

Expresión de la proteína de adherencia del cemento(CAP) con medios condicionantes de cementoblastos, osteoblastos y células de ligamento periodontal

■ TRUJILLO NIEVA MR,* ARZATE H" ■

El propósito de este estudio fue identificar subpoblaciones celulares en el ligamento periodontal. Cementoblastos y osteoblastos que expresen el fenotipo cementoblástico utilizando el anticuerpo policlonal anti-CAP como marcador. Los grupos celulares que se obtuvieron: los cementoblastos de un cementoblastoma humano. Los osteoblastos de fragmentos de hueso obtenidos por un procedimiento quirúrgico de tercer molar y Las células del ligamento periodontal raspando el ligamento de premolares extraídos. Todos estos procedimientos se realizaron en la Unidad de Posgrado de la Facultad de Odontología de la UNAM. Se realizaron los cultivos celulares respectivos y se obtuvieron además de cada grupo celular sus medios condicionantes (cementoblastos, osteoblastos y células de ligamento periodontal). Finalmente, se inmunotizaron y se aplicó el anticuerpo anti-CAP, los resultados se expresaron como Media $\pm$ Error estándar y el análisis estadístico se realizó con el paquete *Sigma Plot*, utilizando la prueba de t de Student con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Con los resultados obtenidos se pudo demostrar que hay una regulación homeostática de la proteína de adherencia del cemento radicular en los tres grupos celulares estudiados.

Palabras clave: cemento, cementogénesis, proteína de adherencia (CAP), anticuerpo anti-CAP, osteoblastos, cementoblastos, células del ligamento periodontal.

The purpose of this study was to identify cellular subpopulation of cells in the periodontal ligament. Cementoblastic and osteoblastic lineages, that express cementum phenotype using the polyclonal antibody anti-CAP. The cellular lines were obtained as described: the lineages cementoblastic from a human Cementoblastoma, lineages osteoblastic from alveolar bone fragments obtained by a surgical procedure of third molar and the periodontal ligament lineages from extracted premolars, all these procedures were carried out at the Dental Surgery Department, School of Dentistry, UNAM, México. Conditioning medium was collected from each cell line. Cell culture how each cell type was treated with conditioning medium and tested for the expression of CAP. Results are expressed as mean $\pm$ SD and the statistical analysis was performed out with the package Sigma Plot, using the student t test with a level of significance of $p < 0.05$. Results showed that there is a homeostatic regulation of CAP.

Key words: Cementum, cementogenesis, polyclonal antibody anti-CAP, adherence protein (CAP) cementoblast, osteoblast, periodontal ligament cells.

INTRODUCCIÓN

El cemento radicular es un tejido conectivo mineralizado cuyas funciones son proveer el anclaje del diente en su alveolo, distribuir las fuerzas masticatorias, mantener el

espacio del ligamento periodontal, así como de mantener una constante relación oclusal.¹ El cemento radicular, además, posee características únicas, ya que no presenta aporte sanguíneo directo, inervación, ni drenaje linfático. A diferencia del hueso, no sufre procesos de remodelación de un modo fisiológico.²

* Alumna de la Especialidad en Endodoncia de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

*** Laboratorio de Biología Molecular y Celular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Este tejido mineralizado tiene características similares al hueso alveolar en cuanto a su composición orgánica e inorgánica. Asimismo, tanto los cementoblastos como los osteoblastos comparten marcadores biológicos como la fosfatasa alcalina (ALP), osteopontina (OPN) y sialoproteína ósea (BSP). Sin embargo, a la fecha no ha sido posible determinar los eventos que regulan el proceso de la cementogénesis. Esto, debido principalmente a que técnicamente ha sido imposible aislar linajes celulares que representen el fenotipo cementoblástico y a la baja actividad metabólica del cemento radicular implica procedimientos laboriosos para obtener suficiente cantidad de muestra y así poder estudiar sus propiedades biológicas.^{3,5}

