



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

---

---

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

**PAPEL INDUCTOR DE LA PROTEÍNA DEL CEMENTO 1  
RECOMBINANTE HUMANA (hrCEMP1) EN EL PROCESO DE  
MIERALIZACIÓN *IN VITRO***

**T E S I S**

QUE PRESENTA  
**ENRIQUE ROMO ARÉVALO**

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

TUTOR:

**Dr. HIGINIO ARZATE**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Agradecimientos**

Al Dr. Higinio Arzate por permitirme trabajar en su laboratorio y haberme guiado durante toda la maestría. Sus comentarios, sugerencias y observaciones me han enriquecido de forma profesional y personal.

A los miembros de mi jurado de examen de grado. Dra. Patricia Tato Zaldivar, Dra. Laurie Ann Ximenez Fyvie, Dra. Gabriela Mercado Celis, Dr. Luis Felipe Jiménez García. Muchas gracias por leer mi tesis y darme sus comentarios. En verdad fue muy valiosa su opinión para este trabajo.

Al Dr. Juan Luis Chávez Pacheco por toda la gran ayuda que me ha brindado, por ser un gran profesor y amigo.

Al Dr. Eduardo Villareal Ramírez por la disposición que siempre ha mostrado para ayudarme, por compartir su punto de vista crítico y su amistad conmigo.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados. Janeth, Lia, Silvia, Meche, Ana, Gonzalo y Carlos por su amistad, apoyo y tiempo compartidos en este tiempo.

Al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado para la realización de esta investigación, bajo el proyecto 48638, además por la beca que se me otorgo para realizar la maestría.

Al Dr. Omar Novelo Peralta por el apoyo técnico para la obtención de las imágenes de microscopia electrónica de barrido y análisis de EDS.

Al Dr. Manuel Aguilar Franco por su apoyo técnico en el estudio de RDX de polvos.

A mis padres por todo su apoyo durante todo este tiempo.

A la Dra. Elba Rosa Leyva Huerta por toda la ayuda desde la coordinación del programa.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la gran institución que es.

## ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES	
I.    Periodonto	5
II.   Encía	6
III.  Ligamento periodontal	6
IV.  Hueso alveolar	7
V.    Cemento radicular	7
VI.  Cementogénesis	8
VII.  Composición orgánica e inorgánica del cemento radicular	10
VIII. Participación de proteínas colágenas y no colágenas en el proceso de biomineralización del cemento radicular	10
IX.  Fosfatasa alcalina (ALP)	11
X.   Sialoproteína ósea (BSP)	12
XI.  Osteocalcina (OCN)	12
XII. Osteopontina (OPN)	13
XIII. Integrinas y factores de crecimiento	13
XIV. Proteína de adhesión del cemento (CAP)	14
XV.  Proteína del cemento 1 (CEMP1)	15
XVI. Estrategias para el estudio de biomoléculas asociadas al proceso de biomineralización	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	21
MATERIAL Y MÉTODOS	22
RESULTADOS	27
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIONES	62
REFERENCIAS	63
APÉNDICE	66

## RESUMEN

Actualmente el principal objetivo que busca la terapia periodontal es la regeneración de los tejidos de soporte del diente (encía, ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento radicular) que han sido destruidos por la enfermedad periodontal. El cemento radicular contiene moléculas específicas que pueden servir para identificar, aislar y caracterizar el linaje cementoblástico y determinar los mecanismos moleculares que regulan el proceso de la cementogénesis, ya que es un paso fundamental en el proceso de regeneración del periodonto. Por tal motivo, la determinación de los procesos celulares y moleculares que regulan la formación del cemento radicular, es de gran interés en el área de la biología y la regeneración periodontal. Este trabajo reporta la purificación de la proteína del cemento 1 recombinante humana (hrCEMP1), expresada en células de *Escherichia coli* BL21 y el papel que desempeña dicha proteína en el proceso de formación y mineralización de cristales de fosfato de calcio en un sistema *in vitro*. La proteína se purificó por medio de cromatografía de afinidad a histidina, utilizando la columna NiTA HisPrep FF/16, la cual tiene níquel acoplado. Nuestros resultados indican que se purificó a homogeneidad una proteína de un peso aproximado de 30 kDa, la cual corresponde con el peso teórico de CEMP1. La identidad de la proteína purificada se confirmó por medio de Western blot utilizando un anticuerpo dirigido contra la proteína ( $\alpha$ CEMP1) y un anticuerpo contra una etiqueta de histidinas presente en el vector de expresión ( $\alpha$ 6xHis). Se realizó cromatografía de afinidad a hidroxiapatita utilizando la proteína hrCEMP1 purificada y se observó que esta tiene una muy alta afinidad a la hidroxiapatita, por lo que se reforzó la hipótesis de que esta proteína participa en el proceso de mineralización. Se realizaron ensayos de formación de cristales de fosfato de calcio con el sistema de contradifusión en gel de silicato, utilizando como control negativo albúmina de suero bovino y ensayos sin proteína, y como grupo experimental agregando al sistema 20  $\mu$ g/ml de hrCEMP1. Los ensayos se realizaron en los siguientes periodos de tiempo: 7, 14, 21, 30, 45 y 60 días. Los resultados demostraron que en los experimentos inducidos con hrCEMP1, se forman cristales que tienen una morfología esférica formada a su vez por cristales aplanados que crecen a partir del centro del cristal. Estos esferoides tienen una relación Ca/P mayor en todos los tiempos observados, comparados

con los controles los cuales presentan principalmente una morfología de placas con bordes irregulares. Nuestros resultados demuestran que la proteína CEMP1 desempeña un papel importante en el proceso de biomineralización, promoviendo la nucleación y crecimiento, así como regulando el grado de mineralización de cristales de fosfato de calcio. Estos descubrimientos hacen a CEMP1 un muy buen candidato para desarrollar aplicaciones biotecnológicas encaminadas a alcanzar la regeneración del cemento radicular y/o la regeneración de tejidos óseos.

## ABSTRACT

The main objective of periodontal therapy is the regeneration of the tissues that comprise the periodontium (gingiva, periodontal ligament, alveolar bone and cementum) and have been destroyed due to periodontitis. Cementum contains specific molecules that can serve to identify, isolate and characterize the cementoblastic lineage and to determine the molecular mechanisms that regulate the process of cementogenesis, since this is a main step in the regenerative process of the periodontium. Therefore, the knowledge about the cellular and molecular processes that regulate the formation of cementum is of great interest in the area of biology and periodontal regeneration. This study reports the production and purification of a novel human recombinant cementum protein 1 (hrCEMP1) expressed in *Escherichia coli* BL21 cells, and its role on the formation and mineralization process of calcium-phosphate crystals in an *in vitro* system. The protein was homogeneously purified by means of affinity chromatography to histidines. The identity of the purified protein was confirmed by Western blot assays using antibodies against hrCEMP1 and a flag of histidines (6xHis) included into the expression vector. In order to test CEMP1's affinity to hydroxyapatite, a chromatography assay was performed using a hydroxyapatite column. These assays corroborated our theory that CEMP1 is involved in the mineralization process. Assays for calcium-phosphate crystal formation were performed with a counterdiffusion system in silicate gels, using 20 ug/ml of hrCEMP1 as experimental group and 20 ug/ml of bovine serum albumin as a negative control. The assays were done in the following time points: 7, 14, 21, 30, 45 and 60 days. Our results showed that hrCEMP1 induces the formation of crystals which have a spherulite-like morphology formed by needle-like crystals emerging from the center of the crystal. The spherulites showed a greater Ca/P relation in all the days tested, when compared with the controls. Controls presented a plate-like morphology with irregular edges. We conclude that CEMP1 plays an important role in the biomineralization process, promoting the nucleation and growth, as well as regulating the degree of mineralization in calcium-phosphate crystals mainly octacalcium phosphate. These findings suggest that CEMP1 is a very good candidate to develop biotechnological techniques for periodontal regeneration.

## INTRODUCCIÓN

La biomineralización ocurre por la deposición de cristales de hidroxiapatita en una matriz extracelular consistente principalmente de colágena I y una variedad de proteínas no colágenas<sup>1</sup>. Se ha establecido que la matriz de colágena tipo I no tiene la capacidad de inducir la formación específica de mineral a partir de soluciones metaestables de fosfatos de calcio ni su precipitación, pero si proporciona una red organizada y nichos para la deposición de los cristales minerales; mientras las macromoléculas no colágenas de matriz pueden controlar la nucleación y crecimiento de la fase mineral. Se cree que las proteínas no colágenas reducen la energía de activación de la nucleación y formación de la apatita. Esta compleja matriz orgánica induce una nucleación heterogénea de cristales de fosfato de calcio<sup>2</sup>. Aunque la hidroxiapatita es el fosfato de calcio más estable termodinámicamente no cristaliza espontáneamente a partir de soluciones de fosfato de calcio a concentraciones fisiológicas<sup>3</sup>. La formación *de novo* de fosfatos de calcio amorfo y su transición hacia fosfato octacálcico constituye el precursor de la hidroxiapatita en los seres vivos.

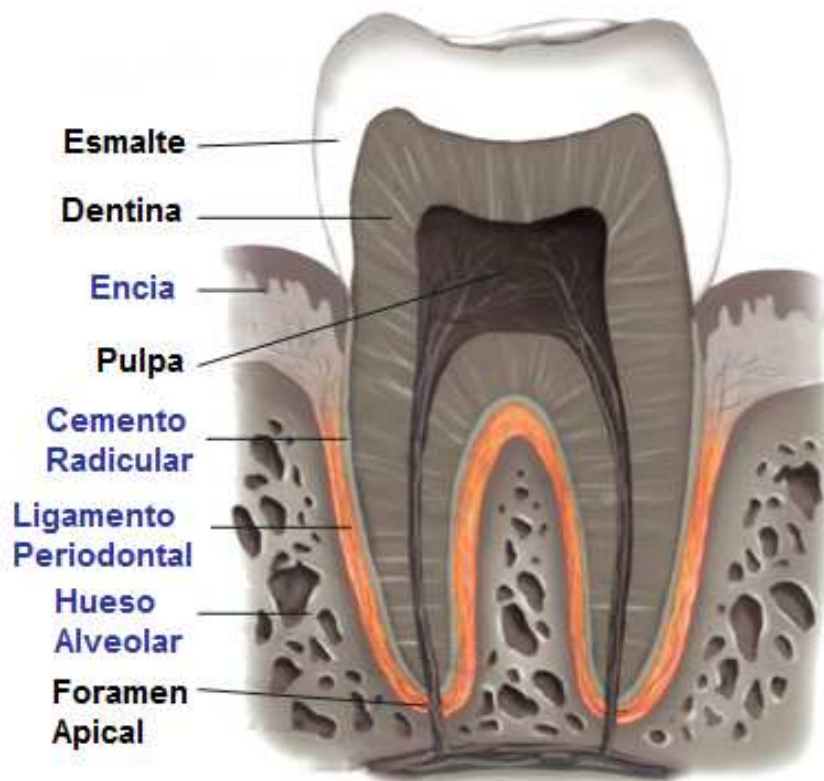
El papel de las proteínas de matriz extracelular respecto al fenómeno de la biomineralización no se ha dilucidado completamente a la fecha. En este aspecto, las proteínas del cemento radicular parecen participar activamente en la regulación, crecimiento, composición y morfología de la matriz mineralizada<sup>4</sup>. La proteína del cemento 1 (CEMP1) es una proteína específica del cemento radicular, que sirve como el único marcador biológico de este tejido a la fecha. CEMP1 se expresa espacialmente a través de la longitud del cemento radicular (celular y acelular) y en células madre mesenquimales de ligamento periodontal<sup>5</sup>. Estos datos en conjunto sugieren que CEMP1 juega un papel clave durante la biomineralización del cemento radicular.



## ANTECEDENTES

### Periodonto

El periodonto es el conjunto de tejidos dinámicos que como principales funciones tiene dar el soporte a los órganos dentales dentro de su alveolo, distribuir las fuerzas de la masticación, ayudar a la fonación, proveer un reservorio de células para la homeostasis y la regeneración o reparación del tejido, así como proteger a la raíz dental<sup>6</sup>. Está constituido por 4 tejidos; dos tejidos blandos: encía y ligamento periodontal y dos tejidos mineralizados: hueso alveolar y cemento radicular (*figura 1*). En estado de salud, estos tejidos se desarrollan y funcionan como una unidad. Sin embargo, si alguno de estos cuatro tejidos presenta una alteración patológica, sin tratamiento la repercusión en los demás genera inestabilidad pudiendo llegar hasta la pérdida de los órganos dentales<sup>7, 8</sup>.



**Figura 1.** Tejidos periodontales

## **Encía**

Está constituida por epitelio gingival y tejido conectivo, forma parte de la mucosa oral recubriendo los procesos alveolares de la mandíbula y la maxila rodeando los cuellos de los dientes. El tejido conectivo de la encía es muy similar al de la piel, compuesto principalmente de fibras colágenas, proteoglicanos, fibronectina, osteonectina, tenascina y elastina en proporciones variables, dependiendo de su localización. Su función principal es de protección para las estructuras profundas.

Anatómicamente se divide en marginal, adherida o insertada y de áreas interdentes. La encía marginal es aquella que rodea el cuello del diente y forma el surco gingival. El surco gingival es el espacio limitado por el cuello del diente por un lado y por el epitelio que recubre a la encía marginal. En humanos clínicamente sanos, se puede medir una profundidad normal de hasta 3 mm. La encía es de consistencia resiliente y se encuentra firmemente adherida al hueso alveolar. Los elementos celulares más abundantes son los fibroblastos<sup>9, 10</sup>.

## **Ligamento periodontal**

Es un tejido conectivo especializado con un recambio metabólico muy alto, que se localiza en el espacio entre el cemento radicular y el hueso alveolar. Sus principales funciones son: dar soporte al órgano dental manteniéndolo en su alveolo, soportar las fuerzas masticatorias y actúa como receptor sensorial, necesario para el posicionamiento oclusal<sup>8</sup>. Estructuralmente, los elementos más abundantes son las fibras periodontales las cuales están formadas de colágena tipo I y III, que son producidas por los fibroblastos. Las fibras de colágena que se insertan en uno de sus extremos al cemento radicular y por el otro extremo al hueso alveolar, son llamadas fibras de Sharpey. Contiene proteoglicanos ricos en leucina incluyendo a la fibromodulina y perlecano, además se han detectado otros proteoglicanos como el CD/44 en la superficie de los fibroblastos y a la glucoproteína tenascina en las zonas de inserción del hueso alveolar y del cemento radicular. La fibronectina se localiza rodeando a las fibras colágenas. Los elementos celulares de este tejido son los fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos y osteoclastos<sup>9, 10</sup>. Dentro de la población celular, la fibroblástica es

la predominante. Son los fibroblastos los que se encargan de sintetizar y remodelar la matriz extracelular. Se ha demostrado que existen diferentes subpoblaciones o subtipos de fibroblastos, dentro de estos, los que presentan el fenotipo mineralizante, enriquecidos en fosfatasa alcalina y tienen la capacidad de diferenciarse a osteoblastos o cementoblastos y son responsables de la producción de cemento radicular acelular con fibras extrínsecas y también se encargan del mantenimiento del espacio del ligamento periodontal<sup>7, 11, 12</sup>.

### **Hueso alveolar**

Los procesos maxilares de los humanos se pueden subdividir en dos partes: a) el proceso alveolar que aloja las raíces de los órganos dentarios erupcionados y b) el cuerpo basal no involucrado en esta función. El proceso alveolar consiste del alvéolo que forma la pared de las criptas, la cortical interna, externa y el hueso esponjoso entre ambas corticales. Como los procesos alveolares se desarrollan y sufren remodelación de acuerdo a la formación y erupción dental, son estructuras óseas dependientes de los órganos dentarios y la forma, localización y función de los dientes determina la morfología de los procesos alveolares<sup>7</sup>. La composición bioquímica no ha sido bien determinada a la fecha. Como el resto de los tejidos periodontales, dentro del componente orgánico, predominan las colágenas tipo I y III. El hueso alveolar contiene además proteínas no colágenas como osteocalcina y sialoproteína ósea, así como componentes no específicos como osteopontina, osteonectina y proteínas morfogenéticas de hueso (BMP's).<sup>13</sup> Presenta una fase mineral que representa el 50% de la composición total del tejido, esta se encuentra constituida principalmente por calcio y fosfato en forma de cristales de hidroxapatita  $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ .<sup>10</sup>

### **Cemento radicular**

Es un tejido conectivo especializado mineralizado que cubre la superficie radicular de los órganos dentarios desde la unión cemento-esmalte, que regularmente se encuentra en el cuello del diente en la unión de la corona y la raíz dental hasta el ápice que es la parte más distal de la raíz dental. El cemento

radicular es un componente de suma importancia en el aparato de inserción del diente, debido a que es el sitio donde las fibras del ligamento periodontal provenientes del hueso alveolar se insertan. Histológicamente este tejido es muy parecido al hueso y la dentina, sin embargo, cuenta con características únicas que lo hacen diferente como son: la ausencia de vascularización directa, carece de inervación y drenaje linfático, tiene un bajo recambio metabólico y no sufre procesos de remodelación sino que tiene un proceso de aposición constante<sup>10, 14, 15</sup>.

### **Cementogénesis**

Durante la formación de la raíz, el mesénquima apical continúa proliferando para formar el periodonto, mientras el epitelio interno y externo se fusionan a nivel cervical formando una vaina epitelial llamada vaina epitelial de Hertwig (HERS). Las células de la vaina proliferan y migran hacia la zona apical, donde se dividen en la papila y el folículo dental. Las células de HERS migran de la raíz a la región del futuro ligamento periodontal donde se reasocian para formar los restos epiteliales de Malassez que persisten en los adultos en una posición cercana a la superficie radicular. Una vez que se ha perdido la continuidad de las células de HERS, las células foliculares ectomesenquimatosas comienzan a depositar el cemento radicular sobre la dentina recién depositada y/o sobre la matriz secretada por las células de HERS. La región apical de la raíz en desarrollo contiene células ectomesenquimatosas progenitoras de fibroblastos, pre-odontoblastos y pre-cementoblastos<sup>16-18</sup>.

Un concepto reciente acerca de la función de las células de HERS postula que estas producen una membrana basal con proteínas quimiotácticas que dirigen la migración de células pre-cementoblásticas e inducen su diferenciación a cementoblastos. Dentro de las moléculas presentes hay proteínas de matriz extracelular, factores de crecimiento, proteínas de esmalte y moléculas de adhesión como la proteína de adhesión del cemento (CAP). Una vez que el órgano dental ocluye con su antagonista, la proliferación de células de HERS disminuye y algunas células quedan atrapadas en la matriz mineralizada. También se piensa que, las células de HERS sufren una transformación ectomesenquimatosas para convertirse en cementoblastos funcionales. Se ha

propuesto que existen diferentes tipos de cementoblastos: los originados de la vaina epitelial de Hertwig vía transformación epitelio-mesénquima y los derivados del folículo dental que forman el cemento celular<sup>18-22</sup>, también que las células progenitoras del ligamento periodontal adoptan una localización paravascular en el ligamento periodontal, estas células exhiben algunas características de células troncales y pueden regenerar tejido funcional<sup>11, 23- 26</sup>.

