

10
29x



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ANALISIS DE LA EXPRESION DE MOLECULAS ASOCIADAS
A LA FORMACION DE TEJIDO MINERALIZADO, EN
CULTIVOS DERIVADOS DE UN TUMOR HUMANO
DE CEMENTO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

DIANA BARRERA OVIEDO



MEXICO, D. F.



266003

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

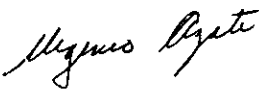
Jurado asignado:

Presidente.	Prof. Aguilar Caballero Raúl.
Vocal.	Prof. Gavilanes Ruiz Marina.
Secretario.	Prof. Arzate Higinio.
1er Suplente.	Prof. Ortega Muñoz Raquel.
2º Suplente	Prof. Olivera Flores Teresa de Jesús.

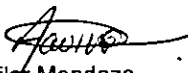
Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Biología Celular, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

El desarrollo de esta tesis fué apoyado parcialmente por CONACYT (057P-M) y D.G.A.P.A. UNAM (IN200597).

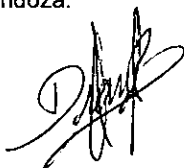
Asesor:
Dr. Higinio Arzate.



Supervisor técnico:
Biol. María Eugenia Aguilar Mendoza.



Sustentante:
Diana Barrera Oviedo



AGRADECIMIENTOS.

A mis padres:

María de los Ángeles Oviedo Zamora.
Genaro Carlos Barrera Jurado.
Por todo lo que me han dado.

A mis hermanos:

Genaro, Claudia, José Carlos y Ángel.
Por soportarme (a veces).

A mi abuelita:

Esperanza Zamora Aguilar.
Por quererme y preocuparse tanto por mí.

A Marco:

Por todo lo que he aprendido a tu lado.
(y lo que falta).

A mis amigos:

Aliesha. Por todo lo que hemos pasado juntas.
Marco. Por todo el apoyo y la ayuda incondicional.
Gina, Mike, Mayra, Mariana, Jasso, Juan Carlos,
Tanya y Frida.
Por todos los momentos que hicieron del tiempo en
la facultad añorable.

Al laboratorio de Farmacología Celular:

Por adoptarme.

Al Dr. Higinio Arzate y a Maru:

Por el tiempo que me dedicaron para realizar esta tesis.

INDICE.

CONTENIDO	PAGINA
1. ANTECEDENTES.	...1
1.1 La enfermedad periodontal.	...1
1.2 El órgano dentario.	...1
1.2.1. El diente.	...2
1.2.2. El periodonto.	...4
1.2.2.1. La encía.	...4
1.2.2.2. El hueso alveolar.	...5
1.2.2.3. El ligamento periodontal	...6
1.2.2.4. El cemento.	...7
Composición química.	...7
Clasificación y Morfología.	...8
Fisiología.	...9
Cementogénesis.	...10
Cementogénesis durante la regeneración.	...11
Moléculas involucradas en la cementogénesis.	...12
1.3. Fundamento de la técnica RT-PCR.	...15
2. PROPUESTA DE ESTUDIO.	...16
3. OBJETIVOS.	...17
4. HIPOTESIS.	...17
5. MATERIAL Y METODOS.	...18
5.1. Líneas celulares.	...18
5.2. Cultivo celular.	...18
5.3. Expresión de moléculas asociadas a la formación de tejido mineralizado.	...19
5.3.1. Extracción de RNA total.	...19
5.3.2. Obtención de cDNA: Reacción de la Transcriptasa Reversa (RT).	...20
5.3.3. Amplificación del DNA: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	...21
5.3.4. Revelado de productos de amplificación:	
Electroforesis de cDNA.	...24
Preparación de geles de agarosa.	...24
Electroforesis.	...24
6. RESULTADOS.	...25
7. DISCUSION.	...28
8. CONCLUSION.	...31
9. BIBLIOGRAFIA.	...32

1. ANTECEDENTES.

1.1. La enfermedad periodontal.

Actualmente la enfermedad periodontal es la enfermedad bucal de mayor frecuencia y un problema de salud pública (1). Es una enfermedad crónica, episódica y sitio específica que destruye las estructuras de soporte del diente (hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento radicular), y que subsecuentemente puede llevar a la pérdida de los dientes, en caso de faltar el tratamiento adecuado.

Las técnicas convencionales utilizadas en el tratamiento de la enfermedad periodontal incluyen la reducción del proceso inflamatorio mediante la eliminación de los factores etiológicos (bacterias periodontopatógenas), seguida de la cirugía periodontal. Idealmente este procedimiento resultaría en la regeneración de los tejidos destruidos; sin embargo, la regeneración del periodonto involucra diversos procesos como: proliferación, migración, adherencia, selección y diferenciación de células progenitoras (2,3). Considerando que el periodonto consiste de dos tejidos mineralizados (cemento y hueso alveolar) y de dos tejidos conectivos blandos (encía y ligamento periodontal), para que se lleve a cabo la adecuada regeneración de cada uno de estos componentes, los procesos antes mencionados deben actuar en una secuencia espacial y temporal concertada. Para cumplir con este requerimiento es necesario primero, entender los mecanismos que regulan la homeostasis y cicatrización de los diversos tejidos que componen el periodonto y segundo, encontrar las vías que controlan dichos mecanismos.

1.2. El órgano dentario.

El órgano dentario, está formado por el diente y el periodonto, su soporte de tejido blando y duro. La unidad dental tiene como principal propósito el de obtener y procesar alimento. Adquiere importancia también en los procesos de deglución, fonación, soporte de músculos faciales, articulación temporomandibular, y además en el bienestar estético.

1.2.1. El diente.

Todos los dientes constan de una *corona* que sobresale por encima de la encía y una o más *raíces* (incisivos, premolares) y que ocupan los *alvéolos* óseos del maxilar o de la mandíbula. La región en que se une la corona a la raíz se llama *unión cemento- esmalte*. Los dientes contienen una *cavidad central* o *cámara de la pulpa*, que corresponde aproximadamente en su configuración a la forma externa del diente. Dicha cámara se continúa hacia abajo por cada raíz, en forma de un canal estrecho que se comunica con el *ligamento periodontal* por medio del agujero apical situado en el ápice de la raíz.

La mayor parte del diente está formada por la *dentina*, que rodea a la cámara pulpar. Es más gruesa en la corona y se adelgaza gradualmente hasta alcanzar el ápice de la raíz. La dentina constituye la masa principal del diente y se continúa formando muy lentamente a lo largo de la vida.

El *esmalte* es una capa que cubre la superficie externa del diente en la región de la corona y es más delgado en la región cervical. El esmalte es la sustancia más dura de todas las que se encuentran en el cuerpo. La superficie libre del esmalte está cubierta por dos capas delgadas: 1) una interna, la *cutícula del esmalte*; y 2) una externa, que es una capa acelular que se encuentra firmemente adherida al diente y es diferente al tejido de la encía. Esta capa acelular se continúa con el cemento que cubre la raíz y son semejantes en composición y estructura histológica.

La *pulpa* ocupa la cavidad pulpar del diente y se extiende por el estrecho canal radicular, donde rodea a los vasos sanguíneos y a los nervios, y se continúa a través del orificio de la punta de la raíz con el ligamento periodontal.

El *ligamento periodontal* rodea al diente y conecta la superficie de la raíz cubierta de cemento con el hueso alveolar y la encía a través de fibras. En la gente joven, la encía está unida al esmalte; a medida que avanza la edad, va poco a poco separándose del esmalte y, en ancianos está unida al cemento. (Figura 1).

