



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología  
Departamento de Medicina Legal y Forense

**EMDOGAIN ESTIMULA LA PRODUCCIÓN DE MARCADORES DE  
MINERALIZACIÓN Y DE LAS CITOCINAS IL-12 e IL-6.**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN QUE PRESENTA  
SERGIO EDUARDO NAKAGOSHI CEPEDA  
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN ODONTOLOGÍA  
POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

GRANADA, Diciembre de 2010.

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Sergio Eduardo Nakagoshi Cepeda  
D.L.: GR 1864-2011  
ISBN: 978-84-694-1302-9



**Dña. Aurora Valenzuela Garach**, Catedrática de Medicina Legal y Forense del Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Psiquiatría de la Universidad de Granada:

**CERTIFICA:** Que el trabajo de investigación que se expone en la presente Tesis: ***EMDOGAIN ESTIMULA LA PRODUCCIÓN DE MARCADORES DE MINERALIZACIÓN Y DE LAS CITOCINAS IL-12 e IL-6***, ha sido realizado bajo mi dirección por el licenciado **Don Sergio Eduardo Nakagoshi Cepeda** y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada, la presente Tesis ha sido revisada por mí y doy conformidad para que pueda ser presentada y aspirar al Grado de Doctor ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo el presente en Granada a dieciséis de diciembre de dos mil diez.

---

**Fdo.: Aurora Valenzuela Garach**

## **INDICE**

<b>RESUMEN.....</b>	<b>4</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>6</b>
<b>DERIVADO DE LA MATRIZ DEL ESMALTE .....</b>	<b>12</b>
<b>FACTORES DE MINERALIZACIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>CITOCINAS.....</b>	<b>22</b>
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
<b>ANÁLISIS DE FACTORES DE MINERALIZACIÓN.....</b>	<b>34</b>
<b>ANÁLISIS DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS .....</b>	<b>38</b>
<b>ANÁLISIS MORFOMÉTRICO .....</b>	<b>42</b>
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
<b>VI.CONCLUSIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>51</b>

## RESUMEN

El empleo de Emdogain (EMD) para el tratamiento de defectos óseos resulta en la mejora de los parámetros clínicos, aunque su mecanismo de acción y efectos fisiológicos no están completamente caracterizados. Con el fin de entender en parte el mecanismo de acción del EMD en este trabajo se evaluó el efecto EMD sobre la producción de factores de mineralización (Ameloblastina, Osteopontina, Osteocalcina, Osteoprotegerina) y sus posibles efectos adversos al analizar la producción de citocinas proinflamatorias (IFN-gama, TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, IL-12).

Para lograr esta evaluación se aislaron fibroblastos de tejido gingival, los cuales fueron incubados con el EMD. Posteriormente, se analizó por métodos inmunocitoquímicos la producción celular de los marcadores de mineralización. Por otra parte, se aislaron células mononucleares de sangre periférica y fueron incubadas con el EMD para analizar la producción celular de citocinas proinflamatorias por inmunocitoquímica.

En cuanto a la producción de factores de mineralización se observó un incremento significativo de células productoras de osteopontina ( $p < 0.01$ ), osteoprotegerina ( $p < 0.05$ ) y osteocalcina ( $p < 0.05$ ). No se encontró diferencia en la producción de ameloblastina entre células incubadas con EMD y el control. Se encontró un incremento significativo de células inmunoreactivas a IL-12 ( $p < 0.01$ ) e IL-6 ( $p < 0.05$ ), sin embargo, no se observó diferencia significativa en la cantidad de células inmunoreactivas a IL-1 beta, TNF-alfa o IFN-gama entre el control y las incubadas con el EMD.

El EMD estimula la producción de algunos factores de mineralización y presenta una buena biocompatibilidad.

## **I. INTRODUCCIÓN**

El empleo del derivado de la matriz del esmalte (EMD) para el tratamiento de defectos infraóseos resulta en la mejora de los parámetros clínicos, en términos de profundidad de sondaje, reducción y ganancia de inserción, comparado con colgajos de acceso o de Widman modificado. Aunque la cicatrización ocasionalmente es regeneración periodontal verdadera, esto no puede considerarse como un resultado predecible y reproducible, es decir, su mecanismo de acción y efectos fisiológicos no están completamente caracterizados. En este estudio se pretende investigar los efectos que tiene el EMD, particularmente sobre la inducción de glucoproteínas iniciadoras de mineralización y sobre la producción de citocinas proinflamatorias.

Los resultados nos permitirán entender en parte el mecanismo de acción del EMD. Además, se establecerán los modelos para evaluar el efecto sobre marcadores de mineralización de otras proteínas y factores de crecimiento

Este estudio, además, nos servirá para establecer los modelos de estudio para la evaluación de nuevas sustancias que pueden inducir la regeneración periodontal, tales como proteínas del esmalte aisladas (por ejemplo amelogenina, la cual es uno de los principales constituyentes del EMD) y factores de crecimiento relacionados al desarrollo dental.

## **ANTECEDENTES**

El periodonto de inserción son un conjunto de estructuras que se encargan de mantener el diente dentro del alvéolo, forman una unidad funcional y tienen el mismo origen embriológico. Los elementos que lo conforman son el hueso alveolar, cemento y el ligamento periodontal los cuales se originan al mismo tiempo que se lleva a cabo la formación de la raíz a partir de la capa interna del saco o folículo dentario.

## **CEMENTO**

El cemento es un tejido conjuntivo mineralizado que cubre la dentina en la porción radicular. Su función es servir como medio de anclaje para las fibras del ligamento periodontal. Por sus características histológicas es muy similar al tejido óseo ya que sus componentes orgánicos e inorgánicos son casi los mismos.

Composición química. La matriz del cemento contiene aproximadamente 50% de componentes inorgánicos, 22% de materia orgánica y 32% de agua. El componente inorgánico más importante es el fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita. Mientras el principal componente de la matriz orgánica está compuesta principalmente por colágeno tipo I.

El cemento se caracteriza por no tener vascularización e inervación, además de por no poseer la capacidad de remodelado. Los principales tipos celulares que encontramos en el cemento son:

*Cementoblastos:* se encuentran en la superficie del cemento del lado del ligamento periodontal y son las células encargadas de la secreción del cementoide (cemento inmaduro) que posteriormente es mineralizado.

*Cementocitos:* se llaman así los cementoblastos cuando éstos quedan incluidos en la matriz del cemento mineralizado. Se alojan en cavidades denominadas cementoplastos. Éstas células poseen prolongaciones citoplasmáticas las cuales se alojan en unos pequeños túneles denominados canalículos o calcóforos los cuáles permiten que se lleve a cabo la difusión de los nutrientes.

## **LIGAMENTO PERIODONTAL**

El ligamento periodontal es un tejido conjuntivo fibroso que a través de sus fibras une el diente al alvéolo. Además de ser el medio de unión del diente al alvéolo, soporta y resiste las fuerzas de la masticación, actúa como receptor sensorial propioceptivo.

Este tejido como cualquier tejido conjuntivo está formado por células, fibras y sustancia fundamental.



Algunas de las células que forman el ligamento periodontal tenemos:

*Fibroblastos:* es la célula forma los componentes de la matriz extracelular como el colágeno, proteoglucanos y elastina.

*Osteoblastos:* cubren la superficie alveolar del ligamento periodontal

*Cementoblastos:* cubren el ligamento periodontal del lado del cemento

*Osteoclastos:* son células que reabsorben hueso y las encontramos debido a los procesos de reabsorción y aposición.

*Cementoclastos:* son células que pueden reabsorber cemento e incluso dentina, presentes en procesos patológicos y fisiológicos como la rizoclasia.

*Macrófagos:* célula cuya función es la fagocitosis ya que contienen una gran cantidad de lisosomas, participan en la defensa.

*Mastocitos:* célula que deriva del basófilo y que contiene gránulos que contienen sustancias como la heparina e histamina.

*Restos epiteliales de Malassez:* éstas células son restos de la vaina epitelial de Hertwig, regularmente se localizan del lado de la superficie del cemento

*Células madre ectomesenquimales:* son células pluripotenciales que se encuentran cerca de los vasos sanguíneos y tienen la capacidad de diferenciarse en fibroblasto, cementoblasto u osteoblasto.

Las fibras que forman el ligamento periodontal son: colágenas, reticulares, elásticas, oxitalánicas y de elaunina.

*Fibras de colágena:* son las más abundantes y están formadas por colágeno tipo I, son muy resistentes y son las que conforman los grupos de fibras principales.

*Fibras elásticas y reticulares:* éstas fibras son escasas, están formadas por colágeno tipo III y se encuentran generalmente cerca de vasos sanguíneos.

*Fibras oxitalánicas y de elaunina:* se consideran fibras elásticas inmaduras.

## **HUESO ALVEOLAR**

El tejido óseo es un tipo de tejido conjuntivo especializado formado también por células y matriz extracelular. Está formado por aproximadamente 60% de componentes inorgánicos, 20% de agua y 20% de componentes orgánicos.

La matriz orgánica está formada principalmente por colágeno tipo I, mientras que el resto está formado principalmente por proteoglicanos y glucoproteínas. Algunas de las glucoproteínas son: Osteopontina, osteonectina, sialoproteína ósea y proteína morfogenética ósea (BMP).

La matriz inorgánica está formado principalmente por cristales de hidroxapatita, 15% de carbonato de calcio y el resto de otras sales minerales.

En cuanto a las células que forman el tejido óseo tenemos:

*Células osteoprogenitoras:* son células que pueden dar origen a osteoblastos.

*Osteoblastos:* son las células que se encargan de secretarla matriz orgánica del hueso y se encuentran rodeando este tejido

*Osteocitos:* así se denominan cuando los osteoblastos quedan encerrados dentro de la matriz ósea mineralizada.

*Osteoclastos:* son las células encargadas de degradar la matriz ósea.

*Célula bordeante ósea:* son células que revisten la matriz ósea en lugares donde la matriz no se forma por los osteoblastos ni se destruye por los osteoclastos.

## **ENFERMEDAD PERIODONTAL**

La encía representa un sitio único en nuestro cuerpo, por que es el único lugar donde la continuidad de la capa protectora epitelial es interrumpida por la protrusión de los dientes dentro de la cavidad oral. Las propiedades protectoras del epitelio gingival están comprometidas frecuentemente por la colonización de microorganismos orales en la región cervical de los dientes. En la mayoría de las personas, la persistente placa dental resulta en inflamación de la encía. En algunos, la presencia de supuestos periodontopatógenos, como el *Actinobacillus actinomycetecomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*, probablemente en unión con un sistema de defensa comprometido, puede permitir el desarrollo de periodontitis, una enfermedad inflamatoria crónica que afecta las partes más profundas del periodonto. Esto frecuentemente permite la degradación del aparato de inserción y reduce el soporte de los dientes. Por lo que uno de los principales propósitos del tratamiento periodontal es prevenir una mayor pérdida de soporte. Sin embargo el último propósito de la terapia periodontal, debería ser una completa regeneración de los tejidos perdidos. Diferentes estrategias han sido enfocadas para alcanzar este objetivo. Ninguna de éstas, sin embargo, se ha comprobado que sea 100% efectiva [1].