El depósito de cemento radicular comienza justo apical al esmalte cervical e histológicamente se ha clasificado en varios tipos de acuerdo al origen de las fibras y la ausencia o presencia de células.

- Cemento acelular afibrilar (AAC). Cubre los dientes a nivel de la unión esmalte-cemento, se compone de una matriz mineralizada pero carece de fibras de colágena y células incluidas. Se deposita sobre esmalte y dentina en forma de parches aislados, su depósito inicia después de la maduración del esmalte y continúa por tiempo indefinido. Este tipo de cemento no es tomado en cuenta por muchos autores porque las células responsables de su producción no se han identificado, se piensa que las células del tejido conectivo depositan la matriz cuando contactan la superficie del esmalte.
- Cemento acelular con fibras extrínsecas (AIFC). También se conoce como cemento acelular o primario, se localiza en el tercio cervical radicular o en la mitad de la raíz. Su desarrollo es muy lento y se considera acelular por que las células que lo forman permanecen en la superficie de este tejido y no quedan incluidas en el. Presenta un gran número de fibras de Sharpey insertadas en forma perpendicular a la superficie de la raíz, lo que destaca la importancia de este tejido en el anclaje del órgano dentario. Su formación comienza poco tiempo después de la formación de la raíz y continua mientras el resto de las estructuras periodontales adyacentes permanezcan intactas. Es producido por cementoblastos que se diferencian en proximidad a la superficie radicular.
- Cemento celular con fibras intrínsecas (CIFC). Llamado cemento secundario o cemento celular se distribuye en el tercio apical de la raíz dental y en los dientes con más de una raíz y se localiza en la zona de la furcación. Se produce como tejido de reparación para rellenar los

defectos creados por resorciones o fracturas y puede localizarse en una posición más coronal. La presencia de fibras de colágena producidas por los cementoblastos (fibras intrínsecas) así como, la presencia de células atrapadas dentro de la matriz mineralizada (cementocitos) son características de este tipo de cemento. Forma parte del componente intrínseco del cemento celular estratificado mixto, el cual presenta estratos o capas derivadas del depósito consecutivo de capas alternadas de cemento acelular con fibras extrínsecas y cemento celular con fibras intrínsecas<sup>15-18, 27, 28</sup>.

### **Composición orgánica e inorgánica del cemento radicular**

La composición del cemento radicular es muy similar a la del hueso y la dentina, tiene aproximadamente 50% de contenido inorgánico, formado principalmente por cristales de hidroxiapatita y 50% de contenido orgánico, de éste, el componente predominante es la colágena tipo I (90%), la colágena tipo III (5%) y en menor proporción colágena tipo XII, trazas de colágena V y VI en localización peri-celular y tipo XIV asociada a las fibras de Sharpey<sup>6, 10, 16, 29</sup>. Se encuentran también proteoglucanos que se asocian principalmente a los cementoblastos y a los cementocitos, y se han localizado e identificado versicano, decorina, biglicano, fibromodulina y lumicano. Las proteínas no colágenas del cemento radicular en su mayoría también están presentes en el hueso incluyendo a la sialoproteína ósea (BSP), proteína de matriz dentinaria-1 (DMP-1), fibronectina, osteocalcina, osteonectina y osteopontina<sup>10</sup>, además de diversos factores de crecimiento como el factor de crecimiento tipo insulínico<sup>14</sup>. A la fecha se han descrito dos proteínas específicas del cemento radicular, la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP)<sup>5, 30-32</sup>.

### **Participación de proteínas colágenas y no colágenas en el proceso de biomineralización del cemento radicular**

Como se mencionó anteriormente la colágena tipo I, es la proteína más abundante de la matriz orgánica del cemento radicular, representa el 90% del total de las proteínas en el cemento. Se ha descrito que los cristales minerales

se forman inicialmente en los espacios entre las fibras de colágena<sup>33</sup>. Las fibras de colágena proporcionan una estructura que funciona como andamio sobre el que se relacionan otras proteínas, las cuales cumplen diversas funciones. Algunas de ellas actúan como proteínas que favorecen la nucleación; que constituye el proceso por medio del cual, un número de moléculas se van agregando o depositando hasta formar núcleos de crecimiento mineral, a estos núcleos se siguen agregando más moléculas hasta formar una nueva fase. La nucleación puede ser homogénea si ocurre sin la participación de elementos externos, sólo con la saturación local de minerales que formarán la fase cristalina, o heterogénea si existe la participación de elementos externos como son las macromoléculas<sup>34</sup>. La nucleación en el proceso de biomineralización del cemento radicular es una nucleación heterogénea.

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

Esta es una proteína glicosilada con actividad enzimática localizada en la porción externa de la membrana citoplasmática<sup>35</sup> y también se encuentra en las vesículas de matriz, que son organelos producidos por las células mineralizantes y están localizadas en la matriz extracelular, dichas vesículas contribuyen a la mineralización de la matriz extracelular formando fosfatos de calcio amorfos y cristales de hidroxiapatita<sup>36</sup>. La fosfatasa alcalina es responsable de regular las concentraciones extracelulares de fosfatos, desfosforilando diversas moléculas. La actividad de esta molécula se incrementa cuando inicia el proceso de mineralización de la matriz extracelular, por lo que es un marcador temprano de la biomineralización<sup>37</sup>. Su actividad se ha localizado en placas de crecimiento de cartílago, en células endosteales, células de medula ósea, osteoblastos y cementoblastos. En hueso se ha identificado en el frente de mineralización<sup>38</sup>, y su participación en la biomineralización aunque no completamente comprendida es muy significativa. En casos de hipofosfatasa, enfermedad metabólica caracterizada por una disminución en la actividad de ALP no-tejido-específica, la formación de cemento es deficiente o nula con la subsecuente exfoliación dental, por lo que se le atribuye un papel importante en la regulación de los niveles de pirofosfato<sup>6, 39-41</sup>. Su actividad también ha sido detectada en el ligamento

periodontal, con una distribución heterogénea en sitios adyacentes al hueso y cemento radicular (zonas de cementogénesis)<sup>42</sup>.

### **Sialoproteína ósea (BSP)**

Constituye hasta el 15% del total de proteínas no colágenas del hueso y cemento radicular. Tiene un peso molecular teórico de 33.6 kDa, aunque al separarla por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), la proteína puede ser identificada como una banda de cerca de 80 kDa, esto por el alto contenido de modificaciones postraduccionales, las cuales son principalmente residuos de ácido glutámico, además de estar altamente fosforilada<sup>43</sup>. Se piensa que el contenido de ácido glutámico está involucrado en la unión a hidroxapatita así como en la nucleación de los cristales de dicho mineral. También posee una secuencia RGD (Arg-Gly-Asp) involucrada en la adhesión celular por medio de integrinas. Se le ha inmunolocalizado en hueso, dentina y cemento radicular asociándose a zonas con nueva formación de hueso, así como en algunos carcinomas que hacen metástasis hacia hueso (mama, próstata, pulmón y tiroides). El papel más destacado que se le atribuye es como nucleador de los cristales de hidroxapatita, por lo que desempeña un papel importante en las etapas iniciales de la mineralización y se le considera como un marcador de diferenciación de osteoblastos y cementoblastos<sup>15, 44</sup>. Su participación en la cementogénesis se ha sugerido como el de una molécula promotora de la formación de mineral sobre la superficie radicular así como en la adhesión celular por su motivo RGD y su interacción con las integrinas<sup>6</sup>.

### **Osteocalcina (OCN)**

También se le conoce como proteína Gla de hueso. Esta es una proteína de sólo 100 aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 5.8 kDa. Fue la primera proteína derivada de hueso que fue caracterizada. Contiene tres residuos de ácido glutámico que están  $\gamma$ -carboxilados, los que se asocian con sus propiedades de unión a calcio y cristales de hidroxapatita. La producen los osteoblastos y los osteoclastos completamente diferenciados y es secretada a la matriz en el frente de mineralización<sup>15</sup>.



Se ha inmunolocalizado en hueso alveolar, cemento radicular y dentina. La función que desempeña es la de modular el crecimiento, tamaño y forma de los cristales de hidroxiapatita, también participa en el reclutamiento de osteoclastos y en la remodelación ósea<sup>6, 45, 46</sup>.

### **Osteopontina (OPN)**

También llamada sialoproteína ósea I (BSPI) o fosfoproteína secretada 1 (SPP1), es una fosfoproteína glicosilada con un peso molecular teórico de 35.4 kDa con un alto contenido de ácido aspártico, puede estar altamente fosforilada en los residuos de serina y treonina. Contiene sitios putativos de unión a calcio, lo que explica su afinidad a los cristales de hidroxiapatita. Presenta un dominio de adhesión celular RGD para interactuar con las integrinas  $\alpha\nu\beta 3$ ,  $\alpha\nu\beta 1$  y  $\alpha\nu\beta 5$ . Se une además a colágena, fibronectina y osteocalcina. En el hueso se localiza en el frente de mineralización. Aunque se considera un componente fundamental del hueso, también se localiza en sitios no mineralizados como riñón, células de músculo liso arterial y en la superficie luminal de células epiteliales en tejidos ductales. También se encuentra en la mayoría de las secreciones corporales como orina, leche, saliva y bilis. En los tejidos mineralizados se han determinado al menos tres funciones para esta proteína: 1) regulación de la adhesión celular, 2) regulación de la actividad osteoclástica y 3) regulación de la mineralización de la matriz extracelular. Se considera que juega un papel importante en la resorción ósea<sup>15, 47</sup>. Datos recientes sugieren que su papel en el proceso de biomineralización está asociado a la inhibición (regulación) del crecimiento de los cristales de hidroxiapatita<sup>6</sup>.

### **Integrinas y factores de crecimiento**

Durante el proceso de biomineralización es necesario que las células interactúen con su sustrato por medio de integrinas, que son proteínas que actúan como receptores de membrana formando heterodímeros consistentes en una cadena  $\alpha$  y una  $\beta$ ; al ser proteínas transmembranales poseen una porción citoplasmática unida al citoesqueleto. Estas proteínas favorecen la organización del citoesqueleto además de activar diversos procesos celulares, como la

proliferación y diferenciación. Esta interacción célula-sustrato propicia la expresión de numerosas moléculas por parte de las mismas células como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), factor de crecimiento tipo insulínico (IGF-I y II), proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento y diferenciación 5 (GDF-5), entre otros, que estimulan la proliferación y diferenciación celular<sup>48</sup>.

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

Se ha aislado, purificado y caracterizado parcialmente a partir de extractos de cemento radicular maduro, es una proteína tipo colágena que tiene un peso molecular de 56 kDa y presenta una secuencia de aminoácidos con cierta homología con la colágena tipo I y XII, aunque no están inmunológicamente relacionadas<sup>30-32</sup>. Se ha inmunodetectado en la matriz del cemento radicular, en células paravasculares de los espacios endosteales y en cementoblastos putativos *in vitro*<sup>32, 49</sup>. Se demostró que promueve la migración celular con mayor afinidad para las células del ligamento periodontal y del hueso alveolar que para fibroblastos gingivales hacia la superficie radicular, promueve la adhesión celular mediada por las integrinas  $\alpha\beta 1$ <sup>50</sup>, incrementa la actividad específica de la fosfatasa alcalina y promueve la condrogénesis y mineralización en células mesenquimatosas; es decir, induce la diferenciación celular<sup>19</sup>. En cultivos celulares del folículo dental de bovino se ha demostrado que los progenitores putativos de los cementoblastos expresan esta molécula<sup>51</sup>. También se ha demostrado que fibroblastos tratados con BMP-2 expresan CAP y ALP, por lo que BMP-2 puede reclutar progenitores e inducir la diferenciación celular por medio de la expresión de moléculas específicas de cemento radicular<sup>52, 53</sup>. Las vías de señalización intracelular involucradas que se han identificado y se propone que participan en la proliferación y diferenciación celular son la vía de Smad-1 (vía canónica de señalización de BMP) y MAPK<sup>54</sup>.

## Proteína del cemento 1 (CEMP1)

Es una proteína de 247 aminoácidos con un peso molecular teórico de 25.9 kDa, la cual inicialmente fue aislada a partir de una biblioteca derivada de cementoblastos putativos humanos cultivados *in vitro*. Su expresión *in vitro* tanto a nivel de ARNm como de proteína se limita a cementoblastos putativos (células derivadas del cultivo de un cementoblastoma humano) y una subpoblación de células derivadas del ligamento periodontal con una localización paravascular, cementoblastos y células de los espacios endosteales. Al analizar la secuencia *in silico* se obtuvieron los siguientes resultados: el ADNc de 1374 nucleótidos contiene un marco de lectura abierto de 744 nucleótidos, la búsqueda en bases de datos determinó que tiene 100% de homología con una clona de ADN de *Homo sapiens* presente en el cromosoma 16 (Gene Bank AC093525.3). Se predice la localización como nuclear a pesar de no tener motivos de unión a ADN, no se ha encontrado similitud significativa con ninguna otra proteína en las bases de datos, sin embargo una región de la proteína (del residuo 30 al 110) presenta 40% de identidad con la colágena tipo X, además de presentar reacción cruzada con anticuerpos específicos contra la colágena X, aunque no tiene las repeticiones clásicas Gly x-y<sup>55</sup>.

CEMP1 ha sido caracterizada parcialmente a la fecha. Los análisis de dicroísmo circular predicen que la estructura secundaria de esta proteína es principalmente de hojas  $\beta$  (32.4%  $\beta$ -anti paralela, 16.7% giros- $\beta$  y 5.8%  $\beta$ -paralela), 10% de  $\alpha$ -hélice y 35% de conformación al azar<sup>56</sup>. Presenta además dos sitios para N-glicosilaciones en los aminoácidos 20 y 25 (Asn-X Ser/Thr). Se ha detectado la presencia de fosforilaciones en CEMP1 utilizando anticuerpos anti-fosfoserina y anti-fosfotreonina. Mediante comparaciones con el peso molecular teórico de CEMP1 se ha logrado deducir que las modificaciones post-transcripcionales contribuyen en 43.5% al peso total de la proteína nativa, la cual muestra una movilidad relativa ( $M_r$ ) de 50,000<sup>4, 56</sup>.

No ha detectado el ARNm ni la proteína en otros tejidos humanos como cerebro, corazón, pulmón, hígado y aorta por lo que constituye un marcador biológico para cementoblastos y los progenitores putativos en el ligamento periodontal<sup>5, 55, 57</sup>. También se demostró que la transfección con el gen de CEMP1 y la sobreexpresión de esta en células no mineralizantes (fibroblastos

gingivales humanos adultos) da como resultado la diferenciación de estas células hacia un fenotipo mineralizante<sup>4</sup>.

Se ha demostrado que CEMP1 participa en el depósito y composición de los cristales de hidroxiapatita así como en la regulación de la expresión de las proteínas ALP, OPN y BSP en cementoblastos putativos *in vitro*<sup>29, 53</sup>, por lo que es probable que juegue un papel fundamental en la regulación local de la diferenciación de los cementoblastos y en la mineralización de la matriz extracelular del cemento. Recientemente se utilizó como marcador de cementoblastos derivados de las superficies radiculares de humano y además se confirmó su expresión en cemento, cementoblastos y células del ligamento periodontal<sup>58</sup>. Otro estudio demostró que células derivadas del folículo dental tratadas con extracto derivado de proteínas de matriz de esmalte se diferenciaron a un fenotipo cementoblástico expresando CEMP1 y CAP, activándose la fosforilación de Smad-1 y activando la vía de MAPK para la proliferación y diferenciación celular<sup>57</sup>.

### **Estrategias para el estudio de biomoléculas asociadas al proceso de biomineralización**

La función de biomoléculas de matriz de los tejidos mineralizados en vertebrados y no vertebrados, generalmente han sido demostradas como se describe:

- 1) Las moléculas que se cree pueden influenciar el proceso de biomineralización son, primeramente aisladas del tejido mineralizado, purificadas, caracterizadas, clonadas y expresadas en formas recombinantes. Se analiza su distribución espacial y temporal en el tejido mineralizado, así como su ausencia o presencia en ciertas patologías relacionadas con los tejidos mineralizados y su ausencia en tejidos no mineralizados, además su inmunolocalización e hibridación *in situ* pueden sugerir su papel en la formación mineral.
- 2) La biomolécula bajo estudio puede estar asociada al proceso de biomineralización *in vivo*, mediante estudios en tejidos genéticamente modificados o en organismos enfermos donde la expresión o ausencia de la biomolécula de interés está alterada, inhibida o amplificada.

- 3) Estudios de mineralización *in vitro* pueden ser usados para generar información sobre el mecanismo de acción de la biomolécula en cuestión y así dilucidar la función que tiene *in vivo*.

Recientemente han sido introducidos técnicas libres de células que utilizan precipitación en geles para ayudar a dilucidar como las proteínas no colágenas y otras biomoléculas actúan en el proceso de biomineralización (*Tabla 1*).<sup>59</sup>

El sistema de contradifusión en gel de metasilicato de sodio ha sido empleado como medio de cristalización ya que presenta las siguientes ventajas:

- A) La proteína en estudio es incorporada al gel a temperatura ambiente, por lo que permanece estable y sin desnaturalizarse durante el tiempo que dura el experimento.
- B) Los cristales formados son fácilmente recolectados del gel, sin contaminación.
- C) La reacción química es fácilmente controlada.
- D) Son experimentos libres de células y el gel no interacciona con el proceso; lo que permite conocer el efecto de la biomolécula por si sola en el proceso de biomineralización.
- E) El sistema permite el estudio de la nucleación de cristales *de novo*, así como la nucleación heterogénea y la regulación del crecimiento de los cristales.
- F) El gel es translúcido y el proceso puede ser fácilmente observado.
- G) Se puede controlar la velocidad de difusión de elementos.
- H) El gel proporciona una matriz sobre la cual se aloja la proteína, la difusión lenta de las sales, el uso de soluciones con un pH y temperaturas de incubación fisiológicas (7.4 y 37°C respectivamente), hacen que este sistema semeje en gran medida a las condiciones presentes en los sistemas biológicos<sup>2</sup>.

