



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CLONACION Y SECUENCIACION DEL GENE QUE CODIFICA PARA LA PROTEINA DE ADHESION DEL CEMENTO RADICULAR HUMANO.

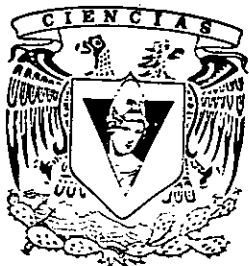
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

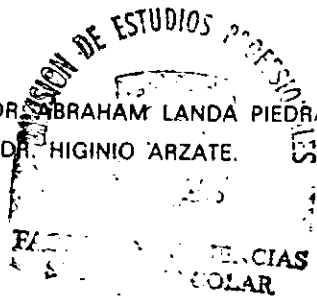
P R E S E N T A :

RUBEN GONZALEZ RIVERA



DIRECTOR DE TESIS: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA.

CODIRECTOR: DR. HIGINIO ARZATE.



1998

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

268332



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Clonación y secuenciación del gene que codifica para la proteína de adhesión del cemento radicular humano.

realizado por **González Rivera Rubén**

con número de cuenta **8526363-3** , pasante de la carrera de **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Abraham Landa Piedra

Propietario

Dr. Higinio Arzate

Propietario

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Suplente

Dra. Ma. De Lourdes Segura Valdéz

Suplente

M. en I.B.B. Benito Estrada Mena

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ

DEPARTAMENTO
DE BILOGIA

PRESENTACIÓN

“Clonación y secuenciación del gene que codifica para la proteína de adhesión del cemento radicular humano”

Tesis realizada en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM y en el Laboratorio de Biología Celular, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM; por el pasante en Biología Rubén González Rivera, bajo la dirección del Dr. Abraham Landa Piedra y la codirección del Dr. Higinio Arzate.

El desarrollo de esta tesis fue apoyado por DGAPA PAPIIT:IN 201795 y por CONACYT (057P-M).

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa Marina e hijos Xchel y Mexitli Atzin, dedico éste trabajo por compartir los momentos de presión y alegría y gracias por que fueron estímulos importantes durante esta trayectoria.

A la pasante de Biología Marina Martínez Vargas por su apoyo durante mis estudios de licenciatura y enseñanza del inglés.

A mi padre porque siempre me estimuló para continuar mis estudios y porque confió en que podría concluir esta meta para poder iniciar otras aún más importantes después de éste importante cimiento.

A mi madre por su apoyo y estímulo brindado en su momento.

A Rodolfo A. y Ricardo Martínez Vargas con sus respectivas familias, ya que me brindaron su apoyo, el cual influyó de manera muy importante para poder concluir mis estudios

Al Dr. Abraham Landa de manera muy especial y al Dr. Higinio Arzate por la asesoría, dirección y codirección de esta tesis.

Al Dr. Manuel Ramos jefe del laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Panamericana y al M.C. Javier Estrada por las facilidades para realizar los trabajos de secuenciación automática.

A las biólogas Ana Lilia Palma Cisneros y Alicia Ochoa Sánchez por su asesoramiento.

A la C.D.E.O. Lorena Garrido Marín por su apoyo durante el inicio de este escrito y por su asesoramiento en el entendimiento de conceptos odontológicos.

A la familia González Pacheco por su estímulo para concluir esta meta.

A mi esposa:

***Eres el arcoiris que tiñe mi vida, con esos colores que irradias al
sonreír.***

Gracias por compartir conmigo tu esplendor.

Mary, que tu sol brille intensamente

Rubén 1998

INDICE GENERAL

PRESENTACIÓN	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE GENERAL	iii
LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS	iv
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	1
1. COMPOSICIÓN INORGÁNICA Y ORGÁNICA DEL CEMENTO RADICULAR HUMANO	1
2. CÉLULAS DEL CEMENTO RADICULAR	4
3. FACTORES DE CRECIMIENTO DEL CEMENTO RADICULAR	4
4. CLASIFICACIÓN DEL CEMENTO RADICULAR	5
5. FUNCIÓN DEL CEMENTO RADICULAR	6
6. DIFERENCIAS ENTRE EL CEMENTO RADICULAR Y EL HUESO	6
7. CEMENTOGÉNESIS Y DESARROLLO DE LA RAÍZ	7
8. EL CEMENTO Y LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS	8
9. PAPEL DEL CEMENTO EN LA REGENERACIÓN PERIODONTAL	9
II. ANTECEDENTES	10
III. OBJETIVOS	11
IV. METODOLOGÍA	12
1. Cultivo de cementoblastos	12
2. Producción de medio condicionante	12
3. Preparación de extracto crudo de cementoblastos (ECC)	12
4. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS)	12
5. Electroelución	13
6. Determinación de la actividad de adhesión	13
7. Producción de un anticuerpo policlonal contra la PAC	13
8. Inmunoelctrotransferencia	14
9. Inmunofluorescencia indirecta	14
10. Titulación de la biblioteca de cDNA de cementoblastos	15
11. Tamizaje	15

12. Preparación de DNA de fago	16
13. Reacción en cadena de la DNA polimerasa	16
14. Electroforesis en geles de agarosa	16
15. Digestión con endonucleasas de restricción	17
16. Transformación de fago a plásmido	17
17. Preparación alcalina pequeña de plásmido	17
18. Preparación alcalina grande de plásmido	18
19. Secuenciación de DNA	18
V. RESULTADOS	19
1. Purificación de la proteína PAC	19
2. Anticuerpo policlonal anti-PAC	21
3. Localización de la PAC en tejidos del órgano dentario	22
4. Aislamiento	22
VI. DISCUSIÓN	27
VII. ANEXO	30
VIII. REFERENCIAS	35

LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

PAC	Proteína de adherencia del cemento radicular humano
Anti-PAC	Anticuerpo anti-proteína de adherencia del cemento radicular humano
ECC	Extracto crudo de cementoblastos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
EDTA	Ácido etilen diamino tetracético
pH	Potencial de iones hidrogeno
ml	Mililitro
λ	Microlitro
rpm	Revoluciones por minuto
mAmp	Miliamperios
NC	Nitrocelulosa
°C	Grados centigrados
Kb	Kilo base
KDa	Kilo Daltons
D.O.	Densidad óptica
pb	Pares de bases
M	Molar
mM	Milimolar
h	Hora
min.	Minuto
mm	Milímetro
IgG	Inmunoglobulina G
mg	Miligramos
PCR	Reacción en cadena de la DNA Polimerasa
1X	Una vez
V/V	Relación volumen-volumen
P/V	Relación peso-volumen
pmol	Picomolas
U	Unidades
Lb	Libras
ng	Nanogramos
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SM	Amortiguador para preservar bacteriofagos
TAE	Amortiguador de tris-acetato de sodio
TE	Amortiguador de Tris-EDTA
γNC	Inmunoglobulinas normal de conejo.

RESUMEN

El cemento radicular Humano. Es un tejido conectivo mineralizado que cubre la superficie radicular del diente, y forma la interfase entre esta superficie y el tejido conectivo del ligamento periodontal. El cemento radicular humano se encuentra cubriendo la dentina radicular y es el sitio de inserción de las fibras de Sharpey que provienen del tejido conectivo blando y las fibras colágenas que provienen del hueso alveolar.

El objetivo del presente trabajo fue contribuir a la caracterización molecular de la proteína de adherencia del cemento radicular humano (PAC), así como la obtención y secuenciación del cDNA que codifica para la proteína PAC. La estrategia utilizada fue purificar a la proteína PAC a partir de los productos de secreción que los cementoblastos producen en el medio condicionante (MC). Este medio condicionante fue pasado a través de una columna de DEAE-celulosa y la fracción obtenida fue sometida a electroelución para purificar una banda de 55 kDa, previamente identificada con un anticuerpo monoclonal anti-PAC. La fracción obtenida de la electroelución en SDS-PAGE presentó 2 bandas una de 55 y otra de 50 kDa, respectivamente. Esta fracción tiene la propiedad de promover la adherencia de fibroblastos del ligamento periodontal.

La banda proteica de 55 kDa de la fracción electroeluida fue aislada y se utilizó para producir un anticuerpo policlonal en conejo denominado anti-PAC. La caracterización inmunológica parcial de este anticuerpo en ensayos de Inmunolectrotransferencia mostró que el anticuerpo policlonal anti-PAC reconoce una banda a 55 kDa en el medio de cultivo de cementoblastos y dos bandas una de 55 y otra de 50 kDa en la fracción purificada por electroelución (PACE).

Estudios de inmunofluorescencia indirecta utilizando este anticuerpo policlonal anti-PAC sobre cortes del órgano dentario de humano, mostraron una gran especificidad por el tejido del cemento radicular, y no a tejidos del ligamento periodontal, dentina, encía y hueso alveolar.

El anticuerpo policlonal anti-PAC fue utilizado como sonda para aislar un cDNA a partir de una biblioteca preparada a partir de una línea celular derivada de un cementoblastoma humano que expresa el fenotipo de los cementoblastos.

De los tamizajes realizados con el anticuerpo anti-PAC se obtuvieron 3 clonas la 241, 242 y 243. Las secuencias de bases y aminoácidos de las clonas 242 y 243 son idénticas. Además, la secuencia de aminoácidos presentó una homología del 10% a una fosfoproteína y a un precursor de una proteína de saliva, ambas de humano y ricas en prolina. El análisis de su secuencia de aminoácidos mostró que contiene el tripéptido RGD motivo relacionado a la propiedad de la adherencia y la presencia de 2 secuencias (CAP-1 VGEPNPTGIAG y CAP-2 ARGEPNPAGX), recientemente obtenidas de un análisis de aminoácidos de varios péptidos obtenidos a partir de la PAC de bovino. Los datos antes mencionados indican que se ha logrado obtener un fragmento del gene que codifica para la PAC humana.

I. INTRODUCCIÓN

El diente se encuentra ubicado en el órgano del periodonto (Esquema I). El periodonto (del griego, *peri* en torno; y *odontos* diente) está formado por cuatro tejidos: la encía, el ligamento periodontal (PDL), el cemento radicular y el hueso alveolar. El periodonto tiene las siguientes funciones: Adherencia del diente al hueso mediante las fibras periodontales, es un amortiguador de los esfuerzos generados por la masticación, el habla, la deglución y mantiene la integridad y funcionalidad de la superficie facial. Realiza el ajuste a cambios estructurales asociados con el incremento de la edad. Además de ser una defensa ante las influencias nocivas externas ambientales presentes en la cavidad oral (1).

EL CEMENTO RADICULAR.

Es un tejido conectivo mineralizado que cubre la raíz de dentina del diente, y forma la interfase entre esta superficie y el tejido conectivo del ligamento periodontal.

1.- COMPOSICIÓN INORGÁNICA Y ORGÁNICA.