El conocer los factores que regulan el proceso de la cementogénesis adquiere relevante importancia, ya que permitiría establecer terapéuticas predecibles para restablecer anatómica y funcionalmente el periodonto, que ha sido afectado por enfermedades periodontales y por secuelas de enfermedades pulpaes que afectan el periodonto. Para lograr este objetivo es preciso determinar las moléculas que regulan la diferenciación de células progenitoras de los cementoblastos y los eventos asociados a la deposición de este tejido mineralizado. Recientemente, hemos aislado una línea celular a partir de un cementoblastoma humano. La caracterización preliminar de esta línea celular ha demostrado que éstas expresan el fenotipo cementoblástico *in vitro* y depositan tejido mineralizado con similitudes composicionales, morfológicas y ultraestructurales al cemento celular humano.^{6,9} Así mismo, estas células producen una proteína de 56 kDa (proteína de adherencia del cemento radicular CAP), la cual ha mostrado promover la adhesión y diferenciación celular.^{10,11} Estas células permiten conocer el proceso de cementogénesis *in vitro* y producen la proteína de adherencia (CAP), único marcador biológico disponible a la fecha y que no parece estar presente en ningún otro tejido mineralizado.^{12,14}

De igual manera, se ha producido un anticuerpo policlonal contra esta molécula (anti-CAP) que ha demostrado ser expresada únicamente por cemento y que por medio de ensayos de inmunotinción se demostró que dicho anticuerpo reconoce cemento, cementoblastos, cementocitos y células progenitoras en los espacios endosteales del hueso alveolar y células de localización perivascular en el ligamento periodontal *in vivo*. De esta forma, la homeostasis del periodonto está dada por una interregulación de los diferentes linajes celulares presentes en éste, por lo que es importante conocer los mecanismos moleculares que permiten el equilibrio de los tejidos mineralizados (cemento y hueso alveolar) y tejidos blandos (ligamento periodontal) de esta unidad anatómica y funcional.

El propósito de este estudio fue identificar la proporción de

subpoblaciones celulares presentes en los fibroblastos del ligamento periodontal, cementoblastos y osteoblastos que expresen el fenotipo cementoblástico, utilizando el anticuerpo policlonal anti-CAP como marcador.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo celular

Se formaron tres grupos celulares, el primero fue de cementoblastos, el segundo de fibroblastos y el tercero de osteoblastos. Las células cementoblásticas se obtuvieron de un paciente masculino de 38 años con diagnóstico previo de cementoblastoma, en la Unidad de Posgrado de la Facultad de Odontología de la UNAM, el cual fue corroborado posteriormente como un cementoblastoma por medio de análisis histológicos en el laboratorio de Patología de la misma institución. El espécimen quirúrgico fue transportado en medio de cultivo esencial Dullbecco (DMEM), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%. El tejido blando (del cementoblastoma) fue raspado y los fragmentos de tejido macerados con una hoja de bisturí descartado. El tejido así obtenido fue cortado en aproximadamente un mm², conteniendo tanto tejido blando como calcificado. Este tejido fue colocado en cajas de cultivo de 25 cm² en medio DMEM, suplementado con 10% de SFB, 4% de suero humano y solución de antibióticos, compuesta por 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomycin. Las muestras fueron incubadas en un ambiente al 100% de humedad a 37°C en una atmósfera con 95% de aire y 5% CO₂. El medio de cultivo no fue cambiado hasta que se observó crecimiento significativo

Para el cultivo de cada grupo celular se utilizó un medio condicionante (de cementoblastos, osteoblastos y células de ligamento periodontal).

(día 14-20). Posteriormente, las células fueron tripsinizadas con 0.025% de tripsina bovina-EDTA y subcultivadas.

- a) Fibroblastos. Se obtuvieron de premolares que fueron extraídos por razones ortodóncicas de un paciente masculino de veinte años. Los dientes se enjuagaron con DMEM y se raspó el tercio medio de la raíz para obtener el tejido periodontal. Los explantes fueron sembrados y tratados como se describió anteriormente.
- b) Osteoblastos. Las células osteoblásticas humanas se obtuvieron de fragmentos de hueso alveolar obtenidos de un procedimiento quirúrgico de extracción de tercer molar. Estos fragmentos óseos, de aproximadamente 1 mm², se mantuvieron en las condiciones anteriormente descritas.