Por lo que se considera que la periodontitis es una enfermedad infecciosa crónica de las encías causada por la presencia de bacterias en la placa dental. Ésta condición induce la ruptura del aparato de sostén del diente hasta que las piezas dentales se pierden [2].

## **TERAPIA PERIODONTAL**

Los procedimientos del tratamiento periodontal pueden ser divididos en quirúrgicos y procedimientos no quirúrgicos. Los procedimientos no quirúrgicos abarcan la limpieza supra y subgingival en casos selectos, sin embargo puede incluir el uso de antibióticos para reducir la cantidad de periodontopatógenos [1].

Los procedimientos quirúrgicos tienen como principal objetivo limpiar la raíz de los dientes de la placa y el cálculo y seccionar las áreas inflamadas. Durante la cirugía de colgajo el área dañada es también accesible para intervenciones técnicas específicas como los procedimientos de la regeneración tisular guiada (GTR). Los fibroblastos gingivales no tienen la capacidad de regenerar un funcional aparato de inserción periodontal. Ellos deben prevenir esta formación. En un intento de establecer una guía de crecimiento de células, se han introducido membranas para mantener las células gingivales en el territorio o dominio gingival y la guía de las células del ligamento periodontal expuestas de lado de la raíz. Aunque no todos los estudios reportan resultados favorables, la aplicación de la regeneración tisular guiada esta en el promedio de resultados para mejorar el nivel del tejido conjuntivo de unión. Actualmente intentos se están realizando para simplificar los

procedimientos periodontales de regeneración tisular guiada. Hasta hoy sustancias biológicas con actividades específicas son aplicadas sobre las raíces que podrían ayudar a dirigir a las células a sus sitios específicos. Muchas de estas sustancias son de factores de crecimiento polipeptídicos como BMP, PDGF, IGF y fibronectina. Éstos factores se supone que promueven la migración, unión y proliferación de los fibroblastos del ligamento periodontal [1, 3].

### **PROTEÍNAS DE LA MATRIZ DEL ESMALTE**

Hace unos años fueron introducidos las proteínas de la matriz del esmalte (EMP) como un nuevo terapéutico. Estas proteínas fueron reportadas por promover la regeneración del aparato de inserción periodontal. Aunque también han sido reportados prometedores resultados clínicos, su mecanismo de acción no es conocido a detalle hasta ahora. Es concebible que de alguna manera modulan el potencial de regeneración de las células del ligamento periodontal. Por otro lado, estas proteínas, las cuales son hidrofóbicas por naturaleza, pueden también influenciar la composición y crecimiento del biofilm bucal.

### **DERIVADO DE LA MATRIZ DEL ESMALTE**

Los derivados de la matriz del esmalte (EMD) fueron introducidos a la literatura periodontal en 1997 como un modulador de la cicatrización de los tejidos para

imitar los eventos que ocurren durante desarrollo de raíces y para ayudar a estimular la regeneración periodontal [4].

El EMD esta formado principalmente por amelogeninas (90%), y el resto son principalmente proteínas no-amelogeninas ricas en prolina. Las proteínas del esmalte se ha probado que no se encuentran en la región del cemento acelular durante el crecimiento y desarrollo de la raíz pero si en la porción apical de la raíz. Recientemente la amelogenina se ha encontrado ausente a lo largo del desarrollo de la superficie de la raíz en molares de ratones. Aunque el EMD claramente muestra potencial para la regeneración estimulada, como se menciona anteriormente el mecanismo de acción del EMD no está claramente entendido, y su interacción con otros factores de crecimiento y proteínas en el sitio de cicatrización del periodonto necesita ser fuertemente estudiado [5].

El EMD contiene una variedad de proteínas del esmalte hidrofobicas y ha sido asociado con la formación de cemento acelular y se ha encontrado que estimula la regeneración periodontal [6].

Para que la regeneración ocurra, la proliferación celular, migración y síntesis de la matriz extracelular son prerequisites. Intentos de regeneración de los defectos periodontales mediante la regeneración tisular guiada usando injertos de hueso y membranas no siempre producen resultados predecibles. La amelogenina, no tiene un efecto significativo sobre la proliferación o migración por si misma. Esto

puede sugerir que tampoco otros componentes de la matriz del esmalte en el EMD pueden ser responsables por algunos de estos efectos clínicos, o que la amelogenina sola no puede desencadenar el potencial regenerativo de los tejidos periodontales y esto puede entonces requerir una interacción combinada con otros componentes de la matriz del esmalte del EMD para dirigir el proceso regenerativo [7].

El EMD es usado clínicamente para promover la regeneración de los tejidos periodontales con una eficacia variable. La aplicación del EMD resulta significativamente frecuente en sitios sin signos clínicos de inflamación; adicionalmente, pacientes que recibieron durante el tratamiento EMD reportaron significativamente menos incomodidad post-operatoria. Sin embargo, hay algunos reportes que se enfocan o definen los mecanismos biológicos para la observación de efectos anti-inflamatorios del EMD. Por lo que se concluye el rol del EMD en inducir proliferación, migración, adhesión, mineralización y diferenciación de células del ligamento periodontal, indicando que el EMD modula factores asociados con la inflamación en monocitos [8].

Se cree que el EMD imita la actividad de las células epiteliales de la vaina radicular de Hertwig, originando la secreción de proteínas de la matriz del esmalte y generando la formación de cemento acelular. Sin embargo, a la fecha no hay evidencia de lo anterior. Y ya se ha escrito que los depósitos de cemento son un prerrequisito para la formación del ligamento periodontal y de hueso alveolar, para el desarrollo del aparato de inserción periodontal [9-11].

El EMD ha sido exitosamente empleado en la imitación de la cementogénesis natural para restaurar completamente la función del ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar en pacientes con periodontitis crónica. Cuando el EMD se aplicó a la superficie desnuda de la raíz, este formó una matriz que localmente facilita la respuesta de regeneración de los tejidos periodontales adyacentes. Por lo que se concluye que el EMD favorece el crecimiento de células mesenquimales sobre las epiteliales, y que la liberación autocrina de factores de crecimiento por las células del ligamento periodontal expuestas al EMD contribuyen a la cicatrización periodontal y la regeneración en el proceso de imitación del desarrollo natural de la raíz [12-13].

El EMD y el factor transformante de crecimiento (TGF-1beta) pueden jugar un rol importante en la regeneración periodontal. El EMD induce la proliferación de fibroblastos del ligamento periodontal humanos así como la migración, síntesis total de proteínas, actividad de fosfatasa alcalina y mineralización, mientras que TGF-1beta incrementó la adhesión celular. Sin embargo la combinación de ambos factores no alteraron positivamente el comportamiento de los fibroblastos [14].

Por otro lado se ha comprobado que el EMD estimula expresión del factor de crecimiento del tejido conjuntivo y la interacción es modulada via factor transformante de crecimiento TGF-beta en las células osteoblásticas. También, el



factor de crecimiento del tejido conjuntivo afecta la mineralización osteoblástica del EMD pero no la proliferación de células [15].

Un estudio para establecer la influencia del EMD sobre células del ligamento periodontal humanas, fibroblastos gingivales y células de un osteosarcoma (MG-63) usando tasas de llenado de defectos en un modelo in vitro, establece que la tasa de de llenado de defectos por las células del ligamento periodontal en presencia del EMD fue estadísticamente más grande que en presencia de fibroblastos gingivales y del osteosarcoma que también fueron tratados con el EMD. Por lo que se concluye que el derivado de la matriz del esmalte puede mejorar la regeneración de heridas específicamente por la modificación en la proliferación y migración de las células del ligamento periodontal [6,16].

Varias técnicas quirúrgicas han sido desarrolladas para regenerar los tejidos periodontales incluyendo la regeneración tisular guiada, injertos de hueso y el uso de derivados de la matriz del esmalte (EMD). El EMD es un extracto de la matriz del esmalte y contiene amelogeninas de diferentes pesos moleculares. Las amelogeninas están involucradas en la formación del esmalte y del periodonto de inserción durante la formación del diente. Las actuales ventajas del uso del EMD son desconocidas. Con la excepción de complicaciones postoperatorias más significativas en casos donde se llevo a acabo la regeneración tisular guiada, sin embargo no hay evidencia clínica importante de diferencias entre realizar regeneración tisular guiada o usar EMD [2].

Los procesos de regeneración tisular guiada han sido exitosamente utilizados para restablecer el periodonto de inserción. Sin embargo, se ha reportado que este nuevo periodonto de inserción difiere del original en fuerza y continuidad. Las proteínas de la matriz del esmalte secretadas por la vaina epitelial de Hertwig juega un rol importante en la cementogénesis sobre la raíz y en el desarrollo del periodonto de inserción. Las proteínas de la matriz del esmalte (EMD) se obtiene de dientes porcinos en desarrollo. Y se ha reportado que induce la regeneración periodontal verdadera (regeneración del periodonto de inserción, cemento acelular adyacente la superficie de la dentina) [12, 17].

Varios ensayos clínicos han indicado que la aplicación del EMD en cirugías con colgado de Widman modificado provee un mejor resultado que la cirugía sola. Otras investigaciones han indicado que durante la cirugía de colgajo la utilización del EMD o de membranas bioabsorbibles logran resultados similares [18].

Estudio histológico para evaluar el efecto del EMD en la regeneración periodontal reporta que hubo regeneración periodontal en todos los casos de defectos, con formación de cemento nuevo, ligamento periodontal con fibras de Sharpey, y se observó también formación de hueso nuevo. Esto ocurrió en ausencia de factores de crecimiento exógenos, injertos de hueso, membranas de barrera o con la combinación de éstas [19].

Estudios in Vitro han encontrado que el EMD favorece el crecimiento de las células mesenquimales sobre el crecimiento de las células epiteliales y posee un efecto citostático sobre las células epiteliales [20].

Este compuesto no afecta la respuesta inmune celular ni humoral [21-22]. Sin embargo, ha sido reportado que el EMD induce la formación de IgG en contra de la amelogenina porcina, ya que esta es 91% semejante a la humana [23].

Las características de EMD en relación a su habilidad para formar hueso han sido investigadas en ratones y se concluyó que el EMD es un agente osteoconductor, ya que potencia el potencial osteoinductivo del material injertado pero se requiere una dosis mínima de 4mg [4].

Por medio de estudios empleando microarreglos, en células semejantes a osteoblastos gran cantidad de genes son transcritos en respuesta al EMD, entre ellos algunos de la matriz extracelular [24].

Otros estudios también han demostrado la transcripción de algunos reguladores del metabolismo óseo, como RANKL, COX2 y Cbfa1 [25, 26], incluso transcritos para glucoproteínas como osteopontina [27], sialoproteína osea [28, 29] y proteoglicanos [30].