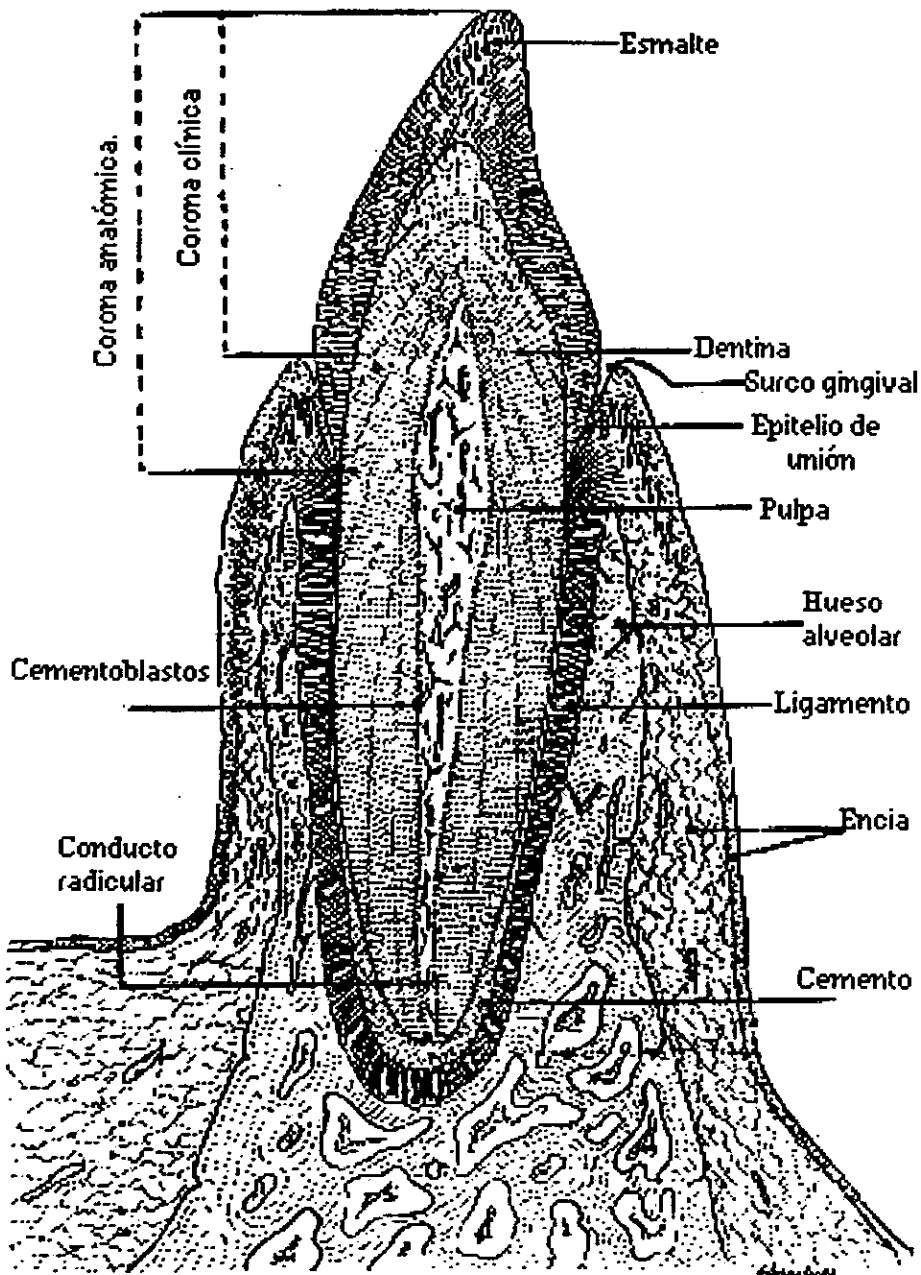


Figura 1. Esquema de un diente.

1.2.2. El periodonto.

El periodonto (del griego *peri*, alrededor, y *odontos*, dientes) es el tejido de soporte del diente. Este tejido está formado por: 1) la encía; 2) el ligamento periodontal; 3) el hueso alveolar; y 4) el cemento. Dichos tejidos están organizados para realizar las siguientes funciones:

- a) Soportar al diente en su cavidad ósea.
- b) Resistir y amortiguar la fuerza generada por la masticación, el habla, y la deglución.
- c) Mantener la integridad del cuerpo superficial del diente por separación de los ambientes externo e interno.
- d) Ajustar por cambios estructurales asociados con desgaste, envejecimiento o continua remodelación y/o regeneración.
- e) Defender contra las influencias ambientales nocivas que están presentes en la cavidad oral.

1.2.2.1. La encía.

La encía es la porción de la membrana de la mucosa oral que cubre y adhiere el proceso alveolar además de la región cervical del diente. La encía termina donde comienza la corona del diente, y consta de tres partes:

- I. *encía marginal libre*: la cual se extiende desde el tejido más suave junto a la corona hasta el surco de la encía.
- II. *encía interdental*: la cual llena el espacio interproximal de la cresta alveolar del área de contacto entre los dientes.
- III. *encía de inserción*: la cual se extiende del surco de la encía a la línea mucogingival de la bóveda vestibular y el fondo de la boca.

La encía marginal libre y la interdental son de especial interés, ya que son las regiones de unión entre el tejido blando y la superficie de la corona o raíz, además de ser los sitios de iniciación de la enfermedad periodontal.

La encía es un tejido conectivo altamente organizado en su estructura arquitectónica, dando tono a la encía marginal libre y a la de inserción, y da resistencia a la tensión generada en el tejido blando interdental. El tejido conectivo del

periodonto consiste de: 1) proteínas colagénicas; 2) glucoproteínas; 3) proteínas no colágenas; 4) proteoglicanos; 5) pequeñas cantidades de elastina; y 5) componentes séricos.

1.2.2.2. El hueso alveolar.

El hueso alveolar es la placa delgada de hueso que forma la pared de los alveolos y es identificado anatómicamente como lámina cribiforme, y radiológicamente como lámina dura. El proceso alveolar está en la porción que comprenden el maxilar y la mandíbula, donde se lleva a cabo la erupción del diente. El proceso alveolar es una estructura dependiente de la presencia de dientes.

El hueso alveolar maduro es una estructura compleja poco frecuente en el organismo. El estado inicial en la formación de hueso se caracteriza por la deposición de sales de calcio en zonas localizadas o islas de hueso (tejido conectivo de matriz no calcificada). Una vez establecido este sitio, continúa la ampliación y fusión, sufriendo gran cantidad de cambios.

Las actividades de resorción y deposición son constantes. Las cavidades dentro de la masa ósea, creadas por la resorción, se encuentran recubiertas del endosteo, el cual es transformado por condensación de finas fibras de colágena y células referidas, siendo idéntico en estructura a la superficie externa del hueso, llamado periosteo.

El endosteo contiene capas de osteoblastos, los cuales tienen la capacidad de depositar matriz de hueso e inducir calcificación, y de osteoclastos, células multinucleares que participan en la resorción. También se encuentran células progenitoras que tienen influencia sobre el hueso alveolar para que se someta a un crecimiento aposicional y de remodelación, ajustando la demanda de desarrollo y erupción de dientes, e involucrando las estructuras maduras.

Las células presentes en el periosteo, llegan a embeberse en la matriz calcificada y son transformados en osteocitos, estas células se encuentran en cavidades pequeñas, llamadas lagunas. Dichas lagunas se comunican entre sí por canaliculos, que generalmente están orientados en dirección al suministro sanguíneo.

Una de las principales características funcionales del hueso alveolar es su capacidad para permitir la renovación en respuesta a las necesidades funcionales (4). Bajo condiciones normales el diente migra y erupciona continuamente para compensar la reducción por desgaste (5,6). Estos movimientos inducen la renovación del hueso alveolar que lo rodea.

1.2.2.3. El ligamento periodontal.

El ligamento periodontal es un tejido conectivo blando que envuelve las raíces de los dientes y se extiende hasta la cresta del hueso alveolar. El ligamento periodontal se forma durante el desarrollo y la erupción del diente. Inicialmente este tejido está formado por células ectomesenquimatosas indiferenciadas, que contienen grandes cantidades de glucógeno y pocos organelos, que se fijan en una matriz afibrilar. Subsecuentemente los fibroblastos del ligamento periodontal, hacen desarrollar células de alta actividad, ricas en organelos y depósitos de fibras de colágena. Debido al continuo desarrollo, se forma una capa densa y uniforme de tejido conectivo que está localizada cerca de la superficie del cemento. La forma de la estructura final no se establece sino hasta que el diente alcanza la oclusión y la fuerza funcional es aplicada.

El tejido conectivo del ligamento periodontal está constituido del mismo tipo de componentes que los presentes en el tejido conectivo de la encía, incluyendo colágenas, proteoglucanos, glucoproteínas y una cantidad pequeña de elastina. Los componentes mayoritarios son la colágena tipo I y tipo III (ambas representan del 15 al 20% del total).

Los componentes colágenos del tejido periodontal maduro se organizan en: 1) fibras primarias o fibras de Sharpey, estas fibras atraviesan el espacio periodontal oblicuamente, insertándose en el cemento y hueso alveolar; y 2) las fibras secundarias, compuestas de fibras de colágena orientadas más o menos al azar, localizadas entre las fibras de Sharpey, fibras nerviosas y vasos sanguíneos.

1.2.2.4. El cemento.

El cemento es originado por células denominadas cementoblastos y forma la interfase entre la dentina de la raíz y el tejido conectivo blando del ligamento periodontal. El cemento es una forma de tejido conectivo mineralizado altamente especializado, el cual en parte se parece estructuralmente al hueso, pero difiere en varios aspectos funcionales importantes. El cemento no posee inervación, suministro sanguíneo directo, ni drenaje linfático; y cubre la superficie de la raíz entera y algunas veces porciones de la corona, permitiendo solo regeneraciones menores (7,8,9).

Composición química.

La composición química del cemento celular es similar a la del hueso. El cemento presenta menor cantidad de sales inorgánicas. Del tejido conectivo mineralizado, el cemento contiene la menor cantidad de sales inorgánicas: aproximadamente el 50% del peso seco. La matriz orgánica contiene en su mayor parte colágenas y en menor grado glucoproteínas y proteoglicanos (10,11).

El contenido inorgánico del cemento fluctúa entre el 45 y 50% (del peso seco), siendo menor al que presenta cualquier otro tejido mineralizado (hueso 70%). Las sales inorgánicas presentes, están en forma de cristales de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Contiene magnesio (0.5 – 0.9%); calcio (0.5 – 0.9%); fluor (0.9% o menos); azufre, y concentraciones detectables de cobre, zinc y sodio.