Para el cultivo de cada grupo celular se utilizó un medio condicionante (de cementoblastos, osteoblastos y células de ligamento periodontal) éstos se obtuvieron de cultivos confluentes de las tres líneas celulares (grupos de investigación) y de un modo independiente. Las monocapas fueron lavadas con 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) cuatro veces y posteriormente incubadas con 10 ml de PBS para eliminar restos de SFB. Las células fueron incubadas durante 48 horas en medio libre de suero y al término se recolectó y dializó contra PBS, posteriormente se liofilizó y reconstituyó en PBS. La concentración de proteínas en cada uno de los medios se determinó por el método de Bradford.

Inmunocitoquímica (CAP)

Se sembraron las células a una densidad de 1500 por pozo, en cajas lab-tek de ocho pozos, se adicionó el medio condicionante (25 µl- 5 µg de proteína) de células cementoblásticas a osteoblastos y fibroblastos del ligamento periodontal. El medio condicionante de fibroblastos de ligamento periodontal se adicionó a cementoblastos y osteoblastos; el medio condicionante de osteoblastos se adicionó a cementoblastos y fibroblastos del ligamento periodontal durante un periodo de tres, siete y catorce días. Al término, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 3.7%, lavadas con PBS e incubadas durante una hora a 4°C con el primer anticuerpo policlonal Anti-CAP, a una dilución de 1:300 en PBS + mg/ml de BSA. Posteriormente, las células se lavaron con PBS durante cinco minutos y fueron incubadas con el segundo anticuerpo (cabra anti-conejo) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) durante una hora a 4°C. Posteriormente, las laminillas se lavaron y fueron montadas en DABCO para evitar la pérdida de la señal fluorescente.

Como control negativo se inmunotñeron laminillas con suero preinmune de conejo. Se seleccionaron tres campos al azar y se contó el número de células positivas con un microscopio a un aumento de 20x.

Todos los resultados fueron expresados como Media ± Errores estándar. El análisis estadístico fue realizado por medio del paquete estadístico Sigma Plot (Jandel Scientific) para poder determinar diferencias entre los grupos controles y los grupos experimentales, utilizando la prueba de t de Student con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

En resumen los grupos quedaron de la siguiente forma:

Grupo	Células	Medio condicionante
a	Cementoblastos	Células del ligamento periodontal
b1	Células del ligamento periodontal	Cementoblastos
b2	Células del ligamento periodontal	Osteoblastos
e1	Osteoblastos	Células del ligamento periodontal
c2	Osteoblastos	Cementoblastos

A cada grupo se le hizo un grupo control en el cual no se les adicionó el medio condicionante.

RESULTADOS

Cementoblastos con ligamento periodontal (grupo a) (gráfica 1)

La expresión de CAP en el proceso de inmunotinción, en cementoblastos con medio condicionante de células del ligamento periodontal a los tres días, en relación con el grupo control, mostró un incremento significativo del grupo experimental de cementoblastos (64%).

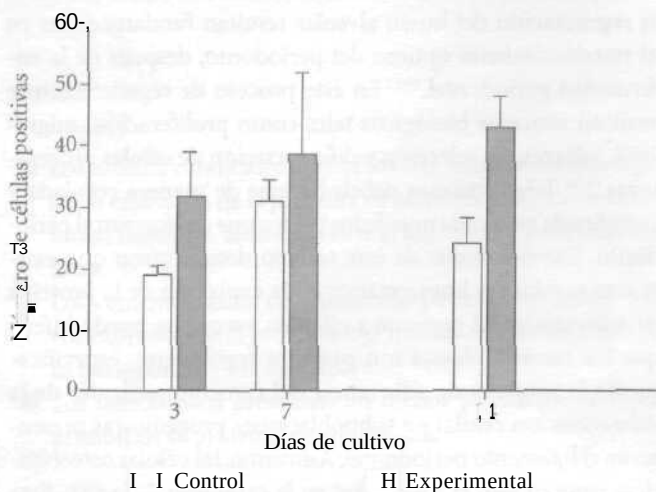
A los siete días, no hubo una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo experimental (26%).

En los resultados obtenidos a los catorce días de cultivo se observó un incremento en el grupo experimental de cementoblastos (79.16%) con relación al grupo control.