Molécula	Origen	Gel	Efecto	µg/ml
Fosfolípidos ácidos	Hueso	Gelatina	Promotor	0.3 – 1.2
Agrecano	Cartílago	Gelatina	Inhibidor	2
Albumina	Suero	Agarosa	Sin efecto	3 – 30
Amelogenina	Diente	Gelatina	Promotor	1250 – 20000
Amelogenina y enamelinina	Diente	Gelatina	No caracterizado	7500 – 15000/ 18-80
Sialoproteína ósea desfosforilada	Hueso	Agarosa	Promotor	5
Sialoproteína ósea	Hueso	Gelatina	Promotor	10 – 50
Sialoproteína ósea	Recombinante	Agarosa	Promotor	1.7 – 3.4
Condrocálcina	Cartílago	Agarosa	Sin efecto	0.3 – 100
Colágena I	Tendón	Gelatina	Sin efecto	1000
Colágena I	Piel	Acrilamida	Sin efecto	1000
Colágena X	Cartílago calcificado	Gelatina	Sin efecto	50 – 300
DS-biglicano	Cartílago, hueso.	Gelatina	Promotor/Inhibidor	10 – 50
DS-decorina	Piel	Gelatina	Sin efecto	1 – 100
Dentin-sialoprotein	Dentina	Gelatina	Promotor/Inhibidor	5 – 10/ 50 – 100
Proteína de matriz de dentina-1	Rata	Gelatina	Promotor	1 – 25
Proteína de matriz de dentina-1	Rata	Gelatina	Sin efecto	0.5 – 28
Proteína de matriz de dentina-1	Bovino	Gelatina	Inhibidor	5 – 25
Osteopontina	Hueso	Agarosa	Inhibidor	100
Osteopontina	Hueso	Agarosa	Sin efecto	1 – 10
Osteopontina	Hueso	Gelatina	Inhibidor	10 – 100
Osteopontina	Hueso	Agarosa	Sin efecto	0.3 – 100
Fosfoforina (*1mM Ca)	Dentina	Gelatina	Promotor/Inhibidor	0.01 – 1/ 10 – 100
Fosfoforina	Dentina	Agarosa	Promotor	10 – 30
Fosfoforina	Dentina	Agarosa	Promotor	1000
Fosvitina	Huevo	Acrilamida	Promotor	1000

**Tabla 1.** Estudios de difusión en gel realizados a moléculas de matriz y su efecto en el proceso de mineralización (Adaptado de Silverman L, Boskey A. Diffusion systems for evaluation of biomineralization. *Calcified Tissue International* 200; 7: 494-501)<sup>59</sup>.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La enfermedad periodontal es uno de los padecimientos bucales de mayor incidencia en la actualidad. Las secuelas que deja dicha enfermedad van desde la resorción ósea moderada y migración gingival, hasta la pérdida de los órganos dentales. Para que se lleve a cabo la regeneración de las estructuras periodontales, es necesario que el cemento radicular se regenere para que las fibras del ligamento periodontal puedan reinsertarse en él. La formación del cemento radicular es un paso obligado para recuperar la homeostasis en el periodonto, por lo cual es importante conocer cómo moléculas específicas de dicho tejido participan en el proceso de biomineralización.

## **JUSTIFICACIÓN**

En el laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados de la Facultad de Odontología de la UNAM, se logró aislar y clonar el gen de la proteína del cemento 1 (CEMP1 o CP-23). Estudios previos realizados sobre esta proteína reportan que sólo se localiza en cementoblastos y células progenitoras localizadas en los espacios endosteales del hueso alveolar, tanto a nivel de ARNm como de proteína, lo que la hace a la fecha, el único marcador biológico del cemento radicular. Dichos estudios también indican que CEMP1 participa de manera importante en la regulación positiva de la mineralización del cemento radicular, aunque los mecanismos específicos mediante los cuales actúa se desconocen a la fecha.

Es de importancia conocer como participa CEMP1 en el proceso de formación y mineralización de cristales de fosfato de calcio ya que se pueden proporcionar nuevos elementos que ayudarán a comprender el proceso de la cementogénesis y en un futuro mediato el diseño de terapias para lograr la regeneración de las estructuras periodontales.



## **HIPÓTESIS**

La proteína del cemento 1 recombinante humana (hrCEMP1) promueve la formación, crecimiento y regulación de la morfología de los cristales de fosfato de calcio en un sistema *in vitro*.

## **OBJETIVOS:**

### **Objetivo general**

Determinar el papel de la proteína hrCEMP1 durante el proceso de mineralización de cristales de fosfato de calcio utilizando el sistema de contradifusión en geles de silicato.

### **Objetivos específicos**

Determinar el efecto de la proteína hrCEMP1 en la morfología de cristales de fosfato de calcio utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM).

Determinar la composición química y la relación Ca/P de los cristales de fosfato de calcio utilizando la técnica de difracción de rayos X de polvos (DRX) y microanálisis de energía dispersiva electrónica con rayos X (EDS).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Clonación y expresión de la proteína recombinante humana CEMP1

Las clonas recombinantes se construyeron en un vector de clonación direccional pENTR/SD/D-TOPO con el gen de la proteína del cemento 1, producto de PCR de extremos romos (Invitrogen, Carlsbad, CA). El gen de CEMP1, producto de PCR se obtuvo diseñando el primer sentido adicionando 4 bases (CACC) en el final 5', seguido de un codón inicial ATG para el inicio de la traducción en forma direccional (5' CACC ATG GGC ACA TCA AGC ACT GA 3'). El primer antisentido se diseñó eliminando el codón de paro nativo (5' CCC CAT TAG TGT CAT CCT GC 3'), con el objeto de fusionar el producto de PCR en marco de lectura con una etiqueta de 6xHis con el vector de entrada Gateway pET-DEST 42 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para la expresión inducible, el vector DEST 42 contuvo un promotor inducible con IPTG, para su selección contó con el gen de resistencia a la ampicilina y para su purificación e inmunodetección contó con un epítipo V5 y una etiqueta de 6 histidinas en el COOH terminal.

El plásmido resultante se introdujo en células de expresión *Escherichia coli* BL21 (*E. coli* BL21 Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células de *E. coli* BL21 que contenían la construcción DEST42/CEMP1, se crecieron a 37°C hasta alcanzar una D.O. de 0.4 a 600 nm, en medio LB (Luria-Bertani, ver apéndice), que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 34-µg/ml de cloranfenicol. En ese momento se adicionó: Isopropil-d-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1.0 mM para inducir la expresión de la proteína hrCEMP1 y el cultivo fue incubado a 37°C con agitación a 200 rpm. Las bacterias se recuperaron después de una noche de incubación mediante centrifugación a 4700 rpm a 4°C durante 15 minutos. El botón celular fue resuspendido en amortiguador de ruptura (4 ml de amortiguador de ruptura por cada 100 ml de medio LB, ver apéndice) y sonicado durante cinco ciclos de un minuto con intervalos de un minuto entre cada uno. Una vez sonicado, se le adicionó lisozima a una concentración final de 1 mg/ml, DNAsa y RNAsa a una concentración final de 5 µg/ml cada una, inhibidores de proteasas (PMSF, N-etilmaleimida, aprotinina 1 µg/ml, leupeptina y pepstatina 0.5 µg/ml, ver apéndice) y se incubó a 4°C con agitación durante 1 hora. Se recuperó el

sobrenadante por medio de dos ciclos de centrifugación, el primero a 8000 rpm durante 15 minutos, y el segundo a 30000 rpm, ambos a 4°C.

### **Purificación y cuantificación de la proteína hrCEMP1**

Como primer paso de purificación se le realizó al extracto crudo de proteínas una precipitación diferencial con sulfato de amonio (Sigma-Aldrich) con los siguientes porcentajes de saturación: 0-20, 20-40 y 40-60.

La sal de sulfato de amonio se agregó lentamente a la muestra, la cual estaba en agitación suave a 4°C. Se incubó durante dos horas y se centrifugó a 33000 rpm durante 22 minutos, el precipitado se almacenó a -20°C y al sobrenadante se le agregó el siguiente porcentaje de saturación y se repitió el proceso. La fracción de 0-20 fue desechada mientras que las fracciones de 20-40 y 40-60 fueron juntadas y dializadas con membrana de punto de corte de 12-14 kDa (Spectra/Por VWR Scientific), contra 50 volúmenes de PBS 1X pH 7.4 con dos cambios de PBS cada 24 horas.

Una vez dializada la muestra se realizó cromatografía de afinidad a histidina utilizando una columna con níquel acoplado (HisPrep FF16/10 GE Healthcare). Se eluyó mediante un gradiente por pasos de imidazol (Amresco Ohio EU) a concentraciones de 10, 20, 30, 50, 100, 200 y 500 mM. Las fracciones conteniendo a CEMP1 (20, 30 y 50 mM) se colectaron y juntaron mediante un concentrador Amicon (Ultra-15, PLGC Ultracel-PL Membrane, 10 kDa) y se dializaron contra 50 volúmenes de una solución de fosfato de sodio 10 mM pH 7.2 durante una noche a 4°C. Como último paso de purificación se realizó una cromatografía de afinidad a hidroxiapatita (HA Ultrogel), realizando una elución por pasos con fosfato de sodio a 20, 50, 100, 150, 200 y 500 mM pH 7.2.

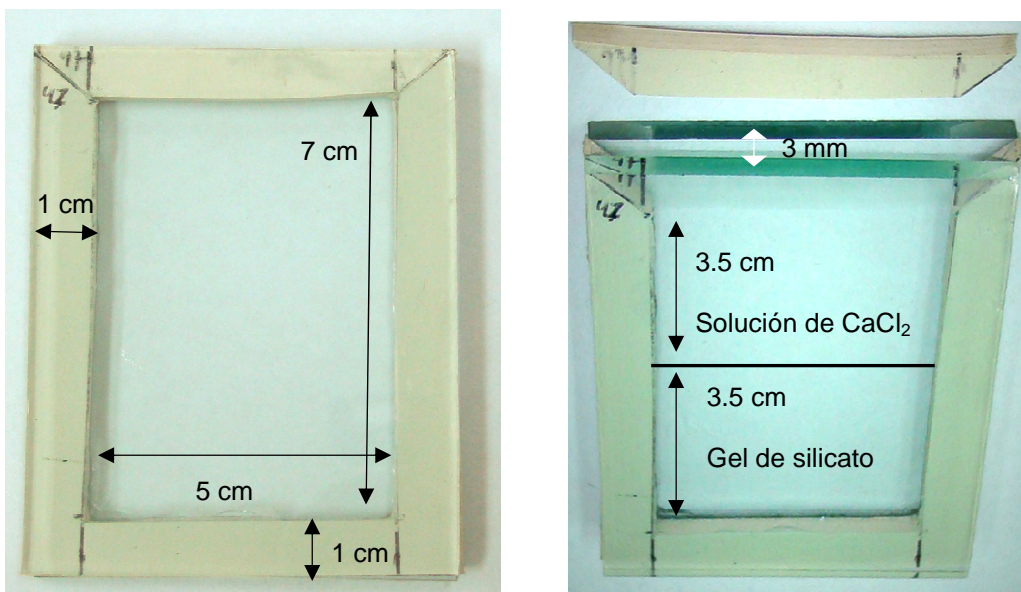
### **Inmunodetección**

La detección de la proteína hrCEMP1 en todos los pasos de purificación se realizó por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), e inmunodetección por medio de Western blot. Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron (ver apéndice) a una membrana de nitrocelulosa (Nitrocellulose-1,

Gibco BRL) durante 1 hora, la membrana se bloqueó para evitar sitios inespecíficos de unión de los anticuerpos (50 ml de TBST, 2.5 gr de leche descremada, ver apéndice). Posteriormente, se incubó durante 24 horas con un anticuerpo policlonal anti-CEMP1 y con un anticuerpo anti-6xHis (His-probe H-15 Santa Cruz Biotechnology) a una concentración de 1:5000 cada uno. Transcurrido el periodo de incubación del primer anticuerpo se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBST (ver apéndice) a las membranas y se incubó el anticuerpo secundario durante 2 horas a una concentración de 1:1000. Pasado el periodo de incubación del anticuerpo secundario se realizaron dos lavados de 10 minutos con TBST y la inmunodetección se reveló con DAB (diaminobenzidina, ver apéndice).

### Formación de cristales de fosfato de calcio

El sistema para la formación de cristales de fosfato de calcio consistió en un casete formado por dos vidrios de 7 cm x 9 cm x 3 mm, separados por un marco de neopreno de 3 mm de grosor (*Figura 2*). El marco se ajustó a los vidrios, se selló con silicón de vacío y sujetadores metálicos para evitar fugas. Se preparó la solución que formaría el gel (ver apéndice) y en estado líquido se agregó 5 ml al interior del sistema. Posterior a la gelificación de éste, se llenó el sistema con la solución de cloruro de calcio (5 ml, ver apéndice) y se selló el sistema incubándolo durante los siguientes periodos de tiempo: 7, 14, 21, 30, 45 y 60 días a 37°C, utilizando un casete para cada periodo de incubación.



**Figura 2.** Sistema de contradifusión en gel de silicato.

Las pruebas del grupo experimental se realizaron agregando 20 µg de la proteína purificada hrCEMP1 por cada mililitro de solución de gel de silicato, un grupo control negativo utilizando 20 µg albúmina de suero bovino (BSA Sigma St Louis MO) por cada mililitro de solución de gel de silicato y un grupo control sin agregar proteína. Como solución de difusión se utilizó cloruro de calcio (JT Baker) a 100 mM preparado en HEPES Buffer 10 mM pH final 7.4.

### **Recuperación de los cristales**

Transcurrido el periodo de tiempo para el crecimiento de los cristales, estos se recuperaron del gel de silicato de dos formas: a) los cristales fueron visualizados mediante un microscopio estereoscópico (Stemi SV11 Carl Zeiss) y recolectados manualmente del gel con MicroMounts de 150 µm (MiTeGen Ithaca, NY) y almacenados en tubos eppendorf de 1.5 ml para su posterior procesamiento y análisis con microscopía electrónica de barrido, b) el resto de los cristales se recolectaron en tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron a 14,000 rpm durante dos minutos a temperatura ambiente para sedimentarlos y el excedente de gel fue separado con micropipetas. Los cristales recolectados con centrifugación fueron molidos con un mortero de porcelana y los polvos se recolectan para su posterior procesamiento y análisis de difracción de rayos X de polvos.

### **Microscopía electrónica de barrido y microanálisis de energía dispersiva de Rayos X**

La composición elemental de los cristales formados en el sistema de contradifusión en gel de silicato, así como la determinación de su morfología fue realizada con el uso de un microscopio electrónico de barrido (SEM) Leica-Cambridge Modelo StereoScan 440, el cual estaba equipado con una microsonda Pentafet para microanálisis de energía dispersiva de rayos X. Todos los análisis se hicieron a 20 kV durante 300 segundos. La relación Ca/P se calculó mediante el análisis de porcentajes atómicos de los elementos identificados en el espectro.

## **Difracción de rayos X de polvos**

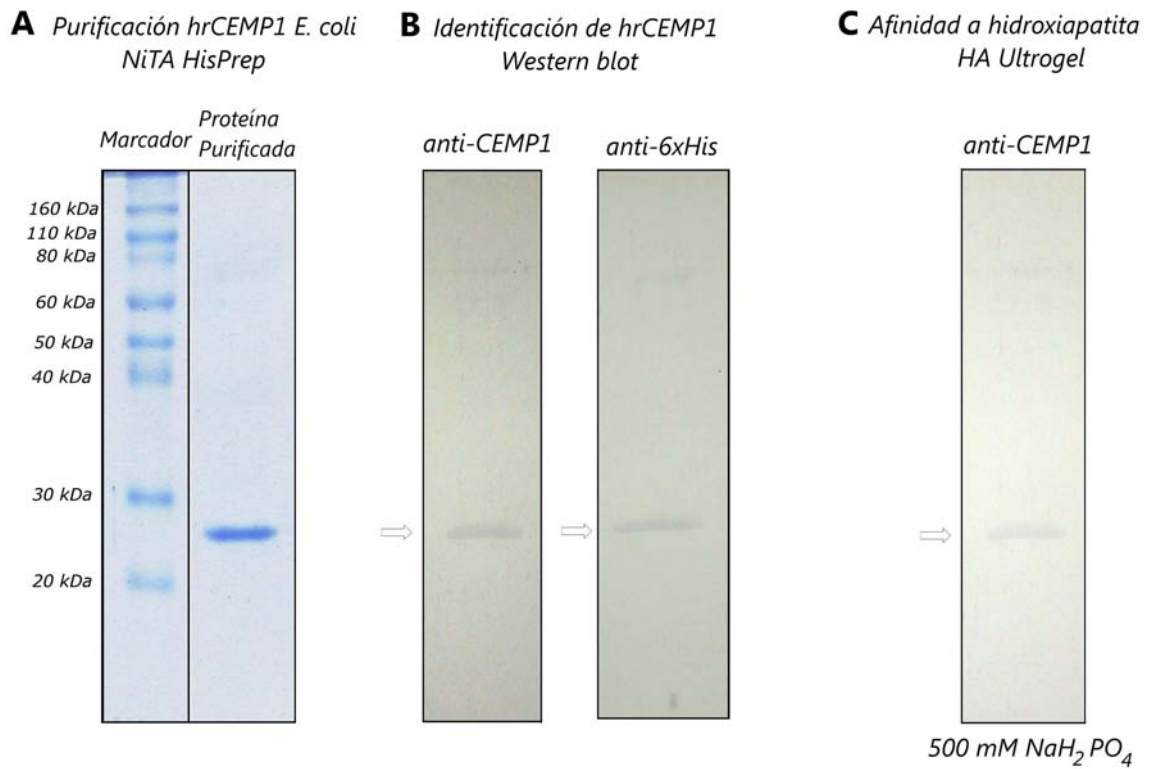
Para determinar la fase cristalina de las muestras recolectadas del sistema de contradifusión en gel de silicato, se empleó el equipo de difracción Bruker AXS modelo D8 Advance, el cual poseía una configuración teta-teta y geometría Bragg bentano. La fuente de radiación fue proporcionada por un ánodo de cobre. El detector tenía una posición fija LinxEye. Las muestras fueron colocadas en porta-muestras de vidrio y las mediciones iniciaron en  $5.000^\circ$  y terminaron en  $85.014^\circ$  con un intervalo de  $0.039^\circ$  y un step-time de 52.8 segundos. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.

## RESULTADOS

### Purificación de la proteína hrCEMP1

Se utilizaron células de *Escherichia coli*, a las que se les insertó el vector de expresión pDEST42/CEMP1 con el objetivo de que expresaran hrCEMP1. Como primer paso de purificación se realizó una precipitación diferencial en sulfato de amonio a diferentes porcentajes de saturación (0-20, 20-40 y 40-60). Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes al 12% (SDS-PAGE) e inmunodetección por la técnica de Western blot utilizando un anticuerpo contra la etiqueta de 6xHis y un anticuerpo policlonal anti-CEMP1, para determinar la localización de la proteína. Por medio de la inmunodetección se determinó que hrCEMP1 se localiza en las fracciones de 20-40 y 40-60. Se juntaron, concentraron y dializaron las fracciones de 20-40 y 40-60. A partir de dichas fracciones se realizó la purificación de hrCEMP por medio de una columna de afinidad a histidina (NiTA HisPrep FF/16), realizando eluciones escalonadas con una solución de imidazol a diferentes concentraciones (10, 20, 30, 50, 100, 500 mM). Se realizaron electroforesis SDS-PAGE e inmunodetección de las eluciones realizadas en la columna HisPrep FF/16, donde se identificó a la proteína hrCEMP1 en las fracciones de 20, 30 y 50 mM de imidazol (*Figura 3a y 3b*).

Como paso final de la purificación de hrCEMP1 se juntaron, concentraron y dializaron las fracciones de 20, 30 y 50 mM de imidazol y se realizó una cromatografía de afinidad a hidroxapatita. Se utilizó una columna de cromatografía con hidroxapatita (HA Ultrogel) y se hicieron eluciones escalonadas con una solución de fosfato de sodio a 20, 50, 100, 150, 200 y 500 mM pH 7.2. Se realizó SDS-PAGE e inmunodetección con la técnica descrita previamente y se identificó a hrCEMP1 en la elución de 500 mM de fosfato de sodio (*Figura 3c*).