La matriz orgánica del cemento consiste principalmente de colágena de tipo I (90%) y tipo III (5%) (11,12,13). El cemento presenta proteínas no colágenas como: 1) glucoproteínas; 2) proteoglicanos; y 3) glucolípidos. Al igual que en el hueso, las proteínas no colágenas predominantes son sialoproteína ósea y osteopontina; ambas son glucoproteínas fosforiladas y sulfatadas. Otras glucoproteínas presentes son: 1) osteonectina (presente en matriz extracelular mineralizada); 2) fibronectina (molécula de membrana que une los componentes de la matriz extracelular a las células durante el desarrollo del cemento); 3) tenascina (molécula de membrana); y 4) osteocalcina (proteína de matriz extracelular) (14,15).

Los proteoglucanos presentes en cemento son: 1) ácido hialurónico; 2) condroitín sulfato; y 3) dermatán sulfato (16,17). En general los proteoglucanos tienen la función de mantener la presión osmótica por regulación de la difusión de agua y electrolitos; además de desempeñan un papel importante en la regulación de las migraciones celulares en el tejido (18).

El espesor del cemento en la porción coronaria de la raíz varía entre 16 y 60 micrones de espesor, y adquiere un mayor espesor (150 a 200 micrones) en el tercio apical y furcas.

Clasificación y Morfología:

Actualmente, basada en la ausencia o presencia de células y a la fuente de fibras colágenas, el cemento se clasifica (Clasificación de Jones) como: 1) cemento celular afibrilar (AAC); 2) cemento acelular de fibras extrínsecas (AEFC); 3) cemento celular de fibras intrínsecas (CIFC), que también puede ocurrir como una variedad acelular (AIFC) (19); y 4) cemento celular mixto estratificado (CMSC) (20).

El AAC consiste en una matriz mineralizada, no contiene fibras de colágena ni células inmersas. La ausencia de fibras de colágena indica que esta variedad de cemento no funciona en la inserción del diente. Este tipo de cemento se encuentra alrededor de la unión cemento - esmalte, en donde cubre pequeñas áreas de esmalte y dentina adyacente a la raíz; el AAC puede ser cubierto por el AEFC y/o por uniones epiteliales. Se cree que células de tejido conectivo son responsables de la formación del AAC cuando este entra en contacto con la superficie del esmalte.

El AEFC, carece de células y está compuesto completamente de paquetes densos de fibras colágenas, las llamadas fibras de Sharpey. Estas fibras continúan dentro del ligamento periodontal y conectan la raíz al hueso alveolar. Este tipo de cemento se forma por fibroblastos del folículo dental o del ligamento periodontal y sirve exclusivamente para el anclaje del diente.

El CIFC contiene células, las cuales se denominan cementocitos, que son cementoblastos atrapados; están localizados en lagunas y debido a esta característica los cementocitos se parecen a los osteocitos. Los cementocitos difieren

de los cementoblastos en que los primeros se encuentran relativamente inactivos. Las fibras colágenas de los cementocitos son el mayor componente de la matriz celular; son todas intrínsecas y siguen un curso circular o espiral alrededor de la raíz, más o menos paralelo a la superficie radicular, por ello el CIFIC es escaso en fibras de Sharpey. En humanos el CIFIC mineralizado, se encuentra principalmente en zonas de reparación (en sitios de resorción lagunar o raíces fracturadas). Está formado por cementoblastos del folículo dental y después del ligamento periodontal; su formación se asocia a la reparación y adaptación.

El CMSC es un tejido estratificado con capas alternadas de AEFC y CIFIC/AIFC, estando superpuestas una en la otra. Este tipo de cemento no está homogéneamente mineralizado y es en parte poroso; su grosor es variable y se localiza en el tercio apical de las raíces y furcaciones. Su principal función es la adaptativa.

Ambas formas de cemento, acelular y celular, pueden exhibir un incremento de capas, lo cual indica periodos intermitentes de crecimiento aposicional y de reposo. En el humano, el cemento acelular es formado sin ningún orden de mineralización para las fibras extrínsecas y las fibras de colágena; en el cemento celular las fibras intrínsecas son mineralizadas, pero solo aquellas que se encuentran en la periferia, resultando un núcleo no calcificado (21,22,23). En comparación el cemento celular está más laminizado y menos calcificado que el cemento acelular (24).

Fisiología.

El cemento tiene tres funciones principales: 1) adherir las fibras del ligamento periodontal a la superficie de la raíz; 2) ayudar al mantenimiento y el control del espesor del ligamento periodontal; y 3) servir como medio directo en el cual, el daño a la raíz es reparado. En el diente normal de humano, el promedio del espesor de cemento incrementa con el aumento de la edad, pero en enfermedades periodontales este incremento se ve disminuido o nulificado (25,26).

La deposición de cemento es continua durante toda la vida (26), lo cual es esencial para el mantenimiento de la salud periodontal. Los defectos en la deposición

de cemento puede servir como base para la formación de bolsas, siendo un proceso que puede estar involucrado en algún tipo de periodontitis (27).

La principal diferencia funcional entre el hueso y el cemento es que este último no sufre gran resorción ni marcada remodelación (8,9).

Cementogénesis.

Los eventos iniciales en la cementogénesis han sido dilucidados en ratas y ratones por microscopía electrónica (28-34), así como en perros y en humanos (35-37). Entre dichos eventos se encuentra la participación de las células de tejido conectivo (fibroblastos), como inductoras de la diferenciación de cementoblastos y de la producción del cementoide en el cual llegan a incorporarse.

En humanos, la génesis de cada tipo de cemento, difiere significativamente. En el proceso de cementogénesis acelular (AAC y AEFC), aunque las células epiteliales los separan, los fibroblastos se distribuyen en la superficie de la raíz en crecimiento y forman una capa delgada de fibras de colágena que une a la superficie incalcificada del exterior de la dentina. Esta capa es una franja de fibras de colágena dispuestas perpendicularmente a la superficie de la raíz. Con el tiempo estas fibras se vuelven acúmulos rodeados por fibroblastos. Los acúmulos se vuelven densos y los fibroblastos comienzan a retirarse lateralmente. Los acúmulos densos llegan a ser fibras de Sharpey. En este estado, se encuentran en la primera capa del cemento acelular.

Cuando ocurre la erupción de los dientes, la capa de cementoide mineraliza junto con la capa externa de dentina. La mineralización continúa, dando lugar a nuevas capas de cementoide, las cuales son extensiones de los acúmulos de fibras originales. El número y tamaño de las fibras de Sharpey varía dependiendo el estado funcional del diente, y su densidad aumenta después de su erupción. El periodo de tiempo en el cual se forma el AEFC durante el desarrollo de la raíz es de 46 a 65 meses, ya que cubre de 8 a 10 mm de la longitud final de la raíz de premolares humanos.

En el CMSC frecuentemente aparece primero una capa de CIFC (producto de los cementoblastos), la cual se forma rápidamente, para después aumentar su grosor. CMSC es un tipo de cemento que se forma más rápido que el AEFC y en el cual aparecen los cementocitos una vez que mineralizó el tejido.

La mineralización comienza con el depósito de precemento (12). Una vez diferenciadas las células (en cementoblastos), comienzan a depositar la matriz orgánica del cemento, que consta de fibras colágenas intrínsecas y sustancia fundamental contra la superficie de la raíz y alrededor de los haces de fibras que forman el ligamento periodontal o fibras extrínsecas. Esta matriz orgánica se mineraliza inicialmente por la propagación de cristales de hidroxapatita desde la superficie de la raíz; dichos cristales son depositados dentro de las fibras colágenas (proceso aparentemente igual al de la mineralización de tejido óseo).

Cementogénesis durante la regeneración.

La regeneración de los tejidos periodontales es un fenómeno biológico complejo. El entendimiento de este fenómeno ha sido limitado por falta de conocimiento de los mecanismos específicos que controlan el crecimiento y diferenciación de las líneas celulares de ligamento periodontal (fibroblastos), cemento (cementoblastos) y hueso alveolar (osteoblastos). Se ha determinado un papel específico para el cemento durante el proceso de la periodontogénesis. Los extractos de cemento poseen una batería de moléculas en su matriz extracelular que promueven adhesión, quimiotaxis, síntesis de matriz extracelular, proliferación y diferenciación celular. Sin embargo, los mecanismos y factores moleculares que regulan el depósito de cemento durante el desarrollo y regeneración no son todavía bien comprendidos (21).

Estudios morfológicos han mostrado que dos matrices de reparación se adhieren a las superficie radicular absorbida (38), siguiendo la liberación de células cementoprogenitoras repoblando las lagunas resultantes de la pérdida de adhesión inicial de la matriz, que ha quedado expuesta. Estas células y sus reparaciones

respectivas de tejidos, revelan homologías de la formación inicial de dos variedades mayores de cemento (AEFC y AIFC) en raíces humanas en desarrollo.

Las evidencias de que la formación inicial de las dos matrices de reparación con la iniciación de AEFC y CIFC indica que en la cementogénesis de reparación son recapitulados los eventos ocurridos durante el desarrollo radicular (39). Sin embargo, el origen preciso de las células cementoprogenitoras y los factores moleculares que disparan la diferenciación no son conocidos (11,12).

