Cytochem.* 1998; 46: 135-142.
- Bosshardt DD, Nanci A, Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 184-192.
- Bosshardt DD, Schroeder HE, Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars. *Anat Rec.* 1996; 245: 267-292
- Bosshardt DD, Sculean A, Windisch P, Pjetursson BE, Lang NP, Effects of enamel matrix proteins on tissue formation along the roots of human teeth. *J Periodontol Res.* 2005; 40: 158-167.
- Bosshardt DD, Sculean Anton, Does periodontal tissue regeneration really work? *Periodontol 2000.* 2009; 51: 208-219.

- Bosshardt DD, Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol*. 2008; 35: 87-105.
- Cañabate FJ, Martínez PT, Osteoprotegrin and RANKL/RANK system: is it the future of bone metabolism? *An Med Interna*. 2002; 19: 385-388.
- Carranza FA, Neuman MG, Clinical periodontology 8<sup>th</sup> Edition. Section one. The normal periodontium. WB Saunders Company USA 1996.
- Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P, Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM, Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*. 2000; 127: 1671-1679.
- Cho MI, Garant PR, Development and general structure of the periodontium. *Periodontol 2000*. 2000; 24: 9-27.
- Chou AM, Lim VS, Lim TM, Schants JT, Teoh SH, Chew CL, Hutmacher DW, (2002) Culturing and characterization of human periodontal ligament fibroblasts a-preliminary study. *Materials Science and Engineering*. 2002; 20: 77-83.
- Coura GS, Garcez RC, de Aguilar CB, Alvarez SM, Magini RS, Trentin AG, Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. *J Periodontal Res*. 2008; 43: 531-536.
- Crewther WG, Dowling LM, Steinert PM, Parry DAD, Structure of intermediate filament. *Int. J. Biol. Macromol*. 1983; 5: 267-274.
- Dave S, Batista ELI, Van Dyke TE, Cardiovascular disease and periodontal diseases: commonality and causation. *Compend Contin Educ Dent*. 2004; 25: 26-37.
- Dereka XE, Markopoulou CE, Vrotsos IA, Role of growth factors on periodontal repair. *Growth Factors*. 2006; 24: 260-267.
- Diekwisch TGH, The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol*. 2001; 45: 695-706.
- Duprey P, Paulin D, What can be learned from intermediate filament gene regulation in the mouse embryo. *Int. J. Dev. Biol*. 1995; 39: 443-457.
- Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV, Enamel matrix derivative (emdogain) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005; 19: 1-34.
- Foster BL, Popowics TE, Fong HK, Somerman MJ, Advances in defining regulators of cementum development and periodontal regeneration. *Curr Top Dev Bio*. 2007; 78: 47-126.
- Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Saito M, Akamine A, Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor stem cell line in vitro and in vivo. *J. Cell Physiol*. 2008; 215: 743-749.
- Garcia RI, Henshaw MM, Krall EA, Relationship between periodontal disease and systemic health. *Periodontol 2000*. 2001; 25: 21-36.
- Gonçalves, Norciti F. Humberto, Dental cementum reviewed: development, structure, composition, regeneration and potential functions, *Braz J Oral Sci*. 2005; 4: 651-658.
- Gonzales SK, Braga BB, Zaffalon CM, Sallum EA, Nociti FH, Stem cells: potential therapeutics for periodontal regeneration. *Stem Cell Rev*. 2008; 4: 13-19.
- Gould TR, Melcher AH, Brunette DM, Location of progenitor cells in periodontal ligament of mouse molar stimulated by wounding. *Anat Rec*. 1977; 188: 133-41.