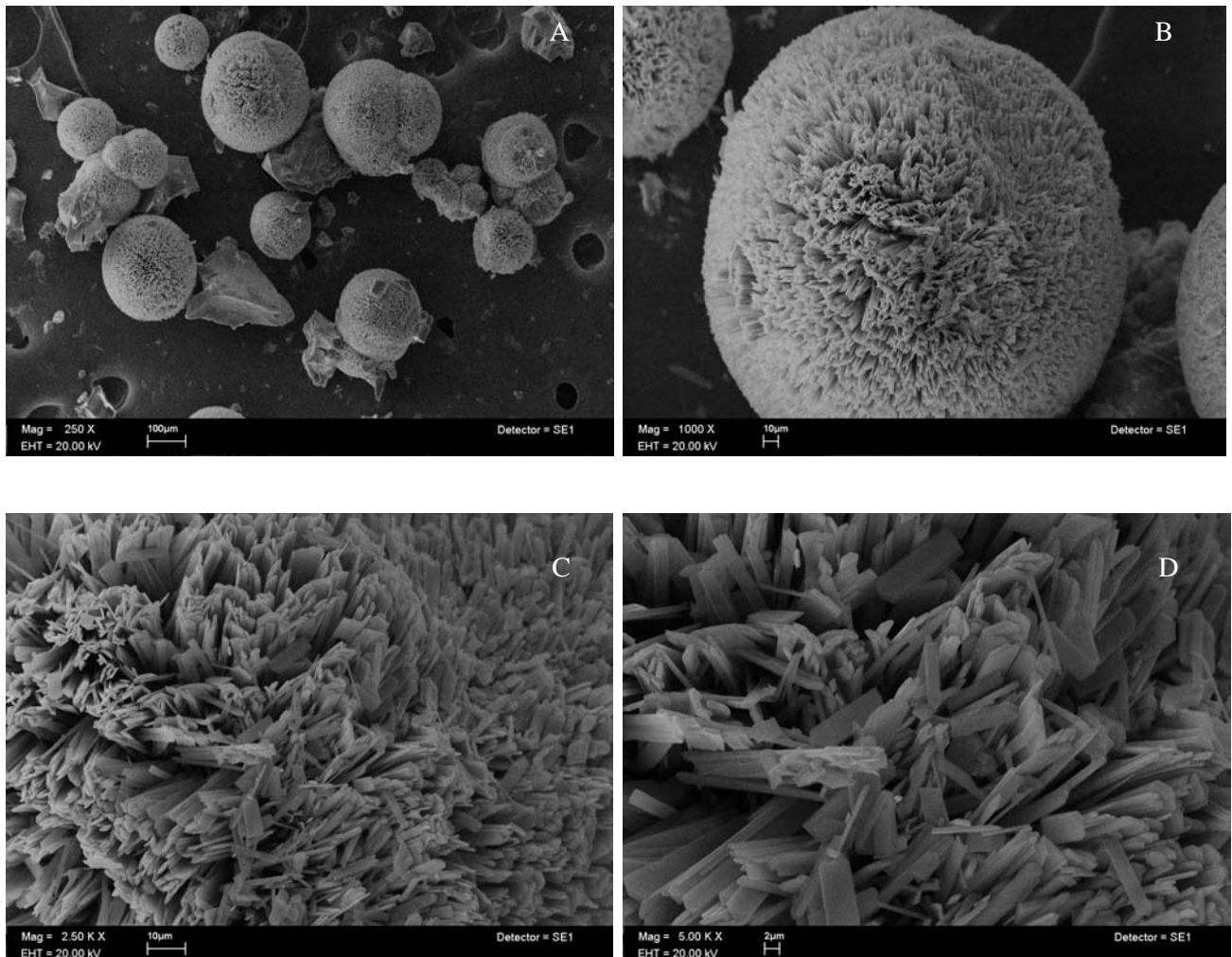
**Figura 3.** Resultados de la purificación e identificación de hrCEMP1. **A)** Purificación de hrCEMP1 (SDS-PAGE 12%, tinción de azul de Comasie). **B)** Western blot de la proteína purificada con la columna NiTA HisPrep FF/16. Se utilizaron anticuerpos policlonales anti-CEMP1 y anti-6xHis, los cuales reconocen la banda de 30 kDa. **C)** Prueba de afinidad a hidroxiapatita; reveló una alta afinidad de hrCEMP1 a la hidroxiapatita. Se logró eluir la proteína a una concentración de 500 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; el anticuerpo anti-CEMP1 reconoce la misma especie de 30k Da



## Microscopía electrónica de barrido (SEM)

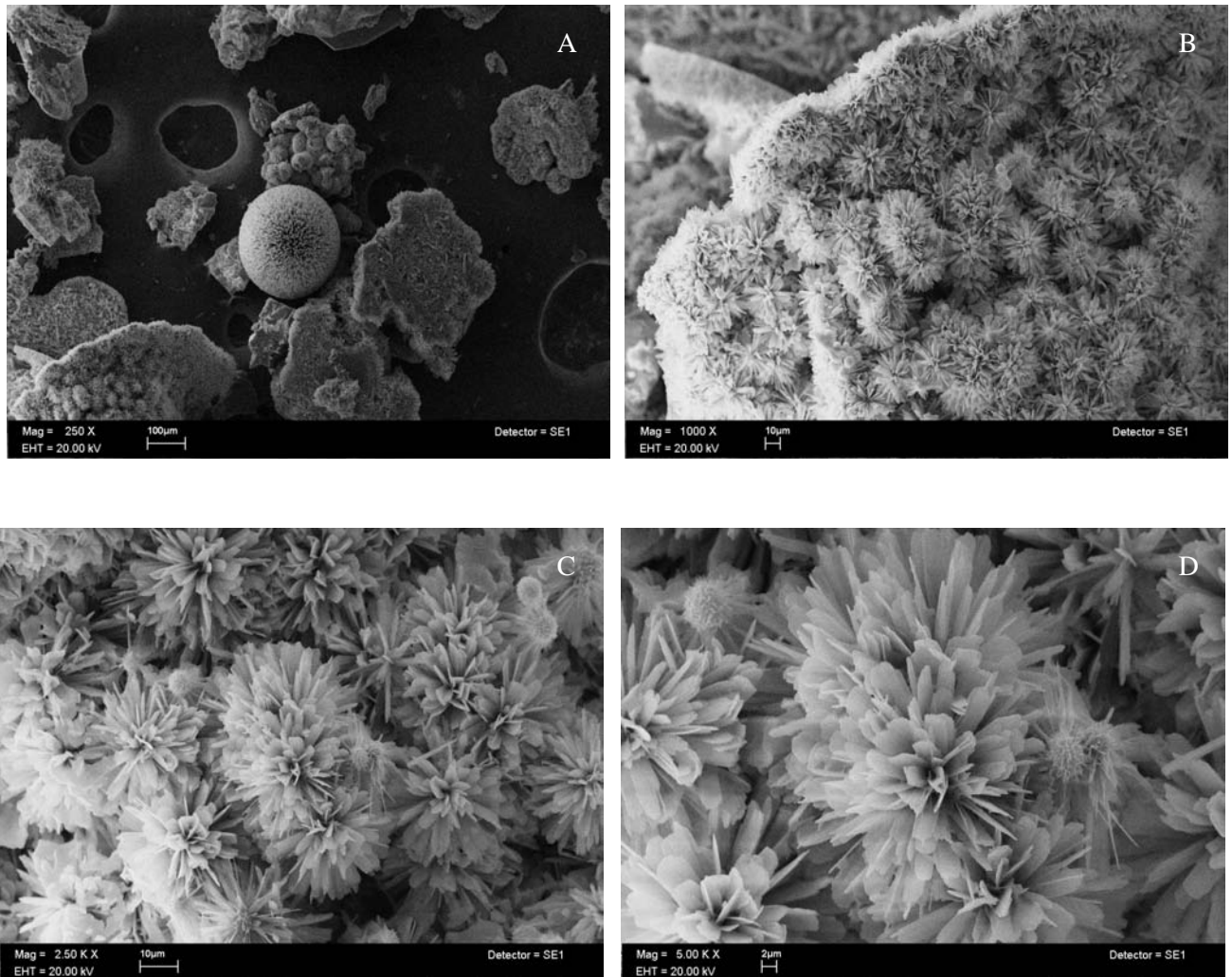
Posterior a los ensayos de formación de cristales de fosfato de calcio y la recolección de los mismos, se realizaron observaciones mediante microscopía electrónica de barrido a diferentes aumentos (250, 1000, 2500 y 5000x) y en todos los periodos de tiempo. Esta herramienta permitió determinar la morfología tridimensional de los cristales (*Figuras 4 – 21*).

En las microfotografías A y B de la figura 4 se observó que la morfología que adquieren los cristales formados en presencia de hrCEMP1 desde los siete días es de esférulas. En las microfotografías C y D (*Figura4*) se distingue la superficie de una esférula, la cual está formada por múltiples placas alargadas.



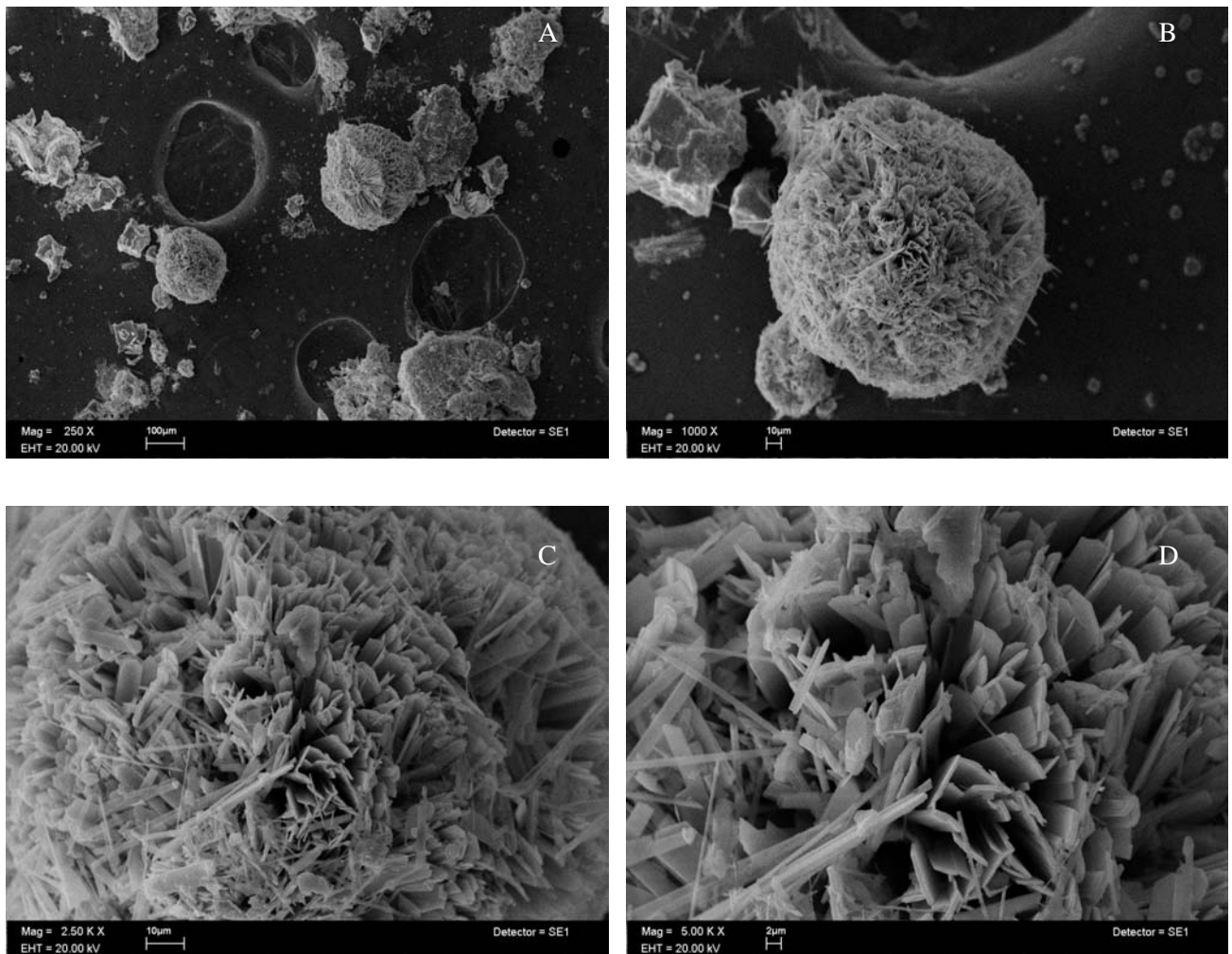
**Figura 4.** Experimental hrCEMP1. Morfología de los cristales de fosfato de calcio formados con el sistema de contradifusión en gel de silicato durante 7 días de incubación. **A)** 250x, **B)** 1000x, **C)** 2500x, **D)** 5000x

En la figura 5 se observa el crecimiento de los cristales a los 14 días de incubación formados en presencia de hrCEMP1. La morfología predominante es de esférulas. En el centro de la microfotografía A se observa una esférula de 150  $\mu\text{m}$  de diámetro. En la microfotografía B se encuentra una zona de crecimiento de esférulas. En las microfotografías C y D se distingue la fase inicial de estos cristales, los cuales se inician a partir de un núcleo de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro aproximadamente. De este núcleo emergen agujas de forma radial, las cuales se engrosan y expanden hasta formar placas alargadas, que en su conjunto y debido a su crecimiento radial forman esférulas.



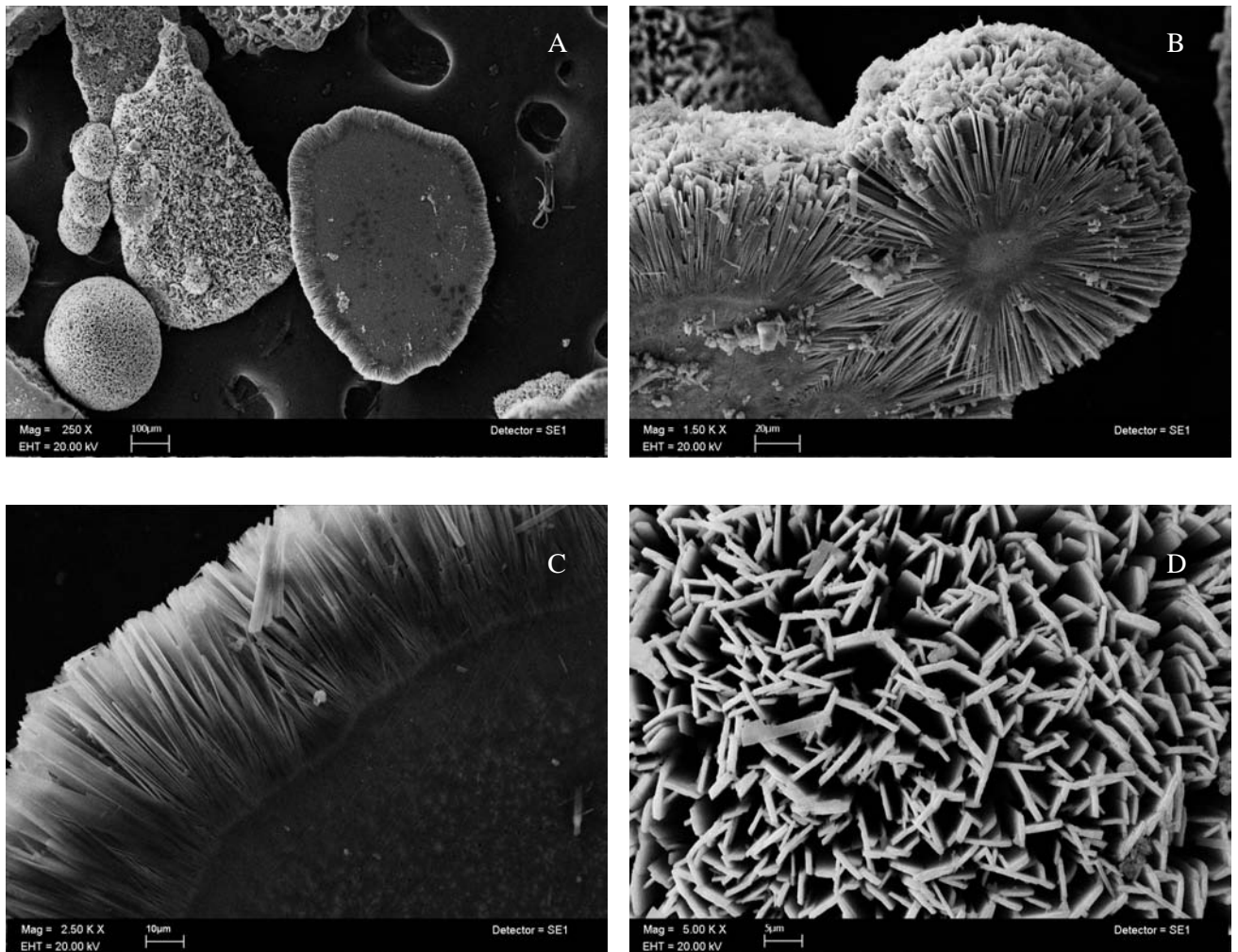
**Figura 5.** Experimental hrCEMP1. Morfología de los cristales de fosfato de calcio formados con el sistema de contradifusión en gel de silicato durante 14 días de incubación. **A)** 250x, **B)** 1000x, **C)** 2500x, **D)** 5000x

A los 21 días de crecimiento (*Figura 6*) en presencia de hrCEMP1, se observan esférulas de un diámetro aproximado de 100 a 150  $\mu\text{m}$ , además de residuos del gel de silicato. Sobre estos residuos de forma irregular se observan numerosos cristales en forma de agujas y placas alargadas (microfotografías A y B). La superficie de las esférulas está formada de cristales hexagonales alargados que provienen del centro de la estructura (microfotografías C y D).