Sabemos que el cemento celular es depositado por cementoblastos, los cuales son progenitores de los cementocitos. Estos cementoblastos depositan una matriz mineralizada rica en fibras de colágena (fibras intrínsecas) y proteínas no colágenas directamente en la superficie radicular, las cuales son mezcladas con fibras colágenas extrínsecas depositadas antes por las células del ligamento periodontal. La matriz de proteínas que sintetizan los cementoblastos es segregada por los osteoblastos y odontoblastos incluyendo osteopontina (OPN), sialoproteína ósea (BSP), osteonectina (ONC) y osteocalcina (OC). Se ha determinado que las células involucradas en la formación de cemento sintetizan y secretan OPN y OC (38).

Moléculas involucradas en la cementogénesis.

a) Fosfatasa Alcalina (AP).

La fosfatasa alcalina es una enzima de naturaleza glucoproteica; esta enzima libera iones fosfato de ésteres de fosfato orgánicos (40). La AP es importante en la mineralización de hueso, cartilago calcificado y cemento. La actividad de la enzima es mayor en cemento celular que en cemento acelular; y existe una relación entre la actividad de la enzima y la producción de cemento acelular (41).

b) Colágena Tipo I (Col I).

Las colágenas forman una familia de proteínas fibrosas bien caracterizadas; se encuentran en todos los animales pluricelulares. Estas proteínas son secretadas por células de tejido conectivo, así como por otros tipos celulares. Las proteínas de esta

familia constituyen el 25% del total de las proteínas en el organismo, siendo las principales componentes en piel y hueso.

Las colágenas son moléculas largas, rígidas, y con una estructura cuaternaria de triple hélice, en la cual tres cadenas peptídicas (denominadas cadenas α), se enrollan una alrededor de otra en una super hélice parecida a una cuerda. Existen alrededor de 25 diferentes cadenas α , codificadas por distintos genes. Las cadenas α se combinan para formar los 15 tipos de colágenas conocidos hasta la fecha.

Los tipos de colágena encontrados en tejido conectivo son los tipos I, II, III, V y XI (colágenas fibrilares). La colágena tipo I es el principal tipo en piel y hueso, por lo cual es la más abundante de las colágenas (42).

c) Osteopontina (OPN).

La OPN es una fosfoproteína sulfatada y glucosilada (rica en ácido siálico); contiene la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), la cual es reconocida por varias integrinas y células que expresen la integrina $\alpha_v\beta_3$ (42), por esto la OPN está propuesta como ligando natural del receptor $\alpha_v\beta_3$.

La OPN se encuentra en diversos tejidos, tiene funciones como: 1) quimiotáctico y factor de adhesión, reclutando y estimulando macrófagos (44); 2) modulador de la resorción de Ca^{2+} producida por osteoclastos (45); 3) promotor de la adhesión y regulador de las interacciones matriz-célula y matriz-matriz (46); 4) regulador de la mineralización de hueso, y se encuentra presente durante la cementogénesis (47).

d) Sialoproteína ósea (BSP).

Es una molécula de naturaleza glucoproteica, fosforilada y sulfatada. BSP se ha purificado a partir de tejido mineralizado, incluyendo dientes humanos (48,49). Se ha encontrado en lugares de nueva formación de hueso y es la proteína predominante presente en la matriz de hueso antes del depósito de la mineralización (38).

Es una molécula de adhesión; estructuralmente contiene varios fragmentos de ácido poliglutámico, involucrados con la unión a hidroxiapatita; un segmento rico en tirosina en el extremo carboxilo-terminal; y una región de adhesión celular RGD, que es identificado como el mediador de la adhesión "*in vitro*"; y ha mostrado una gran especificidad hacia tejido mineralizado. El receptor de membrana asociado a BSP es conocido como receptor de vitronectina ($\alpha_v\beta_3$).

En tejido mineralizado la BSP es regulador del desarrollo; está involucrado con el proceso primario de la mineralización (50,51). En hueso maduro se ha observado un decremento en la expresión de BSP (52), por lo que se ha propuesto que tiene un papel en el control de la diferenciación celular (52-55).

e) Osteocalcina (OC).

La osteocalcina (OC) es una proteína de bajo peso molecular, que se encuentra abundantemente en las matrices extracelulares de tejidos mineralizados (56-58). Es una proteína conjugada con residuos de ácido γ -carboxiglutámico (Gla), los cuales le dan la habilidad para unirse a iones de calcio, promoviendo su absorción hacia la estructura formada por cristales de hidroxiapatita.

La OC actúa como quimiotáctico para monocitos de sangre periférica, células mesenquimales y células que participan en la mineralización. Se ha encontrado que esta proteína puede ser producida por los cementoblastos responsables de la primera fase de formación de cemento tanto celular como acelular (59).

f) Proteína Morfogénica de hueso (BMP).

Ocho de las nueve BMPs reportadas en la literatura están relacionadas unas con otras (BMP-2 a BMP-9). Estas presentan una serie de 7 cisteínas en el extremo carboxilo-terminal; dicha región es la característica de los miembros de la superfamilia de las TGF- β ; por esto, estas ocho BMPs se clasifican dentro de la esta superfamilia.

Las BMPs están relacionadas en los procesos de diferenciación y desarrollo embrionario, también inducen la formación de hueso y cartilago en modelos postfetales. Actúan como señales posicionales y proveen la información necesaria

para el patrón de formación, por estas características las BMPs entran en la categoría de proteínas morfogénicas.

BMP-2 y BMP-4 están implicadas fuertemente en el patrón de formación en embriones de vertebrados, no solo en el desarrollo del esqueleto, sino también en el de otros tejidos, órganos y sistemas (extremidades, corazón, mesenquima craneofacial, cerebro, pulmón riñón, hígado y dientes) (60,61,62).

1.3 Fundamento de la técnica RT-PCR.

El DNA copiado a partir de mRNA es denominado DNA complementario (cDNA). El cDNA tiene la ventaja de no presentar intrones. Es relativamente fácil diferenciar el mRNA de los RNA de transferencia (tRNA) y ribosomal (rRNA), ya que el extremo 3' de los mRNA consiste de una secuencia de 50 a 250 residuos de adenina (A), conocida como cola de poli-A. Con dicha característica es posible reconocer a los mRNAs con la adición de un oligo-dT libre, que hibridiza la cola de poli-A de cada mRNA, sirviendo como iniciador para la enzima Transcriptasa Reversa (nativamente se encuentra en retrovirus), dicha enzima sintetiza una cadena de DNA complementaria para cada molécula de mRNA presente. Obteniendo una cadena de cDNA sencilla sobre una de mRNA (42).

La reacción de la PCR es una técnica en la cual se amplifica el número de copias de una región en específico del DNA o de una secuencia de cDNA previamente obtenida por la reacción de la RT, con el fin de que sea más fácil detectar su presencia.

2. PROPUESTA DE ESTUDIO.

El tratamiento de la enfermedad periodontal tiene como objetivo la regeneración del tejido de soporte del diente (periodonto). Las estrategias para favorecer el proceso de regeneración son: 1) estimulación de la formación del hueso alveolar; 2) estimular a los fibroblastos del ligamento periodontal; o 3) promover la formación de cemento radicular.

Con base en los antecedentes y en las estrategias mencionadas, la propuesta es la de estudiar la expresión temporal de moléculas involucradas en la cementogénesis y por tanto en el proceso regenerativo del cemento; debido a que la neoformación de cemento y de fibras de Sharpey en las superficies radiculares es un paso crucial en el proceso regenerativo (63).

3. OBJETIVOS.

- 1) Determinar la expresión temporal de 8 moléculas asociadas con la formación de tejido mineralizado (AP, Col I, OPN, BSP, OC, ONC, BMP-2, y BMP-4), utilizando la técnica de RT-PCR, en células de cementoblastoma humano y en osteoblastos humanos.
- 2) Analizar el patrón de expresión obtenido, en ambos linajes celulares.

4. HIPOTESIS.

Si los cementoblastos y los osteoblastos son células que dan origen a dos tejidos diferentes (cemento y hueso respectivamente), entonces las células derivadas del cementoblastoma humano, cultivadas *in vitro* presentarán la expresión de moléculas (AP, Col I, OPN, BSP, OC, ONC, BMP-2, y BMP-4) asociadas a la formación de tejido mineralizado, pero en una secuencia temporal diferente a la llevada a cabo por osteoblastos humanos.

5. MATERIAL Y METODOS.

5.1. Líneas celulares.

En el laboratorio donde se realizó este estudio recientemente se generó y expandió una línea celular a partir de un tumor humano de cemento radicular (cementoblastoma) (63), lo cual eliminó las dificultades de clonar diversas subpoblaciones celulares del ligamento periodontal hasta obtener aquellas del linaje cementoblástico.

En teoría representa una línea celular homogénea y clonal. Resultados preliminares han mostrado que estas células producen nódulos mineralizados *in vitro*, cuya formación se considera producto de células diferenciadas y con capacidad osteogénica. Más importante aún es el patrón de mineralización de las células del cemento. Este tuvo una apariencia nodular y ocurrió en forma de condensación de la matriz extracelular a partir de agregados celulares. Un segundo patrón de mineralización observado en cultivos de células derivadas de hueso alveolar humano, mostró una mineralización más plana y difusa, lo que indica que las células del cemento poseen diferentes patrones de mineralización con respecto a los osteoblastos (resultados aún sin publicar).