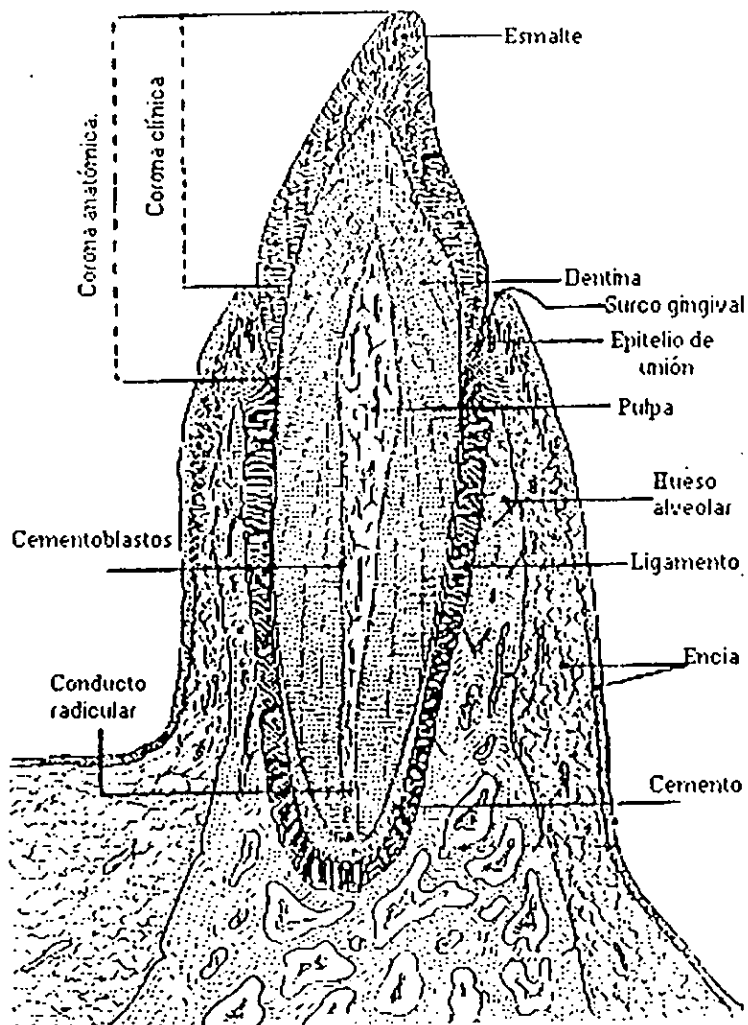
a) Composición inorgánica.

El cemento contiene 46% de sales inorgánicas del total de su peso seco, estas, se encuentran en forma de cristales de hidroxiapatita, con pequeñas cantidades de fosfatos de calcio amorfos, los cuales, participan en los procesos de mineralización. El contenido de magnesio es de 0.5 a 0.9 %, con igual número que los iones calcio en la matriz de cristales. Esta concentración corresponde a cerca de la mitad de la que se halla en la dentina, mientras que es muy similar a la observada en hueso. Este tejido contiene una alta concentración de fluoruro respecto a la que presentan otros tejidos mineralizados, equivalente al 0.9% del peso seco, la cual presenta un incremento general con la edad y varía con el suministro nutricional. También contiene de 0.1 a 0.3 % de azufre como un constituyente de la matriz orgánica, mismo que presenta una mayor distribución que otros componentes inorgánicos (2).

b) Composición orgánica

La matriz orgánica esta formada predominantemente por fibras de colágena densamente empaçadas y rodeadas por una matriz granular relativamente esparcida, glucoproteínas no colágenas y proteoglicanos, cuya función es proporcionar un andamio para la deposición de los cristales de hidroxiapatita (3).

El tipo de colágena predominante es el tipo I que constituye aproximadamente el 95% de la matriz orgánica. La colágena tipo III junto con otras proteínas constituyen el 5 % restante. La baja concentración de este último tipo de colágena, es debida a las fibras de Sharpey que residen en el ligamento periodontal, que han sido embebidas en este tejido calcificado (1).



Esquema 1. Corte longitudinal de diente

c) Proteínas no colágenas

El cemento presenta glucoconjugados ya sea glucoproteínas o proteoglucanos y una variedad de otras proteínas, de forma similar al hueso. Aunque predominan proteínas no colágenas como: sialoproteína ósea y osteopontina (ambas glucoproteínas fosforiladas y sulfatadas fosforiladas). Estas glucoproteínas se unen ligeramente a las matrices de colágena y fuertemente a las integrinas a través del tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD) (3).

La osteonectina, es una proteína glucosilada encontrada en la matriz extracelular de tejidos mineralizados. En hueso, se presenta una estrecha relación entre osteonectina y colágenas, por lo que parece indicar que tiene un efecto en los procesos de mineralización (4 y 5).

Las glucoproteínas fibronectina y tenascina, son proteínas de alto peso molecular y multifuncionales de matriz extracelular. Durante el desarrollo del diente, estas proteínas están presentes en la vaina radicular de Hertwig en el momento de la diferenciación de los odontoblastos; mientras que en el desarrollo tardío son encontradas en el sitio de adherencia del ligamento periodontal, junto a la superficie del cemento pero no en la pared del cemento propiamente dicha (2).

El cemento presenta además condroitin sulfato, dermatan sulfato y ácido hialurónico como los glucosaminoglucanos constituyentes de los proteoglucanos, los cuales inhiben la calcificación de la colágena por hallarse en localizaciones estratégicas en los cristales de hidroxapatita (6). Por otra parte, la osteocalcina, es una proteína encontrada en abundancia en hueso, dentina y cemento, parece estar participando en los procesos de mineralización (7).

A pesar de la identificación de las proteínas antes mencionadas en el cemento radicular, se desconoce el papel que cada una de ellas realiza en este tejido.

2. - CELULAS DEL CEMENTO RADICULAR.

Este tejido de halla constituido por dos tipos celulares: cementoblastos y cementocitos. Los cementoblastos son formadores de la matriz extracelular ligeramente densa, amorfa y finamente granular que se encuentra en el espacio interfibrilar del cemento acelular (8). Mientras que los cementocitos son cementoblastos que han quedado atrapados en la matriz extracelular, y están separados del cemento calcificado que los rodea por un espacio perilagunar, que puede contener material globular (1).

Se considera que los cementocitos son relativamente inactivos, degeneran, y se nutren mediante un sistema de interconexión de canaliculos. Asimismo, tienen capacidad lítica para la transformación de los componentes de la matriz que lo están rodeando (9). Los cementocitos que están más cercanos a la superficie, parecen cementoblastos, sin embargo la cantidad de citoplasma es más reducida, contiene menos retículo endoplásmico y pocas mitocondrias. Ambos tipos celulares expresan un fenotipo más parecido al de los osteoblastos, (2).

3.- FACTORES DE CRECIMIENTO DEL CEMENTO RADICULAR

Los factores de crecimiento celular derivados de plaquetas (PDGF-AA, -AB, -BB) han sido ampliamente descritos en el periodonto *in vitro* e *in vivo*. Estos son quimioatrayentes e influyen en la actividad proliferativa de los fibroblastos del ligamento periodontal (FLP), participan en la síntesis de colágena y de proteínas en general (10 y 11). Además, participan también, junto con fibroblastos de la encía en la síntesis de hialuronato que es necesario para la formación de agregados de proteoglicanos, los cuales proporcionan el enrejado para la deposición de matriz extracelular (12 y 13).

El factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), funciona como quimiotáctico para las células del ligamento periodontal y promueve la migración y proliferación de células endoteliales humanas e incrementa su unión si existe colágena tipo I sobre la superficie de dentina (14 y 15).

El factor de Crecimiento Epidermal (EGF) y sus receptores parecen participar en la diferenciación de los FLP (16). La regulación de este, se encuentra relacionada con el mantenimiento de las células en un estado indiferenciado (con disminución de la actividad de la fosfatasa alcalina), mientras que una disminución en la concentración del mismo influye en la diferenciación de los cementoblastos y osteoblastos (17).

El factor de crecimiento derivado del cemento (CGF), tiene actividad mitogénica sobre los FLP y fibroblastos de la encía, su acción es potenciada por el factor de crecimiento epidermal (EGF) (18 19). El CGF promueve la migración y

crecimiento de células progenitoras de los cementoblastos presentes en sitios adyacentes a la matriz de dentina, y participa en la diferenciación de los mismos. También promueve la síntesis de colágena y podría jugar un papel importante en la formación de tejido conectivo y restauración de la adherencia de este a la superficie radicular del diente previamente expuesta por enfermedad o traumatismo **(12 y 19)**.

Las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), producen múltiples efectos, actuando como mitógeno sobre células mesenquimáticas indiferenciadas y precursores de osteoblastos, induciendo la expresión de osteoblastos (ejem. incrementando la actividad de la fosfatasa alcalina en células de hueso). También actúan como quimioatrayentes para células mesenquimáticas, monocitos, y unen la colágena tipo IV a la matriz extracelular **(15)**.

Los factores de crecimiento implícitos en la reparación y regeneración del cemento radicular, regulan diversos procesos celulares claves, tales como: proliferación celular, quimiotaxis (migración dirigida), diferenciación y síntesis de la matriz, vía unión a receptores específicos de la superficie celular. Estas moléculas naturales han demostrado tener un efecto pleiotrópico sobre la reparación de heridas en el periodonto **(20)**.

4.- CLASIFICACIÓN DEL CEMENTO RADICULAR.

La clasificación del cemento mas aceptada hasta la actualidad se fundamenta en el análisis de la estructura del tejido y fue propuesta por Owens, y modificada por Schroeder y Page. En ella se distinguen cinco clases **(1)**.

El cemento Afibrilar Acelular: Es una forma de cemento de origen desconocido que carece de fibras de colágena o células atrapadas. Se encuentra frecuentemente en la región cervical de la superficie de esmalte del diente y puede ser depositado en regiones donde el epitelio reducido del órgano de esmalte esta en degeneración y el tejido conectivo ha llegado a estar en contacto con el esmalte.

El cemento Fibrilar Acelular: Esta formado exclusivamente de un sistema de fibras colagénicas y fibras de Sharpey. Se localiza en la región media y apical de la raiz.

El cemento celular contiene ambos sistemas de fibras extrínsecas e intrínsecas: Frecuentemente contiene fibras intrínsecas de colágena, y también presenta fibras de Sharpey. El cemento celular con fibras intrínsecas es una forma de cemento de reparación que no contiene fibras de Sharpey, las fibras intrínsecas forman la mayor parte de la matriz.

La mezcla estratificada de cemento celular, presenta a los tipos de cemento acelular con fibras extrínsecas y cemento celular con fibras intrínsecas en una matriz de cemento acelular con fibras intrínsecas, el cual contiene fibras y fibrillas de colágena, entre las cuales se encuentran las fibras de Sharpey y los cementocitos.

El cemento con fibras extrínsecas y haces de fibras de colágena, no es mineralizado, mientras que en el cemento con mezcla de fibras, es decir las fibras intrínsecas y las fibras de Sharpey, presentan un alto grado de mineralización. Las fibras de Sharpey son fibras originadas del ligamento periodontal, las cuales no son calcificadas en su origen y podrían ser calcificadas cuando quedan embebidas en el cemento, es entonces, cuando se empiezan a acumular iones inorgánicos y otros componentes requeridos para la calcificación.

5.- FUNCIÓN DEL CEMENTO RADICULAR

El cemento radicular es el tejido donde se insertan las fibras periodontales a la superficie del diente, participa en el mantenimiento y control del espacio del ligamento. Además, es un medio a través del cual los daños en la superficie de la raíz son reparados y constituye la matriz, por medio de la cual, las fibras de colágena del tejido periodontal quedan embebidas, sirviendo como sitio de adherencia a prolongaciones de fibras de tejido conectivo y fibras de Sharpey (1).