El tratamiento de regeneración con EMD ha mostrado promover la cicatrización de los defectos intraóseos como se ha mencionado anteriormente. Sin embargo,

hasta ahora varios regímenes postoperatorios de antibióticos han sido utilizados en combinación con el EMD y por lo tanto no puede excluirse que los resultados puedan también ser atribuibles al tratamiento con antibióticos. Por lo que se hizo un estudio y se demostró que la administración sistémica de amoxicilina y metronidazol adyacente al uso del EMD para el tratamiento de cirugía de defectos intraóseos no produce estadísticamente reducción superior de profundidad de sondaje ni ganado de nivel de adhesión clínica en comparación con los que se trataron solamente con EMD [31].

Por otra parte, se ha reportado un efecto antiinflamatorio del EMD, cuando se estimularon células sanguíneas con lipopolisacárido y peptidoglicano, la liberación de citocinas proinflamatorias fue inhibida [32, 33]. Sin embargo, incrementa la producción de las citocinas IL-6 y TGF-beta [12-32].

## **FACTORES DE MINERALIZACIÓN**

### **Ameloblastina**

Es la segunda más abundante proteína estructural de la formación de la matriz del esmalte. Durante la maduración mineral la ameloblastina es degradada, y un fragmento específico se ha mostrado que rodea la ruta secretora de los ameloblastos que definen los límites laterales de la célula [34]. Es una proteína de relativamente alto peso molecular [35].

Aunque la ameloblastina puede actuar como una molécula de adhesión celular ésta es esencial para el mantenimiento del estado de diferenciación de los ameloblastos, ambos la amelogenina y la enamelysina son indispensables para la generación del grosor total del esmalte de adecuada estructura de cristales [36].

### **Osteopontina (OPN)**

Es una no colágena, ligada al calcio, fosfoproteína glicosilada producida por osteoblastos. Aunque la OPN es un componente de la matriz ósea, esta proteína es también encontrada en el riñón, sangre, glándulas mamarias y salivales. La OPN es también producida por osteoclastos y esta relacionada con la reabsorción así como a la formación de hueso, por que la expresión de OPN incrementa no solo en los estadios de maduración y mineralización de la matriz, ni en la diferenciación de los osteoblastos también en los sitios de reabsorción ósea.

Además, los niveles de OPN incrementan en sepsis en enfermedad inflamatoria del riñón e incrementa citocinas inflamatorias como IL-1 beta y TNF-alfa que modulan la producción de OPN, lo cual indica la asociación de OPN con inflamación. Por éstos hallazgos los niveles de OPN pueden reflejar lesiones activas de enfermedad periodontal acompañada de reabsorción del hueso alveolar. En estados progresivos de enfermedad periodontal con reabsorción del hueso alveolar, es posible que la OPN derivada de osteoblastos, osteoclastos y células inflamatorias aparezcan en el fluido gingival crevicular [37].

## **Osteocalcina**

La osteocalcina es producida por el osteoblasto, considerada una proteína específica ósea, dependiente de la vitamina K y fijadora de calcio; es la proteína no colágena unida a la hidroxiapatita más importante de la matriz ósea. Del total de su producción, una pequeña parte no se incorpora a la matriz extracelular del hueso, la cual es la fracción medida en el suero. Su acción metabólica consiste en regular la homeostasia del calcio, lo que evita la excesiva mineralización ósea. Es una proteína relativamente inestable y se metaboliza rápidamente tras liberarse a la circulación. Sus concentraciones varían durante el transcurso del día, sus picos más altos ocurren durante la noche. Puede encontrarse disminuida la osteocalcina en pacientes que cursan con hipoparatiroidismo y que consumen esteroides; su concentración aumenta en pacientes con hiperparatiroidismo primario o secundario y en la enfermedad de Paget [38].

## **Osteoprotegerina (OPG)**

Nuevo miembro de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) que a diferencia de todos sus parientes, no permanece tras su síntesis como una proteína transmembrana con el cometido de elaborar señales de transducción entre distintas células, sino que es secretada y no permanece anclada en la membrana [39].

Fue descubierta simultáneamente pero de manera totalmente distinta por dos grupos de investigación uno de ellos en EU mientras estudiaban cDNAs en intestino de rata y otro en Japón mientras buscaban factores de inhibición y/o estimulación de los osteoclastos [39].

Una vez descubierta la OPG, numerosos estudios se sucedieron para desenmascarar y caracterizar tanto su estructura como sus funciones. El RNAm de la OPG se expresa en numerosos tejidos humanos (pulmón, corazón, riñones, hígado, intestino, estómago, cerebro, glándula tiroides y médula espinal) además de en el hueso, en el cual su principal función parece ser la inhibición de la maduración de los osteoclastos y de su activación, tanto in vivo como in vitro. Esto queda claramente de manifiesto en los experimentos realizados con ratones OPG-knock-out, los cuales, aún de apariencia normal al crecimiento, tenían una mayor tasa de mortalidad en la adolescencia debida a un incremento en la incidencia de fracturas vertebrales y femorales. Sus tejidos óseos eran característicos de sujetos con un alto grado de remodelado: huesos con pérdida trabecular y porosidad cortical aumentada. Y algo más sorprendente aún: éstos ratones mostraban calcificaciones de la aorta de las arterias renales desde las dos semanas de vida, calcificaciones que se encontraban en 2/3 partes del animal a los 2 meses [45-40].

## **CITOCINAS**

Las citocinas son pequeñas proteínas (aproximadamente 25kDa) solubles secretadas por varios tipos de células. Usualmente éstas son liberadas en el cuerpo en respuesta a la activación e inducen una respuesta a través de receptores específicos. Las citocinas pueden actuar de manera autocrina, afectando el comportamiento de la célula que la produce, de manera paracrina, afectando el comportamiento de células adjuntas a la que la produce, y algunas citocinas que son lo suficientemente estables pueden actuar de manera endocrina, afectando el comportamiento de células a distancia, aunque esto depende de la habilidad de éstas para entrar en la circulación y de su vida media en la sangre [41-44].

Las citocinas secretadas por macrófagos en respuesta a patógenos son un grupo estructuralmente muy diverso de que incluyen: IL-1 Beta, IL-6, IL-12, TNF-Alfa y la quimiocina IL-8. El nombre interleucina (IL) seguido por un número fué denominado con la finalidad de desarrollar una nomenclatura estandarizada para moléculas secretadas por leucocitos. Hay dos grupos principales de citocinas: la familia de hematopoyetinas, las cuales incluyen hormonas del crecimiento y también muchas interleucinas que juegan papeles importante en la respuesta inmune innata y adaptativa; y la familia de TNF, la cual también tiene un rol importante en la respuesta inmune innata y adaptativa. De las interleucinas derivadas de macrófagos, IL-6 pertenece a la gran familia de hematopoyetinas, TNF-Alfa es obviamente parte la familia de TNF, IL-1 e IL-12 son estructuralmente distintas. Todas tienen importantes efectos locales y sistémicos que contribuyen a



la respuesta inmune. El reconocimiento de diferentes clases de patógenos puede involucrar distintos receptores de señalamiento con lo que resulta una variación en las citocinas inducidas [45-48].

### **Interleucina 1 beta (IL-1beta)**

La familia interleucina 1 (IL-1) es un grupo de citocinas relacionadas que incluye dos proteínas agonista (IL-alfa e IL-1beta) [49].

Interleucina 1 es principalmente una citocina inflamatoria. Biológicamente está más cercanamente relacionada con factor de necrosis tumoral (TNF) que con cualquier otra citocina o interleucina, aunque la estructura y receptores para IL-1 y TNF son claramente distintos. IL-1 puede contribuir al crecimiento celular y a funciones de reparación. Durante la inflamación, daño inmunológico o infección, debido a sus múltiples propiedades biológicas contribuye a la enfermedad [13,50].

IL-1 juega un papel clave en el inicio y desarrollo de la respuesta del huésped a la invasión, siendo un importante factor en la iniciación de la respuesta inflamatoria y en la activación de las funciones inmunológicas. Además de ésta actividad pleiotrópica y al alto potencial de estos efectos inflamatorios, la actividad de IL-1 es fuertemente regulada en el cuerpo por una compleja red de sistemas de control [49].

La familia de las proteínas humanas IL-1 son mediadores clave de la respuesta a infecciones, lesiones y cambios inmunológicos. El mecanismo por el cual IL-1 activa la respuesta pro inflamatoria en células blanco, y el plasma de los receptores de membrana involucrados es bastante bien conocido [51].

### **Interleucina 6 (IL-6)**

La interleucina 6 (IL-6) es una citocina multifuncional, que juega un importante rol en la inflamación aguda y crónica así como también está implicada en la reabsorción de hueso. Se ha comprobado que la estimulación de la liberación de IL-6 en células del ligamento periodontal en presencia de *Pórfiromonas Endodontalis* puede jugar un rol en el progreso de la inflamación y reabsorción del hueso alveolar en la enfermedad periodontal y la periapical [52].

Tiene efectos sobre múltiples células, incluyendo la promoción y desarrollo de células del sistema inmune y osteoclastos. Se ha comprobado incluso que la delección de IL-6 promueve el desarrollo de la lesión periapical como resultado de la infección en los conductos radiculares [53].

### **Interleucina 12 (IL-12)**

La familia de la interleucina 12 está compuesta por 3 citocinas heterodinámicas: IL-12, IL-23, e IL-27. En base a su estructura similar se espera que tengan funciones proinflamatorias e inmuno reguladoras [54].

IL-12 tiene un rol central como citocina inductora y mantenedora de una respuesta Th1, la cual es esencial en la inmunidad mediada por células, en infecciones virales y el control del tumor. También tiene un papel importante en el desarrollo y progresión de la enfermedad autoinmune mediada por células [54,55, 56].

Se requiere para la óptima diferenciación de las células linfocitos T CD4 a células maduras efectoras Th1 y también pueden inducir la secreción de INF-gamma por linfocitos NK y linfocitos T CD8. Basada en el grado de secuencia y homología estructural, es bien sabido que IL-12, IL-27 puede promover la respuesta Th1 [57].

Las 3 citocinas (IL-12/IL-23/IL-27) no son completamente redundantes, como ellas pueden preferencialmente activar células ingenuas o células T de memoria, inducen discretos perfiles de citocinas de células T, contribuyen a distinguir estados de la respuesta inmune del huésped a agentes infecciosos y diferencialmente promueve la autoinmunidad.

Además IL-12 no es solo un elemento del tejido conjuntivo entre células accesorias y linfocitos, es también una molécula clave para la programación de la función de los macrófagos y células dendríticas [58].

Estimula la producción de INF-gamma por medio del linfocito T helper (Th1) mientras que IL-18 induce la respuesta Th1 cuando está presente IL-12 pero una respuesta Th2 en ausencia de IL-12 [59].