5.2. Cultivo celular.

Las células derivadas de cementoblastoma o derivadas de hueso alveolar (osteoblastos), fueron sembradas a una densidad de 2×10^5 células y se cultivaron en botellas para cultivo celular (Nunc) de 25 cm^2 de área, hasta tener una monocapa confluyente. El medio de cultivo utilizado fue medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 10^{-3} M de aminoácidos no esenciales, 10^{-3} M de piruvato de sodio, 100 UI/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomocina, 10^{-2} M de β -glicerofosfato, 50 $\mu\text{g/ml}$ de ácido ascórbico y 10^{-7} M de dexametasona. Las condiciones de incubación fueron: temperatura de 37°C y en atmósfera de 5% de CO_2 .

5.3. Expresión de moléculas asociadas a la formación de tejido mineralizado.

El análisis de las moléculas mencionadas, se realizó mediante la extracción de RNA total de las células cultivadas a diferentes tiempos. A partir de la fracción de mRNA, se obtuvo DNA complementario (cDNA) por medio de la reacción de la RT. El cDNA obtenido se amplificó mediante la PCR, y los productos de amplificación se revelaron en geles de agarosa.

5.3.1. Extracción de RNA total.

Las células fueron sincronizadas en medio sin suero y luego se sembraron en tres botellas (10^5 células por botella). Después de 7, 14 y 21 días de haber sido sembradas, las células fueron lavadas con PBS y separadas con tripsina porcina-EDTA (0.25 mM). Para obtener el RNA total de las células crecidas a los diferentes tiempos, se centrifugaron y el paquete celular fue resuspendido en 600 μ l de solución desnaturalizante de isotiocianato de guanidina 4M (solución "D"). Después se añadieron las siguientes soluciones de manera secuencial: 1) acetato de sodio 2M pH 4.0 (120 μ l), y 2) solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (720 μ l), mezclando en el vórtex durante un minuto cada vez que se añadió una solución. Se incubó a 4°C durante 15 minutos y se centrifugó a 14,000 x g durante 10 minutos. Se separó la fase acuosa y se precipitó la fracción que contenía al RNA con un volumen igual de isopropanol durante 1 hora a -20°C. Se centrifugó y decantó el sobrenadante.

Finalmente la fracción precipitada se disolvió en 300 μ l de solución "D", se añadió un volumen igual de isopropanol y se dejó precipitar nuevamente durante 1 hora a -20°C. Se centrifugó y se lavó 2 veces con 100 μ l de etanol al 75 %; se secó la fracción que contenía el RNA total en un desecador a 65°C durante 30 minutos y se resuspendió en 10 μ l de H₂O-DEPC (64). La concentración de RNA, en esta última solución, se determinó mediante espectrofotometría a 260-280 nm (65). El RNA total aislado se almacenó a -70°C.

5.3.2. Obtención de cDNA: Reacción de la Transcriptasa Reversa (RT).

Para llevar a cabo la reacción de la RT (66), se utilizaron los siguientes componentes de la reacción: 1) transcriptasa reversa M-MuLV* (0.4 U/ μ l); 2) Oligo dT* (8×10^{-3} mM); 3) Inhibidor RNasa* (0.8 U/ μ l); 4) Desoxinucleotidos trifosfato** (dNTP) (0.8 μ M de cada uno); 5) MgCl₂** (6 mM); 6) Buffer PCR**, que contiene: Tris-HCl (10 mM, pH 8.3), KCl (50 mM), y gelatina (1.0 μ g/ml); 7) muestra de RNA total (5 μ g aproximadamente); 8) Agua DEPC, para ajustar el volumen a 50 μ l en cada reacción.

*Boehringer Mannheim

**Biotecnologías Universitarias.

Procedimiento:

Previo a la reacción de la RT se realizó una incubación con DNasa*, a 37°C por 30 minutos (hidrólisis de DNA presente) y luego a 65°C por 5 minutos (desnaturalización de la DNasa).

Para la reacción de la RT, se preparó una mezcla con las siguientes soluciones (Tabla 1), adicionadas en orden y en las cantidades indicadas, en un tubo eppendorf de 0.5 ml.

Tabla 1. Componentes de la reacción de RT

COMPONENTES	VOLUMEN
	10 x
MgCl ₂ (30 mM).	20 μ l
Buffer PCR 10X.	10 μ l
Agua DEPC.	16 μ l
dNTP ¹ (2 mM c/u).	40 μ l
Inhibidor RNasa (40 U/ μ l).	2 μ l
Oligo dT (0.4 mM).	2 μ l
Muestra de RNA.	8 μ l
Transcriptasa reversa (20 U/ μ l).	2 μ l
Volumen total.	100 μl

1. dNTP= dATP, dTTP, dGTP y dCTP

Se incubó la mezcla en un termociclador (PCR MJ Research PTC-100) con el siguiente ciclo:

- a. 60 minutos a 42° C (alineación de oligo dT y síntesis de cDNA).
- b. 10 minutos a 95° C (temperatura de inactivación de la transcriptasa reversa).

Luego de terminado el ciclo, las muestras se refrigeraron a -20°C, para evitar que se desnaturalice el cDNA. El volumen total resultante es suficiente para 9 reacciones de la PCR.

5.3.3. Amplificación del DNA: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para llevar a cabo la PCR (66) se utilizaron los siguientes componentes de la reacción: 1) ADN-polimerasa termoestable** (50 mU/μl), proveniente de *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa); 2) Desoxinucleótidos trifosfato** (dNTP) (320 μM de cada uno); 3) MgCl₂** (1.2 mM); 4) Buffer PCR**, que contiene: Tris-HCl (10 mM, pH 8.3), KCl (50 mM), y gelatina (1.0 μg/ml); 5) Formamida y Glicerol (1% c/u) (Sigma); 6) muestra de RT (cDNA); 7) iniciadores específicos (30 μM); y 8) Agua DEPC, para ajustar el volumen a 50 μl en cada reacción.

Los iniciadores específicos (oligonucleótidos) fueron diseñados a partir de secuencias humanas (Gene Bank), y se mandaron sintetizar a Gibco BRL (Tabla 2). Se utilizó β actina como control interno, con iniciadores específicos diseñados de la misma manera.

Procedimiento:

Se preparó una mezcla con las soluciones indicadas en la Tabla 3, adicionadas en orden y en las cantidades indicadas, en un tubo eppendorf de 1.5 ml.

Se dividió el volumen total en 9 partes (35.5 μl cada una) en tubos eppendorf de 0.5 ml y se adicionaron a cada una las soluciones indicadas en la Tabla 4.

Tabla 2. Secuencias de iniciadores específicos.

MOLECULA		SECUENCIAS DE INICIADORES
β-Actina	Sentido	5' CCC AGG CAC CAG GGC GTG AT 3'
	Antisentido	5' TCA AAC ATG ATC TGG GTC AT 3'
AP	Sentido	5' ACC GCT TAC CTC TGC GGN GTN AA 3'
	Antisentido	5' AC GTG GGT GTG GTC AGC NGT NAC 3'
Col I	Sentido	5' CGG GTC GAC AGC GCT GGT TTC GAC TTC A 3'
	Antisentido	5' CGG GAA TCC CAG TCT GCT GGT CCA TGT A 3'
OPN	Sentido	5' TTC GGA TGA GTC TGA TGA GAC C 3'
	Antisentido	5' GGA AGA ACA GAA GCA AAG TGC 3'
BSP	Sentido	5' ACG CCA CAC TTT CCA CAC TCT C 3'
	Antisentido	5' GTT CCT TCT GCA CCT GCT TCA G 3'
OC	Sentido	5' GAG TCC TGA GCA GCA GCC CAG C 3'
	Antisentido	5' GGT GCC TGG AGA GGA GCA GAA C 3'
ONC	Sentido	5'GAT CCA TGA GAA TGA GAA GCG 3'
	Antisentido	5'CTA TGT TAG CAC CTT ATC CCC 3'
BMP-2	Sentido	5' ACC CGG GAG AAG GAG GAG G 3'
	Antisentido	5' CGC ACA GTG TTG GCT CGG 3'
BMP-4	Sentido	5' GCC ATT CCG TAG TGC CAT CC 3'
	Antisentido	5' TCT TGC TAG GTG CGG GC 3'

N= C, G, A o T.

Tabla 3. Mezcla inicial para la PCR.

Componentes	Volumen
	9 X
MgCl ₂ (30 mM).	18 µl
Buffer PCR 10 X	45 µl
dNTP ¹ (2 mM c/u).	72 µl
Formamida	4.5 µl
Glicerol	4.5 µl
Agua DEPC	175.5 µl
Volumen total	319.5 µl

1. dNTP= dATP, dTTP, dGTP y dCTP.

Tabla 4. Mezcla de reacción para la PCR.

Componentes	Volumen
	1 X
Solución anterior.	35.5 µl
Iniciador sentido (0.75 mM).	2 µl
Iniciador antisentido (0.75 mM).	2 µl
Muestra de RT (cDNA).	10 µl
Amplificasa.	0.5 µl
Volumen total	50 µl

Se colocaron los tubos en el termociclador con el siguiente programa:

1. 5 minutos a 95°C (temperatura de desnaturalización de RNA-cDNA)
2. 40 ciclos de:
 - A. 1 min a 94°C (temperatura de desnaturalización del cDNA).
 - B. 1 min a 50°C (temperatura de alineamiento de iniciadores).