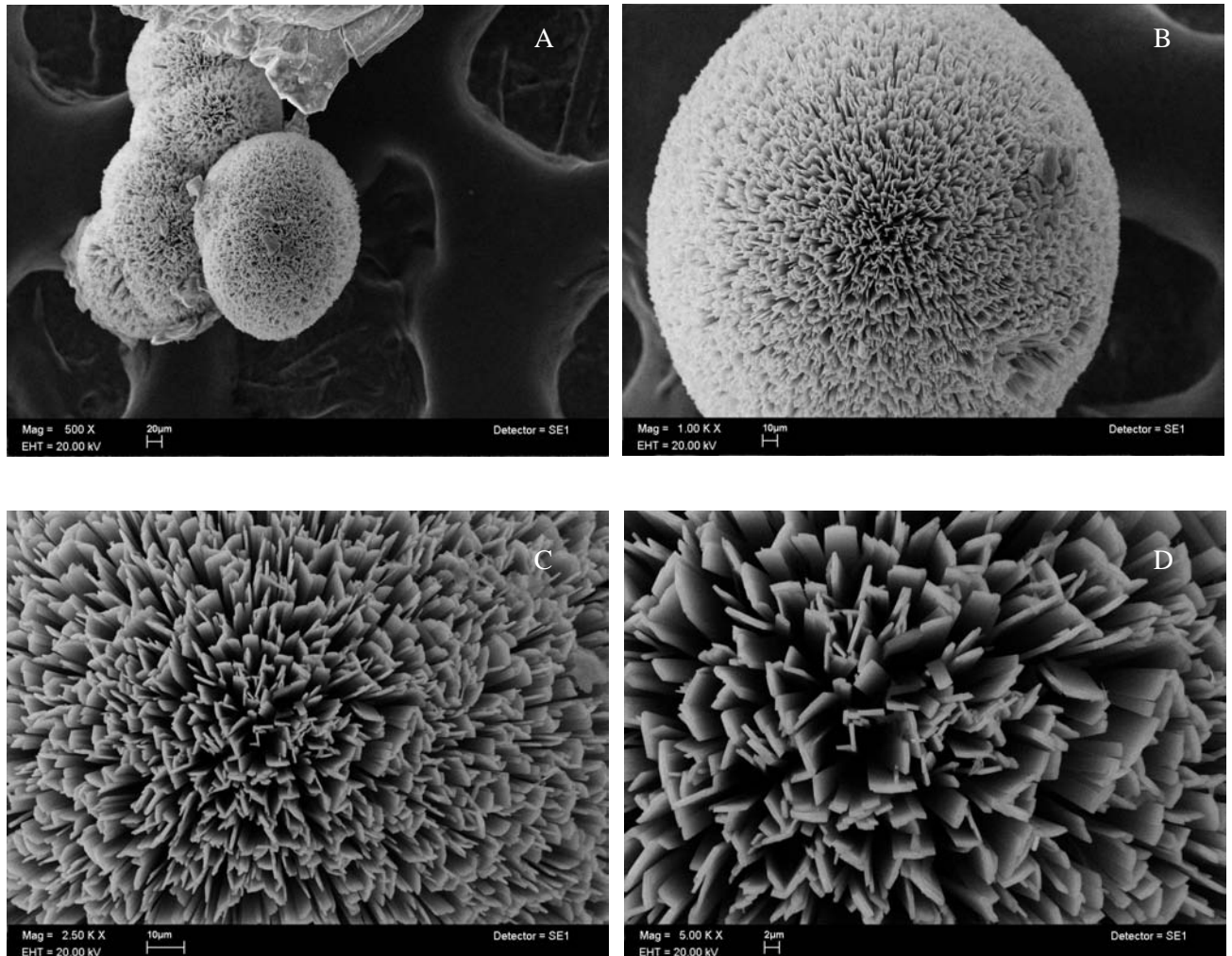
**Figura 6.** Experimental hrCEMP1. Morfología de los cristales de fosfato de calcio formados con el sistema de contradifusión en gel de silicato durante 21 días de incubación. **A)** 250x, **B)** 1000x, **C)** 2500x, **D)** 5000x

A los 30 días de crecimiento (*Figura 7*) en presencia de hrCEMP1, las estructuras predominantes observadas son esférulas, las cuales tienen un diámetro que va de los 60  $\mu\text{m}$  hasta una estructura de 600  $\mu\text{m}$  aproximadamente (microfotografía A zona central). En la microfotografía B se muestran tres esférulas divididas a la mitad; en esta imagen se demuestra que estos cristales tienen su origen a partir de un núcleo sobre el cual crecen cristales hexagonales alargados. En la microfotografía C, se muestra un acercamiento de la estructura de 600  $\mu\text{m}$ , donde se distingue el núcleo y la zona de crecimiento de los cristales hexagonales. Microfotografía D, superficie de una esférula.



**Figura 7.** Experimental hrCEMP1. Morfología de los cristales de fosfato de calcio formados con el sistema de contradifusión en gel de silicato durante 30 días de incubación. A) 250x, B) 1500x, C) 2500x, D) 5000x.

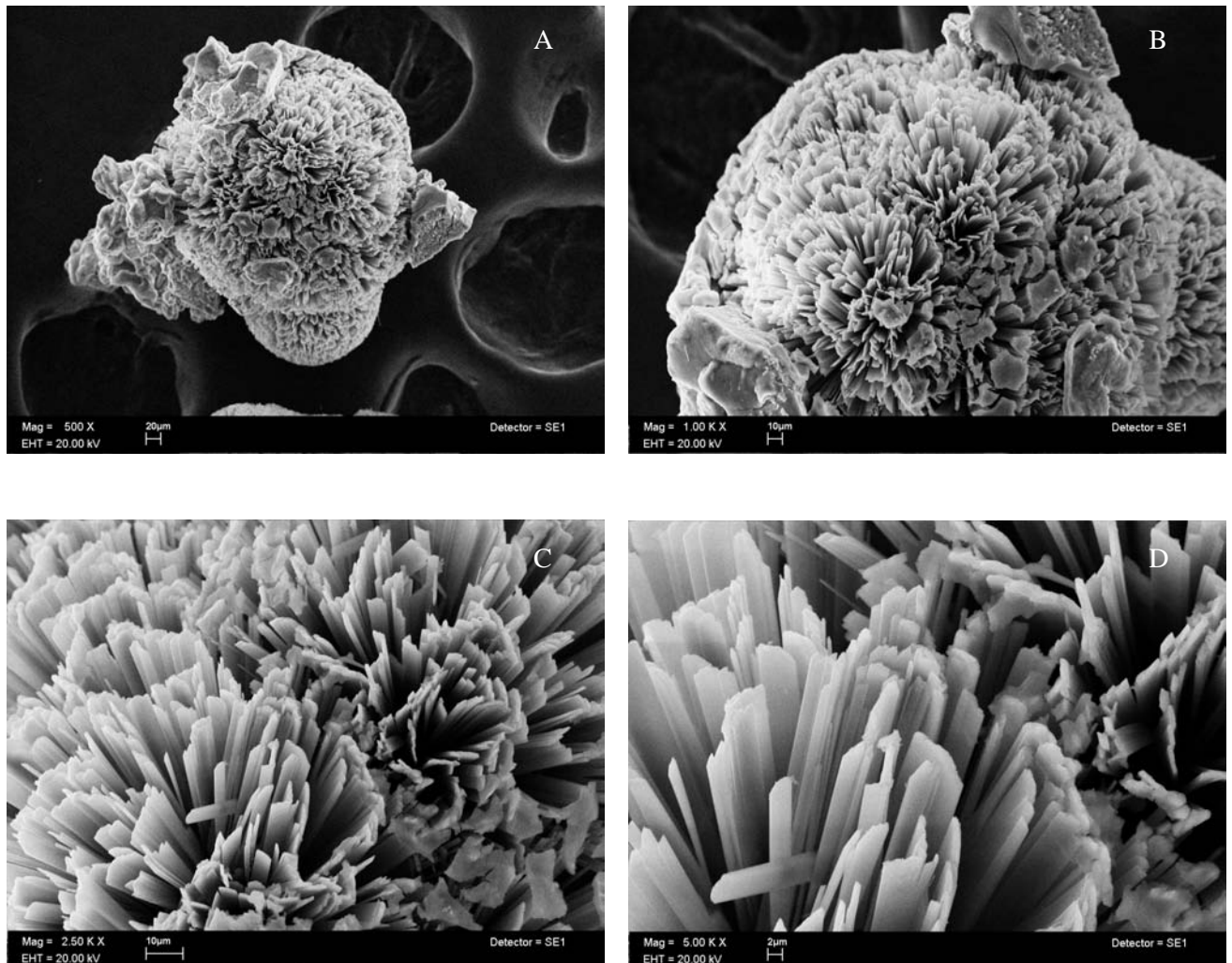
A los 45 días de crecimiento (*Figura 8*) en presencia de hrCEMP1 se observan esférulas con un tamaño que va de 100 a 200  $\mu\text{m}$  de diámetro aproximadamente (microfotografías A y B), así como un residuo de gel de silicato en la parte superior de las esférulas (microfotografía A). Tanto la morfología de la estructura como la de la superficie son bastante regulares y están formadas por cristales hexagonales (microfotografías B, C y D).



**Figura 8.** Experimental hrCEMP1. Morfología de los cristales de fosfato de calcio formados con el sistema de contradifusión en gel de silicato durante 45 días de incubación. A) 500x, B) 1000x, C) 2500x, D) 5000x.

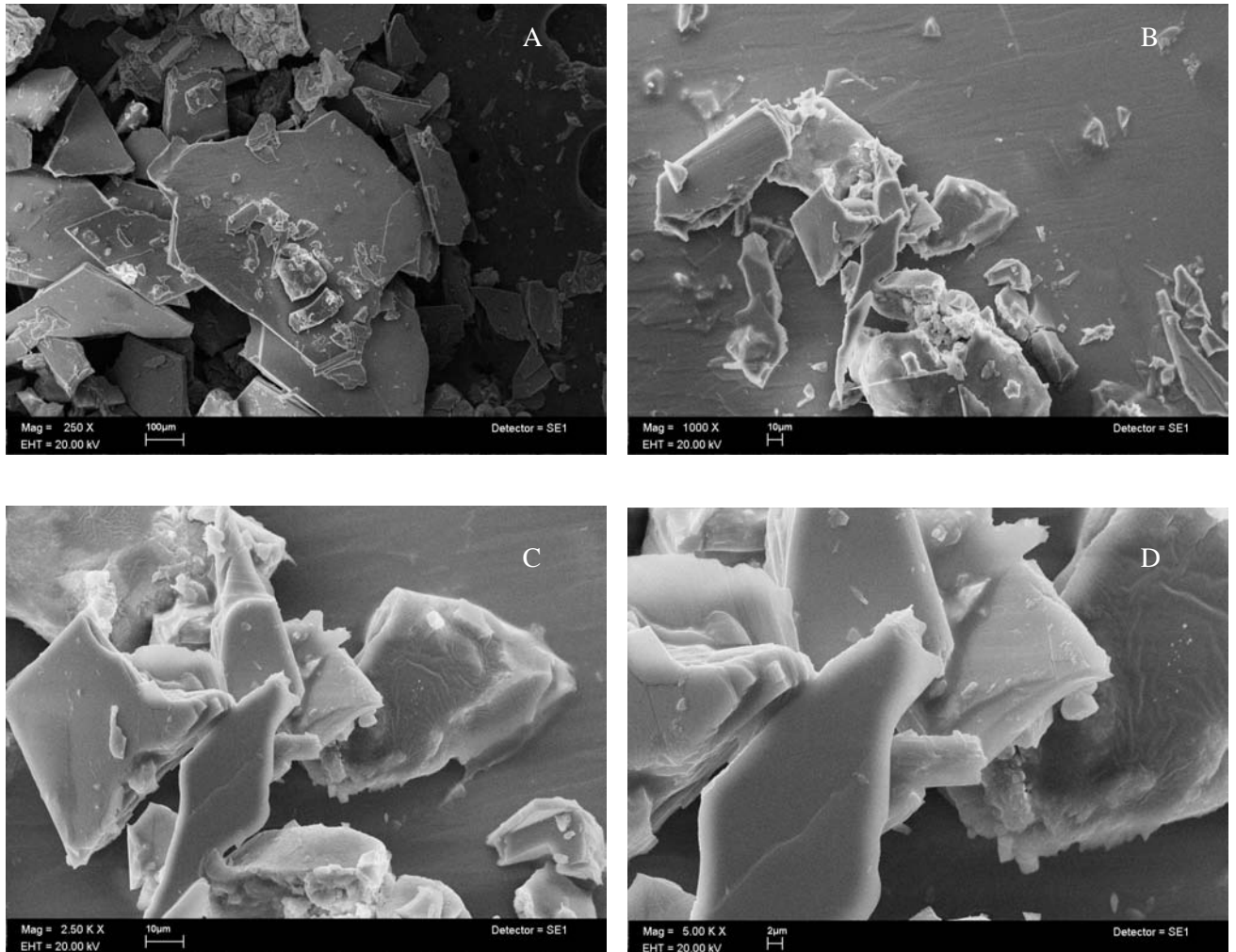


A los 60 días de crecimiento en presencia de hrCEMP1 (*Figura 9*) se observan esférulas de un tamaño aproximado de 200  $\mu\text{m}$  de diámetro (microfotografía A). Parte de la superficie de la esférula está cubierta por residuos de gel de silicato (microfotografía B). Tanto las características morfológicas de la superficie (microfotografías C y D), como de la estructura en su conjunto son consistentes desde el primer día de observación (día 7) hasta el día 60.



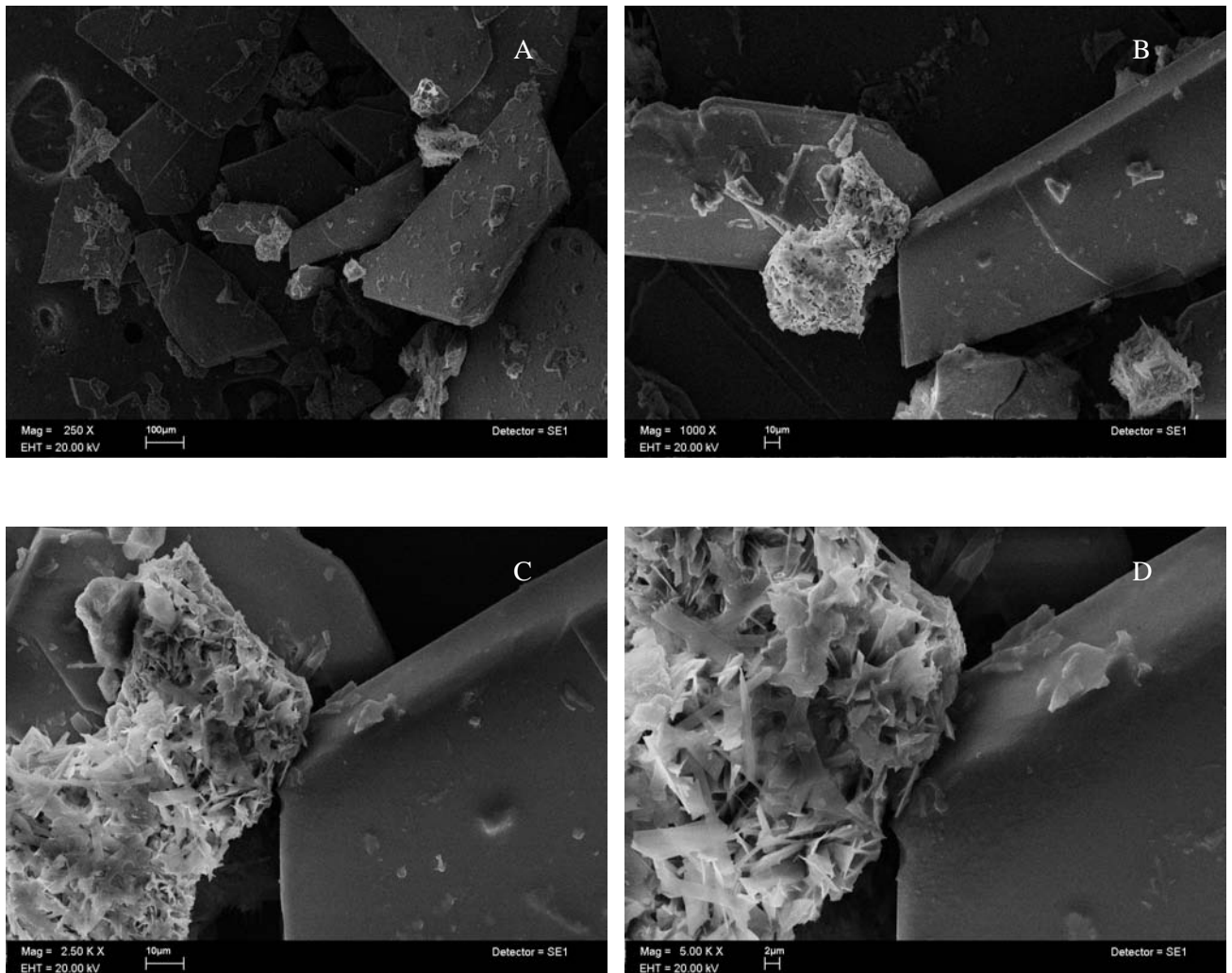
**Figura 9.** Experimental hrCEMP1. Morfología de los cristales de fosfato de calcio formados con el sistema de contradifusión en gel de silicato durante 60 días de incubación. **A)** 500x, **B)** 1000x, **C)** 2500x, **D)** 5000x.

En la figura 10 se observa la morfología de los cristales formados en el sistema de contradifusión en gel de silicato a los 7 días de incubación sin la presencia de proteína hrCEMP1. Los cristales formados son planos, semejantes a placas con bordes seccionados y tienen un tamaño muy variable. Hay estructuras de hasta 750  $\mu\text{m}$  de longitud aproximadamente (microfotografía A). Estas estructuras presentan defectos en su superficie (microfotografías B, C y D).



**Figura 10.** Control sin proteína. Morfología de los cristales de fosfato de calcio formados con el sistema de contradifusión en gel de silicato durante 7 días de incubación. **A)** 250x, **B)** 1000x, **C)** 2500x, **D)** 5000x.

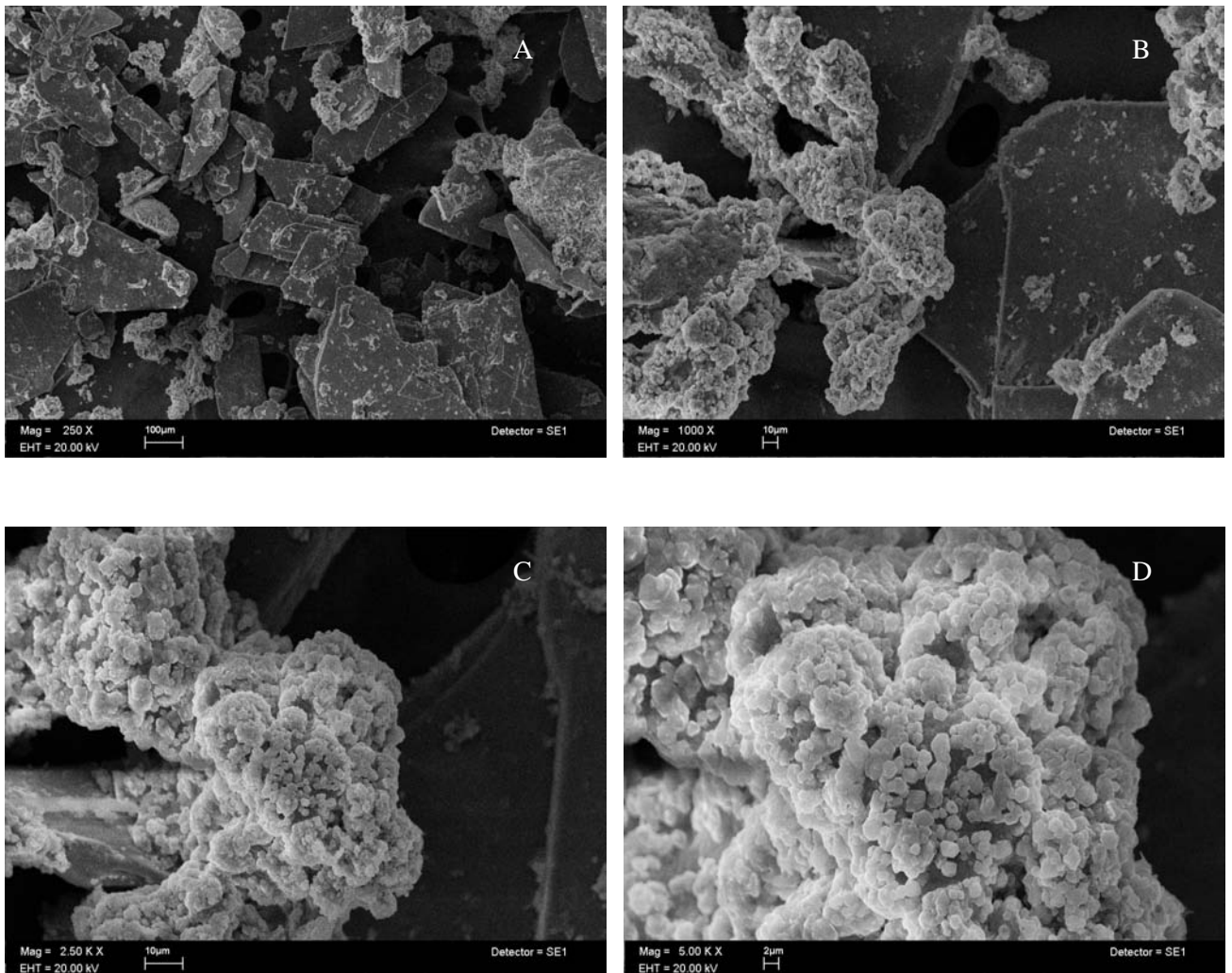
A los 14 días de crecimiento en el grupo control en ausencia de la proteína hrCEMP1 (*Figura 11*) hay placas con bordes irregulares y de tamaño muy variable (microfotografías A y B). Se observa un residuo de gel de silicato donde hay placas de forma irregular y agujas (microfotografías C y D).