- 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; 74: 1374-81.
- Gronthos S, Brahim J, Li W, *et al*, Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002; 81: 531-535.
- Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S, Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci.* 2000; 97: 13625-13630.
- Gronthos S, Zannettino AC, Graves SE, Ohta S, Hay SJ, Simmons PJ, Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J Bone Miner Res.* 1999; 14: 47-56.
- Gruenbaum-Cohen Y, Tucker AS, Haze A, Shilo D, Taylor AL, Shay B, Sharpe PT, Mitsiadis TA, Ornoy A, Bluenfeld A, Deutsch D, Amelogenin in cranio-facial development: the tooth as a model to study the role of amelogenin during embryogenesis. *J. Exp. Zool.* 2009; 312: 445-457.
- Grzesik W, Narayanan A.S. Cementum and periodontal wound healing and regeneration *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13: 474-484.
- Hakki SS, Berry JE, Somerman MJ. The effect of enamel matrix protein derivative on follicle cells in vitro. *J. Periodontol.* 2001; 72: 679-687.
- Hammarström L, Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 669-677.
- Hammarström L, Heijl L, Gestrelus S, Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 669-677.
- Hammarström L. (a) The role of enamel matrix proteins in the development of cementum and periodontal tissues. *Ciba Foun Symp.* 1997; 205: 246-255.
- Hammarström L. (b) Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 658-668.
- Hammarström L, Alati I, Fong CD, Origins of cementum. *Oral Diseases.* 1996; 2: 63-69.
- Hassell M. Thomas, Tissues and cells of the periodontium, *Periodontology* 2000. 1993; 3: 9-38.
- Howell TH, Maruscelli G, Oringer K, Polypeptide Growth factors for periodontal regeneration. In: Williams RC, Yunka RA, Newman MG, editors *Curr Opin Periodontol.* 1996; 3: 149-156.
- Huang GTJ, 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; 88: 792-806.
- Ikezawa K, Hart CE, Williams DC, Narayanan AS, Characterization of cementum derived growth factor as an insulin-like growth factor-I like molecule. *Connect Tissue Res.* 1997; 36: 309-319.
- Ivanovski S, Gronthos S, Shi S, Bartold PM, Stem cells in the periodontal ligament. *Oral Diseases.* 2006; 12: 358-363.
- Kalpidis CDR, Ruben MP, Treatment of intrabony periodontal defects with enamel matrix derivative: a literature review. *J Periodontol.* 2002; 73: 1360-1376.
- Komaki M, Kang M, Narayanan AS, Role of MAP Kinases p42<sup>erk-2</sup>/p44<sup>erk-1</sup> in cementum-derived attachment-protein-mediated cell attachment. *J Dent Res.* 2000; 79: 1789-1793.

- Lang H, Schuler N, Arnhold S, Nolden R, Mertens T, Formation of differentiated tissues in vivo by periodontal cell populations cultured in vitro. *J Dent Res.* 1995; 74: 1219-1225.
- Lekic P, McCulloch CAG, Periodontal ligament cell populations: the central role of fibroblasts in creating unique tissue. *The Anatomical Record.* 1996; 245: 327-341.
- Lézot F, Davideau JL, Thomas B, Sharpe P, Forest N, Berdal A, () Epithelial Dlx-2 HOmeogene expression and cementogenesis. *J Histo Cyto.* 2000; 48: 277-283.
- Li X, Shu R, Liu D, Jiang S, Different effects of 25-kDa amelogenin on the proliferation, attachment and migration of various periodontal cells. *Bio Biophy Res Communi.* 2010; 394: 581-586.
- Lin HN, Gronthos S, Bartold PM, Stem cells and future periodontal regeneration. *Periodontology 2000.* 2009; 51: 239-251.
- Lin NH, Menicanin D, Mrozik K, Gronthos S, Bartold PM, Putative stem cells in regenerating human periodontium. *J Periodont Res.* 2008; 43: 514-523.
- Lindhe J, Karring T, Lang NP, Clinical periodontology and implant dentistry 4<sup>th</sup> edition Blackwell Munksgaard, Blackwell Publishing Company (2003).
- 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; 12: 1691-1699.
- Luan X, Ito Y, Dangaria S, Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium. *Stem Cells and Development.* 2006; 15: 595-608.
- Lyngstadaas SP, Wohlfahrt JC, Brookes SJ, Paine ML, Snead ML, Reseland JE, Enamel matrix proteins; old molecules for new applications, *Orthod Craniofac Res* 2009; 12: 243-253.
- MacNeil RL, Sheng N, Strayhorn C, Fisher LW, Somerman MJ, Bone sialoprotein is localized to the root surface during cementogenesis. *J Bone Miner Res.* 1994; 9: 1597-1606.
- MacNeil RL, Thomas HF, Development of the murine periodontium. 11. Role of the epithelial root sheath in formation of the periodontal attachment. *J Periodontol* 1993; 64: 285-291.
- Mariotti Angelo, The extracelular matriz of the periodontium: dynamic and interactive tissues. *Periodontology 2000.* 1993; 3: 39-63.
- Martínez PJM, Martínez RJM, Review of intermediate filaments, with special refence to cytokeratins. *Rev. Comp. Cienc. Vet.* 2010; 4: 1-11.
- Matsuda N, Kumar NM, Ramakrishnan PR, Lin WL, Genco RJ, Cho MI, Evidence for up-regulation of epidermal growth factor-receptors on rat periodontal ligament fibroblast cells associated with stabilization of phenotype *in vitro.* *Arch Oral Biol.* 1993; 48: 559-569.
- McAllister B, Narayanan AS, Miki Y, Page RC, Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum, *J Periodont Res* 1990; 25: 99-105.
- McCulloch CA, Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. *Anat Rec.* 1985; 211: 258-262.
- McCulloch CA Origins and functions of cells essential for periodontal repair: the role of fibroblast in tissue homeostasis. *Oral Dis.* 1995; 1: 271-278.