C. 1 min a 72°C (temperatura de amplificación de iniciadores).

3. 5 min 72°C (temperatura de desnaturalización de la amplificasa).

Luego de terminado el programa, las muestras se guardaron a -20°C para evitar que el cDNA se desnaturalice.

5.3.4. Revelado de productos de amplificación: Electroforesis de cDNA.

Para identificar los productos de cDNA generados por la PCR, las muestras se corrieron en una electroforesis horizontal con geles de agarosa.

Preparación de geles de agarosa.

En 100 ml de buffer TAE 1X, se adicionaron 4 g de agarosa, se calentó hasta la completa disolución de la agarosa y se repuso el agua perdida por evaporación. Se dejó enfriar hasta una temperatura aproximada de 45° C; la cantidad suficiente fue vertida en la cámara de electroforesis y se colocó el peine adecuado, para obtener un gel de tamaño, grosor y número de carriles deseados. Una vez gelificado fue retirado el peine y se colocó el gel en la cámara en posición adecuada para la electroforesis (65).

Electroforesis.

Se colocó el gel en la cámara de electroforesis; se llenó la cámara con buffer de TAE 1X y fueron colocados 15 µl de cada una de las muestras mezclándolas previamente con 7 µl de colorante para DNA (azul de bromofenol 3X). De igual forma se colocaron 5 µl de un marcador de bajo peso molecular**.

Una vez colocadas las muestras y marcador, se cerró la cámara y se conectó a la fuente de poder, se corrió con un voltaje de 80-90 volt, durante 1 ½ horas o hasta que el colorante recorriera aproximadamente ¾ del largo del gel.

El gel fue teñido con bromuro de etidio (1%) y destañido en agua; las bandas de los productos se visualizaron con un transiluminador de luz UV y fueron tomadas las respectivas fotografías.

6. RESULTADOS.

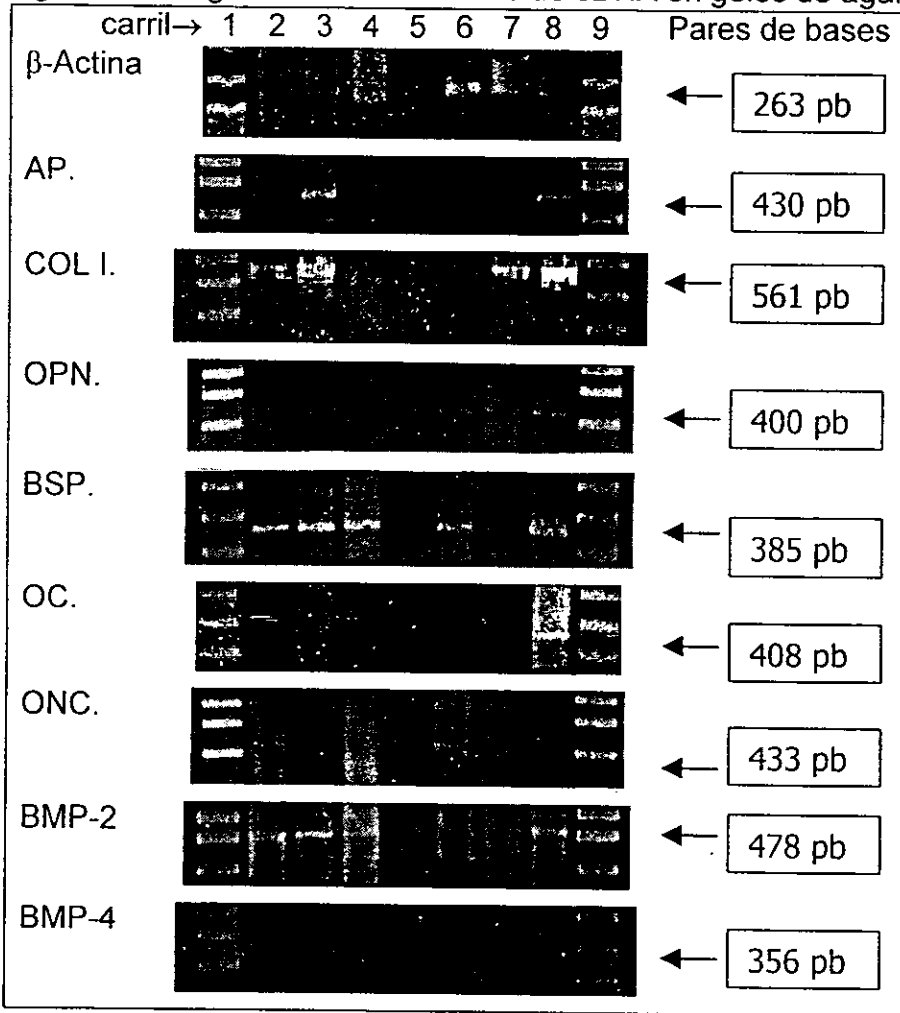
Las células (cementoblastos y osteoblastos) se cultivaron durante 7, 14 y 21 días en presencia de dexametasona, la cual es un importe glucocorticoide regulador de la proliferación y diferenciación celular (67,68). Al término de su cultivo, se extrajo el RNA total y fue cuantificado espectrofotométricamente (Tabla 5), como se indica en el apartado de Material y Métodos. Además se observó su grado de pureza relativo con relación 260/280, la cual debe ser mayor de 1.8.

Tabla 5. Determinación de la concentración de RNA total.

	Abs. (260nm)	Abs. (280nm)	260/280	Conc. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Cem. 7	0.0714	0.0245	2.9186	2.856
Cem. 14	0.1009	0.0493	2.0467	4.036
Cem. 21	0.0580	0.0185	3.1296	2.320
Osteo. 7	0.0266	0.0095	2.8000	1.064
Osteo. 14	0.0259	0.0069	3.7536	1.036
Osteo. 21	0.0536	0.0214	2.5077	2.144

El RNA total se sometió a las reacción de la RT para obtener el cDNA de cada RNA mensajero presente y luego se realizó la reacción de PCR (ver Material y Métodos), para amplificar el cDNA de las nueve moléculas buscadas. Las muestras obtenidas se corrieron en una electroforesis horizontal; para cada molécula buscada se corrió un gel y se tomó una fotografía a cada uno (Figura 2). Las bandas correspondientes al cDNA de las moléculas buscadas se identificaron con sus pesos moleculares correspondientes (Tabla 6). La concentración en cual se encontraban no se determinó, únicamente se estimo dependiendo de la intensidad con la cual se observan las bandas (Tabla 7).

Figura 2. Fotografías del corrimiento de cDNA en geles de agarosa.



Carril 1: marcador de bajo peso molecular.

Carril 2: cementoblastos de 7 días de cultivo celular.

Carril 3: cementoblastos de 14 días de cultivo celular.

Carril 4: cementoblastos de 21 días de cultivo celular.

Carril 5: control negativo .

Carril 6: osteoblastos de 7 días de cultivo celular.

Carril 7: osteoblastos de 14 días de cultivo celular.

Carril 8: osteoblastos de 21 días de cultivo celular.

Carril 9: marcador de bajo peso molecular.

Tabla 6. Pesos moleculares de los cDNAs buscados.

MOLECULA	PESO MOLECULAR
β -Actina	263 pb
AP	430 pb
Col I	561 pb
OPN	400 pb
BSP	385 pb
OC	408 pb
ONC	433 pb
BMP-2	478 pb
BMP-4	356 pb

Tabla 7. Presencia de moléculas en Cementoblastos y Osteoblastos Humanos.

	tiempo de incubación de las células					
	Cementoblastos.			Osteoblastos.		
	7 días	14 días	21 días	7 días	14 días	21 días
1- β -Actina.	+	+	+	+	+	+
2- AP.	+	++	-	-	-	++
3- Col I.	++	+++	+	+	+++	>+++
4- OPN.	+	+	+	+	+	+
5- BSP.	++	++	++	++	+	++
6- OC.	-	-	-	-	-	+
7- ONC.	+	-	-	+	-	-
8- BMP-2.	++	++	++	-	+	++
9- BMP-4.	-	-	-	-	-	-

-: ausencia de mRNA.

+: presencia.

++: presencia considerable.

+++: presencia abundante.

El mRNA de β -actina se encontró en ambos tipos de células y para todos los tiempos de cultivo celular.

El mRNA de AP fue detectado en cementoblastos de 7 y 14 días, pero no a los 21 días; en cambio en osteoblastos, solo se detectó a los 21 días de cultivo celular.

El mRNA de Col I se encontró en ambos tipos celulares y en todos los tiempos observados, pero en concentraciones diferentes. En cementoblastos comienza a los 7 días con una concentración considerable para aumentarla a los 14 días y baja notablemente a los 21 días de cultivo. En osteoblastos la concentración va aumentando conforme aumentan el tiempo de cultivo.

El mRNA de OPN fue encontrado en todos los tiempos de cultivo observados en cementoblastos y osteoblastos en cantidad pequeña pero perceptible.

El mRNA de BSP se observó en concentraciones apreciables en todas las reacciones realizadas.

El mRNA de OC fue encontrado únicamente en osteoblastos de 21 días de cultivo celular.

El mRNA de ONC se detectó solo a los 7 días de cultivo en ambos tipos celulares.