**Figura 11.** Control sin proteína. Morfología de los cristales de fosfato de calcio formados con el sistema de contradifusión en gel de silicato durante 14 días de incubación. **A)** 250x, **B)** 1000x, **C)** 2500x, **D)** 5000x.

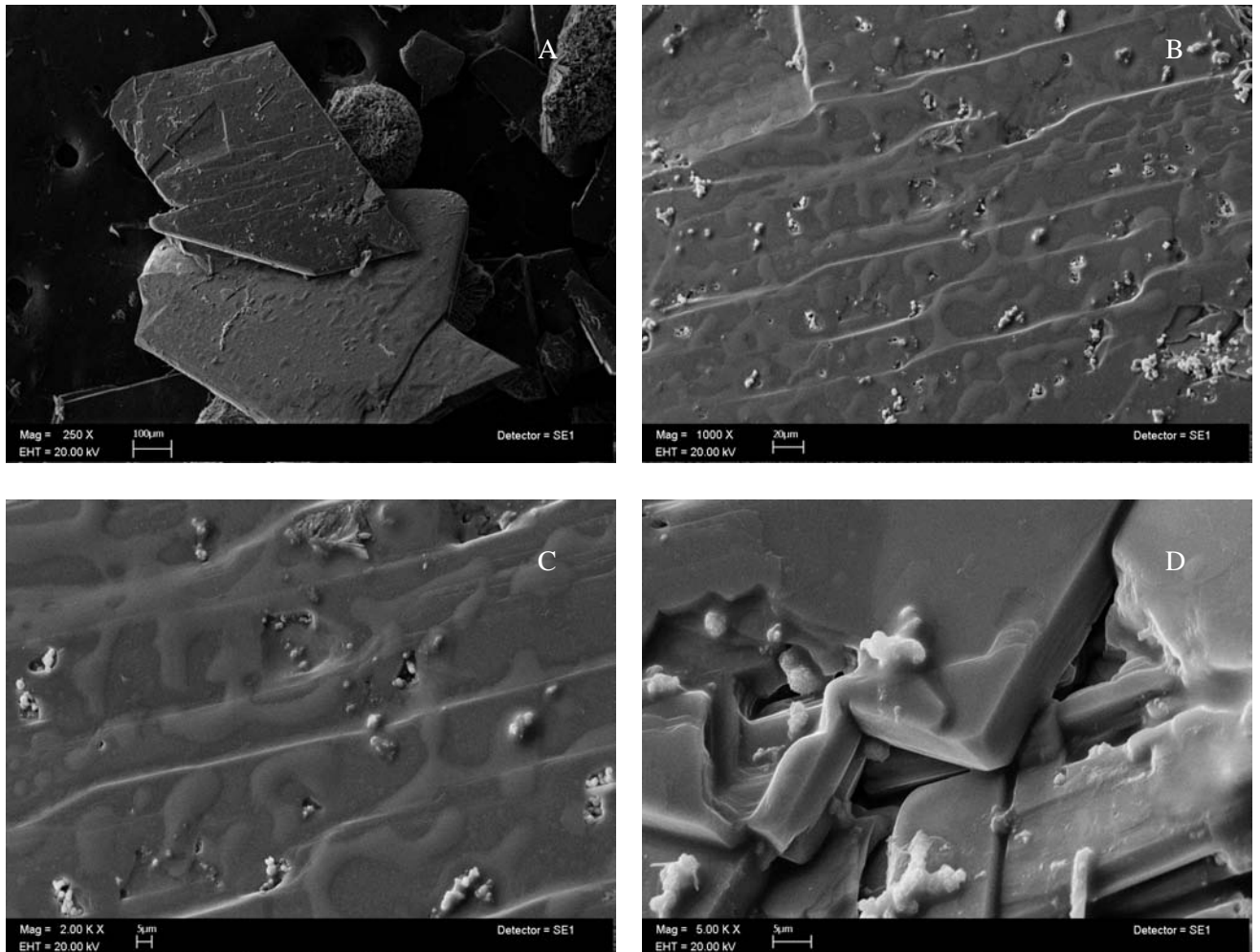


A los 21 días de crecimiento sin la proteína hrCEMP1 (*Figura 12*) las estructuras que se observan son placas con bordes irregulares y residuos de gel de silicato (microfotografías A y B). En un acercamiento a un residuo de gel se pueden ver múltiples cristales hexagonales aplanados, que al crecer se fusionan unos con otros. Estos son probablemente la etapa inicial de las placas de mayor tamaño (microfotografías C y D).



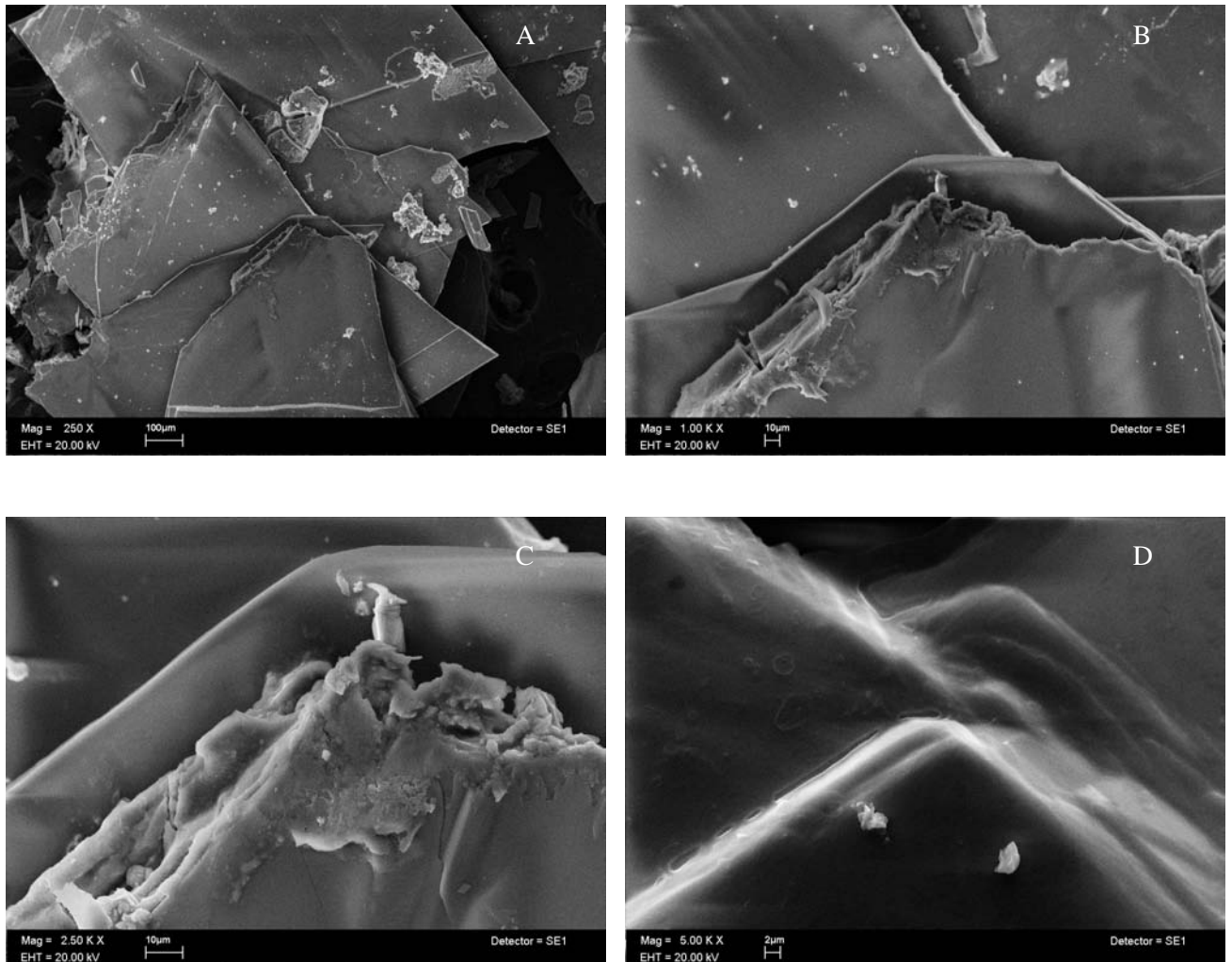
**Figura 12.** Control sin proteína. Morfología de los cristales de fosfato de calcio formados con el sistema de contradifusión en gel de silicato durante 21 días de incubación. **A)** 250x, **B)** 1000x, **C)** 2500, **D)** 5000x.

A los 30 días de crecimiento en ausencia de la proteína hrCEMP1 (*Figura 13*) hay placas con ángulos rectos y bordes irregulares, además de residuos de gel con placas y agujas (microfotografía A). Se muestran también microfotografías de los detalles de la superficie de una placa donde se puede notar las líneas de las fases de crecimiento (microfotografías B y C). Superficie de una placa donde se observa un defecto en la continuidad de la misma, aquí se puede observar las fases de crecimiento interno (microfotografía D).



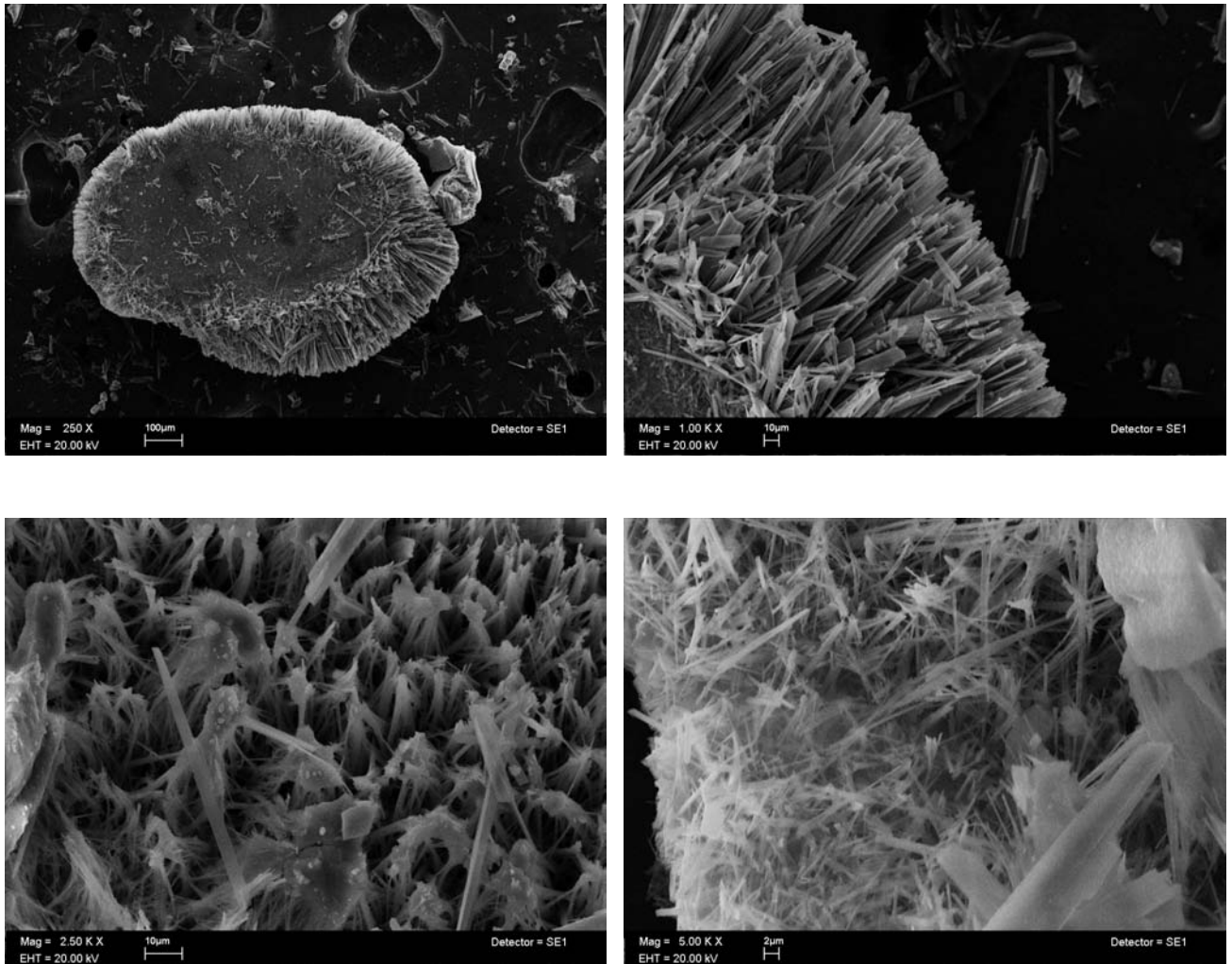
**Figura 13.** Control sin proteína. Morfología de los cristales de fosfato de calcio formados con el sistema de contradifusión en gel de silicato durante 30 días de incubación. **A)** 250x, **B)** 1000x, **C)** 2000x, **D)** 5000x.

En ausencia de la proteína hrCEMP1 a los 45 días de crecimiento (*Figura 14*) se observan placas que comparten bordes rectos e irregulares (microfotografía A), que son consistentes con las estructuras de los tiempos previos (7, 14, 21 y 30 días de crecimiento sin hrCEMP1). Algunos bordes presentan defectos en la continuidad (microfotografías B, C y D)



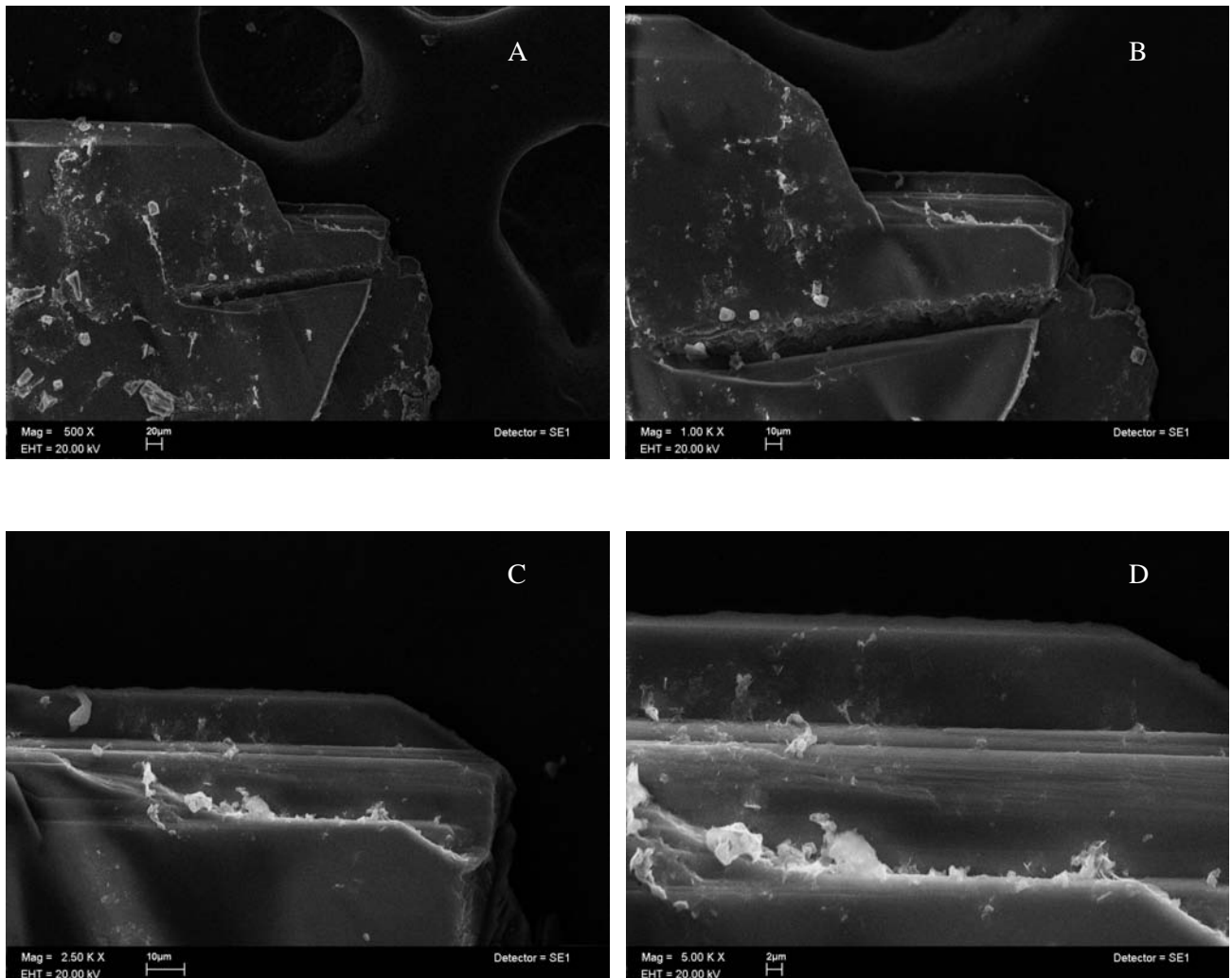
**Figura 14.** Control sin proteína. Morfología de los cristales de fosfato de calcio formados con el sistema de contradifusión en gel de silicato durante 45 días de incubación. **A)** 250x, **B)** 1000x, **C)** 2500x, **D)** 5000x.