6.- DIFERENCIAS ENTRE EL CEMENTO RADICULAR Y EL HUESO

El cemento es un tejido conectivo mineralizado, el cual se asemeja estructuralmente al hueso, aunque varía en diversos e importantes aspectos funcionales (ver TABLA I):

TABLA I. DIFERENCIAS CEMENTO RADICULAR VS HUESO

<u>Cemento</u>	<u>Hueso</u>
- Avascular	-Vascularizado
-Carece de inervación	-Presenta inervación
-Está sometido a mínima remodelación	-Está sometido a remodelación
-Es muy baja la cantidad depositada	-La cantidad depositada es alta
-Sirve de inserción de fibras del ligamento periodontal y gingivales para fijación del diente.	-Inserción de músculos para todo el cuerpo.
-Las sales inorgánicas forman el 46% del total del peso seco.	-Las sales inorgánicas forman el 70% del total del peso seco.

7.- CEMENTOGÉNESIS Y DESARROLLO DE LA RAÍZ.

La cementogénesis y la formación de la raíz de dentina son procesos estrechamente relacionados.

a) Desarrollo de la raíz

El desarrollo de la raíz del diente se lleva a cabo en la vaina epitelial radicular de Hertwig. La cual se forma a partir del crecimiento excesivo del epitelio reducido del esmalte. La vaina radicular de Hertwig, esta constituida por una doble pared celular de epitelio odontogénico. La parte más apical denominada diafragma, la cual es un centro de proliferación, que induce la diferenciación de células de la papila dental a odontoblastos (21). Otra parte de la vaina es la corona la cual sufre una fragmentación. Esta pérdida de continuidad permite a las células del interior del revestimiento del folículo dental ponerse en contacto con la raíz (2). Finalmente, la vaina radicular de Hertwig, rodea a la pulpa pero sin entrar en contacto con ella y continúa rodeando la pared externa de predentina en torno al anillo apical de la raíz, durante la elongación de esta.

Los vestigios de la vaina epitelial de Hertwig forman restos del epitelio de Malassez, y se integran al ligamento periodontal (22 y 23).

b) Cementogénesis

La cementogénesis es un proceso que implica la diferenciación de células progenitoras de los cementoblastos, mediante complejas interacciones inductivas entre células epiteliales y células del mesénquima folicular, con el fin de producir el cemento radicular (2). La cementogénesis produce dos tipos de cemento: el acelular y celular

1) Cemento acelular.

Es donde los fibroblastos del tejido conectivo se aproximan a la superficie del primordio de la raíz y forman una pared de fibrillas de colágena que están en contacto con la superficie no calcificada de la dentina, pareciendo una franja de fibrillas de colágena orientada en ángulo recto respecto a la superficie del diente. Estas fibrillas llegan a compactarse y se rodean de procesos celulares de fibroblastos. Los haces de fibras llegan a ser densamente empacados y los fibroblastos migran hacia el tejido conectivo, se postula que son las células que secretan las futuras fibras de Sharpey, en esta etapa.

Cuando ocurre la erupción del diente, esta pared cementoide se mineraliza a lo largo del diente, alrededor de la dentina. Durante el proceso de mineralización se depositan nuevas paredes del cementoide conteniendo extensiones de los haces de fibras originales que pueden formarse y posteriormente calcificarse. El número y medida de las fibras de Sharpey varia con el estado funcional del diente y su incremento y densidad después de haber emergido el mismo (1).

II) Cemento celular

La cementogénesis del cemento celular, se desarrolla preferencialmente sobre la superficie de la raíz del diente del lado de la furca en dientes multiradiculares y en la región apical en dientes con una sola raíz. Después de la separación de las células del epitelio de Hertwig, las células de tejido conectivo se ponen en contacto con la superficie de la raíz, se diferencian en cementoblastos y producen cementoide en el cual algunas células llegan a ser incorporadas dando lugar a los cementocitos (1).

8.- El cemento y la cicatrización de heridas

El proceso de reparación de heridas, implica la formación de cemento con la inserción del sistema de fibras periodontales y fibras de Sharpey. Durante la cicatrización de heridas las células cementogénicas provenientes del ligamento periodontal o del espacio del hueso alveolar migran y se adhieren a la superficie expuesta de la raíz del diente, repoblando las áreas de reabsorción. Estas células se diferencian a cementoblastos y se unen a la matriz extracelular inicial de reparación secretada por ellos a la pared descalcificada y a fibrillas de colágena residuales y expuestas.

Los cementoblastos durante el desarrollo embrionario son originados de la papila dental, mientras que durante los procesos de reparación son originados de células mesenquimáticas indiferenciadas localizadas en el espacio del endoste del hueso alveolar y áreas paravasculares del ligamento periodontal (24, 25, 26, 27 y 28).

En los procesos de mineralización del cemento, participa la enzima fosfatasa alcalina (Beertsen 1967), la cual se puede encontrar unida a la membrana plasmática, o bien a la matriz extracelular (29). Una saturación de iones fosfato, liberados de ésteres orgánicos, podría resultar en la precipitación de sales de fosfato de calcio. (30, 31 y 32). La actividad de la fosfatasa alcalina adyacente a fibras intrínsecas de cemento celular es más alta que en las fibras extrínsecas de cemento acelular.

La deposición del cemento no cesa cuando termina la formación de la raíz, ni cuando el diente erupciona, ésta continúa durante la vida (Zandar 1958), ya que es esencial para la migración mesial y la erupción compensatoria del diente, lo cual permite el rearrreglo de las fibras del ligamento periodontal y el mantenimiento de la adherencia de las fibras durante el movimiento del diente (1).

9.- PAPEL DEL CEMENTO EN LA REGENERACIÓN PERIODONTAL

La regeneración periodontal es definida como la restauración de los diferentes componentes del periodonto, tales como, el hueso alveolar, ligamento periodontal, cemento radicular y la encía para impedir la pérdida del diente a causa de enfermedades (38). Durante el proceso de regeneración periodontal se presenta una marcada homología a la génesis de la formación de los dos tipos de cemento celular con fibras extrínsecas y con fibras intrínsecas, sobre el crecimiento de los dientes humanos.

En analogía a la formación de la unión dentina-cemento en el desarrollo embriológico. Durante el proceso de regeneración se presenta la interdigitación de las fibrillas de colágena nuevamente formadas con los residuos de fibrillas colagénicas de la matriz dentinal, las cuales ocurren antes del inicio de la depositación de matriz extracelular por los cementoblastos.

Durante la reabsorción del diente por el daño causado, el nuevo sitio de adherencia llega a ser obscurecido por la presencia de material electrodenso. Asimismo, se observa la acumulación globular que es indicativa de los procesos de mineralización. Eventualmente, la unión fibrilar revela líneas basofílicas y electrodensas en la cual posteriormente se deposita la matriz de reparación. Esta se asemeja al cemento celular con fibras intrínsecas formado sobre la raíz no reabsorbida.

Los procesos de reparación de la reabsorción del diente recapitulan los eventos que ocurren durante el desarrollo embriológico del diente (2, 37 y 38).

II. ANTECEDENTES

El cemento radicular humano se encuentra cubriendo la dentina radicular y es el sitio de inserción de las fibras de Sharpey que provienen del tejido conectivo blando y las fibras colágenas que provienen del hueso alveolar.

La formación del cemento sobre la raíz del diente continúa a través de la vida y puede ser interrumpida por condiciones patológicas periapicales o periodontales. Cambios en la posición del diente pueden ejercer variaciones espaciales y temporales en la deposición del cemento en respuesta a la presión o tensión sobre la raíz y la superficie del hueso (2).

Sustancias derivadas del raspado del cemento de diente humano presentan actividad quimiotáctica para fibroblastos gingivales (33). Asimismo, el extracto de cemento de bovino parece ser un potente mediador de la adherencia de fibroblastos, pero se cree que esta propiedad puede deberse a moléculas diferentes tales como fibronectina, laminina y colágena, e incluso una proteína de 55 kDa, denominada proteína de adherencia del cemento radicular humano (PAC) (34). La PAC promueve la adherencia de fibroblastos del ligamento periodontal y se encuentra localizada únicamente en el cemento radicular. Asimismo promueve la expresión de la fosfatasa alcalina, la actividad de adherencia de condrocitos, la proliferación y diferenciación de células mesenquimáticas, además de la síntesis de proteoglicanos ricos en condroitin sulfato (36).

La existencia de proteínas de adherencia como la PAC en el cemento, sugieren una participación en conjunto con otras moléculas para el buen funcionamiento del periodonto. Asimismo, el conocer los diferentes componentes de este tejido permitirá realizar estudios de diferenciación, quimiotaxis y migración celular, además de funcionar como marcadores de este tejido cemento. Esto abre la posibilidad que en el futuro estas proteínas sean una herramienta aplicable en la terapia para la regeneración periodontal (33y 35).

En la actualidad no se conoce con exactitud cuales son los factores que influyen en la adherencia del cemento, se ha reportado que el extracto de cemento ejerce efectos quimiotácticos sobre células indiferenciadas del hueso alveolar (36), no se ha determinado con exactitud los factores que influyen en la adherencia del cemento durante el desarrollo embriológico y en etapa adulta durante procesos de cicatrización, es importante reiterar que las investigaciones en este campo están en sus inicios, ya que no se conocen los procesos moleculares de la cementogénesis.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Clonar y secuenciar el gene que codifica para la proteina de adhesión del cemento radicular humano.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Purificar la proteina de adherencia del cemento radicular (PAC) a partir de un cementoblastoma humano
- Caracterizar la actividad biológica de adherencia.
- Producir un anticuerpo policlonal específico anti-PAC.
- Determinar la expresión espacial de la PAC en tejidos periodontales.
- Clonar a partir de una biblioteca de cDNA de cemento radicular humano el cDNA que codifica para la PAC.
- Secuenciar las clonas aisladas
- Análisis de las secuencias obtenidas

IV. METODOLOGÍA

1.- Cultivo de cementoblastos.

Se cultivo una línea celular de cementoblastos de un tumor de cemento humano (cementoblastoma) en cajas de cultivo conteniendo medio Dulbecco-Vogt (Medio DV), 10% de suero fetal de bovino (39). Se crecieron hasta llegar a confluencia. Las células fueron despegadas de las cajas de cultivo utilizando tripsina porcina-EDTA al 0.025% en PBS (anexo). El cultivo celular se centrifugó en tubos de 15 ml (Falcon) a 1500 rpm, para obtener la pastilla de células. Finalmente, las células se resuspendieron en PBS y fueron contadas, transferidas a otras cajas de cultivo y congeladas en nitrógeno líquido.

2.- Producción de medio condicionante (MC).

Los cementoblastos en etapa de semiconfluencia, fueron lavados con PBS 4-6 veces y posteriormente incubados en medio libre de suero (Medio condicionante MC), durante 48 hrs. Se obtuvieron aproximadamente 4 litros de MC el cual fue dializado contra PBS 0.1X, liofilizado y resuspendido en PBS. Se purificó la PAC secretada al medio condicionante (MC), por medio de una columna de intercambio iónico (DEAE-Celulosa) de 10 cm de longitud y 1 cm de diámetro y fue equilibrada con este mismo amortiguador, el medio de cultivo fue cargado en la columna. Posteriormente esta fue lavada con 10 volúmenes de PBS y la PAC eluida con 0.5 M de NaCl. Esta fracción fue dializada contra PBS y liofilizada. Las proteínas unidas a la columna entre ellas la PAC (55 kDa), fueron eluidas con una solución de PBS adicionado de 0.5 M NaCl. Esta fracción fue dializada, liofilizada, resuspendida en PBS pH 7.4 y congelada a -20°C hasta su uso.