El mRNA de BMP-2 se encontró en cementoblastos en todos los tiempos en concentración constante y apreciable. En osteoblastos no se encontró a los 7 días, pero sí a los 14 y 21 días en concentración creciente.

No se detectó el mRNA de BMP-4 en ningún tiempo de ninguno de los tipos celulares.

La sensibilidad del método utilizado permite detectar hasta 10 moléculas de mRNA específico. Teóricamente 0.1 pg de RNA total serían suficientes para lograr detectar, en un gel de agarosa, al menos 5 ng de DNA amplificado (sensibilidad límite de la tinción con bromuro de etidio). En nuestros ensayos utilizamos 5 μ g de RNA total; por lo que consideramos que la molécula no se expresa si no aparece la banda de cDNA amplificado.

7. DISCUSION.

En este estudio se observó la expresión temporal de proteínas, que se considera tienen importancia en el proceso de mineralización en cementoblastos y osteoblastos humanos. Siendo el patrón de expresión diferente como se esperaba (Tabla 8), tanto en presencia o ausencia de la expresión como en la concentración aparente (apreciación visual únicamente).

Anteriormente los cementoblastos han sido caracterizados únicamente en tejido, utilizando una descripción histológica e inmunohistoquímica, además de hibridación *in situ*, para determinar la localización y expresión de proteínas específicas, respectivamente. Diversos estudios han provisto valuable información de la histología del cemento y de la expresión o secreción de proteínas de células *in situ* (52-54,63,71-73). Se ha observado en cemento maduro de humano, que contiene numerosas proteínas similares a las que se encuentran en hueso, incluyendo fibronectina, BSP, OPN, OC, y colagena tipo I (56,57). Estudios subsecuentes han deducido la expresión espacial y temporal de proteínas asociadas a hueso incluyendo BSP, OPN, y OC durante la cementogénesis en ratas y ratones (52,73,74), y se ha demostrado que OPN y BSP son los componentes mayoritarios del cemento, y que estas proteínas son secretadas por los cementoblastos de la periferia del tejido ya mineralizado (51). Usado hibridación *in situ*, se identificaron mRNAs de BSP, OPN, y OC, en células de la superficie de la raíz durante la cementogénesis (52), además la expresión de mRNA ha mostrado correspondencia con la localización de proteínas en cemento en tiempos específicos de su desarrollo (52,74).

Para conocer la expresión temporal de algunas proteínas asociadas con cementoblastos y distinguir dicho patrón del presentado por hueso, buscamos proteínas descritas como específicas de cemento (OPN, BSP), y otras descritas en el proceso de mineralización en hueso (AP, Col I, OC, ONC BMP-2 y -4) para observar el comportamiento en ambos linajes. Para este propósito se utilizaron células de cementoma humano (64), que se aislaron con el fin de estudiar y entender los factores y mecanismos de regularización de los cementoblastos, y con ello

comprender la formación y/o regeneración del tejido periodontal. Estas células y los osteoblastos humanos fueron cultivadas por 7, 14 y 21 días (tiempo que representa la iniciación de la cementogenesis), y después se realizó el ensayo para determinar la expresión de mRNAs de las proteínas de interés.

Encontramos que para ambos tipos celulares, la presencia de mRNAs de Col I, OPN y BSP es similar. Dichas proteínas se expresan a los tres tiempos observados, sugiriendo que para ambos tipos celulares sus necesidades respecto a la función de dichas moléculas es semejante en tiempo y quizás en función. Existe evidencia que sugiere que BSP está involucrada en la iniciación de la mineralización (51-53,70,75,76), por lo cual es un marcador de la biomineralización; también durante el desarrollo de molares de ratón, la expresión y secreción de BSP por células de la raíz coincide con la cementogénesis (52). La OPN es una glicoproteína fosforilada, rica en ácido siálico, con el cual forma complejos con osteocalcina (77) y colágena (78). Originalmente se aisló de hueso, y ahora se sabe que está presente en una gran variedad de tejidos. La función que se ha deducido para la OPN en la mineralización del tejido incluye el control de la migración y la adhesión de osteoblastos y osteoclastos, además de la regulación del crecimiento de los cristales (51,64,75,76,79).

El mRNA de ONC se encontró en ambos tipos celulares, solo cuando las células tenían 7 días de cultivo. Esta molécula es capaz de facilitar la mineralización por su afinidad al calcio, hidroxapatita y colágena tipo I. Es posible que esta proteína reaparezca en otra etapa más avanzada del desarrollo y que no observamos aquí.

El mRNA de BMP-4 no se encontró a ningún tiempo de cultivo de ambas líneas celulares. La BMP-4 está implicada fuertemente en el proceso de formación embrionaria y en la formación de cartílago y hueso. El mRNA de BMP-2 se encontró en ambos tipos celulares, pero se presentó primero en cementoblastos. La BMP-2 es de la misma familia que la BMP-4 y por tanto tiene funciones semejantes, por lo cual compensa la ausencia de la 4. Ambas moléculas también proveen la información necesaria para la formación de diversos tejidos.

El mRNA de AP se presenta primero en los cementoblastos, sugiriendo que la mineralización pudiese empezar primero en cemento. Se ha observado que existe una relación entre la actividad de la AP y la producción de cemento acelular (41). Por otra parte el mRNA de OC solo se encontró a los 21 días de cultivo de osteoblastos. La OC o proteína Gla de hueso, está involucrada con la mineralización de la matriz extracelular, que se cree es exclusiva de hueso, pero se ha encontrado en la raíz durante la etapa primaria de la cementogénesis.

8. CONCLUSION.

El proceso de mineralización es semejante en ambos tipos celulares, y las diferencias observadas aquí fueron que el proceso comienza primero en cementoblastos, independientemente de ser más lento, y que al menos en el tiempo de observación realizado, los cementoblastos no expresan mRNA de OC, por lo cual, podría ocuparse como marcador celular en esta etapa de su desarrollo.

La enfermedad periodontal es una enfermedad mundial, que frecuentemente termina con la pérdida de piezas dentales. Se cree que el cemento tiene un papel crucial en el proceso de regeneración del tejido en conjunto, luego de haberse visto afectado por la enfermedad. A pesar de la naturaleza de la enfermedad, se desconoce el mecanismo de acción, tanto a nivel celular como a nivel molecular, de la función de los cementoblastos. Por lo que la caracterización de esta línea celular en cultivo, permitirá obtener información para comprender la función de los cementoblastos en el proceso global de la mineralización del tejido, con lo cual pueden desarrollarse terapias para la regeneración de tejido periodontal.

9. BIBLIOGRAFIA.

1. Page RC and Baab DA. A new look at the etiology and pathogenesis of early-onset periodontitis. Cementopathia revisited. *J Periodontol.* 156:748, 1985.
2. Ramakrishnan PR, Lin WL, Sodek J and Cho MI. Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells invitro. *Calcif Tissue Int.* 57:52, 1995.
3. Pitaru S, McCulloch CA and Narayanan SA. Cellular origins and differentiation control mechanism during periodontal development and wound healing. *J Periodont Res.* 29:81, 1994.
4. Lindhe J. *Periodontología Clínica.* 2a edición. Ed. Panamericana. México. 1990.
5. Baker CW. Relation of the alveolus to the cementum-enamel junction following attritional wear in aboriginal skulls. An enquiry into the normality of cementum exposure with aging. *J Periodontol.* 46:357, 1975.
6. Balazs EA Ed. *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix.* New York Academic Press. vols. I-III, 1970.
7. Henry JL and Weinmann JP. The pattern of resorption and repair of human cementum. *J Am Dent Assoc.* 42:270, 1971.
8. Orban B. *Oral Histology and Embryology.* 4th Ed. St. Louis, C.V. Mosby, 1970.
9. Provenza VD. *Oral Histology, Inheritance and Development.* Philadelphia, JB. Lippincott Co., 1980.
10. D' Errico JA, Macneil RL, Takata T, Berry J, Strayhom C and Somnerman MJ. Expression of bone associated markers tooth root lining cell. In situ and in vitro. *Bone.* 20:117, 1997.
11. MacNeil RL, Somerman MJ. Molecular factors regulating development and regeneration of cementum. *Periodont Res.* 28:550, 1993.
12. Dieter D, Bosshardt and Selvig KA. Dental Cementum: Dynamic tissue covering of the root. *Periodontology 2000.* 13:41, 1997.
13. Smith AJ, Leaver AG and Smith G. The amino-acid composition of the non-collagenous organic matrix of human cementum. *Arch Oral Biol.* 28:1047, 1983.