A los 60 días de crecimiento sin la presencia de hrCEMP1 (*Figura 15*), además de placas con características similares a las observadas en el mismo grupo en tiempos previos, se pudo observar una estructura que semeja a una esférula (microfotografía A). En la superficie de esta estructura se observan agujas, las cuales no tienen una dirección definida (microfotografías B, C y D).



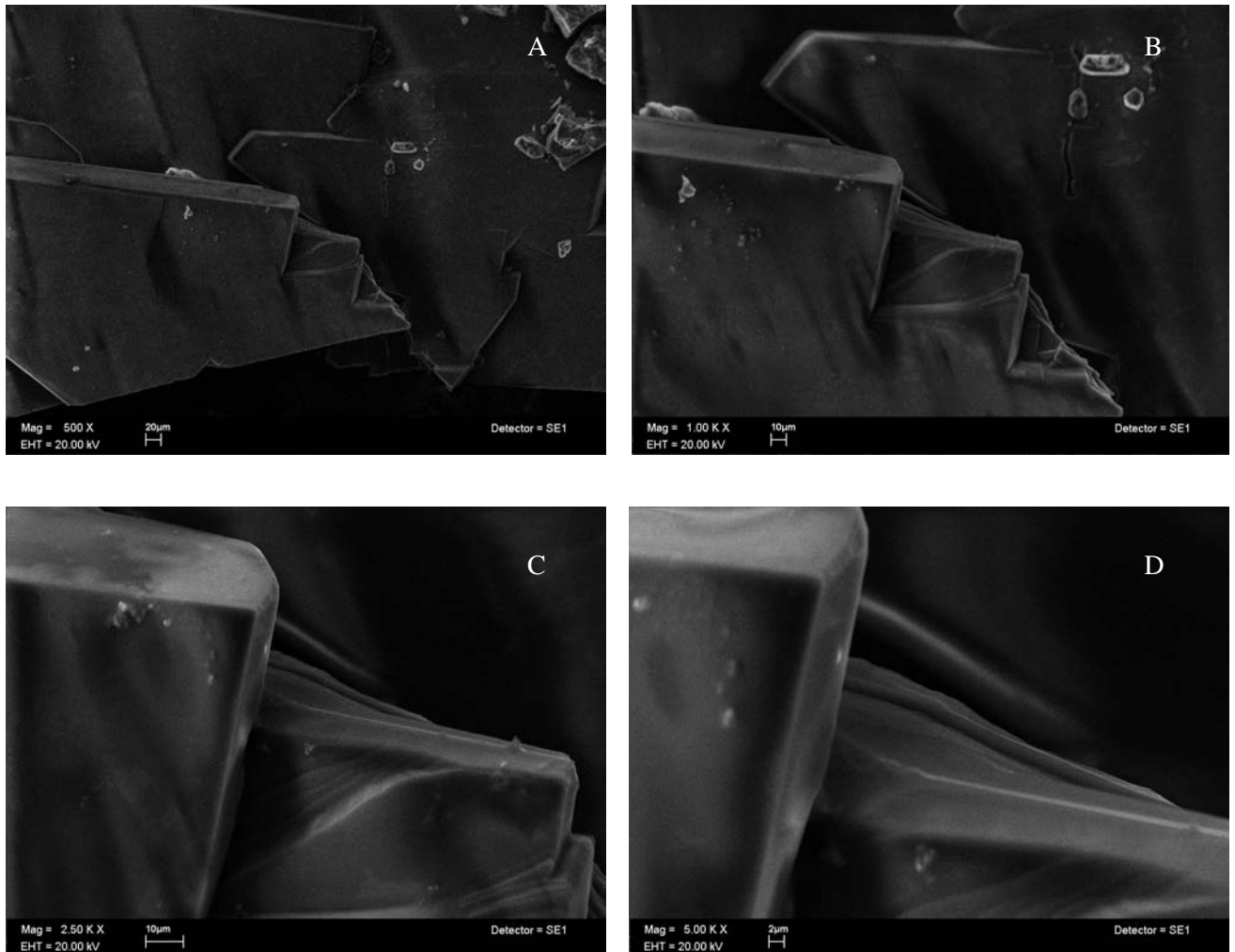
**Figura 15.** Control sin proteína. Morfología de los cristales de fosfato de calcio formados con el sistema de contradifusión en gel de silicato durante 60 días de incubación. **A)** 250x, **B)** 1000x, **C)** 2500x, **D)** 5000x.

Los cristales formados a los 7 días de crecimiento en el grupo al cual se le agregó BSA (*Figura 16*), tienen una morfología de placas que comparten bordes rectos e irregulares y tienen un tamaño variable (microfotografías A y B). Se pueden observar los diversos periodos de crecimiento que tienen las placas (microfotografías C y D), dichos periodos o fases de crecimiento del cristal son las capas de depósito de mineral que en su conjunto forman a las placas (se pueden distinguir como líneas escalonadas entre las placas).



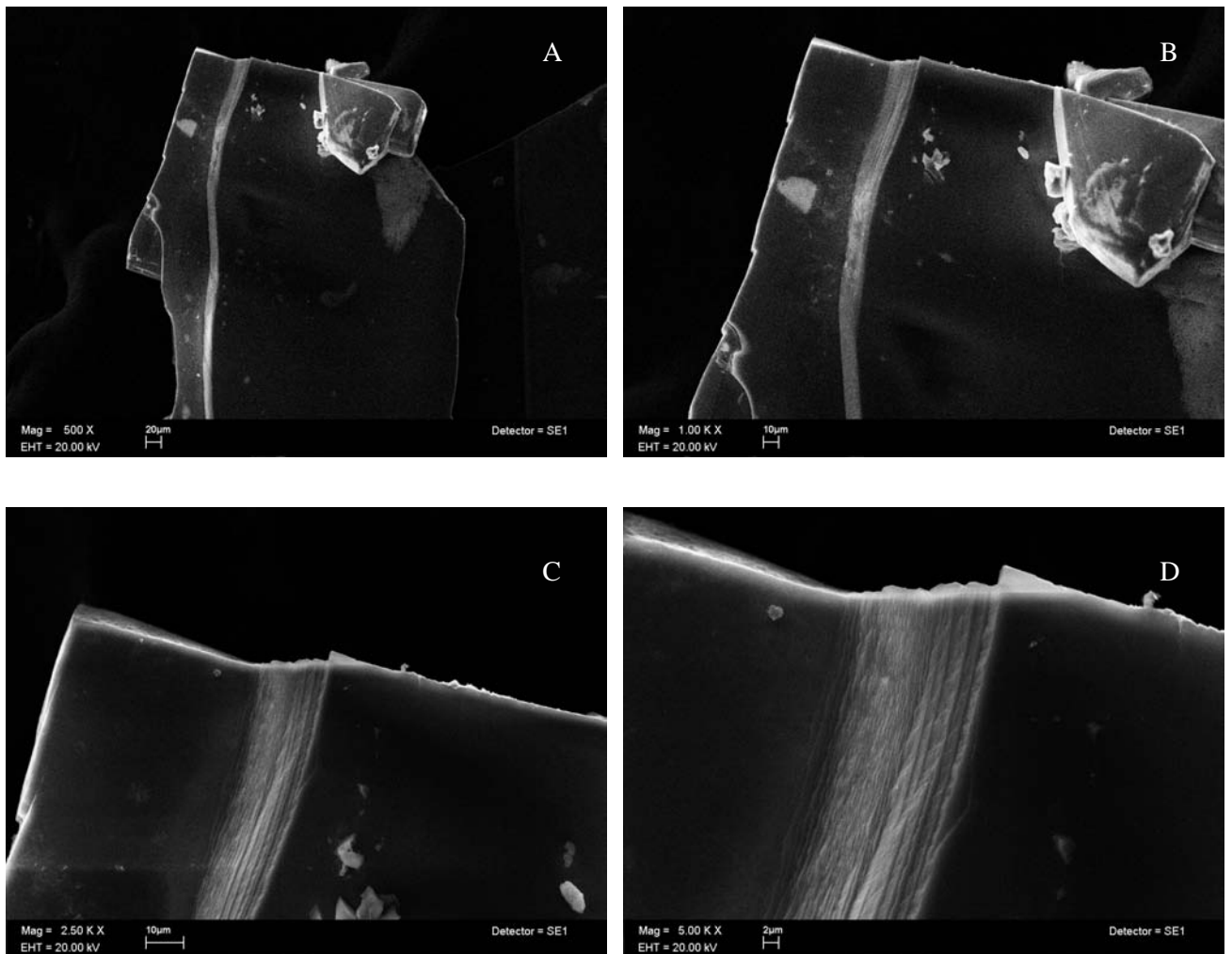
**Figura 16.** Control negativo BSA. Morfología de los cristales de fosfato de calcio formados con el sistema de contradifusión en gel de silicato durante 7 días de crecimiento. **A)** 250x, **B)** 1000x, **C)** 2500x, **D)** 5000x.

A los 14 días de crecimiento con BSA (*Figura 17*) se observan placas con bordes rectos e irregulares (microfotografías A y B). A mayor aumento se observa el detalle de un ángulo recto en una placa y la fase de crecimiento de la misma (microfotografías C y D).



**Figura 17.** Control negativo BSA. Morfología de los cristales de fosfato de calcio formados con el sistema de contradifusión en gel de silicato durante 14 días de crecimiento. **A)** 250x, **B)** 1000x, **C)** 2500x, **D)** 5000x.

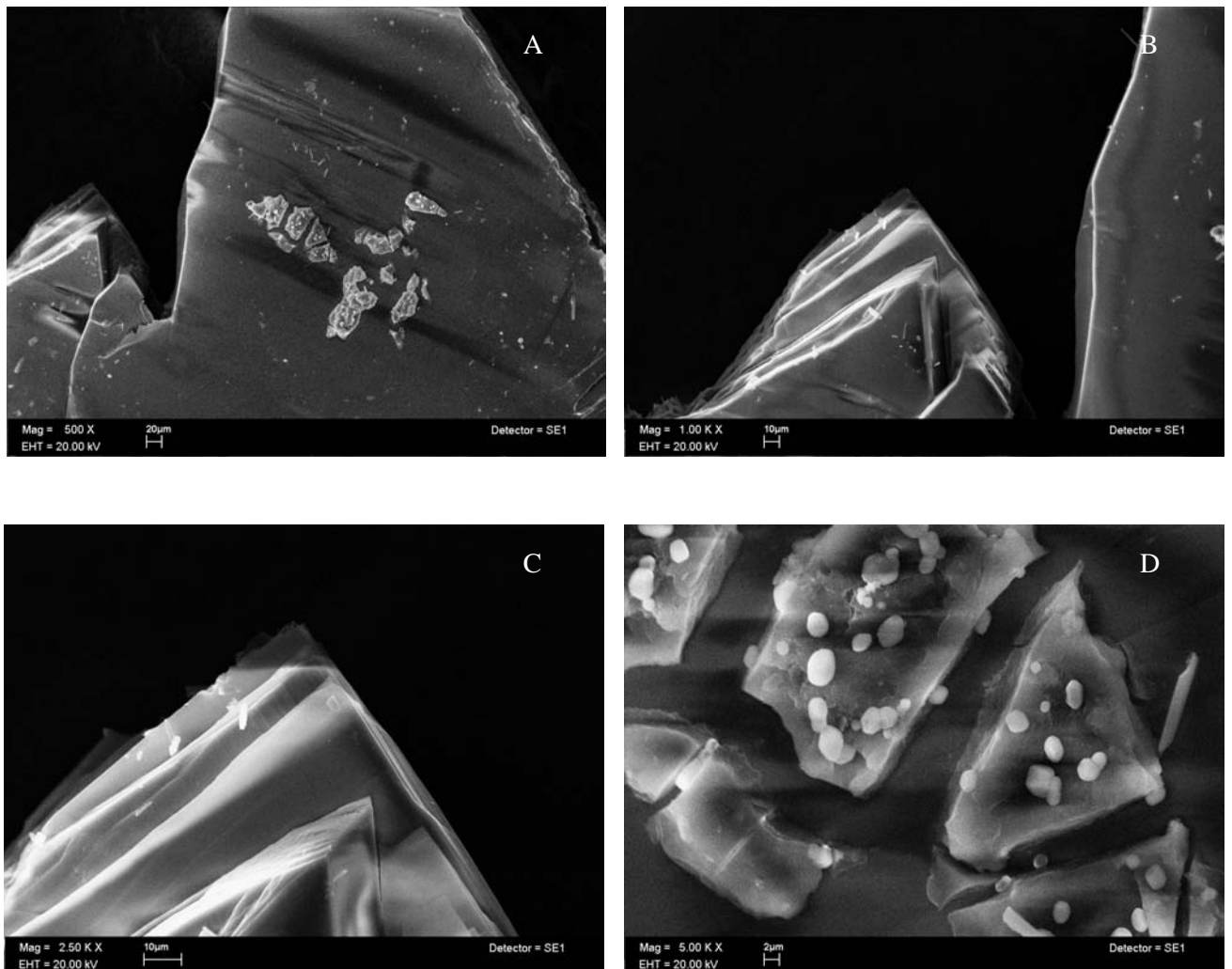
Placa formada a los 21 días de crecimiento en el grupo control con BSA (*Figura 18*). La placa presenta bordes irregulares y defectos en su superficie (microfotografías A y B). Asimismo se observan las fases de crecimiento de la placa (microfotografías C y D).



**Figura 18.** Control negativo BSA. Morfología de los cristales de fosfato de calcio formados con el sistema de contradifusión en gel de silicato durante 21 días de crecimiento. **A)** 500x, **B)** 1000x, **C)** 2500x, **D)** 5000x.



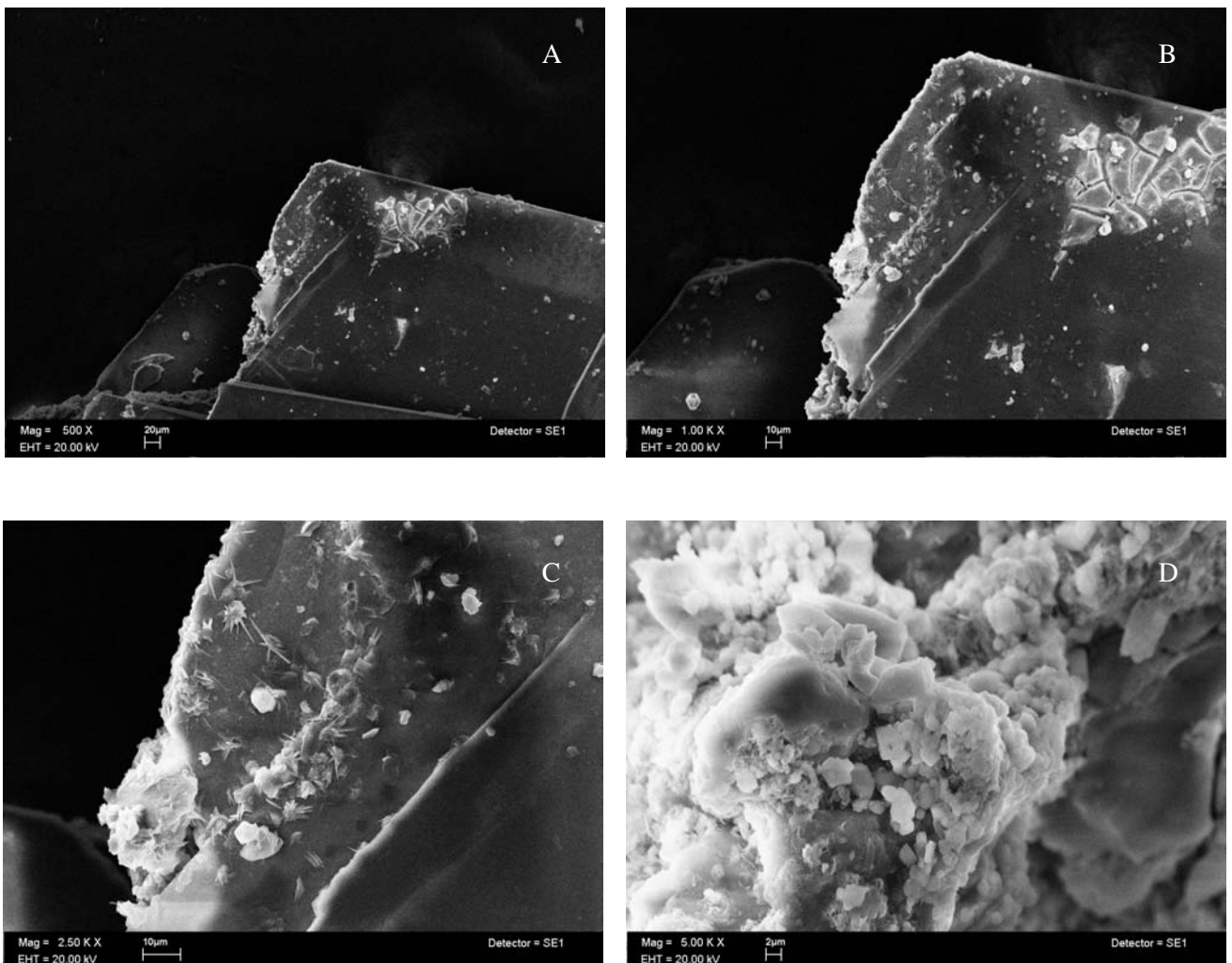
A los 30 días de crecimiento los cristales formados en el grupo con BSA (*Figura 19*) mantienen la morfología de placas con bordes irregulares (microfotografías A y B). Se presenta también el detalle de las fases de crecimiento de la placa (microfotografía C). Estas placas presentan defectos en su superficie donde se depositan residuos del gel de silicato (microfotografía D).



**Figura 19.** Control negativo BSA. Morfología de los cristales de fosfato de calcio formados con el sistema de contradifusión en gel de silicato durante 30 días de crecimiento. **A)** 500x, **B)** 1000x, **C)** 2500x, **D)** 5000x.