## **Interferón gama (IFN-gama)**

Ésta citocina juega un rol importante en la inducción y modulación de una gran cantidad de respuestas inmunológicas. Participa en casi todas las fases de la respuesta inmune e inflamatoria, incluyendo la activación y diferenciación de células T, células B, linfocitos NK, macrófagos y otros; por lo que se le conoce como citocina inmuno reguladora. La secreción de INF-gamma es característico de los linfocitos Th1, aunque también es secretada por células T, por algunas células Th0 y por células NK. Cada uno de éstos tipos celulares secretan INF-gamma solo cuando son activados usualmente como parte de la respuesta inmune y especialmente en respuesta a la producción IL-2 e IL-12 y es inhibida por IL-4, IL-10, TGF beta, glucocorticoides, ciclosporina A [60].

La exposición de INF-gamma potencializa la actividad microbicida de los macrófagos y los induce a secretar oxido nítrico y monocinas como IL-1, IL-6, IL-8 y TNF-alfa. Esto realza la actividad de células Th1, pero inhibe la producción de células Th2. INF-gamma no solo disminuye la producción de IL-4 por células Th2 [60].

Casi todos los tipos celulares expresan un receptor para INF-gamma y responden a esta citocina por el incremento de la expresión en la superficie de proteínas clase complejo mayor de histocompatibilidad [61].

Los efectos celulares de INF-gama incluyen la regulación del reconocimiento de patógenos, procesamiento y presentación de antígenos, el estado antiviral, inhibición de células, proliferación y efectos en la apoptosis, activación de funciones efectoras de microbicidas, inmuno modulación, tráfico leucocítico y también activa neutrófilos, células NK y células endoteliales; así como también promueve la diferenciación de células B y linfocitos T CD8. La producción innata de INF- gamma es un paso crítico en la defensa inmunológica en contra de ciertos patógenos, así como bacterias intracelulares, virus y hongos [60, 61].

### **Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa)**

La familia de factor de necrosis tumoral alfa ha sido una de las familias de proteínas más intensamente estudiadas. A ésta familia la constituyen 19 miembros que median diversas funciones biológicas al ligar a la superficie de la membrana receptores que pertenecen a la familia de receptores TNF (TNFr) [62].

Los miembros de la familia por otra parte también pueden ejercer daño en el huésped como sepsis, caquexia en tumores así como en enfermedades autoinmunes. Además ahora son conocidos el papel esencial de los miembros de la superfamilia de TNF, así como sus receptores durante la organogénesis de órganos linfáticos secundarios y el mantenimiento de la arquitectura de los tejidos linfáticos [63].

Factor de necrosis tumoral es una citocina pro inflamatoria que juega un rol crítico en diversos eventos celulares, incluyendo proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Esta también involucrada en muchos tipos de enfermedades. Se ha demostrado que las diversas respuestas biológicas mediadas por TNF se alcanzan por la activación de múltiples mecanismos de señalización [64].

### **Fibroblastos**

Las células más abundantes en el tejido conjuntivo son los fibroblastos. El rol de éstas células es producir las proteínas estructurales del tejido conjuntivo como el colágeno y la elastina, así como las glucoproteínas y glucosaminoglucanos que comprenden la base sustancial del tejido conjuntivo periodontal. Bajo condiciones normales, los fibroblastos periodontales producen y modifican la matriz extracelular y juegan un rol en mantener la homeostasis y la integridad del tejido. Además los fibroblastos son capaces de fagocitar objetos extraños y juegan un papel crítico en el proceso de cicatrización de las heridas [65].

Observaciones recientes demostraron que los fibroblastos secretan una variedad de citocinas inmunoregulatoras y mediadores químicos cuando son estimulados con un variedad de citocinas inflamatorias o endotoxinas bacteriales, lo cuál sugiere que los fibroblastos gingivales pueden jugar un rol importante no solo en mantener la integridad del tejido periodontal, sino también en regular la respuesta inflamatoria local [65].

Los fibroblastos en vivo exhiben un rango de características morfológicas y funcionales que incluyen la forma de cigarro o la forma estrellada in vitro pero una gran variedad de formas in vivo. Es posible describir un comportamiento heterogéneo en poblaciones celulares del ligamento periodontal y la encía debido al hecho de que hay una gran cantidad de diferentes tipos de celulares. Por ejemplo, los macrófagos tisulares y los fibroblastos modificados son morfológicamente muy similares al microscopio de luz [66].

## **Macrófagos**

Los macrófagos se diferencian al salir de los vasos sanguíneos, son células muy grandes con propiedades fagocíticas ya que poseen organitos en su citoplasma que contienen gránulos en el interior con sustancias citotóxicas contra agentes patógenos. Casi todos los tejidos, órganos y cavidades poseen una población constante de macrófagos residentes y dependiendo en que sitio estén establecidos adquieren un nombre específico, así por ejemplo histiocitos corresponde al nombre de los que residen en el tejido conjuntivo, células de Kupffer en el hígado, osteoclastos en el hueso, macrófagos alveolares en el pulmón por mencionar algunos. La forma y función dependen varía según el tejido en el que se encuentren [67].

Los macrófagos también se encuentran en órganos linfáticos. Se ubican en muchas regiones del ganglio linfático, en particular en el seno marginal, donde la

linfa eferente ingresa al tejido linfático, y en los cordones medulares, donde se colecta la linfa eferente antes de salir a la sangre. Su principal función es fagocitar microorganismos y partículas de antígeno y de este modo impedir que ingresen en la sangre. Si bien los macrófagos procesan microorganismos y antígenos fagocitados y exponen antígenos peptídicos en su superficie en conjunto con moléculas coestimuladoras, se piensa que su función principal en los tejidos linfáticos es actuar como fagocitos de patógenos y de linfocitos apoptóticos. Los macrófagos en reposo tienen pocas o ninguna molécula del MHC de clase II en su superficie y no expresan B7 [68].

La expresión de moléculas del MHC de clase II y de B7 es inducida por la ingestión de microorganismos y el reconocimiento de sus patrones moleculares ajenos. Los macrófagos, como células dendríticas híbridas, tienen una variedad de receptores que reconocen componentes de la superficie microbiana, como el receptor de manosa, el receptor fagocítico, receptores del complemento y varios TLR. Tales receptores participan en la fagocitosis de microorganismos y en la señalización para la secreción de citocinas proinflamatorias, que reclutan y activan más fagocitos. Los macrófagos fagocitan continuamente células muertas o moribundas, que son fuentes ricas en antígenos propios, por lo cual reviste particular importancia que no activen células T en ausencia de infección microbiana [68].

La población de macrófagos exhibe un amplio rango de fenotipos funcionales y antigénicos, que incluyen la producción de citocinas, respuesta a estímulos



inmunomoduladores y la limpieza de patógenos. Su amplia distribución en los tejidos hace que estas células estén situadas listas para proveer una defensa inmediata en contra de elementos foráneos previo a la inmigración de leucocitos. La circulación de monocitos provee una fuente móvil de inmunocitos competentes funcionalmente capaz de infiltrarse en los tejidos. Por que los macrófagos participan en ambas inmunidades específicas via presentación de antígeno y producción de IL-1 y la inmunidad no específica en contra de bacterias, virus, hongos y patógenos neoplásicos [69, 70].

## **II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

En este estudio se investiga si las glicoproteínas indicadoras de mineralización son sintetizadas en fibroblastos por efecto del EMD. Además, se investiga el efecto del EMD sobre la producción y secreción de las citocinas proinflamatorias.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analizar el efecto del EMD sobre la producción y secreción de factores de mineralización como Ameloblastina, Osteopontina, Osteocalcina, Osteoprotegerina en células aisladas de tejido gingival.
- Analizar el efecto del EMD sobre la producción y secreción de las citocinas proinflamatorias IFN-gama, TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, IL-12 en células mononucleares.

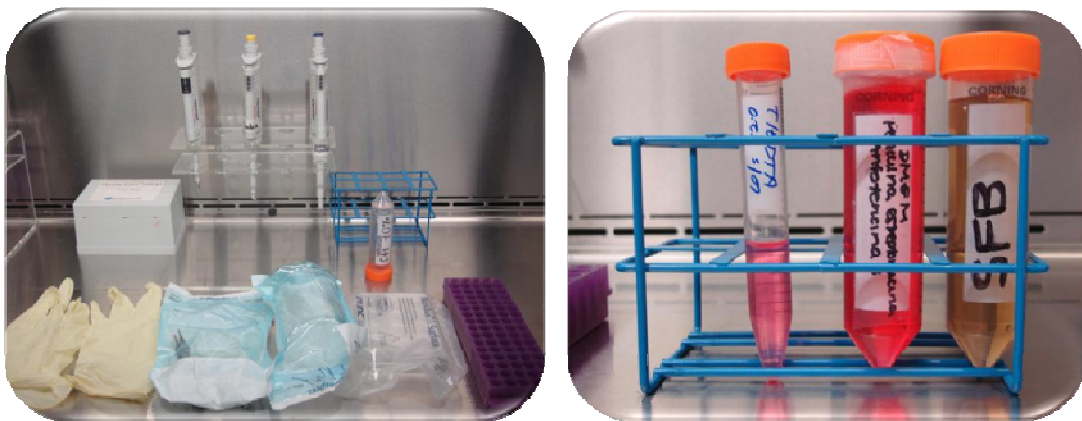
### **METAS**

- Obtener resultados morfofisiológicos que nos permitan justificar y garantizar el empleo de EMD.
- Establecer modelos para evaluar nuevas glucoproteínas y factores de crecimiento que podrían actuar en la regeneración dental.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

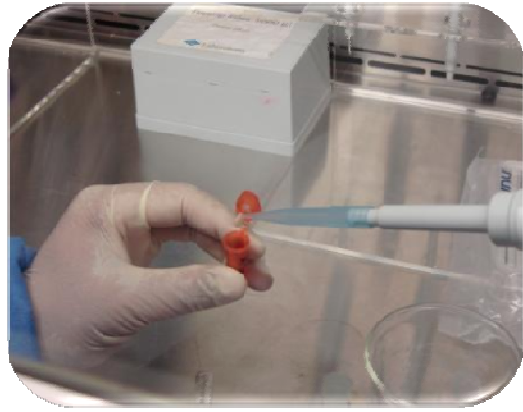
#### ANÁLISIS DE FACTORES DE MINERALIZACIÓN.

Se seleccionaron pacientes de entre 35 y 55 años, sin ninguna enfermedad sistémica que acudieron a la clínica de exodoncia. Después de firmar la carta de consentimiento informado, se obtuvieron biopsias de la región gingival de aproximadamente 2 mm<sup>3</sup> y se colocaron en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y penicilina 100 U/ml, estreptomicina 50 µg/ml y anfotericina B (0.25 µg/ml) durante su traslado al cuarto de cultivo.