3.- Preparación de Extracto Crudo de Cementoblastos (ECC).

Aproximadamente 1×10^6 células resuspendidas en 200 λ de PBS (anexo), fueron sonicadas en un polytron (Brinkman Instruments) durante 30 seg a 4°C, para romper la membrana celular y así liberar el máximo de las proteínas que contienen las células.

4.- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS).

Se preparó un PAGE-SDS reductor al 10% (ver anexo) (Laemmli, 1970). Se mezclaron 100 λ de MC con 100 λ amortiguador de proteínas 2x (anexo) a una dilución 1:1. Las muestras y los estándares de pesos moleculares (Gibco BRL) se calentaron a 100°C durante 1 min. La electroforesis se corrió a 100 mA utilizando una fuente de poder (EC 3000-90, E-C APARATUS Co.), hasta que el frente de corrida llegó al borde del gel.

5.- Electroelución.

La banda de 55 kDa que corresponden a la proteína PAC (36) fue identificada y recortada de los geles PAGE-SDS tomando como referencia los marcadores de peso molecular de bajo rango (GIBCO BRL). Para la electroelución se empleó una cámara Electro-Eluter (Modelo 422, BIO RAD) y un amortiguador de electroelución (ver anexo). La electroelución se realizó aplicando una corriente eléctrica constante de 20 mA durante una hora. La proteína eluida fue visualizada en gel de poliacrilamida con SDS, teñido con azul de Coomassie o con nitrato de plata (Wray 1981) y por medio de Inmunoelctrotransferencia utilizando el anticuerpo monoclonal anti-PAC (36), (el hibridoma de este anticuerpo ya no existe y se dispuso de poca cantidad de anticuerpo monoclonal anti-PAC, sólo el suficiente para los ensayos fundamentales para el inicio de los experimentos propuestos). A esta fracción purificada se le denominó fracción de proteína PAC eluida (PACE).

6.- Determinación de la actividad de adhesión.

Las células (fibroblastos) del ligamento periodontal humano (FLPH) utilizadas en este ensayo fueron obtenidas de una línea celular establecida (34). Se utilizaron cultivos celulares en el segundo pasaje. Placas de cultivo de 24 pozos (Costar) no tratadas para cultivo celular, fueron incubadas con la proteína PAC electroeluida a concentraciones de 1, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ en PBS, se utilizó colágena tipo I (5 $\mu\text{g/ml}$), como control positivo mientras que, el control negativo consistió de medio libre de suero. Las placas fueron incubadas durante 24 h a 4°C, posteriormente fueron lavadas con PBS. Los sitios no específicos fueron bloqueados con 2 mg/ml de BSA en medio libre de suero durante una hora.

Las células FLPH fueron tripzinizadas y lavadas profusamente en medio libre de suero durante cuatro veces retirando restos de suero fetal bovino.

Las células se sembraron a una densidad de 2×10^4 y se incubaron durante una hora a 37°C, las células no adheridas se desecharon y las placas fueron lavadas con PBS 3 veces y las células adheridas a los pozos se evaluaron con el método de Hayman y cols, con algunas modificaciones. Las células se fijaron con paraformaldehído al 3.5 % durante 15 min y teñidas con toluidina al 0.1 % durante 3 h, el exceso de colorante fue lavado con PBS y la actividad de adherencia fue determinada extrayendo el colorante de las células con SDS al 1%, y la absorbancia del colorante fue leída a 600 nm. Este ensayo se realizó por triplicado y al menos 3 veces.

7.- Producción de un anticuerpo policlonal contra la PAC.

El sobrenadante que contiene a la PAC del cultivo de células de la línea celular de cementoblastos, pasado por la columna de DEAE-celulosa, se liofilizó y se sometió a electroforesis en PAGE-SDS a una concentración del 10%. Se identificó y cortó la región donde se encuentra la proteína PAC. La proteína PAC contenida en el gel de poliacrilamida se electroeluyó del gel (ver anexo). La

proteína eluida se mezcló volumen a volumen con adyuvante completo de Freund para la primera inmunización y con adyuvante incompleto para las subsecuentes inmunizaciones. Los conejos *Nueva zelanda* hembras fueron inmunizados con aproximadamente 100 µg de la proteína eluida. Las inmunizaciones fueron por vía subcutánea cada 15 días. La aparición de anticuerpos en contra de la PAC en los sueros de los conejos, fueron monitoreados por medio de Inmunoelctrotransferencia utilizando membranas conteniendo el MC y la PAC purificada. Los títulos de anticuerpos fueron determinados por medio de ELISA. Cuando los conejos presentaron buenos títulos y calidad de anticuerpos anti-PAC, los conejos fueron sangrados a blanco y el suero fue separado. La fracción de inmunoglobulinas anti-PAC fue purificada de la siguiente manera. El suero de los conejos fue mezclado con amortiguador a una proporción 1:1 V/V. Entonces esta mezcla fue pasada a través de una columna de afinidad de proteína A-sefarosa (BIORAD). La fracción de IgG's (anticuerpo policlonal anti-PAC) obtenidas se liofilizó, se determinó su concentración por medio del método de Bradford (1976) y se probó su actividad por medio de inmunoelctrotransferencia (Towbin 1979), respectivamente.

8.- Inmunoelctrotransferencia.

Algunos PAGE-SDS fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa (NC) (GIBCO BRL), siguiendo el procedimiento reportado por Towbin (1979). La transferencia se llevó a cabo a 150 mAmp durante una hora en una Cámara húmeda de transferencia (Mini trans-blot, BIORAD). La membrana de NC fue recortada en tiras, se incubó en una solución bloqueadora (anexo). Cada membrana se incubó con el primer anticuerpo durante 1 h, después se lavó con PBS-tween (anexo) por 3 veces y se incubó durante 45 min con el segundo anticuerpo anti-conejo (SIGMA) que tiene acoplada la enzima peroxidasa. Las membranas fueron lavadas como antes se mencionó y los anticuerpos unidos a estas se revelaron con una solución conteniendo 20 mg de diaminobencidina, 5 λ de peróxido de hidrógeno (3%) disueltos en 100 ml de PBS pH 7.4

9.- Inmunofluorescencia indirecta.

Se utilizaron cortes del órgano dentario completo (diente y periodonto), de humano. Brevemente, el tejido dentario fue fijado en formaldehído al 10 % durante 24 h y lavado profusamente con agua corriente. Posteriormente fue desmineralizado en una solución de EDTA al 10% durante 7 semanas. El órgano dentario fue deshidratado con concentraciones ascendentes de alcohol etílico, aclarado en xilol y embebido en parafina. Se realizaron cortes de 5 µm de grosor para la inmunofluorescencia indirecta. Los cortes fueron desparafinizados en xilol y rehidratados secuencialmente con las siguientes soluciones etanol al 96%, 70%, 50% y en PBS pH. 7.4. Los cortes fueron incubados con el anticuerpo policlonal anti-PAC diluido 1:100 en PBS y como control se utilizó el suero normal de conejo a una dilución de 1:100. Los cortes fueron incubados durante una h en una cámara húmeda a 4°C. Los cortes se lavaron con PBS por tres veces de 3 min

cada vez. Entonces se adicionan 100 λ de un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a fluoresceína (SIGMA) diluido 1:50 en PBS pH7.4 y se incubó durante 60 min a 4°C. Finalmente, los cortes fueron lavados como se menciona para el primer anticuerpo, y los cubreobjetos montados sobre el corte con una solución de glicerol PBS en relación 1:9: con 2 mg/ml de DABCO (1,2-Diazo bicyclo 2.2 octane), observados y fotografiados en un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss, modelo Axiophot).

10.- Titulación de la biblioteca de cDNA de Cementoblastos.

Una colonia de la bacteria huésped XL1-Blue fue crecida a 37°C hasta alcanzar una $D_{0.600} = 0.5$ en medio SOBMB (Anexo), las bacterias fueron centrifugadas a 3,000 r.p.m., durante 10 min. y resuspendidas en 1/10 de sulfato de magnesio 10 mM. Se utilizaron 200 λ de las bacterias para ser infectadas con 10 λ de las siguientes diluciones de fagos (1×10^{-4} , y 1×10^{-6}) de la biblioteca de cDNA de cemento radicular clonada en el vector λ ZAPXR (Arzate y cols. 1992), a 37°C durante 20 min. La mezcla se adicionó a 3 ml de medio top-agar SOBMB, previamente fundido para ser sembradas en una caja petri con medio SOBMB y se incubaron a 37°C toda la noche (Huynh y cols 1985, Sambrook y cols 1989).

La eficiencia y el título de la biblioteca se determinó contando el número de placas líticas y refiriéndolos como fagos/ml de solución.

11.- Tamizaje.

Se infectaron bacterias *Escherichia coli* XL 1-Blue con 10,000 fagos y se sembraron como ya se mencionó anteriormente. Cuando ya existieron placas líticas (aproximadamente 5 h), las cajas se cubrieron con filtros de NC previamente impregnados con una solución de IPTG 10 mM y se incubaron por 4 h más. Terminado ese tiempo los filtros en las cajas se marcaron asimétricamente y se removieron de las cajas. Los filtros fueron transferidos a una solución TBS-T1 (anexo) durante 45 min (15 ml/filtro) y a una solución de TBS-T2 durante 1.5 hrs. Terminado ese tiempo se transfirieron a una solución TBS-T3 en la cual se adicionó el primer anticuerpo policlonal (anti-PAC) adsorbido en contra de *E. coli*, diluido 1:100 en la misma solución. Los filtros de NC con el anticuerpo se incubaron en agitación durante toda la noche a temperatura ambiente. Los filtros fueron lavados por dos veces en una solución de TBS-T3 y una vez con TBS (anexo).

Se adiciono el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a la enzima fosfatasa alcalina (SIGMA) a una dilución 1:2000 en TBS-T1 y se incubo durante 2h. Finalmente los filtros se lavaron como ya se mencionó para el primer anticuerpo y los anticuerpos unidos a la membrana se revelaron con solución de un estuche de sustrato conjugado (Paranitrofenil fosfato (PNPP), Bromocloro indolyl fosfato (BCIP) para fosfatasa alcalina (BIORAD).

Las clonas que fueron positivas al tamizaje primario fueron aisladas y utilizadas un tamizaje secundario y terciario, con el fin de aislar las clonas. Las clonas obtenidas fueron transferidas a medio SM y guardadas a 4°C, hasta su uso.

12.- Preparación de DNA de Fago:

Para la preparación del DNA del fago se utilizaron 300 λ del fago para infectar bacterias *E coli* XL1-Blue que fueron plaqueadas en una caja de cultivo con medio s3ido a 37°C durante toda la noche. Se recolect3 el lizado con 5 ml de medio SM y se les adicion3 200 λ de cloroformo. La mezcla anterior se centrifug3 a 3,000 rpm y el sobrenadante se transfiri3 a un tubo nuevo y se denomin3 "fago stock".