Fibroblastos con cementoblastos (grupo b1) (gráfica 2)

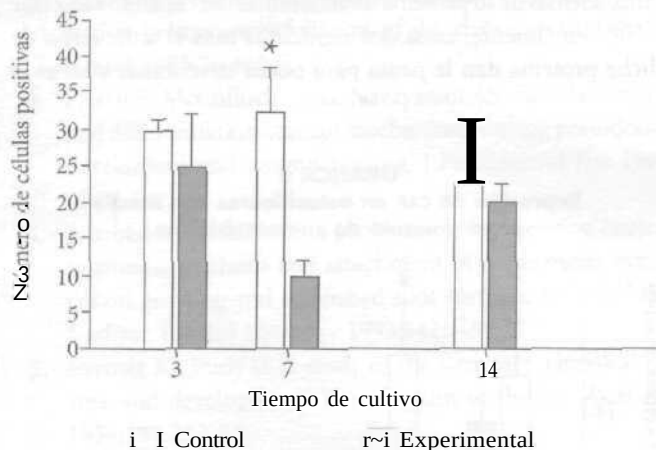
En esta línea celular, a los tres días, no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y las células tratadas

GRÁFICA 1
Expresión de CAP en cementoblastos con medio
condicionante de células de ligamento periodontal



La expresión de la proteína de adherencia no mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa en los tres grupos experimentales ($p < 0.05$).

GRÁFICA 2
Expresión de CAP células de ligamento periodontal
con medio condicionante de cementoblastos



* La expresión de CAP mostró un aumento del grupo control con respecto al experimental (36%) $p < 0.05$.

con el medio condicionante de cementoblastos del grupo experimental de fibroblastos, con un decremento de 84.43%. Para el día siete, también se observó un decremento en el grupo experimental, de células del ligamento periodontal (36%) en relación con el grupo control. Finalmente, en el día catorce no hubo diferencias significativas entre el grupo control y el grupo experimental de células del ligamento periodontal (81%).

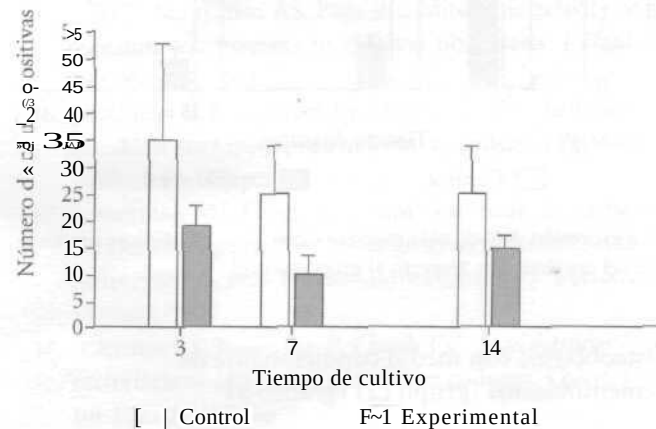
Fibroblastos con medio condicionante de osteoblastos (grupo b2) (gráfica 3)

En el día tres, la expresión de la proteína de adherencia del cemento radicular manifestó un incremento en el grupo experimental de fibroblastos (87.6%) en relación con el grupo control.

Al igual que en los días siete y catorce se observaron incrementos en comparación al grupo control.

En el día siete se observó un incremento para el grupo control de fibroblastos del 134%. Mientras que en el día catorce se observó un incremento para los fibroblastos (97%).

GRÁFICA 3
Expresión de CAP células de ligamento periodontal
con medio condicionante de osteoblastos



En este grupo celular no se manifestaron diferencias estadísticas significativas a los tres, siete, y catorce días, respectivamente.