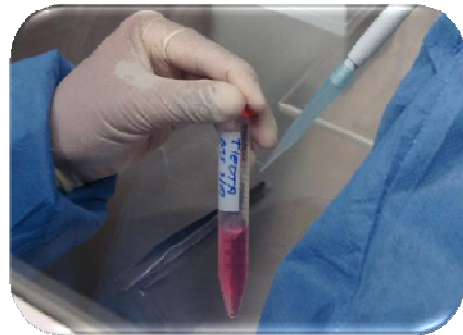
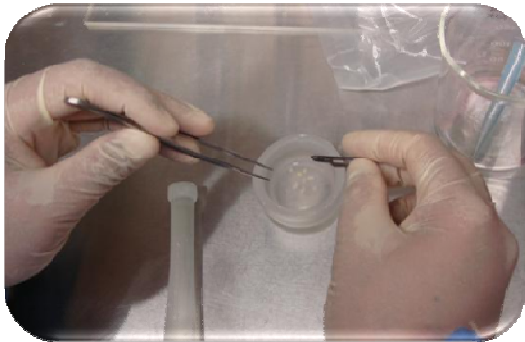


#### CULTIVO DE CÉLULAS

En la campana de flujo laminar se retiró el medio de cultivo de la muestra con la micropipeta y se extrajo la muestra para posteriormente ser macerada, adicionando 500 µl de tripsina (0.1%), y cortada en trozos pequeños por medio de un bisturí.



La muestra fue macerada y cortada por medio de un bisturí.



Se incubaron por 10 minutos con enzimas como tripsina, colagenasa y hialuronidasa (0.05% cada una), en condiciones de humedad, a 37 °C y 0.5% de CO<sub>2</sub>.



Después de un lavado a 1,200 rpm durante 5 minutos se resuspendió en 4.5 ml de medio DMEM con 10% de suero fetal bovino. Se incubaron en placas de 12 pozos a 37 °C y 0.5% de CO<sub>2</sub> por 8 días.



Se estimularon posteriormente las células con el EMD en una concentración de 25 microgramos por mililitro y fueron incubadas durante 48 horas.

Después se retiró el medio de cultivo y las células adheridas a las placas se fijaron con paraformaldehído (4%) durante 24 hrs.

Transcurridas las 24 horas se retiró el formaldehído y se hicieron lavados con buffer de fosfatos (PBS) 0.2 M, pH 7.4 durante 24 horas.

Uno de los pozos de la placa fue teñido con la técnica de Papanicolau para detectar posibles efectos citotóxicos.

## **INMUNOCITOQUIMICA**

Las células fueron incubadas por 24 horas con anticuerpos (SantaCruzBiotechnology) dirigidos a Ameloblastina (sc-50533), Osteopontina (sc-21742), Osteocalcina (sc-80902), y Osteoprotegerina (sc-8468), diluidos en PBS con triton X-100 al 0.5% (PBS-TX100). Después de la incubación se lavaron dos veces con PBS-TX100

Posteriormente, se incubaron por dos horas con anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa. La peroxidasa fue visualizada por medio de 3,3 tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (Sigma, Aldrich) al 0.5% en PBS con 0.01% de peróxido de hidrógeno.

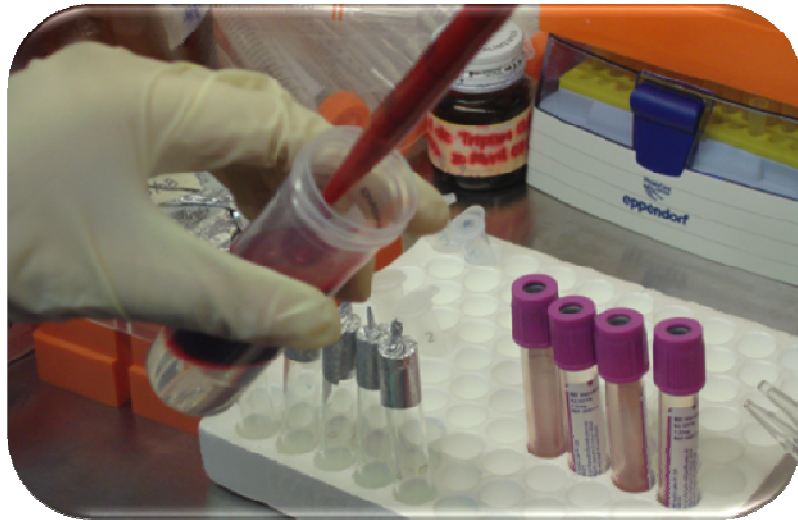
Un análisis morfométrico permitirá detectar diferencias en la producción celular de estos marcadores de mineralización.

## **ANÁLISIS DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS**

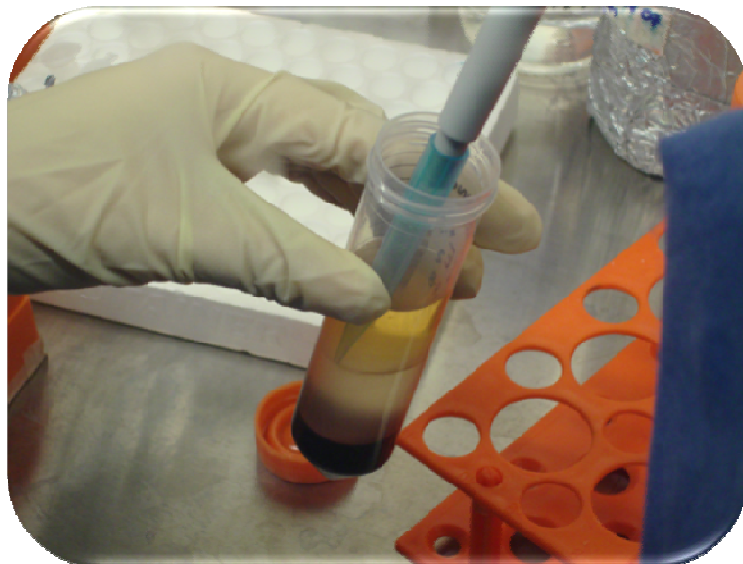
Después de firmar la carta de consentimiento informado, se recolectaron muestras de sangre de voluntarios sanos de entre 20 y 30 años, realizando una punción en la vena cubital o basílica se obtuvieron 20 ml de sangre aproximadamente y se colocaron en tubos con anticoagulante.



Se hizo una dilución de la sangre con Buffer salino de fosfatos (PBS) estéril para después colocarle Ficoll.

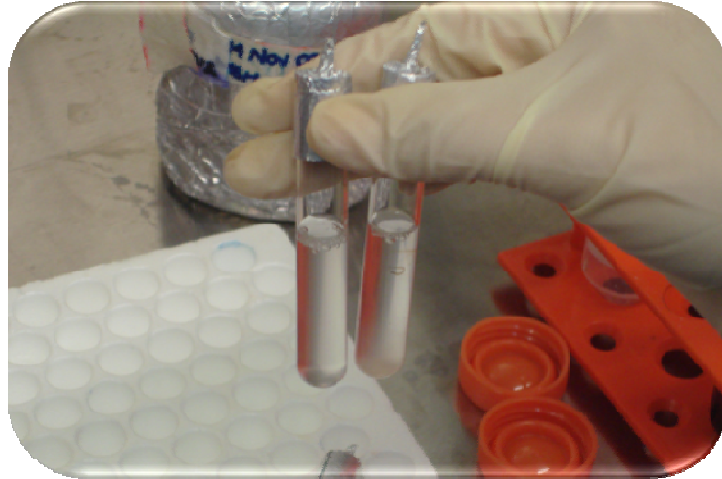


Se centrifugó durante media hora a 1200 rpm. Después se eliminó el exceso de suero, para después obtener cuidadosamente un halo blanquecino que se encuentra entre el Ficoll y el suero.



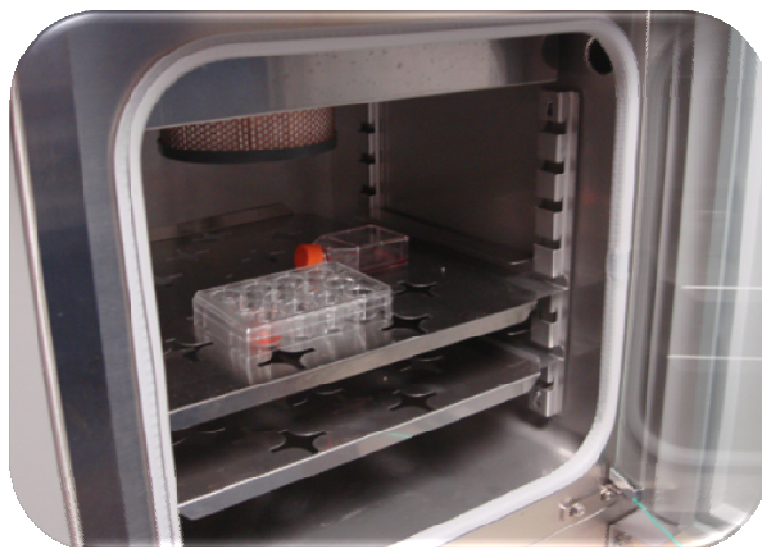


Este extracto es el que contiene las células mononucleares al cual se le hacen 3 lavados con PBS estéril.



### **CULTIVO DE CÉLULAS**

Posteriormente se resuspendieron las células en medio de cultivo (RPMI) y suero fetal bovino al 10% para posteriormente ser colocados en placas de cultivo de 12 pozos, éstos se mantuvieron en incubación durante 48 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.



Se incubaron con el EMD en una concentración de 25 microgramos por mililitro y fueron incubadas durante 48 horas.

Posteriormente se retira el medio de cultivo y las células adheridas a las placas se fijaron con paraformaldehído (4%) durante 24 hrs. Transcurridas las 24 hrs se retiro el formaldehído y se hicieron lavados con buffer de fosfatos (PBS) 0.2 M, pH 7.2-7.4 durante 24 horas. Uno de los pozos de la placa fue teñido con la técnica de Papanicolau para detectar posibles efectos citotóxicos.

## **INMUNOCITOQUIMICA**

Las células fueron incubadas por 24 horas con anticuerpos (SantaCruzBiotechnology) dirigidos a IFN-gama (sc-73392), TNF-alfa (sc-52793), IL1-beta (sc-52864), IL-6 (sc-80839) e IL-12 (sc-65354), diluidos en PBS con triton X-100 al 0.5% (PBS-TX100). Después de la incubación se lavaron dos veces con PBS-TX100. Posteriormente, se incubaron por dos horas con anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa. La peroxidasa fue visualizada por medio de 3,3 tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (Sigma, Aldrich) al 0.5% en PBS con 0.01% de peróxido de hidrogeno.

## **ANALISIS MORFOMÉTRICO**

Se analizaron 12 pozos, 4 campos en cada pozo, por cada uno de los anticuerpos, es decir, los dirigidos a las 5 citocinas proinflamatorias y a los 4 marcadores de mineralización. Se realizó un conteo de las células inmunoreactivas, mononucleares para citocinas y fibroblastos para factores de mineralización. Los resultados se muestran en graficas como media y su desviación estándar. Los resultados fueron evaluados por la prueba t de student, para confrontar dos grupos, ó por análisis de varianza, para analizar diferencias entre varios grupos.