Para la preparaci3n de DNA se utilizaron 700 λ del sobrenadante anterior y se le adicionaron 700 λ de la soluci3n de polietilenglicol (PEG) 20% con NaCl 2.5 M y se incub3 en hielo durante 1 hr. La suspensi3n se centrifug3 a 14,000 r.p.m. por 15 min a temperatura ambiente y se descart3 el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en 200 λ de medio SM e incubado a 37°C con 2 λ de RNAsa (1mg/ml) y 2 λ de DNAsa (10 mg/ml) durante 30 min. Entonces, se adicion3 2 λ de SDS al 10% y 2 λ de EDTA 0.5 M pH 8.0 y se incub3 a 68°C durante 15 min. Terminado este tiempo, se realiz3 una extracci3n fen3lica, de donde la fase acuosa se transfiri3 a un tubo nuevo y fue precipitada con isopropanol a -70°C durante 20 min. y centrifugada a 14,000 r.p.m. durante 15 min a 4°C. El precipitado obtenido se sec3 y resuspendi3 en 30 λ de TE (anexo).

13.- Reacci3n en Cadena de la DNA Polimerasa.

El templado de DNA fue amplificado por medio de Reacci3n en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para el caso del DNA f3gico y el de fagemido pBluescript se utilizaron oligonucle3tidos que se encuentra flanqueando al sitio m3ltiple de clonaci3n de estos vectores (oligonucle3tidos T3 y T7) (ver anexo). Las condiciones del PCR para estos vectores fue la siguiente: 1X (95 °C- 3 min, 50°C-1min, 72°C-2 min), 30X (95 °C-1 min, 50 °C-1min, 72 °C-2 min), 1X (53 C - 1 min, 72 C -5 min)

14.- Electroforesis en geles de agarosa.

Todas las muestras de DNA fueron mezcladas (1:1 v/v) con amortiguador de cargado 2X (ver anexo) y corridas en geles de agarosa al 1% con el amortiguador de electroforesis TAE (Tris-acetato) (Ver anexo). Despu3s de cargar las muestras en el gel, se aplic3 corriente el3ctrica constante de 100 Volts. Como marcador se utiliz3 el DNA del fago Lambda digerido con la enzima Hind III y pBR 322 digerido con la enzima MspI.

15.- Digestión con endonucleasas de restricción.

Las digestiones se realizaron con las siguientes enzimas Bam HI, Xho I Eco RI y Sal I (New England Biolabs y Gibco BRL). Las digestiones fueron realizadas de acuerdo a las recomendaciones de las casas comerciales (Anexo). Las digestiones fueron visualizadas en geles de agarosa en amortiguador TAE al 1% y teñidos con bromuro de etidio (SIGMA).

16.- Transformación de fago a plásmido.

Se creció por toda la noche a 37°C una colonia de las bacterias *E. coli* SOLR y *E. coli* XL1-Blue MRF' que previamente fueron seleccionadas con los antibióticos kanamicina y tetraciclina, respectivamente (ver anexo). El cultivo se centrifugó a 3000 rpm y se resuspendió en 1/10 de sulfato de Magnesio 10 mM. Cada clona positiva de fago obtenida del tamizaje con el anticuerpo policlonal anti-PAC (inciso 11) se utilizó para infectar *E. coli* XL1-blue MRF'. Las células infectadas fueron sembradas e incubadas a 37°C, hasta la aparición de placas líticas. Una placa lítica (1×10^6 fagos) y 10 λ del fago ExAssist se incubaron con bacterias *E. coli* XL1-blue MRF' durante 5 min a 37°C. A la mezcla anterior se le adicionó medio 2XYT (anexo) y se continuó la incubación durante 3 hr a 37°C. Posteriormente, la mezcla se incubó a 70°C durante 20 min, se centrifugó a 3,000 rpm y el sobrenadante obtenido se guardó a 4°C. Entre 5-10 λ del sobrenadante anterior conteniendo los fagemidos seleccionados se utilizó para infectar 200 λ de células *E. coli* SOLR que se incubaron a 37°C durante 15 min. Finalmente, se sembraron en cajas con medio de cultivo LB adicionadas con antibiótico ampicilina e incubaron a 37°C durante toda la noche para obtener colonias de bacterias.

Esta transformación de fago a plásmido tiene el siguiente fundamento los fagos como el Lambda ZAP y el fago ExAssist se pueden replicar en la cepa de *E. coli* XL1-blue MRF' y pueden formar fagos híbridos entre ambos. Cuando estos fagos (ZAP, EXAssist, híbridos) son utilizados para infectar a una cepa de *E. coli* SOLR por la genética de la cepa solamente se replicar el fago híbrido, que en su proceso de replicación libera al plásmido contenido en lambda ZAP.

17.- Preparación alcalina pequeña de plásmido.

Una de las colonias anteriormente transformadas, se inoculó en medio de cultivo SOBM-ampicilina, y se crecieron a 37°C durante toda la noche. Se centrifugó a 3,000 rpm 1.5 ml del cultivo bacteriano para obtener la pastilla de bacterias. Se adicionó a la pastilla 200 λ de la solución I (ver anexo), y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación se adicionaron 400 λ de solución II fresca (ver anexo) y se agitó e incubó en hielo durante 5 min. Se adicionaron 300 λ de solución III (ver anexo), se agitó e incubó en hielo durante 5 min. La mezcla anterior se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Este sobrenadante se le adicionaron 600 λ de isopropanol frío, se incubó en hielo durante 5 min y se centrifugó a 10,000 r.p.m. durante 5 min a 4 °C para obtener una pastilla de plásmido. Esta

pastilla se lavó con 100 λ de etanol al 70% frío. La pastilla así obtenida se secó y resuspendió en 30 λ de TE.

18.- Preparación alcalina grande de DNA de plásmido.

Este procedimiento es similar a la preparación alcalina pequeña de DNA de plásmido, solo que se parte de 50 ml de cultivo bacteriano. Además, el DNA se sometió a digestiones con 2 λ de la enzima RNAasa (10 mg/ml) para digerir el RNA que se encuentra contaminando la preparación de DNA. Se realizó una extracción con Fenol-cloroformo. El sobrenadante obtenido de esta extracción fue pasado a través de una columna de sefrosa CL4B equilibrada con amortiguador TE. Las fracciones obtenidas de la columna fueron observadas por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador de TAE. Las fracciones conteniendo el plásmido puro, se precipitaron con acetato de sodio 3 M pH 5.2 y Etanol absoluto a 70°C durante 20 min, y se centrifugaron a 14,000 rpm para obtener la pastilla de plásmido. Esta pastilla se secó y se resuspendió en 40 λ de amortiguador de TE. Finalmente, este DNA fue cuantificado en un fluorómetro (D y NA Quant 200 FLUOROMETER, Hoefer)

19.- Secuenciación de DNA.

El DNA de plásmido purificado se secuenció utilizando el estuche de Rhodamine Terminator Ampli TAQ DNA (PERKIN ELMER). Se utilizaron entre 500 ng de DNA para realizar las reacciones de secuencia. Se utilizaron oligonucleótidos universales de M13 hacia adelante, M13 Reverso y oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de los fragmentos en cuestión (ver anexo), a una concentración de 10 pmol y el premix ready reaction. La reacción fue aforada a 20 λ con H₂O didestilada desionizada. La PCR se llevó a cabo en un termociclador (PERKIN ELMER 2400), con el siguiente programa: Un ciclo de desnaturalización inicial de 96°C 1 min y 25 ciclos de: 96°C-10 seg; 50°C-5 seg; y 60°C-4 min. Una vez finalizado el PCR las muestras se purificaron en columnas (CENTRI-SEP) previamente hidratadas. Las columnas se centrifugaron a 3,000 r.p.m. durante 2 min. La muestra eluida de la columna fue secada en una bomba de vacío, sin aplicar calor. La muestra se resuspendieron en 24 λ de Terminator Ready Reaction que viene en el estuche de secuenciación. Finalmente, se pusieron a electroforesis en un secuenciador automático ABI PRISM 310 (PERKIN ELMER).

V. RESULTADOS

Purificación de la proteína PAC.

El medio condicionante de cementoblastos en cultivo fue dializado contra PBS 0.1X, liofilizado y resuspendido en PBS. El MC fue parcialmente purificado en una columna de 10 cm de longitud y 1 cm de diámetro de DEAE-celulosa. La columna fue equilibrada con este mismo amortiguador con 10 volúmenes de la columna y el MC fue cargado en la columna. Posteriormente esta fue lavada con 10 volúmenes de PBS y la PAC eluida con PBS adicionado con 0.5 M de NaCl. Esta fracción fue dializada contra PBS y liofilizada. Para determinar su actividad de adherencia, esta fue resuspendida en PBS y su concentración determinada por el método de Bradford. Esta fracción fue sometida a electroforesis preparativa en un gel de poliacrilamida al 10 % con SDS y teñido con nitrato de plata (Wray 1981) (Fig. 1). Esta figura en el carril 1, muestra extracto crudo de cementoblastos y en el carril 2, los productos de secreción de los cementoblastos obtenidos del medio de cultivo (crudo). En el carril 3, se observa la fracción eluida de la columna de DEAE-celulosa la cual presenta un enriquecimiento de la proteína PAC. En el carril 4 se muestra la fracción PACE. Cabe mencionar que la proteína PAC de 55 kDa fue identificada en la fracción eluida de la columna por medio de la técnica de inmunoelectrotransferencia utilizando el anticuerpo monoclonal anti-PAC (36). La fracción eluida con 0.5 M NaCl del MC fue sometida a electroforesis preparativa y la región donde la proteína PAC migra (55 kDa) fue cortada y purificada por medio de la técnica de electroelución. En la misma figura 1, carril 4 se muestra la composición de la fracción PACE, la cual presenta dos bandas con pesos moleculares de 50 y 55 kDa. Previo a la inmunización del conejo, la proteína eluida fue sometida a electroforesis en gel PAGE con SDS probada con un anticuerpo monoclonal anti-PAC y anti-albúmina, para determinar que nuestra proteína no contenía albúmina, ya que la albúmina es abundante en esta fracción, se cortó la banda que migró a 55kDa y fue inoculada a conejos.

Por otro lado, la Fracción PACE fue probada en ensayos de adherencia para determinar su actividad como promotor de esta. Estos ensayos se llevaron a cabo utilizando diversas diluciones de la fracción PACE, colágena tipo I (control positivo) y medio de cultivo libre de suero (control negativo) (Fig. 2). La fracción PACE mostró un 70% de adhesión de las células a una concentración de 10 µg/ml en comparación con la colágena tipo I, la cual presentó el 100%. No se observó adhesión celular significativa en el control negativo (medio libre de suero).

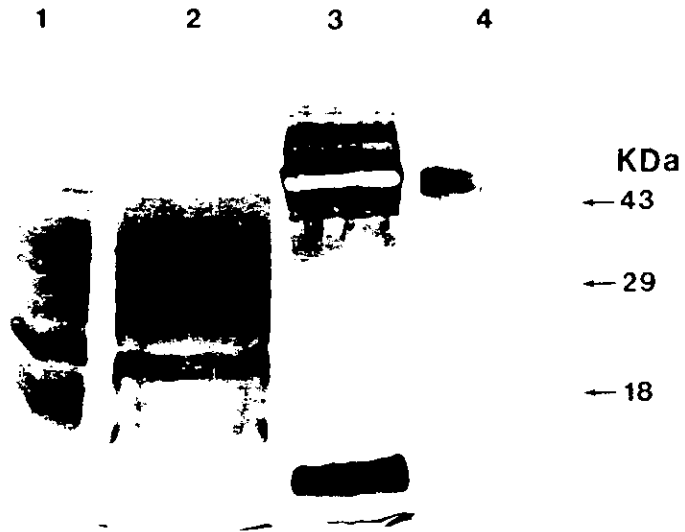


Fig. 1 Purificación de la proteína PAC a partir de las proteínas secretadas al medio de cultivo por cementoblastos derivados de un cementoblastoma humano. PAGE-SDS teñido con nitrato de plata: Carril 1.- Extracto crudo de cementoblastos (ECC); Carril 2.- Medio de cultivo de cementoblasto (MC); Carril 3.- Fracción eluida de la columna DEAE-celulosa y Carril 4.- Fracción electroeluida de proteína PAC (PACE).