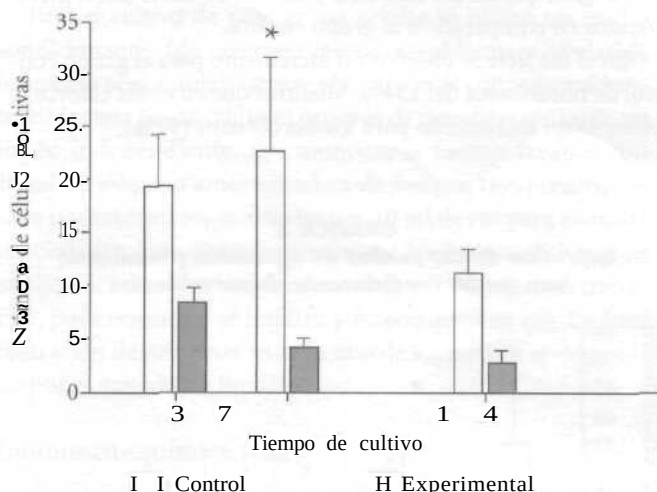
Las células obtenidas de un cementoblastoma humano permiten conocer el proceso de cementogénesis in vitro.

Osteoblastos con medio condicionante de fibroblastos (grupo el) (gráfica 4)

En el tercer día de cultivo hubo un decremento en la expresión de CAP del grupo de Osteoblastos (43%), en relación con el grupo control. Para el día siete, la expresión de CAP a la inmunotinción, presentó un incremento para el grupo experimental de Osteoblastos del 52%, con respecto al grupo control.

Para el día catorce, también hubo diferencias significativas entre el grupo control y el grupo experimental, presentando un incremento en Osteoblastos de 41%.

GRÁFICA 4
Expresión de CAP en Osteoblastos con medio condicionante de células del ligamento periodontal



* La expresión de CAP, sólo muestra diferencias estadísticas significativas el día siete, con respecto al grupo control.

Osteoblastos con medio condicionante de cementoblastos (grupo c2) (gráfica 5)

En el día tres hubo diferencias, un decremento en el grupo experimental de Osteoblastos del 65.5% en relación al grupo control, en cuanto a la expresión de CAP en Osteoblastos tratados con medio condicionante de cementoblastos.

En el día siete, también hubo un decremento en el grupo experimental de osteoblastos del 52%, en relación al grupo control.

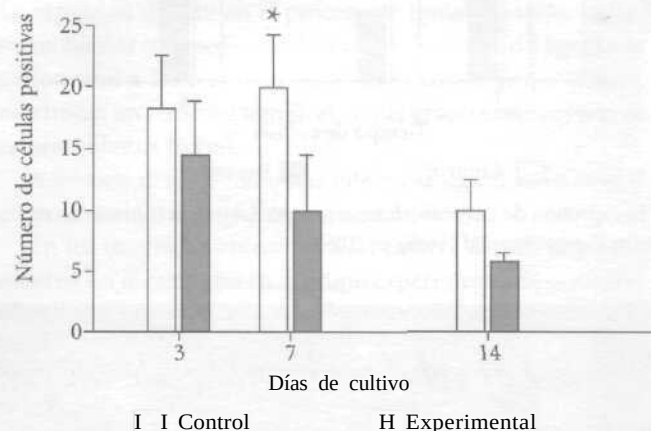
En cuanto al día catorce, se observaron un incremento del 88% del grupo experimental osteoblastos en relación al grupo control.

DISCUSIÓN

La importancia de la formación de nuevo cemento radicular y la regeneración del hueso alveolar resultan fundamentales en el restablecimiento óptimo del periodonto, después de la enfermedad periodontal.^{15,17} En este proceso de regeneración se realizan procesos biológicos tales como proliferación, migración, adherencia, selección y diferenciación de células progenitoras.^{18,20} Tales procesos deben hacerse de manera regulada y coordinada para cada uno de los tejidos que conforman el periodonto. Los resultados de este trabajo demostraron que existe una regulación homeostática en la expresión de la proteína de adherencia del cemento radicular, ya que se puede inferir que los cementoblastos son potentes reguladores, específicamente la proteína de adherencia del cemento radicular da la diferenciación celular en subpoblaciones progenitoras presentes en el ligamento periodontal. Asimismo, las células osteoblásticas parecen ejercer un control en la expresión de la CAP. Esto se correlaciona con hallazgos previos que demostraron que un bajo porcentaje de células osteoblásticas pudieran expresar el fenotipo cementoblástico o ser progenitoras de este linaje celular.