#### **IV. RESULTADOS**

No se observaron alteraciones morfológicas en los fibroblastos o células mononucleares por efecto del EMD. Ambos tipos celulares mostraron estructura celular semejante a las células sin el EMD.

Es claro que el EMD estimula la producción de factores de mineralización en fibroblastos aislados (Figura 1). El análisis morfométrico demostró una producción significativa de osteopontina ( $p < 0.01$ ), osteoprotegerina ( $p < 0.05$ ) y osteocalcina ( $p < 0.05$ ) (Figura 2). Aunque hubo producción de ameloblastina, ésta fue semejante a la del control.

La producción de algunas citocinas en células mononucleares fue afectada por efecto del EMD. Se encontró un incremento significativo de células inmunoreactivas a IL-12 ( $p < 0.01$ ) e IL-6 ( $p < 0.05$ ), sin embargo, no se observó diferencia significativa en la cantidad de células inmunoreactivas a IL-1 beta, TNF-alfa o IFN-gama entre el control y las incubadas con el EMD (Figura 3).

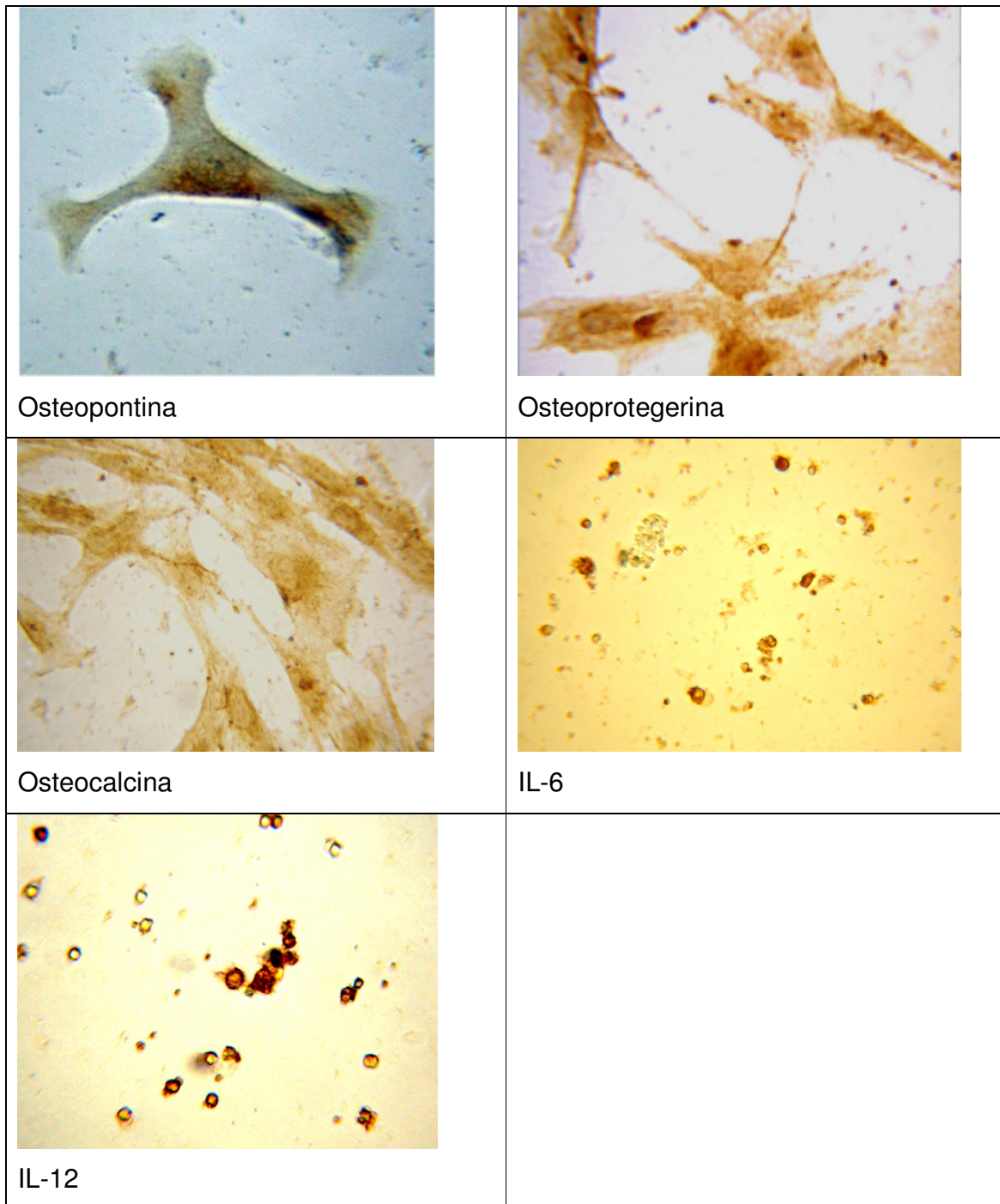


Fig 1.- Fotomicrografías que muestran el efecto del EMD en fibroblastos y células mononucleares aisladas de sangre periférica. Se observa inmunoreactividad a factores de mineralización como osteopontina, osteoprotegerina y osteocalcina en fibroblastos aislados de la encía. Además, se observa inmunoreactividad a IL-6 e IL-12 en células mononucleares aislados de sangre periférica.

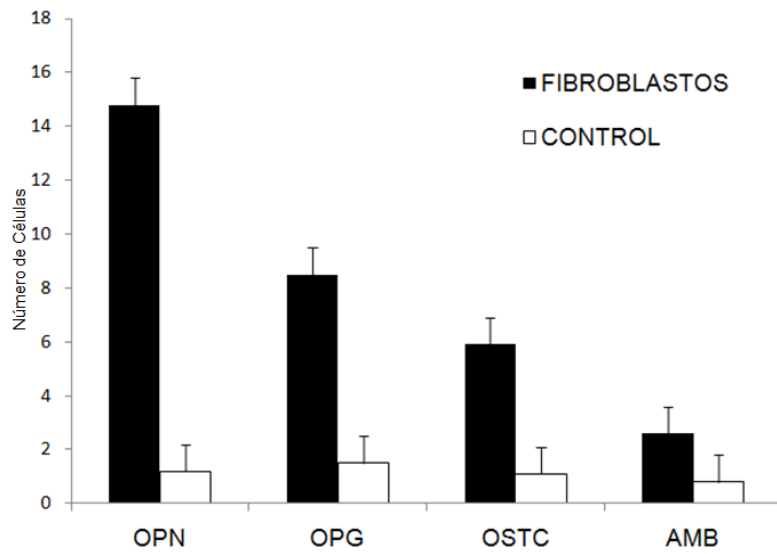


Figura 2. Se muestra el número (media y desviación estándar) de fibroblastos, aislados de encía, con inmunoreactividad a osteopontina (OPN), osteoprotegerina (OPG), osteocalcina (OSTC) y ameloblastina (AMB).

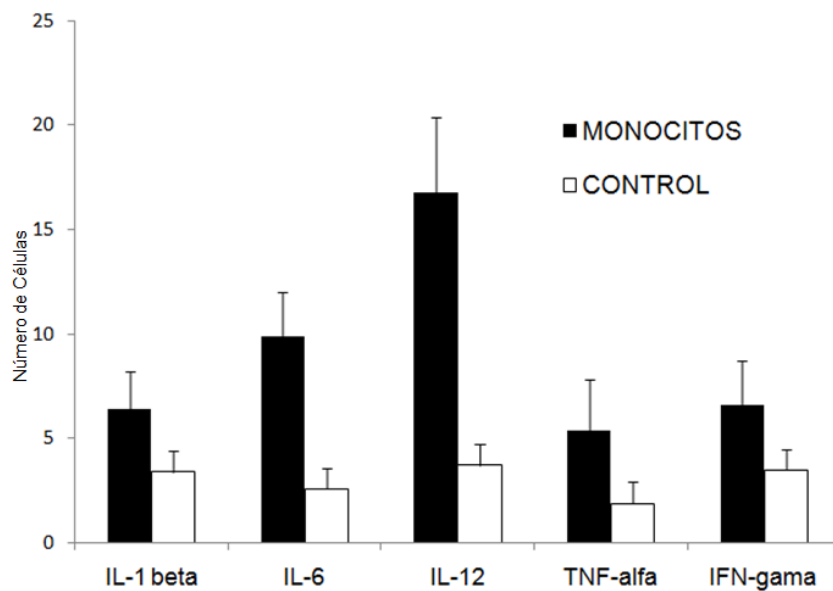


Figura 3. Se muestra el número (media y desviación estándar) de células mononucleares aisladas de sangre periférica con inmunoreactividad a citocinas.

## V. DISCUSIÓN

El EMD ha sido empleado para regenerar tejido periodontal aunque su mecanismo de acción no ha sido completamente caracterizado. En este estudio demostramos la presencia de osteopontina, osteoprotegerina y osteocalcina en respuesta a EMD. Esto parece indicar que el EMD actúa estimulando la producción de factores de mineralización. También se investigó los efectos del EMD sobre la producción de citocinas proinflamatorias, encontramos que no estimula la producción de IFN-gama, IL-1beta y TNF-alfa, y que solo IL-6 e IL-12 estaban incrementadas. Estos resultados indican que el EMD presenta una relativa buena biocompatibilidad.

Estudios previos han demostrado la presencia de RNA mensajero de algunas sustancias mineralizantes como osteoprotegerina, osteopontina y sialoproteína ósea en respuesta a EMD. El presente estudio demuestra la presencia de epitopos de las proteínas osteoprotegerina, osteopontina y osteocalcina. Ha sido reportado que la producción de RNA mensajero de osteoprotegerina [72], e incluso la proteína [71], puede ser estimulada por EMD, en este estudio se demuestra la presencia de epitopos (proteína) de osteoprotegerina en respuesta al EMD. Se conoce que la osteoprotegerina inhibe la resorción ósea, mediante la vía de señalización RANK/RANKL, inactivando a los osteoclastos [73, 74] posiblemente el EMD actué manteniendo la osteogénesis mediante la producción de osteoprotegerina.

La producción de osteocalcina por osteoblastos puede ser estimulada incluso por polyfosfato [75], y la amelogenina disminuye el número de osteoclastos [76], esto, en conjunto, favorece la osteomineralización. Estos componentes se encuentran en el EMD. También ha sido reportado que el EMD estimula la producción de RNA mensajero de osteocalcina [77]. Este trabajo demuestra que EMD estimula la producción de osteocalcina.