Anticuerpo policlonal.

El hibridoma del anticuerpo monoclonal anti-PAC (36) ya no existe y se dispuso de poca cantidad de este anticuerpo, entonces fue necesario obtener un anticuerpo anti-PAC. La banda identificada por el anticuerpo monoclonal anti-PAC fue utilizada para inmunizar conejos nueva Zelanda y producir un anticuerpo policlonal anti-PAC. Cuando los conejos produjeron altos títulos (1×10^6) de anticuerpos anti-PAC, se procedió a la purificación de la fracción de gamaglobulinas (anticuerpo policlonal anti-PAC) por medio de una columna de Proteína A-sefarosa. Este anticuerpo policlonal anti-PAC fue ensayado por Inmunolectrotransferencia para determinar su especificidad.

Promoción de la adherencia en FLP por la PAC

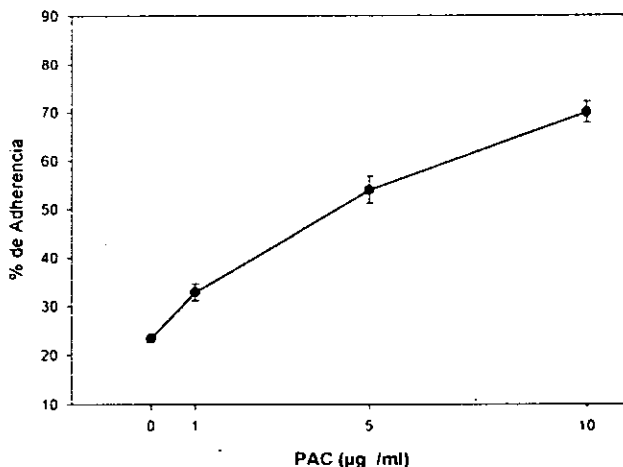


Fig. 2. Promoción de la adherencia de fibroblastos de ligamento periodontal por la proteína PAC electroeluida. Los resultados mostrados son los porcentajes de tres diferentes ensayos.

La figura 3, muestra los resultados de la inmunoelectrotransferencia en la que se utilizó como antígeno unido a la NC el medio condicionante de los cementoblastos (carriles 1 a 3), en contra del anticuerpo policlonal anti-PAC, (carril 1) el cual reconoce 1 banda de 55 kDa; (carril2) el anticuerpo monoclonal anti-PAC que reconoce una sola banda de 55 kDa; (carril 3) el anticuerpo anti-albumina que reconoce una sola banda. Asimismo, en la fracción PACE (carriles 5-8); (carril 5) El anticuerpo policlonal anti-PAC reconoce dos bandas, de 55 kDa y 50 kDa; (carril 6) el anticuerpo monoclonal anti-PAC reconoce las mismas bandas que el anticuerpo policlonal anti-PAC, (carril 7) el anticuerpo policlonal anti-albúmina no reconoce ninguna banda en la fracción PACE y (carril 4) las γ NC no reconocen ninguna banda en el MC.

Localización de la PAC en tejidos del órgano dentario.

El anticuerpo policlonal anti-PAC fue utilizado en ensayos de inmunofluorescencia indirecta para realizar estudios de localización en cortes del órgano dentario y estructuras periodontales adyacentes. Este anticuerpo policlonal anti-PAC reconoció claramente estructuras en el tejido del cemento radicular. En este tejido reconoció intensamente a los cementoblastos, cementocitos y a la matriz cementoide. Algunas poblaciones celulares en el ligamento periodontal fueron reconocidas por este anticuerpo. Este anticuerpo no reconoció ninguna estructura en la dentina radicular, la encía y el hueso alveolar (Fig. 4).

Aislamiento y caracterización parcial de un cDNA que codifica para la PAC.

El anticuerpo policlonal anti-PAC fue utilizado para tamizar una biblioteca de cDNA de expresión de cementoblastos de un fibroma cementificante construida en el vector λ ZAPXR. Después de realizado el tamizaje, se obtuvieron tres clonas positivas las cuales fueron denominadas de la siguiente manera: λ 241, λ 242, λ 243. Estas clonas de fago fueron transformadas a plásmido y sometidas a PCR utilizando los iniciadores T3 y T7 incluidos en el vector y como templado el DNA de cada clona. La figura 5, muestra el tamaño de los insertos encontrados para la clona 241= ~1.3; 242= ~1.2 y 243= ~1.2 Kb respectivamente. Este tamaño de inserto fue liberado del vector por medio de digestiones con las enzimas Xho I y Bam HI, excepto el inserto de la clona 241. Cabe mencionar que el inserto de la clona 243 también fue liberado con las enzimas Eco RI y Xho I.

Los plásmidos (241, 242 y 243) fueron secuenciados en un aparato automático utilizando los iniciadores de M13 hacia adelante, M13 reverso e iniciadores internos diseñados a partir de las secuencias generadas por los primeros (ver anexo, tabla 2). El análisis de las secuencias fue realizado en el programa computacional Pcgene, así como la consulta en el Banco de Genes (Gene bank).

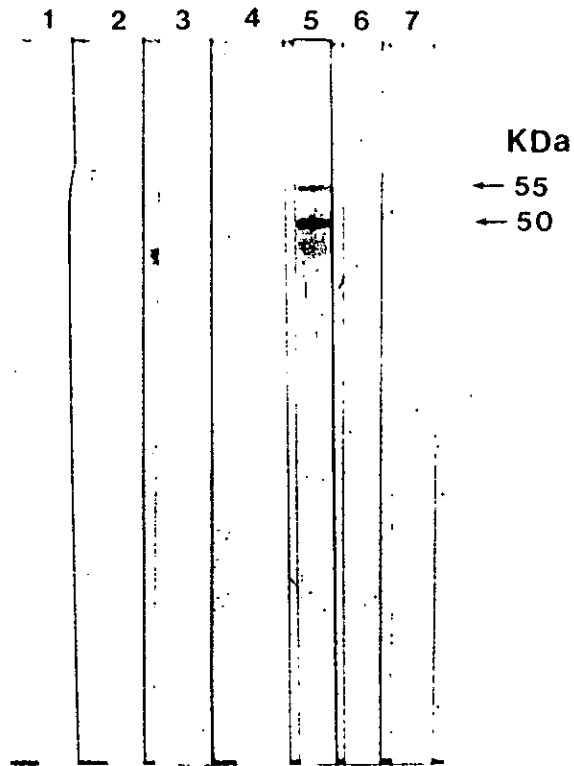


Fig. 3 Análisis de los anticuerpos policlonales anti-PAC por medio de la técnica de inmunoelectrotransferencia. Los carriles 1 a 4 son medio de cultivo (MC) y carriles 5 a 7 son fracción electroeluida de la proteína PAC (PACE). Carril 1.- Anticuerpo policlonal anti-PAC; Carril 2.- Anticuerpo monoclonal anti-PAC; Carril 3.- Anticuerpo policlonal anti-albúmina; Carril 4.- Gammaglobulina normal de conejo (γ NC); Carril 5.- Anticuerpo policlonal anti-PAC; Carril 6.- Anticuerpo monoclonal anti-PAC y Carril 7.- Anticuerpo policlonal anti-albúmina

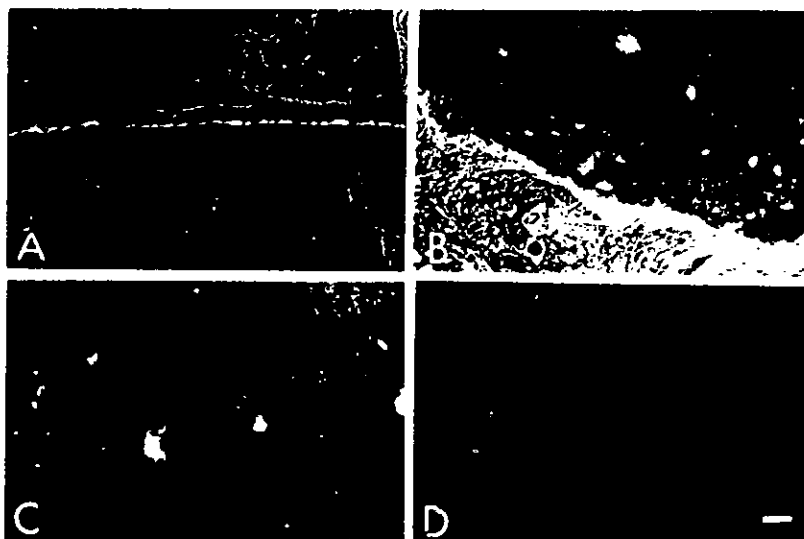


Fig. 4 Inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo policlonal anti-PAC en el periodonto humano. A). Expresión de la PAC a lo largo de la superficie radicular (aumento 10X). B) Intensa reacción del tejido cementoide en el cemento celular, también algunos cementocitos inmersos en la matriz del cemento tiñen positivamente (aumento 20X), C) microfotografía mostrando cementocitos (aumento 40X). D) Control utilizando suero no inmune de conejo. Barra = 5 μ m.

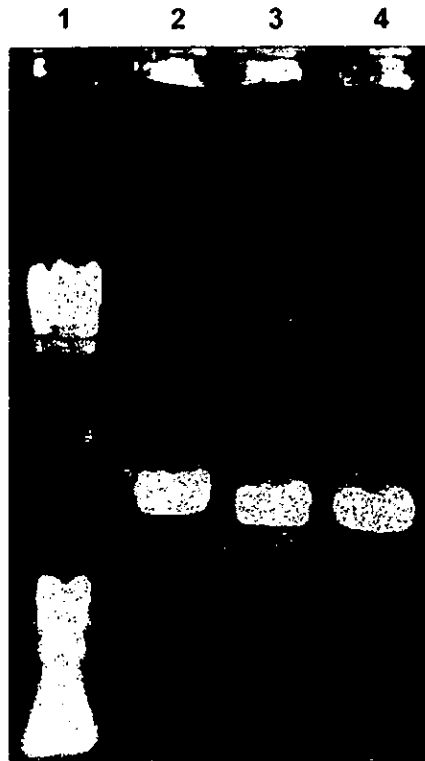


Fig. 5 Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, mostrando la amplificación por PCR del inserto de las clonas positivas obtenidas con el anticuerpo policlonal anti-PAC. Carril 1.- Marcador de pesos moleculares del fago λ digerido con la enzima Hind III y pBR 322 con la enzima .MspI; Carril 2.- clona 241; Carril 3.- clona 242 y Carril 4 clona 243

La clona 241 presentó un tamaño de 1,120 nucleótidos, así como repetidas interrupciones o codones de término dentro de su secuencia (razón por la cual no se profundizó más en su caracterización). Sin embargo, esta clona no presentó regiones características para la adherencia, pero si algunas de sus regiones presentaron homología con la cadena α IV de colágena, y la cadena β IV del precursor de la integrina.