14. Kagayama M, Li H, Zhu J, Sasano Y, Hatakeyama Y and Misoguchi Y. Expression of osteocalcin in cementoblasts forming acellular cementum. *J Periodont Res.* 32:273, 1997.
15. Olson S, Arzate H, Narayanan AS and Page RC. Cell attachment activity of cementum proteins and mechanism of endotoxin inhibition. *J Dental Research.* 70:1272, 1991.
16. Bartold PM, Miki Y, McAllister B, Narayanan AS, and Page RC. Glycosaminoglycans of human cementum. *J Periodont Res.* 23:13, 1988.
17. Bartold PM and Page RC. Isolation, identification, and quantitation of Glycosaminoglycans synthesized by human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodont Res.* 20:284, 1985.
18. Genco GC. *Periodoncia.* Ed. Panamericana, 1993.
19. Bosshardt DD, Schroeder HE. Cementogenesis reviewed: comparison between human premolars and rodent molars. *Anat Rec.* 245:267, 1996.
20. Schroeder H, Jean KW and Friedman M. Biological problems of regenerative cementogenesis: Synthesis and attachment of collagenous matrices on growing and established root surface. *Rev Cytology.* 142:1, 1993.
21. Listgarden MA, Grant AD, Stern BI. *Periodontics.* Ed. Mosby, 1988.
22. Selving KA. An ultrastructural study of cementum formation. *Acta Odont Scand.* 22:105, 1964.
23. Selving KA. The fine structure of human cementum. *Acta Odont Scand.* 23:423, 1965.
24. Ishikawa G. Microradiographic study of cementum and alveolar bone. *J Den. Res.,* 49:936, 1964.
25. Hürzeler B and Zander HA. Cementum apposition in periodontal diseased teeth. *Helv Odontol Acta.* 1:1, 1957.
26. Zander HA and Hürzeler B. Continuous cementum apposition. *J Dent Res.* 37:1035, 1958.
27. Lindskog S and Blomlöf L. Cementum hypoplasia in teeth affected by juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol.* 10:443, 1983.

28. Jande SS and Bélanger LF. Fine structural study of rat molar cementum. *Anat Rec.* 167:439, 1970.
29. Listgarten MA. Afibrillar dental cementum in the rat and hamster. *J Periodont Res.* 10:158, 1975.
30. Paynter KJ and Purdy G. A study of the structure, chemical nature, and development of cementum in the rat. *Anat Rec.* 131:223, 1958.
31. Selving KA. Electron microscopy of Hertwig's epithelial sheath and of early dentin and cementum, formation in the mouse incisor. *Acta Odont Scand.* 21:175, 1963.
32. Selving KA. Ultrastructural changes in cementum and adjacent connective tissue in periodontal disease. *Acta Odont Scand.* 24:459, 1966.
33. Selving KA and Selving SK. Mineral content of human and seal cementum. *J Dent Res.* 41:624, 1962.
34. Stern IB. An electron microscopic study of the cementum, Sharpey's fibers and periodontal ligament in the rat incisor. *Am J Anat.* 115:377, 1964.
35. Owens PDA. Patterns of mineralization in the roots of premolar teeth dogs. *Arch Oral Biol.* 20:709, 1975.
36. Owens PDA. The root surface in human teeth: A microradiographic study. *J Anat.* 122:389, 1975.
37. Owens PDA. Ultrastructure of Hertwig's epithelial root sheath during early root development in premolar teeth in dogs. *Arch Oral Biol.* 23:91, 1978.
38. Schroeder HE. *Oral Structural Biology.* George Thieme Verlag, Stuttgart, Germany. 144-170, 1991.
39. Stefan P, Sven L and Ake F. Mineralization and cementoblast attachment to original and reparative cementum. *J Dent Res.* 98:295, 1990.
40. Beertsen W, Van S and Boos T. Alkaline phosphatase induces the deposition of calcified layers in relation to dentin: an in vitro study to mimic the formation of afibrillar acellular cementum. *J Dent Res.* 70:176, 1991.
41. Groeneveld MC, Evert V and Beertsen W. Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingiva of the rat molar: its relation to cementum formation. *J Dent Res.* 74:1374, 1995.

42. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc. New York. 1983.
43. Rodan GA. Osteopontin Overview. *Ann N Y Acad Sci*. 760:1, 1996.
44. Denhardt DT and Gao X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB*. 7:1475, 1993.
45. Bélanger LF. Resorption of cementum by cementocyte activity (cementolysis). *Calcif Tissue Res*. 2:229, 1968.
46. McKee MD and Nanci A. Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover and repair. *Microsc Res Tech In Press*. 1994.
47. MacNeil RL, Berry J, D'errico J, Strayhorn C and Somerman MJ. Localization and expression of osteopontin in mineralized and nonmineralized tissues of the periodontium. *Ann NY Acad Sci*. 760:166, 1995.
48. Somerman MJ, Sauk JJ, Foster RA, Dickerson K, Norris K, and Argraves WS. Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum. *J Periodont Res*. 26:10, 1991.
49. Fujisawa R, Butler WT, Brunn JC, Zhou HY and Kuboki Y. Differences in composition of cell-attachment sialoproteins between dentin and bone. *J Dent Res*. 72:1222, 1993.
50. Kasagai S, Nagata T, and Sodek J. Temporal studies on the tissue compartmentalization of bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), and SPARC protein during bone formation in vitro. *J Cell Physiol*. 152:467, 1992.
51. Sodek J, Chen J, Kasugai S, Nagata T, Zhang Q, McKee MD, and Nanci A. Elucidating the functions of bone sialoprotein and osteopontin in bone formation. *Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*. 7:307, 1992.
52. Chen JC, Shapiro HS and Sodek J. Developmental expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. *J Bone Min Res*. 7:987, 1992.
53. Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD and Gedron RP. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif. Tissue Int*. 49:421, 1991.

54. Macneil RL, Sheng N, Strayhorn C, Fisher LW and Somerman MJ. Bone Sialoprotein is Localized to the Root Surface During Cementogenesis. *J Bone Mineral Res.* 9:1597, 1994.
55. MacNeil RL, Berry J, Strayhorn C and Somerman MJ. Expression of bone sialoprotein mRNA by cells lining the mouse tooth root during cementogenesis. *Archs oral Biol.* 41:827, 1996.
56. Hauschka PV, Wians Jr FH. Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone. *Anat Rec.* 224:180, 1989.
57. Heinegard D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J* 3:2042, 1989.
58. McKee MD, Glimcher MJ, Nancy A. High-resolution immunolocalization of osteopontin and osteocalcin in bone and cartilage during endochondral ossification in the chicken tibia. *Anat Res.* 234:479, 1992.
59. Bronckes ALJJ, Farach-Carson MC, Waveren EV, Butler WT. Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin, and dentin sialoprotein during root formation and early cementogenesis in the rat. *J Bone Min Res.* 9:833, 1994.
60. Lyons K, Pelton RW and Hogan BLM. Organogenesis and pattern formation in the mouse; RNA distribution patterns suggest a role for Bone Morphogenetic Protein-2A (BMP-2A). *Development.* 109:833, 1990.
61. Wozney JM. Bone Grafts. Derivates and substitutes, Eds. Urist, M.R., O'Conner, B.T., 397-413, 1994.
62. Lee MB. Bone morphogenetic proteins: background and implications for oral reconstruction. *J Clin Periodontol.* 24:335, 1997.
63. Schroeder HE. Biological problems of regenerative cementogenesis: synthesis and attachment of collagenous matrices on growing and established root surfaces. *Int Rev Cytol.* 142:1, 1992.
64. Arzate H, Olson SW, Page RC and Narayanan AS. Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in culture. *Bone Miner.* 18:15, 1992.

65. Chomczynski P and Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem.* 162:156, 1987.
66. Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
67. Innis MA, Gelfand DH and Sninsky. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, Inc. 482 p, 1990.
68. McCulloch and Tenenbaum HC. Dexamethasone induces proliferation and terminal differentiation of osteogenic cells in tissue culture. *Anat Rec.* 215:397, 1986.
69. Bellows CG, Heersche JNM and Aubin JE. Determination of the capacity for proliferation and deafferentation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. *Developmental Biol.* 140:132, 1990.
70. Bellows CG and Aubin JE. Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells in vitro. *Dev Biol.* 133:8, 1989.
71. Birkedal-Hansen H, Butler WT and Taylor RE. Proteins of the periodontium. Characterization of the insoluble collagens of bovine dental cementum. *Calcif Tissue Res.* 23:39, 1977.
72. Chen Y, Bal BS and Gorski JP. Calcium and collagen binding properties of osteopontin, bone sialoprotein, and bone acidic glycoprotein-75 from bone. *J Biol Chem.* 267:24871, 1992.
73. Lekic P, Sodek J and McCulloch C. Osteopontin and bone sialoprotein expression in regenerating rat periodontal ligament and alveolar bone. *Anat Rec.* 244:50, 1996.
74. Takano-Yamamoto T, Takemura T, Kitamura Y and Nomura S. Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteocalcin and osteopontin revealed by in situ hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. *J Histochem Cytochem.* 42:885, 1994.
75. Fisher LW, Whitson SW, Avioli LV and Termine JD. Matrix sialoprotein of developing bone. *J Biol Chem.* 258:12723, 1983.

76. Hunter GK and Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: Role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Bioch J.* 302:175, 1994.
77. Ritter NM, Farach-Carson MC and Butler WT. Evidence for the formation of a complex between osteopontin and osteocalcin. *J Bone Miner Res.* 7:877, 1992.
78. Chen J, McKee MD, Nanci A and Sodek J. Bone sialoprotein mRNA expression and ultrastructural localization in fetal porcine calvarial bone: comparisons with osteopontin. *J Histochem.* 26:67, 1994.
79. Nishimura K, Hayashi M, Matsuda K, Shigeyama Y, Yamasaki A and Yamaoka A. The chemoattractive potency of periodontal ligament, cementum and dentin for human gingival fibroblast. *J Periodontal Res.* 24:146, 1989.