Otros estudios (14, 15, 78, 79) han demostrado el incremento de RNA mensajero de osteopontina en respuesta a la estimulación con EMD, este trabajo, al igual que Sculean y colaboradores [80] demuestra un incremento en la proteína. Además de su capacidad estimulante de la mineralización, osteopontina también se encuentra aumentada en reacciones inflamatorias, actúa en la quimiotaxis de monocitos-macrófagos y regula la producción de citocinas en macrófagos, células dendríticas y linfocitos T. De hecho últimamente se ha clasificado como una citocina Th1, estimulando el proceso inflamatorio (83, 84, 85). En este estudio, la osteopontina se observó que se produjo en gran cantidad de células, quizá en condiciones fisiológicas, la osteopontina actúa en ambas funciones, es decir, como su conocida acción de agente mineralizante y estimulando la acción inflamatoria, en defensa del material extraño.

Encontramos que las citocinas clásicas proinflamatorias, tales como IL-1 beta, IFN-gama y TNF-alfa, no estaban incrementadas por efecto del EMD, sin embargo citocinas pleiotropicas como IL-12 e IL-6 estaban aumentadas. Estudios acerca de biocompatibilidad de EMD han establecido que no estimula el sistema inmune



[22,81], ya que no incrementa la proliferación de linfocitos B, ni la producción de IL-2, IL-6 ó inmunoglobulinas, aunque hay un incremento leve en la cantidad de linfocitos cooperadores [21]. En contraste, y al igual que otros estudios [32, 12, 82], en este estudio encontramos un incremento de IL-6. Quizá el tipo de células empleadas en los estudios sea la causa probable de estas diferencias, como ha sido demostrado en algunos estudios [73].

## VI. CONCLUSIONES

**Primera:** Podemos establecer que el EMD estimula la producción de factores de mineralización en fibroblastos aislados de la encía, y presenta buena biocompatibilidad, ya que no estimula la producción de citocinas proinflamatorias.

**Segunda:** El análisis morfométrico demostró que una gran cantidad de células aisladas del tejido gingival ( $14.8 \pm 1.5$ ) produjeron osteopontina en respuesta a Emdogain, en comparación con el control ( $1.2 \pm 0.5$ ), ( $p < 0.01$ ).

**Tercera:** Gran cantidad de las células aisladas del tejido gingival produjeron osteoprotegerina ( $8.5 \pm 1.3$ ) y osteocalcina ( $5.9 \pm 1.4$ ) en respuesta a Emdogain, en comparación con su respectivo control ( $1.5 \pm 0.6$  y  $1.1 \pm 0.4$ , respectivamente), ( $p < 0.05$ ).

**Cuarta:** En comparación con el control, no se observó diferencia en cuanto a la producción de ameloblastina por células aisladas del tejido gingival en respuesta a Emdogain, ( $p > 0.05$ ).

**Quinta:** Las células mononucleares aisladas de sangre periférica produjeron más Interleucina 12 ( $16.8 \pm 3.6$ ) e Interleucina 6 ( $9.9 \pm 2.1$ ) en respuesta a Emdogain, en comparación con el control ( $3.72 \pm 1.3$  y  $2.1 \pm 0.7$ , respectivamente), ( $p < 0.01$  y  $p < 0.05$ , respectivamente).

**Sexta:** En comparación con el control, no se observó diferencia en cuanto a la producción de Interleucina 1 beta, Factor de Necrosis Tumoral Alfa e Interferon gama en células mononucleares aisladas de sangre periférica en respuesta a Emdogain, ( $p>0.05$ ).

## VII. BIBLIOGRAFÍA

[1 ] Monique T.M. van der Pauxh

Fibroblasts and their role in periodontal regeneration, 6 december 2000 te 14.00 uur ISBN 90-646-4592-2

[2] Esposito M, Grusovin MG, Papanikolaou N, Coulthard P, Worthington HV.

Enamel matrix derivative (Emdogain) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. A Cochrane systematic review.

Eur J Oral Implantol. 2009 Winter;2(4):247-66.

[3] Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration

P. Mark Bartold, Yin Xiao, S. Petter Lyngstaadas, Michael L. Paine & Malcolm L. Snead

Periodontology 2000, Vol. 41, 2006, 123–135

[4] Hammarström L.

Enamel matrix, cementum development and regeneration.

J Clin Periodontol 1997;24:658–668.

[5] Chong CH, Carnes DL, Moritz AJ, Oates T, Ryu OH, Simmer J, Cochran DL.

Human periodontal fibroblast response to enamel matrix derivative, amelogenin, and platelet-derived growth factor-BB.

J Periodontol. 2006 Jul;77(7):1242-52.

[6] Hoang AM, Oates TW, Cochran DL.

In vitro wound healing responses to enamel matrix derivative.

J Periodontol. 2000 Aug;71(8):1270-7.

[7] CH, Carnes DL, Moritz AJ, Oates T, Ryu OH, Simmer J, Cochran DL.

Human periodontal fibroblast response to enamel matrix derivative, amelogenin, and platelet-derived growth factor-BB.Chong

J Periodontol. 2006 Jul;77(7):1242-52

[8] Sato S, Kitagawa M, Sakamoto K, Iizuka S, Kudo Y, Ogawa I, Miyauchi M, Chu EY, Foster BL, Somerman MJ, Takata T.

Enamel matrix derivative exhibits anti-inflammatory properties in monocytes

J Periodontol. 2008 Mar;79(3):535-40

[9] Cardaropoli G, Leonhardt AS.

Enamel matrix proteins in the treatment of deep intrabony defects.

J Periodontol 2002;73:501-504.

[10] Garrett S.

Periodontal regeneration around natural teeth.

Ann Periodontol 1996, 1:621-666.

[11] Kaldipis CDR, Ruben MP.

Treatment of intrabony periodontal defects with enamel matrix derivative: a literature review.

J Periodontol 73:1360-1376

[12] Lyngstadaas SP, Lundberg E, Ekdahl H, Andersson C, Gestrelus S.

Autocrine growth factors in human periodontal ligament cells cultured on enamel matrix derivative.

J Clin Periodontol. 2001 Feb;28(2):181-8

[13] Francis J. Hughes, Wendy Turner, Georgios Belibasakis & Gianluca Martuscelli

Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation

Periodontology 2000, Vol. 41, 2006, 48–72

[14] Rodrigues TL, Marchesan JT, Coletta RD, Novaes AB Jr, Grisi MF, Souza SL, Taba M Jr, Palioto DB.

Effects of enamel matrix derivative and transforming growth factor-beta1 on human periodontal ligament fibroblasts

J Clin Periodontol. 2007 Jun;34(6):514-22.

[15] Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G.

Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation.

Periodontol 2000. 2006;41:48-72.

[16] Cattaneo V, Rota C, Silvestri M, Piacentini C, Forlino A, Gallanti A, Rasperini G, Cetta G.

Effect of enamel matrix derivative on human periodontal fibroblasts: proliferation, morphology and root surface colonization. An in vitro study.

J Periodont Res 2003; 38; 568–574.

[17] Hirooka H.

The biologic concept for the use of enamel matrix protein: true periodontal regeneration.

Quintessence Int. 1998 Oct;29(10):621-30

[18] Greenstein G.

Emdogain: evidence of efficacy

Compend Contin Educ Dent. 2000 Apr;21(4):299-305, 308, 310

[19] Cochran DL, King GN, Schoolfield J, Velasquez-Plata D, Mellonig JT, Jones

The effect of enamel matrix proteins on periodontal regeneration as determined by histological analyses.

A.J Periodontol. 2003 Jul;74(7):1043-55.

[20] Gestrelius S, Andersson C, Lidstrom D, Hammarstrom L, Somerman M.  
In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative.  
J Clin Periodontol. 1997, 24:685-92.

[21] Petinaki E, Nikolopoulos S, Castanas E.  
Low stimulation of peripheral lymphocytes, following in vitro application of  
Emdogain.  
J Clin Periodontol. 1998, 25(9):715-20.

[22] Nikolopoulos S, Petinaki E, Castanas E..  
Immunologic effects of emdogain in humans: one-year results.  
Int J Periodontics Restorative Dent. 2002, 22(3):269-77.

[23] Yuan K, Hsu CW, Tsai WH.  
The induction and possible subsequent effect of human antibodies against porcine  
enamel matrix derivative.  
J Periodontol. 2006, 77(8):1355-61.

[24] Carinci F, Piattelli A, Guida L, Perrotti V, Laino G, Oliva A, Annunziata M,  
Palmieri A, Pezzetti F.  
Effects of Emdogain on osteoblast gene expression.  
Oral Dis. 2006, 12(3):329-42.

[25] Takayanagi K, Osawa G, Nakaya H, Cochran DL, Kamoi K, Oates TW.  
Effects of enamel matrix derivative on bone-related mRNA expression in human  
periodontal ligament cells in vitro.  
J Periodontol. 2006, 77(5):891-8.

[26] Otsuka T, Kasai H, Yamaguchi K, Nishihara T.  
Enamel matrix derivative promotes osteoclast cell formation by RANKL production  
in mouse marrow cultures.

J Dent. 2005, 33(9):749-55.

[27] Rincon JC, Xiao Y, Young WG, Bartold PM.

Enhanced proliferation, attachment and osteopontin expression by porcine periodontal cells exposed to Emdogain.

Arch Oral Biol. 2005, 50(12):1047-54.

[28] Shimizu E, Nakajima Y, Kato N, Nakayama Y, Saito R, Samoto H, Ogata Y.

Regulation of rat bone sialoprotein gene transcription by enamel matrix derivative.

J Periodontol. 2004, 75(2):260-7.

[29] Weishaupt P, Bernimoulin JP, Trackman P, Hägewald S.

Stimulation of osteoblasts with Emdogain increases the expression of specific mineralization markers.

Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008 Aug;106(2):304-8.

[30] Haase HR, Bartold PM.

Enamel matrix derivative induces matrix synthesis by cultured human periodontal fibroblast cells.

J Periodontol. 2001, 72(3):341-8.

[31] Sculean A, Blaes A, Arweiler N, Reich E, Donos N, Brex M

The effect of postsurgical antibiotics on the healing of intrabony defects following treatment with enamel matrix proteins.

J Periodontol. 2001 Feb;72(2):190-5.

[32] Lee AZ, Jiang J, He J, Safavi KE, Spangberg LS, Zhu Q. Stimulation of

cytokines in osteoblasts cultured on enamel matrix derivative. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008 Jul;106(1):133-8.



[33] Myhre AE, Lyngstadaas SP, Dahle MK, Stuestol JF, Foster SJ, Thiemermann C, Lilleaasen P, Wang JE, Aasen AO.

Anti-inflammatory properties of enamel matrix derivative in human blood.

J Periodontal Res. 2006, 41(3):208-13.

[34] J Bone Miner Res. 2008 Dec;23(12):1995-2006.

Bioactive nanofibers instruct cells to proliferate and differentiate during enamel regeneration.

Huang Z, Sargeant TD, Hulvat JF, Mata A, Bringas P Jr, Koh CY, Stupp SI, Snead ML.

[35] Smith CE, Wazen R, Hu Y, Zalzal SF, Nanci A, Simmer JP, Hu JC.

Consequences for enamel development and mineralization resulting from loss of function of ameloblastin or enamelin.