Las clonas 242 y 243 resultaron idénticas y en la figura 6 se presenta la secuencia de aminoácidos de la clona 243. Ambas clonas presentaron un tamaño de inserto de 1020 bases. El análisis de la secuencia de nucleótidos mostró un solo marco de lectura abierto de 325 aminoácidos que codifica para un péptido de 35,106 kDa. Otros análisis computacionales mostraron la presencia del tripéptido RGD (del nucleótido 536 al 544) y la presencia de 2 secuencias (CAP-1 VGEPNPTGIAG y CAP-2 ARGEPNPAGX entre los nucleótidos 698 a 730 y 694 a 724 respectivamente), recientemente obtenidas de un análisis de aminoácidos realizado con un fragmento peptídico obtenido por digestiones con tripsina. Además, la secuencia de aminoácidos presentó homología a una fosfoproteína, a un precursor de una proteína de saliva, ambas de humano y ricas en prolina y a la cadena α V de laminina.

```

1   MSCDLPSVAA APSMCPDGCS FVSLMCRKEQ WHCPPWGVIS
41  PLPAQALGVR EEPCAASTRS QGRKRHVPPC PRSWPHQAPP
81  PDSQGSWGSP PSAHSPQGLQ LRGGTAVLKG HRDGSVCLGQ
121 TDIAPHIRDA ADEWTIEQRN KEPTDHSLLV GPQIPHVLVC
    ***
161 RANARGDLVE CWESCPLPKV PFTIPRGSQP WAALTVHYMP
201 WPPSRGPGLM EQEGSGRGRG EANPPGIASG HFPSFWPGLA
241 QGPGSRSCSG HAAFRNKLFP AACFQIFIDF CLCFPSFLDK
281 GLLWVTDCTR PVLTHFLKAV HGRTVARWAT EGVGRARGCR
321 GPLPL

```

Fig. 6 . Secuencia de aminoácidos traducida de la secuencia nucleotídica de las bases 44 a 1018 de la clona 243 positiva al anticuerpo policlonal anti-PAC. El motivo de adherencia RGD se muestra en letras oscuras con asteriscos. La secuencia con homología a las secuencias de aminoácidos obtenidas de la CAP de bovino (CAP 1: VGEPNPTGIAG y CAP 2: ARGEPNPAGLPG), se muestran subrayadas y con letras oscuras. El aminoácido prolina (P) se muestran con letra oscura.

VI. DISCUSIÓN

El tejido del cemento radicular humano se produce en muy bajas cantidades sobre la superficie radicular. Por lo que purificar la proteína PAC a partir de este tejido, resulta un proceso laborioso y costoso del cual se obtiene muy bajas cantidades de la proteína de nuestro interés. Por tal motivo en este trabajo se utilizó una línea celular de un cementoblastoma humano que expresa y secreta esta proteína.

Como ya se mencionó la concentración de proteína PAC presente en el ECC y MC es muy baja, por lo que al ser secretada al medio de cultivo se aprovecho para purificarla del medio condicionante. Sin embargo, aunque no se producen grandes cantidades, se recolectaron varios litros de cultivo aprovechando que se tiene una línea celular que expresa el fenotipo del cemento radicular. Sin embargo, el medio de cultivo se encuentra compuesto por un sinnúmero de proteínas en el que predomina la albúmina y en dónde la PAC se encuentra en muy bajas cantidades.

Para su purificación se utilizó una columna de intercambio iónico (DEAE-celulosa) para enriquecer a la proteína PAC contenida en el medio de cultivo de los cementoblastos, sin embargo también se enriquecen otras proteínas entre ellas la albúmina. Por tal motivo, se empleó la técnica de electroelución para purificar a la proteína PAC, lo que resultó en la obtención de una fracción denominada PACE, compuesta por 2 proteínas puras una de 55 kDa y una de 50 kDa. Esta fracción PACE promovió la adhesión de fibroblastos del ligamento periodontal a concentraciones mayores a 5 $\mu\text{g/ml}$, y registrando un 70% de adherencia de las células que se unen a las placas. Lo que indica que la purificación de la proteína por este método no pierde la propiedad de la adhesión y que se enriquece la fracción.

Los ensayos de inmunoelectrotransferencia mostraron que, el anticuerpo monoclonal y el anticuerpo policlonal anti-PAC de conejo reconocen a una banda de 50 kDa en el MC de los cementoblastos y a dos bandas de 55 y de 50 kDa en la fracción PACE, respectivamente. La banda de 50 kDa en el MC es la misma que la banda de 55 kDa reconocida en la fracción PACE por ambos anticuerpos. Asimismo, la banda de 50 kDa en esta misma fracción es probablemente el resultado de la degradación de la PAC, debido a los procesos de purificación. Por otro lado, el anticuerpo anti-albúmina reconoce una banda de alrededor de 55 kDa en el MC, en lugar de una banda de 68 kDa que normalmente presenta la albúmina en este tipo de ensayos. Además, el anticuerpo anti-albúmina no reconoció ninguna banda proteica en la fracción PACE, lo cual sugiere que esta fracción no está contaminada con albúmina y que la proteína de 55 kDa purificada por electroelución es la proteína PAC, así como que la proteína de 50 kDa es un fragmento de la misma. Cabe mencionar, que los efectos de la migración relativa alterada en los geles de poliacrilamida e inmunoelectrotransferencia de la PAC en el medio de cultivo, puede ser el resultado de la gran cantidad de albúmina que lo constituye.

Por otro lado, este anticuerpo policlonal anti-PAC en ensayos de inmunofluorescencia indirecta reconoció específicamente a estructuras presentes en el tejido del cemento radicular, tales como a los cementoblastos, cementocitos, a la matriz cementoide y algunas poblaciones celulares del ligamento periodontal y no a otros tejidos adyacentes a este.

Los resultados antes mencionados mostraron que el anticuerpo policlonal anti-PAC obtenido es específico en contra de la PAC. Por lo que fue utilizado para tamizar la biblioteca de expresión de cementoblastos construida en λ ZAPXR. El tamizaje resultó en la obtención de 3 clonas positivas que presentaron tamaños de inserto de 1.2 a 1.3 kb, que son insertos del tamaño esperado que podrían estar codificando para la PAC que presenta un peso molecular de 55,000 Da.

Los análisis de la secuencia de aminoácidos de la clona 241 presentó varios codones de termino en su secuencia nucleotídica, sin embargo presentó varias regiones pequeñas con homología estructural a proteínas de tipo colágena.

Para el caso, caso de las clonas 242 y 243 los resultados de sus análisis computacionales de la secuencia de bases, mostraron que era clonas idénticas. Estas clonas codifican para una péptido de 325 aminoácidos con un peso molecular de 35,106 kDa. Asimismo, estas secuencias presentaron una baja homología alrededor del 10% con 2 proteínas de tipo colágena, a la fosfoproteína, al precursor de una proteína salival, ambas de humano, ricas en prolina y la cadena α V de laminina. Lo que sugiere que esta proteína pertenece a un grupo de proteínas fibrilares del tipo colágena. Además, la secuencia parcial obtenida presenta el motivo del tripéptido RGD, el cual está reportado como un dominio de adherencia en proteínas. Este hallazgo y la propiedad de adhesión de la PAC purificada presentada en esta tesis, está de acuerdo con lo reportado por otros autores que al depletar al extracto de cemento de proteínas que contienen este dominio (RGD), pierde la capacidad de promover la adherencia (9, 50 y 51). Es muy importante mencionar que la secuencia de aminoácidos de la clona 242 y 243 presentan una identidad del 100% con 2 secuencias, recientemente obtenidas de un análisis de aminoácidos realizado con un fragmento peptídico obtenido de la PAC (CAP-1 VGEPNPTGIAG y CAP-2 ARGEPNPAGX). Además, la secuencia obtenida fue empleada en la búsqueda de proteínas similares o idénticas en el banco de genes mundial (Gen-Bank). Los resultados de esta búsqueda mostraron porcentajes de similitud e identidad muy bajos con otras proteínas incluyendo las de tipo colágena, lo que sugiere que esta proteína no ha sido reportada por otros grupos.

Finalmente no se logró obtener el cDNA completo que codifica para la PAC, ya que ninguna de las clonas presentaron la secuencia de poliadenilación ni la cola de poli A característica de los RNA mensajeros. Sin embargo, esta tesis presenta los primeros avances en el aislamiento de un gene que codifica para una proteína del cemento radicular humano y la obtención de herramientas moleculares como el anticuerpo anti-PAC y una secuencia parcial del gene que codifica para la PAC. El disponer de estas 2 herramientas permitirán profundizar

en la investigación de aspectos moleculares del cemento. Por ejemplo, utilizar el cDNA que codifica para la PAC como sondas para estudiar expresión en el tejido del órgano dentario y para aislar el gene completo con la idea de producir una PAC recombinante, lo que permitiría estudiar el papel que la PAC esta efectuando en la biología del periodonto. Asimismo, se podrían iniciar estudios *in vitro* de como se lleva a cabo el proceso de la cementogénesis, así como la identificación de las células progenitoras del cemento radicular y de un modo muy importante el determinar el papel regulador en este proceso y en la regeneración del periodonto que juega la PAC.

VII. ANEXO

1.- Amortiguador salino de fosfato (PBS)

Stock 10 X

NaCl	137 mM	80.0 gr.
KCl	2.7 mM	2.0 gr.
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	4.3 mM	11.5 gr.
KH ₂ PO ₄	1.4 mM	2.0 gr.

pH 7.4 Aforado a un litro.

4.- Gel SDS-PAGE

Acilamida 30% BIS 0.8%

Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

Tris-HCl 1.5 M pH 6.8

SDS 10%

TEMED N,N,N', N'-tetrametilen diamino (BIORAD)

Persulfato de amonio

Amortiguador para proteínas.

H ₂ O desionizada	3.8 ml.
Tris-HCl 0.5M, pH 6.8	1.0 ml.
SDS 10% P/V	1.6 ml.
2-Mercaptoetanol	0.4 ml.
Azul de bromofenol 1%	0.4 ml.

Amortiguador para electroforesis de proteínas.

5X

Tris base	9.0 gr.
Glicina	43.2 gr.
SDS	3.0 gr.

Se afora a 600 ml de H₂O desionizada.

5.- Amortiguador de electroelución de proteínas.

Tris base	25 mM.	3.0 gr.
Glicina	192 mM.	14.4 gr.
SDS	0.1%	1.0 gr.

Aforado a un litro con H₂O.

8.- Inmunoelctrotransferencia

Amortiguador de transferencia

Metanol	20%
Tris	25 mM.
Glicina	192 mM.

Aforado a un litro con H₂O desionizada.

Amortiguador de Bloqueo

PBS pH 7.4	850.0 ml.
Tween 20, 0.3%	0.150 ml.
(Tween 20, Polioxietileno Sorbitan monolaurato SIGMA).	
Leche 5 %	2.5 gr.
(Leche descremada en polvo Svelty Nestle)	

Solución de lavado (PBS-Tween 20, 0.3%)

PBS pH 7.4	49.850 ml.
Tween 20	0.150 ml.

Solución de revelado

3,3 Diaminobenzidina (SIGMA)	20 mgr.
peróxido de Hidrogeno (MERCK)	5 λ.

Aforar con PBS pH 7.4 p.d.b 100 ml.