- McCulloch CA, Nemeth E, Lowenberg B, Melcher AH, Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *Anat Rec.* 1987; 219: 233-242.
- Melcher A. H, On the repair potential of periodontal tissues. *Journal of periodontology.* 1976; 1: 256-260.
- Melcher AH, Cells of periodontium: their role in healing of wounds. *Ann R Coll Surg Engl.* 1985; 67: 130-135.
- Miao D, Scutt A, Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *The journal of histochemistry & cytochemistry.* 2002; 50: 333-340.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100: 5807-5812.
- Mizuno N, Shiba H, Mouri Y, Xu W, Kudoh S, Kawaguchi H, Kurihara H, Characterization of epithelial cells derived from periodontal ligament by gen expression patterns of bone-related and enamel proteins. *J. Cell Biol.* 2004; 11: 111-117.
- Montenegro MA, Ibarra GC, Rojas M, Expresión de citoqueratinas en el epitelio oral de la mucosa gingival humana y de ratón. *Rev. Chil. Anat.,* 1998; 16: 211-217.
- Morsczeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C *et al.*, Isolation of precursor cells (Pcs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matriz Biol.* 2005; 24: 155-165.
- Nakae H, Narayanan AS, Raines E, Page RC, Isolation and partial characterization of mitogenic factors from cementum. *Biochemistry.* 1991; 30: 7047-7052.
- Nanci A., D. Bosshardt D. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000.* 2006; 40: 11-28.
- Nevins M, Camelo M, Nevins ML, seienk RK, Lynch SE, Periodontal regeneration in humans using recombinant huamn PDGF-BB and allogenic bone. *J Periodontol.* 2003; 74: 1282-1292.
- Nordlund L, Hormia M, Saxen L, Theleff I, Immunohistochemical localization of epidermal growth factor receptors in human gingival epithelia. *J Periodontal Res* 1991; 26: 333-338.
- Nymphea P, Rajvir M, Deepa P, Tissue engineering: A new vista in periodontal regeneration. *J Indian Soc Periodontol.* 2011; 15: 328-337.
- Olson S, Arzate H, Narayanan AS, Page RC, Cell attachment activity of cementum proteins and mechanism of endotoxin inhibition. *J Dent Res.* 1991 ; 70:1272-1277.
- Paine ML, Snead ML, Tooth developmental biology: disruptions to enamel-matrix assembly and its impact on biomineralization. *Orthod Craniofacial Res.* 2005; 8: 239-251.
- Park JY, Jeon SH, Choung PH, Efficacy of periodontal stem cell transplantation in the treatment of advanced periodontitis. *Cell Transplantation.* 2011; 20: 271-285.
- Pitaru S, McCulloch CA, Narayanan SA Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodont Res.* 1994; 29: 81-94.
- 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; 30: 360-368.
- Raja S, Byakod G, Pudakalkatti P, Growth factors in periodontal regeneration *Int J Dent Hygiene.* 2009; 7: 82-89.

- Rincon JC, Young WG, Bartold PM, The epithelial cell rests of Malassez a role in periodontal regeneration? *J. Periodont Res.* 2006; 41: 245-252.
- Ripamonti U, Recapitulating development: a template for periodontal tissue engineering *Tissue Eng.* 2007; 13: 51-71.
- Ripamonti U, Petit JC, (2009) Bone morphogenetic proteins, cementogenesis, myoblastic stem cells and the induction of periodontal tissue regeneration. *Cyto Growth Fac Re.* 2009; 20: 489-499.
- Ripamonti U, Reddi AH, Rueger DC, Sampath TK, Induction of cementogenesis by recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1/BMP-7) in the baboon (*Papio ursinus*) *Arc Oral Biol.* 1996; 41: 121-126.
- Ripamonti U, Reddi AH, Rueger DC, Sampath TK, Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissues by bone morphogenetic proteins. *Crit Rev Oral Biol* 1997; 8: 154-163.
- Ripamonti U, Renton L Bone morphogenetic proteins and the induction of periodontal tissue regeneration. *Periodontology 2000.* 2006; 41: 73-87.
- Roulahti E, Integrins *J Clin Invest* 1991; 87:1-5
- Sawaf MH, Ouhayoun JP, Forest N, Cytokeratin profiles in oral epithelia: a review and a new classification. *J. Biol. Buccale,* 1991; 19: 187-198.
- Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MI, Molecular and cell biology of cementum. *Periodontal 2000.* 2000; 24: 73-98.
- Saying NE, Tokiyasu Y, Giannobile WV, Somerman MJ, Growth factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblasts. *J Periodontol.* 1997; 71: 1591-1600.
- Schroeder HE, Biological problema of regenerative cementogenesis: synthesis and attachment of collagenous matrices on growing and established root surfaces. *Int Rev Cytol* 1992; 142: 1-59.
- Sculean A, Rathe F, Junker R, Becker J, Schwarz F, Arweiler N. The use of emdogain in periodontal and osseus regeneration. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2007; 117: 598-606.
- Sela J, Schwartz Z, Swain LD, Boyan BD, The role of matrix vesicles in calcification. En Bonucci E. *Calcification in biological systems.* Florida, USA CRC press 1992.
- Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J *et al*, Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364: 149-155.
- Shi S, Gronthos S, Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* 2003; 18: 696-704.
- Shih IM, The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *J Pathol.* 1999; 189: 4-11.
- Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, Matsuzaki H, Hashimoto S, Muramatsu T, Shima K, Matsuzaka KI, Inoue T, Regulatory Mechanisms of periodontal regeneration *Microscopy Research and Technique* 2003; 60: 491-502.
- Simmons PJ, Torok-Sorb B (1991) Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1, *Blood.* 1991; 78: 55-62.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J,