Eur J Oral Sci. 2009 Oct;117(5):485-97.

[36] Barron MJ, Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC, Hunt C, Mironov A, Kingswell NJ, Maycock J, Shuttleworth CA, Dixon MJ.

A mutation in the mouse Amelx tri-tyrosyl domain results in impaired secretion of amelogenin and phenocopies human X-linked amelogenesis imperfecta.

Hum Mol Genet. 2010 Apr 1;19(7):1230-47. Epub 2010 Jan 12.

[37] Kido J, Nakamura T, Asahara Y, Sawa T, Kohri K, Nagata T: Osteopontin in gingival crevicular fluid.

Osteopontin in gingival crevicular fluid

J Periodont Res 2001; 36: 328±33

[38] Juan Guzmán Cruz, Rafael Flores Martínez, Jazmine Gómez Martínez, Erick Soberanes

Gutiérrez, Maricela Escarela Serrano,1 Carlos d'Hyver de las Deses2

Osteoporosis. Conceptos básicos para la práctica diaria

Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas 2009;14(3):128-40

[39] Ferrer Cañabate J, Tovar I, Martínez P.  
Osteoprotegerina y Sistema RANKL/RANK: ¿el futuro del metabolismo óseo?  
An Med Interna (Madrid) 2002; 19: 385-388.

[40] Therapeutic implications of osteoprotegerin  
Sofia Fili\*1, Maria Karalaki1 and Bernhard Schaller2  
Cancer Cell International 2009, 9:26

[41] Larsson, B.M., Larsson, K., Malmberg, P., and Palmberg, G.  
Gram positive bacteria induce IL.6 and IL-8 production in human alveolar  
macrophages and epithelial cells Inflammations 1999, 23:217-230

[42] Ozato, K., Tsujimura, H. and Tamura, T.  
Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the  
immune system  
Biotechniques 2002, Suppl:66-69, 70, 72 C3a, C5a.

[43] Svanborg, C., Godaly, G., and Hedlund, M.  
Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and  
host defence  
Curr. Opin. Microbiol. 1999, 2:99-105

[44] Guidotti, L.G., and Chisari, F.V.  
Cytokine-mediated control of viral infections  
Virology 2000, 273:221-227

[45] Larsson, B.M., Larsson, K., Malmberg, P., and Palmberg, G.  
Gram positive bacteria induce IL.6 and IL-8 production in human alveolar  
macrophages and epithelial cells

Inflammations 1999, 23:217-230

[46] Ozato, K., Tsujimura, H. and Tamura, T.

Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the immune system

Biotechniques 2002, Suppl:66-69, 70, 72 C3a, C5a.

[47] Svanborg, C., Godaly, G., and Hedlund, M.

Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence

Curr. Opin. Microbiol. 1999, 2:99-105

[48] Guidotti, L.G., and Chisari, F.V.

Cytokine-mediated control of viral infections

Virology 2000, 273:221-227

[49] Boraschi D, Bossu P, Macchia G, Ruggiero P, Tagliabue A.

Structure-function relationship in the IL-1 family.

Front Biosci. 1996 Oct 1;1:d270-308.

[50] Dinarrello CA

The biological properties of interleukine-1.

Eur Cytokine Netw. 1994 Nov-Dec;5(6):517-31

[51] Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F.

The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release.

J Immunol. 2006 Apr 1;176(7):3877-83. Review.

[52] Ogura N, Shibata Y, Kamino Y, Matsuda U, Hayakawa M, Oikawa T, Takiguchi H, Izumi H, Abiko Y.

Stimulation of interleukin-6 production of periodontal ligament cells by porphyromonas endodontalis lipopolysaccharide.

Biochem Med Metab Biol. 1994 Dec;53(2):130-6.

[53] Huang GT, Do M, Wingard M, Park JS, Chugal N.

Effect of interleukin-6 deficiency on the formation of periapical lesions after pulp exposure in mice.

Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001 Jul;92(1):83-8.

[54] Alber G, Al-Robaiy S, Kleinschek M, Knauer J, Krumbholz P, Richter J, Schoeneberger S, Schuetze N, Schulz S, Toepfer K, Voigtlaender R, Lehmann J, Mueller U.

Induction of immunity and inflammation by interleukin-12 family members.

Ernst Schering Res Found Workshop 2006;(56):107-27

[55] Kang BY, Kim TS.

Targeting cytokines of the interleukin-12 family in autoimmunity.

Curr Med Chem. 2006;13(10):1149-56. Review.

[56] Becker C, Wirtz S, Neurath MF.

Stepwise regulation of TH1 responses in autoimmunity: IL-12-related cytokines and their receptors.

Inflamm Bowel Dis. 2005 Aug;11(8):755-64

[57] Alejandro V Villarino and Christopher A Hunter

Biology of recently discovered cytokines: Discerning the pro- and anti-inflammatory properties of interleukin-27

Arthritis Res Ther. 2004;6(5):225-33. Epub 2004 Aug 16.

[58] Bastos KR, Marinho CR, Barboza R, Russo M, Alvarez JM, D'Império Lima MR

What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells?  
Microbes Infect. 2004 May;6(6):630-6

[59] Orozco A, Gemmell E, Bickel M, Seymour GJ.  
Interleukin-1beta, interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid and serum of patients with gingivitis and periodontitis.  
Oral Microbiol Immunol. 2006 Aug;21(4):256-60.

[60] Ita M.  
Role of IFN-gamma in nonviral infection  
Nippon Rinsho. 2006 Jul;64(7):1269-74.

[61] Gattoni A, Parlato A, Vangieri B, Bresciani M, Derna R.  
Interferon-gamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II) (1 of 2 parts)  
Clin Ter. 2006 Jul-Aug; 157 (4):377-86

[62] Feng X.  
Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclasts.  
Gene. 2005 Apr 25;350(1):1-13

[63] Pfeffer K.  
Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors.  
Cytokine Growth Factor Rev. 2003 Jun-Aug;14(3-4):185-91

[64] Liu ZG.  
Molecular mechanism of TNF signaling and beyond.  
Cell Res. 2005 Jan;15(1):24-7.

[65] Murakami S, Okada H.  
Lymphocyte-fibroblast interactions.  
Crit Rev Oral Biol Med. 1997;8(1):40-50

[66] Lekic PC, Pender N, McCulloch CA

Is fibroblast heterogeneity relevant to the health, diseases, and treatments of periodontal tissues?

Crit Rev Oral Biol Med. 1997;8(3):253-68.

[67] J.R. Regueiro González, C. López Larrea S. González Rodríguez, E. Martínez Naves.

Inmunología Biología y patología del sistema inmune.

Editorial Panamericana. ISBN. 84-7903-707-5

[68] Kenneth Murphy, Paul Travers, Mark Walport.

Inmunología de Janeway 7a Ed

Mc Graw hill ISBN-13: 978-970-10-7347-6

[69] Mark S. Rutherford, Alice Witsell, and Lawrence B. Schook

Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited

Journal of Leukocyte Biology Volume 53, May 1993

[70] M-L. Lohmann-Matthes, C. Steinmüller, G. Fra

Pulmonary macrophages

Eur Respir J, 1994, 7, 1678–1689

[71] Lossdörfer S, Sun M, Götz W, Dard M, Jäger A. Enamel matrix derivative promotes human periodontal ligament cell differentiation and osteoprotegerin production in vitro. *J Dent Res.* 2007 Oct;86(10):980-5.

[72] Wada Y, Mizuno M, Tamura M.

Enamel matrix derivative neutralized the effect of lipopolysaccharide on osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand expression of osteoblasts.

*Arch Oral Biol.* 2009 Apr;54(4):306-12.

[73] Pérez-Sayáns M, Somoza-Martín JM, Barros-Angueira F, Rey JM, García-García A.

RANK/RANKL/OPG role in distraction osteogenesis.

*Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 May;109(5):679-86.

[74] Liu C, Walter TS, Huang P, Zhang S, Zhu X, Wu Y, Wedderburn LR, Tang P, Owens RJ, Stuart DI, Ren J, Gao B.

Structural and functional insights of RANKL-RANK interaction and signaling.

*J Immunol.* 2010 Jun 15;184(12):6910-9.

[75] Usui Y, Uematsu T, Uchihashi T, Takahashi M, Takahashi M, Ishizuka M, Doto R, Tanaka H, Komazaki Y, Osawa M, Yamada K, Yamaoka M, Furusawa K.

Inorganic polyphosphate induces osteoblastic differentiation.

*J Dent Res.* 2010 May;89(5):504-9.

[76] Yagi Y, Suda N, Yamakoshi Y, Baba O, Moriyama K.

In vivo application of amelogenin suppresses root resorption.

J Dent Res. 2009 Feb;88(2):176-81.

[77] Miron RJ, Oates CJ, Molenberg A, Dard M, Hamilton DW.

The effect of enamel matrix proteins on the spreading, proliferation and differentiation of osteoblasts cultured on titanium surfaces.

Biomaterials. 2010 Jan;31(3):449-60.

[78] Koike Y, Murakami S, Matsuzaka K, Inoue T.

The effect of Emdogain on ectopic bone formation in tubes of rat demineralized dentin matrix.

J Periodontal Res. 2005 Oct;40(5):385-94.

[79] Yoneda S, Itoh D, Kuroda S, Kondo H, Umezawa A, Ohya K, Ohyama T, Kasugai S.

The effects of enamel matrix derivative (EMD) on osteoblastic cells in culture and bone regeneration in a rat skull defect.

J Periodontal Res. 2003 Jun;38(3):333-42.

[80] Sculean A, Junker R, Donos N, Windisch P, Brex M, Dünker N.

Immunohistochemical evaluation of matrix molecules associated with wound healing following treatment with an enamel matrix protein derivative in humans.



Clin Oral Investig. 2003 Sep;7(3):167-74.

[81] Sato S, Kitagawa M, Sakamoto K, Iizuka S, Kudo Y, Ogawa I, Miyauchi M, Chu EY, Foster BL, Somerman MJ, Takata T.

Enamel matrix derivative exhibits anti-inflammatory properties in monocytes.

J Periodontol. 2008 Mar;79(3):535-40.

[82] Jiang J, Fouad AF, Safavi KE, Spångberg LS, Zhu Q. Effects of enamel matrix derivative on gene expression of primary osteoblasts. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001 Jan;91(1):95-100.

[83] Scatena M, Liaw L, Giachelli CM.

Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Nov;27(11):2302-9.

[84] Cho HJ, Cho HJ, Kim HS.

Osteopontin: a multifunctional protein at the crossroads of inflammation, atherosclerosis, and vascular calcification.

Curr Atheroscler Rep. 2009 May;11(3):206-13.

[85] Hirota S, Imakita M, Kohri K, Ito A, Morii E, Adachi S, Kim HM, Kitamura Y, Yutani C, Nomura S.

Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in atherosclerotic plaques. A possible association with calcification.

Am J Pathol. 1993 Oct;143(4):1003-8.