10.- Medio de cultivo SOBm

Bacto-triptona	20.0 gr.
Extracto de levadura	5.0 gr.
NaCl	0.5 gr.
MgSO ₄ 7H ₂ O a concentración final de	10 mM.
Kcl	2.5 mM.

Medio de cultivo SM

NaCl	5.8 gr.
MgSO ₄ 7H ₂ O	2.0 gr.
Tris-HCl 1M pH 7.5	50.0 ml.
Gelatina al 2%	5.0 ml.

Medio de cultivo Luria Bertani

Bacto-triptona	10.0 gr.
Extracto de levadura	5.0 gr.
NaCl	10.0 gr.

Los componentes se disuelven y se afora a un litro. El pH de todos los medios se ajusta a 7.0 y se esterilizan en autoclave durante 20 min. a 15 Lb de presión en ciclo líquido. el Mg⁺⁺ y K⁺ se esterilizan por filtración a través de membranas con poros de 0.22 micrómetros de diámetro.

Para medios sólidos se les adiciona bacto agar o agarosa a una concentración final de 1.5% y para Top agar a una concentración final de 0.75%

Para el fago lambda, a los medios se les adiciona 0.02% de maltosa, el cual es un inductor del gen lambda que codifica para el receptor del fago.

11.- Solución TBS

Tris-HCl pH 7.5	50 mM.
NaCl	150 mM.

Solución TBS-T1

Tris-HCl pH 7.5	50 mM.
Tween 20	0.3%

Solución TBS-T2

Tris-HCl pH 7.5	50 mM.
Tween 20	0.3%
Leche	5.0%

Solución TBS-T

Tris-HCl pH 7.5	50 mM.
Tween 20	0.05%

12.- Amortiguador TE

Tris-HCl pH 8.0	10.0 mM.
EDTA pH 8.0	1.0 mM.

13.- Reacción de PCR

Estuche de PCR (BIOTECSA)

DNA	1 λ.
MgCl ₂ 20X	5 λ.
Amortiguador 10X	10 λ.
Deoxinucleotidos 10X	10 λ.
dATP, dCTP	
dGTP, dTTP 2 mM C/U	
Oligonucleotidos de M13	
T3 y T7	10 pmol. C/U
H ₂ O c.b.p.	100 λ.
Amplificasa	5 U.

14.- Amortiguador TAE

Stock 50X

Tris-base	242.0 gr.
Acido acético glacial	57.1 ml.
EDTA 0.5M pH 8.0	100.0 ml.

Gel de agarosa a 1%

Agarosa	0.5 gr.
Amortiguador TAE	50 ml.
Bromuro de etidio	4 λ .

Amortiguador para muestras de DNA

Glicerol	50.0 % V/V
EDTA	100 mM.
SDS	1.0 % P/V
Azul de bromofenol	0.1 % P/V

15.- Digestión con enzimas endonucleasas

Se utilizaron las siguientes enzimas, Xho I, Bam HI, Eco RI, Sal I.

DNA de fago	1 λ .
Amortiguador 10X	2 λ .
H2O	17 λ .
Enzima	5 U.

Doble digestión de DNA de plásmido.

DNA de plásmido	3 λ .
Amortiguador 10 X	10 λ .
Enzima 1	5 U.
Enzima 2	5 U.
H2O c.b.p..	100 λ .

En el caso que la enzima (Bam HI, Sal I y Xho I de la cas comercial NE Biolabs) reaccione en presencia de BSA se adiciona 0.5 λ a una concentración de 10 mg/ml

17.- Solución I

Glucosa	50 mM.
EDTA	10 mM.
Tris pH 8.0	25 mM.

Solución II

NaOH 0.2 M.
SDS 1.0 %
Disuelto en H₂O

Solución III

Acetato de amonio 7.5 M.

19.- TABLA 2 Diseño de oligonucleótidos

Clona	Oligonucleótido	Sentido	Secuencia nucleotídica
241	C 241-1	Adelante	ACTCCGGATACGTCCTCTG
	C 241-2	Reverso	TGCCTTCCAGTGGCCTG
242	C 242 T3-1	Reverso	CTCATTCGTCAGCTTAATG
243	C 243-1	Adelante	AACAAGATCTGGAGCCGG

VIII.- REFERENCIAS

- 1.- Schluger S, Yuodelis R, Page R y Johnson R. Periodontal Diseases, Cap. 1 Philadelphia, London 1991 pp 3-52
- 2.- Bosshardt D, Selvig K. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontology* 2000 1997; 13:41-75.
- 3.- Christoffersen J, y Landis WJ. A contribution with review to the description of mineralization of bone and other calcified tissues in vivo. *Anat. Rec.* 1991; 230:435-450
- 4.- Fisher LW, Termine ID. Noncollagens proteins influencing the local mechanism of calcification. *Clin Orthop* 1985; 200:362-385
- 5.- Romberg RW, Werness PG, Lollar P, Riggs BL, Mann KG. Isolation and characterization of native adult osteonectin. *J Biol. Chem* 1985; 260:2728-2736.
- 6.- Bartold PM, Miki Y, Narayanan AS, Page RC. Glycosaminoglycans of human cementum. *J Periodont Res* 1988; 23:
- 7.- Hauschka PV, Wians FH. Osteocalcin-hidroxiapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone. *Anat. Rec* 1989;224:180-188
- 8.- Furseth R. 1969 The fine structure of The Cellular Cementum of young Human Teeth. *Archs oral Biol.* Vol 14 pp. 1147-1158
- 9.- Belanger, L. F. 1968 Resorption of cementum by cementocyte activity (cementolysis). *Calcified Tissue Res.* 2:229
- 10.- Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI, Genco RJ. Mitogenic chemotactic and synthetic responses of rat periodontal ligament cells to polypeptide growth factor in vitro. *J Periodontol* 1992; 63:515-525
- 11.- Dennison DK, Vallone DR, Pinero GJ, Rittman B, Caffesse RG. Differential effect of periodontal ligament cells and gingival fibroblast. *J Periodontol* 1994;65:641-648
- 12.- Narayanan SA., Yonemura K. Purification and characterization of a novel growth factor from cementum. *J Periodont res.* 1993; 28:563-565
- 13.- Bartold PM, Narayanan AS, Page RC. Platelet-derived growth factor reduce the inhibitory effects of lipopolysaccharide on gingival fibroblast proliferation. *J Periodont Res.* 1992; 27:499-505

- 14.- Terranova VP, Odziemec C, Tweden KS, Spadone DP. Repopulation of dentin surfaces by periodontal ligament cells and endothelial cells: Effect of basic fibroblast growth factor. *J. Periodontol* 1989; 60:293-301
- 15.- Position Paper Committee on Research. Science and Therapy. The Potential Role of Growth and Differentiation Factors in Periodontal Regeneration. *J Periodontol* 1996;67:545-553.
- 16.- Cho MI, Lin WL, Garant PR. Occurrence of epidermal growth factor binding sites during differentiation of cementoblast and periodontal ligament fibroblast of the young rat: A light and electron microscopic radiographic study. *Anat. Rec.* 1991; 231:14-24
- 17.- Matsuda N, Kumar NM, Ramakrishnan PR, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. Evidence for up-regulation of epidermal growth factor receptors on rat periodontal ligament fibroblastic cell associated with stabilization of phenotype in vitro. *Arch. Oral Biol.* 1993; 38:559-569
- 18.- Nakae H, Narayanan AS, Raines E, Page RC. Isolation and partial characterization of mitogenic factors from cementum. *Biochemistry* 1991; 30:7047-7052
- 19.- Yonemura K, Narayanan AS, Miki Y, Page RC, Okada H. Isolation and partial characterization of growth factor from human cementum. *Bone Miner.* 1992; 18:187-198.
- 20.- Ripamonti U, Reddi AH. Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetics proteins. *J Periodont Res.* 1994; 29:225-235
- 21.- Thomas HF, Kollar EJ. Differentiation of odontoblasts in grafted recombinants of murine epithelial root sheath and dental mesenchyme *Arch Oral Biol.* 1989; 34:27-35
- 22.- Listgarten MA. Cell rest in the periodontal ligament of mouse molars. *J Periodontol Res.* 1975 10:197
- 23.- Spouge JD. A new look at the rest off Malassez. A review of their embryological origin, anatomy, and possible role in periodontal health and disease. *J Periodontol.* 1980;51:437
- 24.- McCulloch CAG, Nemeth HE, Lowenberg B, Melcher AH. Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *Anat. Record* 1987; 219:233-242.

- 25.- Melcher AH. Does the developmental origin of cementum, periodontal ligament and bone predetermine their behavior in adults? In Guggenheim B, Ed *Periodontology Today*. Basel: Krager AG, 1988;6-14)
- 26.- Cho MI, Garant PR. Ultrastructural evidence of directed cell migration during initial cementoblast differentiation in root formation. *J Periodont Res*. 1988; 23:268-276.
- 27.- Cho MI, Garant PR. Radioautographic study of [3H]-mannose utilization during cementoblast differentiation, formation of acellular cementum and development of periodontal ligament principal fibers. *Anat. Rec*. 1989; 223:209-222
- 28.- McCulloch CAG y Melcher AH. Continuous labelling of the periodontal ligament of mice. *J Periodontol* 1983; 18:231-241).
- 29.- Groeneveld MC, Everts V, Beertsen W. Alkaline Phosphatase activity in the periodontal ligament and gingival of the rat molar: its relation to cementum formation. *J Dent Res*. 1995; 74:1374-1381
- 30.- Beertsen W. Van den Bos T. Calcification of dentinal collagen by cultured rabbit periosteum: the role of alkaline phosphatase. *Matrix* 1989; 69:159-171
- 31.- Beertsen W. Van den Bos T. Alkaline phosphatase induces the deposition of calcified layer in relation to dentin: an in vitro study to mimic the formation of afibrillar acellular cementum. *J Dent Res*. 1991; 70:176-181
- 32.- Beertsen W. Van den Bos T. Alkaline phosphatase induces the mineralization of sheets of collagen implanted subcutaneously in the rat. *J Clin Invest*. 1992; 89:1974-1980
- 33.- Nishimura K, Hayashi M, Matsuda K, Shigeyama Y, Yamasaki A, Yamaoka A. The chemoattractive potency of periodontal ligament, cementum and dentin for human gingival fibroblasts. *J Periodont Res* 1989; 24:146-148
- 34.- Arzate H, Olson SW, Page RC, Gown AM and Narayanan AS. Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in culture. *Bone and mineral* 1992; 18:15-30
- 35.- McAllister B, Narayanan A, Miki Y and Page R. Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum. *J. Periodont Research*. 1990; 25:99-105

- 36.- Arzate H, Olson SW, Page RC, Gown AM and Narayanan AS. Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J.* 6: 2990-2995; 1992.
- 37.- MacNeil RL, Somerman MJ. Molecular factors regulating development and regeneration of cementum. *J Periodont Res.* 1993; 28:550-559.
- 38.- Introduction Rev of angiology. 1993. Ed Kwdeor F; Friedlands M
- 39.- Arzate H, Alvarez Perez MA, Aguilar Mendoza ME, Alvarez-Fregoso O. Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells in vitro. *J periodont Res.* 1998; 33:249-258.
- 40.- Arzate H, Chimal-Monroy L, Hernández-Lagunas L, Díaz de León L. Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *J periodont Res.* 1996; 31:144-148.