- Derby P, Lee R, Boyle WJ, Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997; 89: 309-319.
- Sire JY, Delgado S, Fromentin D, Girondot M, Amelogenin: lessons from evolution, *Archives of Oral Biology*. 2004; 50: 205-212.
- Somerman MJ, Shroff B, Argraves WS, Morrison G, Craig AM, Denhardt DT, *et al*, Expression of Attachment proteins during Cementogenesis. *J Biol Buccale*. 1990; 18: 207-214.
- Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S *et al*, Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study, *J Endod*. 2008; 34: 166-171.
- Steinert PM, Roop DR, Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Ann. Rev. Biochem*, 1988; 57: 593-625.
- Swanson EC, Fong HK, Foster BL, Paine ML, Gibson CW, Snead ML, Somerman MJ, Amelogenins regulate expression of genes associated with cementoblasts in vitro. *Eur J Oral Sci*. 2006; 114: 239-243.
- Ten Cate A, Mills C, Solomon G. The development of the periodontium. A transplantation and autoradiographic study. *Anat Rec* 1971; 170: 365–380.
- Teng YT, The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003; 14: 237-252.
- Thomas HF. Root formation. *Int J Dev Biol*. 1995; 39: 231-237.
- Thomas MH, Tissues and cells of the periodontium, *Periodontology 2000*. 1993; 3: 9-38.
- Tokiyasu Y, Takata T, Saygin E, Somerman M, Enamel factors regulate expression of genes associated with cementoblasts. *J. Periodontol*. 2000; 71: 1829-1839.
- Tonetti MS, Lang NP, Cortellini P, Suvan JE, Adriaens P, Dubravec D, Fonzar A, Fourmouzis I, Mayfield L, Rossi R, Silvestri M, Tiedemann C, Topoll H, Vangsted T, Wallkamm B, Enamel matrix proteins in the regenerative therapy of deep intrabony defects. A multicenter randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 317-325.
- Venezia E, Goldstein M, Boyan BD, Schwartz Z, The use of enamel matrix derivative in the treatment of periodontal defects: a literature review and meta-analysis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; 15: 382-402.
- Villareal RE, Moreno A, Mas OJ, Chávez PJJ, Narayanan AS, Gil CI, Zeichner DM, Arzate H, Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): Primary role in biomineralization, *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 384: 49-54.
- Viswanathan H, Berry J, Foster B, Gibson C, Li Y, Kulkarni A, Snead M, Somerman M, Amelogenin: A potential Regulator of cementum-associated genes. *J. Periodontol*. 2003; 74: 1423-1431.
- Webb PP, Moxham BJ, Benjamin M, Ralphs JR, Changing expression of intermediate filaments in fibroblasts and cementoblasts of the developing periodontal ligament of the rat molar tooth. *J. Anat*. 1996; 188: 529-539.
- Whyte MP, Peck WA, Alkaline phosphatase: physiological role explored in hypophosphatasia. *Bone Min Res*. 1989; 6: 175-218.

- Yamazaki K, Yoshie H, Seymour GI, T cell regulation of the immune response to infection in periodontal diseases. *Histol Histopathol.* 2003; 18: 889-896.
- Yonemura K, Narayanan AS, Miki Y, Page RC, Okada H, Isolation and partial characterization of a growth factor from human cementum. *Bone Miner.* 1992; 18: 187-98.
- Yonemura K, Raines EW, Ahn NG, Narayanan AS, Mitogenic signaling mechanisms of human cementum-derived growth factor. *J Biol Chem.* 1993; 268: 26120- 26126.
- Zeichner DM, Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited. *Periodontol 2000.* 2006; 41: 196-217
- Zeichner DM, 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. *Develop dynamics.* 2003; 228: 651-663.
- Zeichner-David Margarita, Is there more to enamel matrix proteins than biomineralization? *Matrix Biol.* 2001; 20: 307-316.