De esta manera, las células obtenidas de un cementoblastoma humano permiten conocer el proceso de cementogénesis *in vitro*, además de su proteína de adherencia del cemento radicular (CAP). Finalmente, estos dos elementos más el anticuerpo de dicha proteína dan la pauta para poder determinar cuál es el

GRÁFICA 5
Expresión de CAP en Osteoblastos con medio condicionante de cementoblastos



* Diferencia estadística del grupo experimental del día siete de un 65.5% con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

papel regulador de los cementoblastos que ejercen sobre la diferenciación celular y el depósito de matriz mineralizada en las células del ligamento periodontal y células osteoblásticas.

CONCLUSIÓN

- Los medios condicionantes de los tres linajes celulares regulan la expresión de la proteína de adherencia del cemento en forma diferente, al adicionarles el anticuerpo policlonal anticap.
- Los cementoblastos del ligamento periodontal tienen mayor expresión de la proteína CAP que las células del ligamento periodontal y los osteoblastos.
- Los osteoblastos presentan un menor porcentaje en la expresión de la proteína de adherencia.

REFERENCIAS

1. Page RC, Engel D, Narayanan AS, Clagett JA. Chronic inflammatory gingival and periodontal disease. *J Am Med Assoc* 1978;240:545-50.
2. Baab DA, Page RC, Morton T. Studies of a family manifesting premature exfoliation of deciduous teeth. *J Periodontol* 1985;56:403-9.
3. Pitaru S, McCulloch CAG, Narayanan AS. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodontol Res* 1994;29:81-94.
4. Schroeder HE. Biological problems of regenerative cementogenesis: synthesis and attachment of collagenous matrices on growing and established root surfaces. In: Friedman J, editor. *Int Rev Cytology* 1993;142:1-59.
5. Paynter KJ, Pudy G. A study of the structure, chemical nature and development of cementum in the rat. *Anat Rec* 1958;131:233-51.
6. Slavkin HC, Bessem C, Fincham AG, Bringas P, Santos V. Human and mouse cementum proteins immunologically related to enamel proteins. *Biochem Biophys Act* 1989;991:12-8.
7. Somerman MJ, Sauk JJ, Agraves WS, Morrison G. Expression of attachment proteins during cementogenesis. *J Biol Buccale* 1990;18:207-14.
8. Arzate H, Álvarez MA, Aguilar ME, Álvarez O. Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells *in vitro*. *J Periodontol Res* 1998;33:249-58.
9. Arzate H, Álvarez MA, Álvarez O, Wusterhaus A, Reyes J, Ximénez LA. Electron microscopy, micro-analysis and X-ray diffraction characterization of the mineral-like tissue deposited by human cementum tumor-derived cells. *I Dent Res* 2000;79:28-34.
10. Pitaru S, Narayanan AS, 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 Periodont Res* 1995;30:360-8.
11. McCulloch CAG. Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. *Anat Rec* 1985;21:258-62.
12. Arzate H. Preliminary characterization of epithelial root sheath cells *in vitro*. *Bol Est Med Biol Mex* 1994;42:27-30.
13. Arzate H, Chimal MJ, Hernández LL, Díaz LL. Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *J Periodontol Res* 1996;31:144-8.
14. Arzate H, Olson SW, Page RC, Gown AM, Narayanan AS. Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J* 1992;6:2990-5.
15. Miki Y, Narayanan AS, Page RC. Mitogenic activity of cementum components to gingival fibroblasts. *J Dent Res* 1987;66:1399-403.
16. McAlister B, Narayanan AS, Miki Y, Page RC. Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum. *J Periodontol* 1990;25:99-105.
17. Somerman MJ, Foster RA, Irnm GM, Sauk JJ, Archer SY. Periodontal ligament cells and gingival fibroblasts respond differently to attachment factors *in vitro*. *J Periodontol* 1989;60:73-77.
18. Christner P, Robinson P, Clarck CC. A preliminary characterization of human cementum collagen. *Calcif Tissue Int* 1977;23:147-50.
19. Reichert T, Storkel S, Becker K, Fisher LW. The role of osteonectin in human tooth development: An immunohistological study. *Calcif Tissue Int* 1992;50:468-72.
20. Bronckers ALJJ, Farach MC, Van Waveren E, Butler WT. Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin and dentin sialoprotein during dental root formation and early cementogenesis in rat. *J Bone Miner Res* 1994;9:833-41.