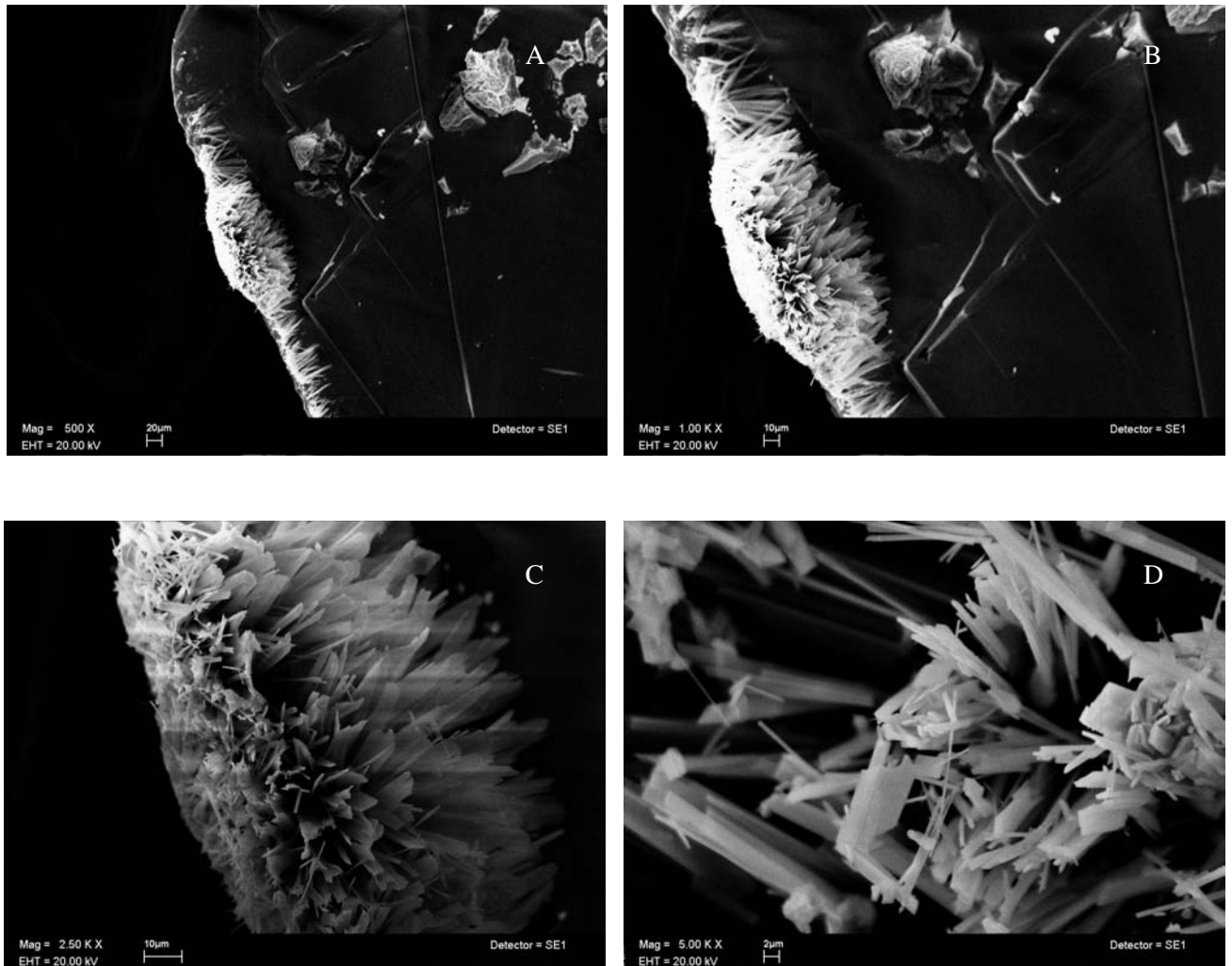


La morfología de los cristales en presencia de BSA a 45 días (*Figura 20*) sigue siendo de placas con bordes irregulares (microfotografía A). Se observan defectos en la continuidad de un borde de la placa y grietas en su superficie (microfotografía B). El borde donde se presenta el defecto tiene en su superficie algunas agujas (microfotografía C). El detalle del defecto del borde se muestra en la microfotografía D.



**Figura 20.** Control negativo BSA. Morfología de los cristales de fosfato de calcio formados con el sistema de contradifusión en gel de silicato durante 45 días de crecimiento. **A)** 500x, **B)** 1000x, **C)** 2500x, **D)** 5000x.

La morfología de los cristales formados en el grupo control con BSA a los 60 días de crecimiento (*Figura 21*), es consistente con aquellas observadas en los tiempos previos del mismo grupo (7, 14, 21, 30 y 45 días). Sin embargo, a los 60 días se pudo observar una placa que tiene un crecimiento de agujas en uno de sus bordes (microfotografías A, B y C). En la microfotografía D se presentan los detalles de dichas agujas, las cuales no tienen una orientación definida.

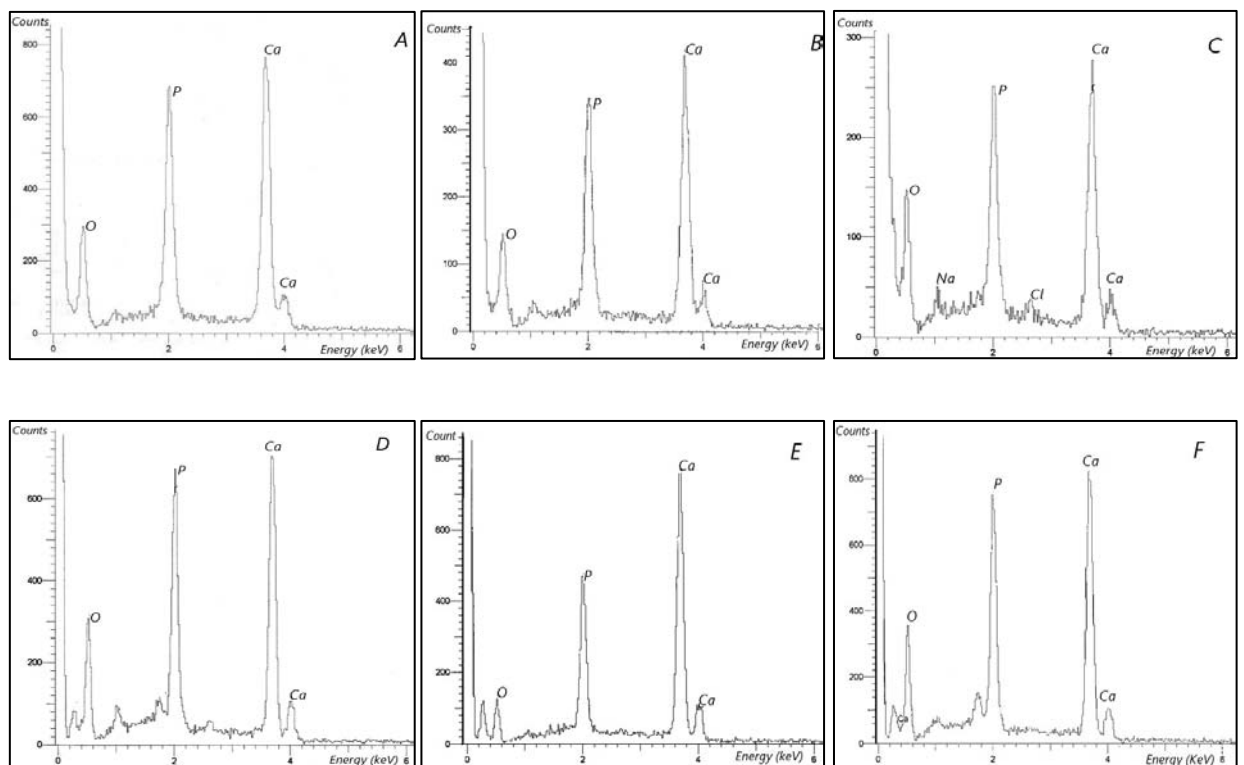


**Figura 21.** Control negativo BSA. Morfología de los cristales de fosfato de calcio formados con el sistema de contradifusión en gel de silicato durante 60 días de crecimiento. **A)** 500x, **B)** 1000x, **C)** 2500x, **D)** 5000x.

## Microanálisis de energía dispersiva electrónica con rayos X (EDS)

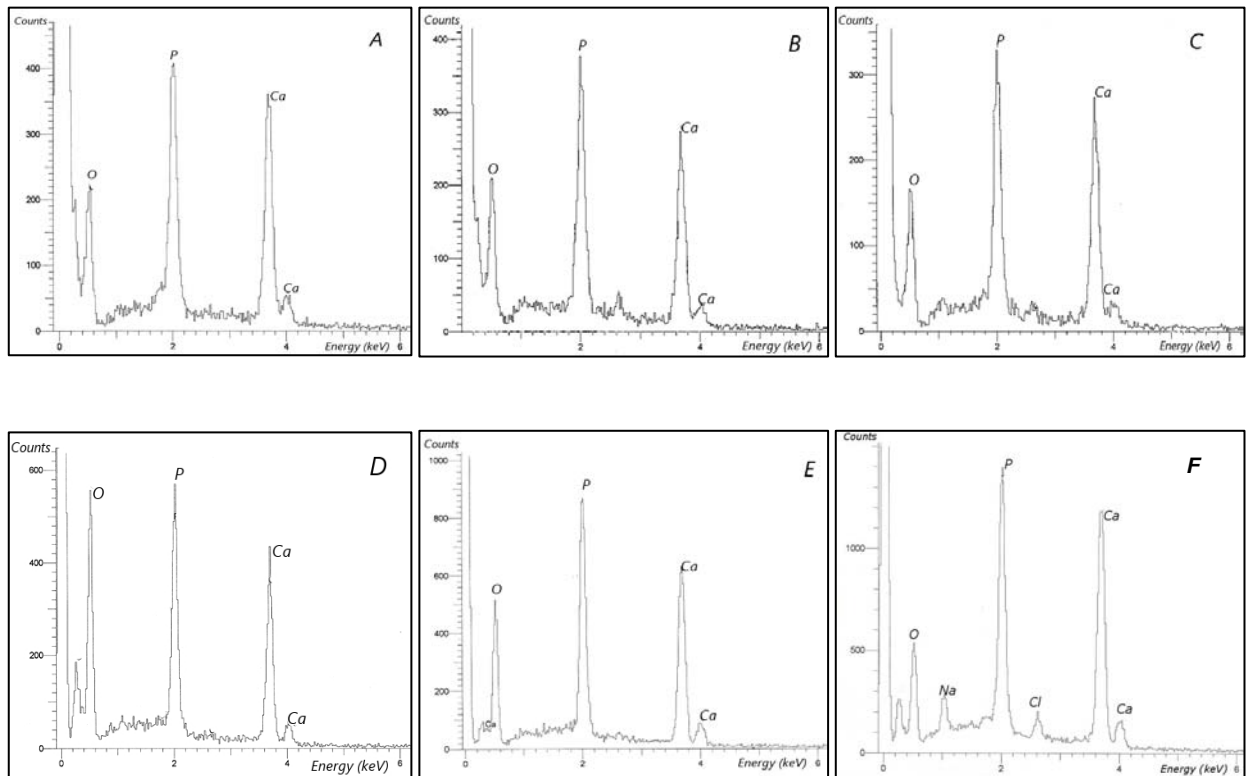
La composición elemental de los cristales formados en el sistema de contradifusión en gel de silicato de todos los grupos y periodos de tiempo fueron analizados mediante microanálisis de energía dispersiva electrónica con rayos X.

El análisis de EDS realizado a los cristales formados en presencia de hrCEMP1 (*Figura 22*) mostró que dichos cristales están formados principalmente por calcio y fósforo. El elemento más alto abundante en estos cristales en todos los periodos de tiempo es el calcio, seguido de conteos más bajos de fósforo. Este tipo de relación donde predomina el calcio sobre el fósforo favorece las fases mineralizadas.



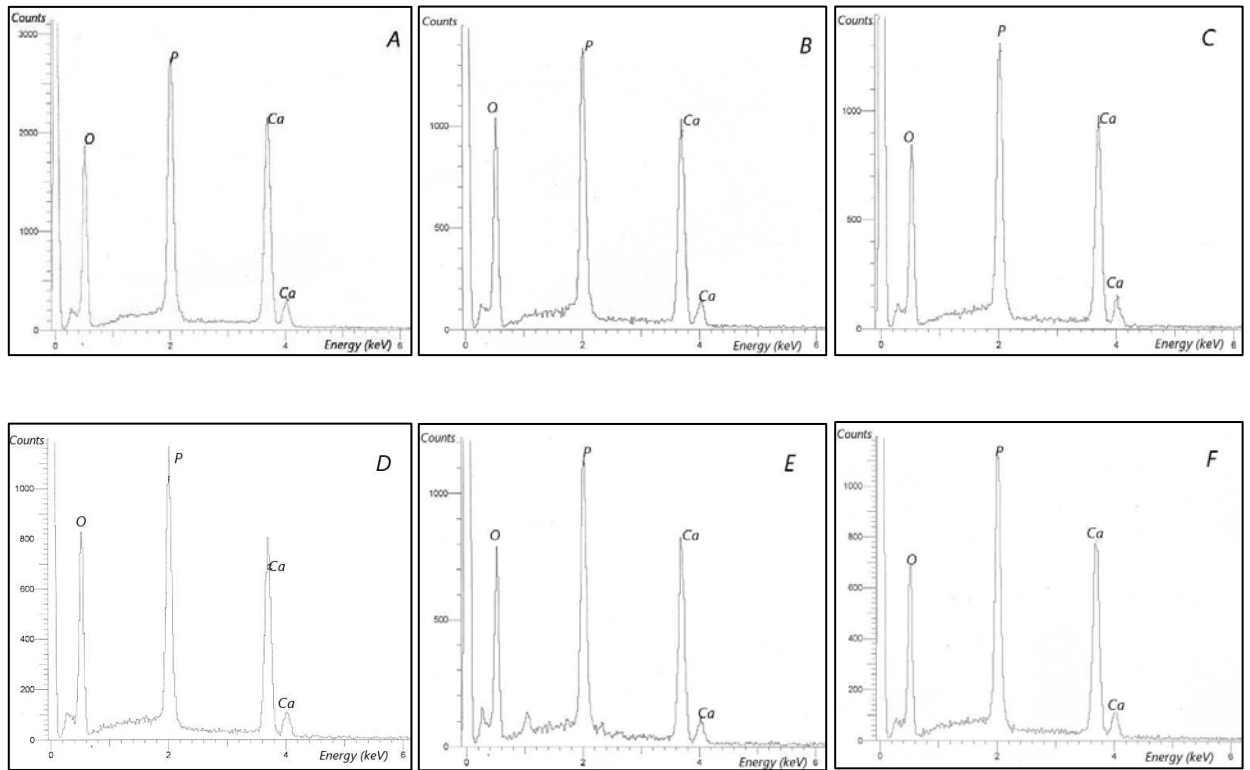
**Figura 22.** Espectros de difracción de los microanálisis de energía dispersiva electrónica con rayos X, realizados a los cristales formados con el sistema de contradifusión en geles de silicato inducidos con la proteína hrCEMP1 en los diferentes periodos de crecimiento estudiados. A) 7, B) 14, C) 21, D) 30, E) 45 y F) 60 días.

Los resultados del análisis de EDS demuestran que los cristales del grupo control sin hrCEMP1 están formados por calcio y fósforo (*Figura 23*). Contrastando con los resultados del grupo experimental con hrCEMP1, en este caso los conteos mas altos en todos los periodos de tiempo fueron para el fósforo, seguido del calcio.



**Figura 23.** Espectros de difracción de los microanálisis de energía dispersiva electrónica con rayos X, realizados a los cristales formados con el sistema de contradifusión en geles de silicato inducidos sin proteína, en los diferentes periodos de crecimiento estudiados. A) 7, B) 14, C) 21, D) 30, E) 45 y F) 60 días.

Los resultados del EDS realizados al grupo control con BSA (*Figura 24*) indican que la composición elemental de los cristales de este grupo es principalmente de fósforo y calcio. Los resultados para este grupo son similares a los observados en el grupo control sin proteína. El elemento más abundante en estos cristales es el fósforo, seguido por el calcio.



**Figura 24.** Espectros de difracción de los microanálisis de energía dispersiva electrónica con rayos X, realizados a los cristales formados con el sistema de contradifusión en geles de silicato inducidos con la proteína BSA, en los diferentes periodos de crecimiento estudiados. A) 7, B) 14, C) 21, D) 30, E) 45 y F) 60 días.

## Relación Ca/P

La relación Ca/P fue calculada a partir de la intensidad de los conteos presentes en el patrón de EDS. Se tomó al calcio y fósforo como el 100% de los elementos presentes para poder obtener la relación en base a su porcentaje atómico y determinar la fase cristalina en la que se encontraban las muestras y se comparo con la relación Ca/P de referencia para los fosfatos de calcio de relevancia biológica (*Tabla 2*).

Ca/P	Formula	Fase Cristalina
1	$\text{CaHPO}_4$	Monetita (Fosfato dicálcico)
1	$\text{CaHPO}_4\text{H}_2\text{O}$	Brushita (Fosfato dicálcico dihidratado)
1.33	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4\text{5H}_2\text{O}$	Fosfato octacálcico.
1.43	$\text{Ca}_{10}(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_6$	Whitlockita
1.67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatita

**Tabla 2.** Relaciones Ca/P de referencia para los fosfatos de calcio con relevancia en los sistemas biológicos.

	hrCEMP1			
	Ca % Atómico	P % Atómico	Relación Ca/P	Fase cristalina
7 días	55.70	44.30	1.25	Fosfato octacálcico
14 días	56.76	43.24	1.31	Fosfato octacálcico
21 días	56.84	43.16	1.31	Fosfato octacálcico
30 días	56.78	43.22	1.36	Fosfato octacálcico
45 días	57.76	42.24	1.36	Fosfato octacálcico
60 días	58.00	42.00	1.38	Fosfato octacálcico

**Tabla 3.** Relación Ca/P y fase cristalina de las muestras obtenidas en el sistema de contradifusión en gel de silicato en el grupo experimental con hrCEMP1.

<b>No Proteína</b>				
	Ca % Atómico	P % Atómico	Relación Ca/P	Fase cristalina
7 días	49.16	50.84	0.96	Fosfato dicálcico
14 días	47.17	52.83	0.89	Fosfato dicálcico
21 días	49.04	50.96	0.96	Fosfato dicálcico
30 días	47.17	52.83	0.89	Fosfato dicálcico
45 días	49.62	50.38	0.98	Fosfato dicálcico
60 días	52.88	47.12	1.12	Fosfato dicálcico

**Tabla 4.** Relación Ca/P y fase cristalina de las muestras obtenidas en el sistema de contradifusión en gel de silicato en el grupo control sin proteína.

<b>BSA</b>				
	Ca % Atómico	P % Atómico	Relación Ca/P	Fase cristalina
7 días	47.14	52.86	0.89	Fosfato dicálcico
14 días	46.99	53.01	0.88	Fosfato dicálcico
21 días	47.60	52.40	0.90	Fosfato dicálcico
30 días	47.60	52.40	0.90	Fosfato dicálcico
45 días	47.31	52.69	0.89	Fosfato dicálcico
60 días	48.93	51.07	0.95	Fosfato dicálcico

**Tabla 5.** Relación Ca/P y fase cristalina de las muestras obtenidas en el sistema de contradifusión en gel de silicato en el grupo control con BSA.

Los resultados obtenidos a partir del cálculo de la relación Ca/P indican que la incorporación de hrCEMP1 al sistema de contradifusión tiene un efecto en la incorporación de calcio a la composición del cristal, así como en el grado de mineralización del mismo. La relación Ca/P permite conocer que el grado de mineralización de los cristales formados en presencia de hrCEMP1 es fosfato octacálcico; esta es una fase termodinámicamente más estable comparada con los fosfatos dicálcicos (monetita y brushita), ya que los fosfatos dicálcicos presentan un alto grado de solubilidad (*Tabla 3*).

La tabla 4 (grupo control sin la adición de hrCEMP1) indica que la fase que se forma es fosfato dicálcico, esto se debe a que el fósforo predomina sobre los conteos de calcio. El fosfato dicálcico es una fase con alta solubilidad y bajo

grado de mineralización. La relación Ca/P de este grupo se mantuvo por debajo de 1 desde el día 7 hasta la medición del día 45. La medición más alta de este grupo fue la del día 60 (Ca/P 1.12), aunque esto no represento ningún cambio en la fase cristalina.

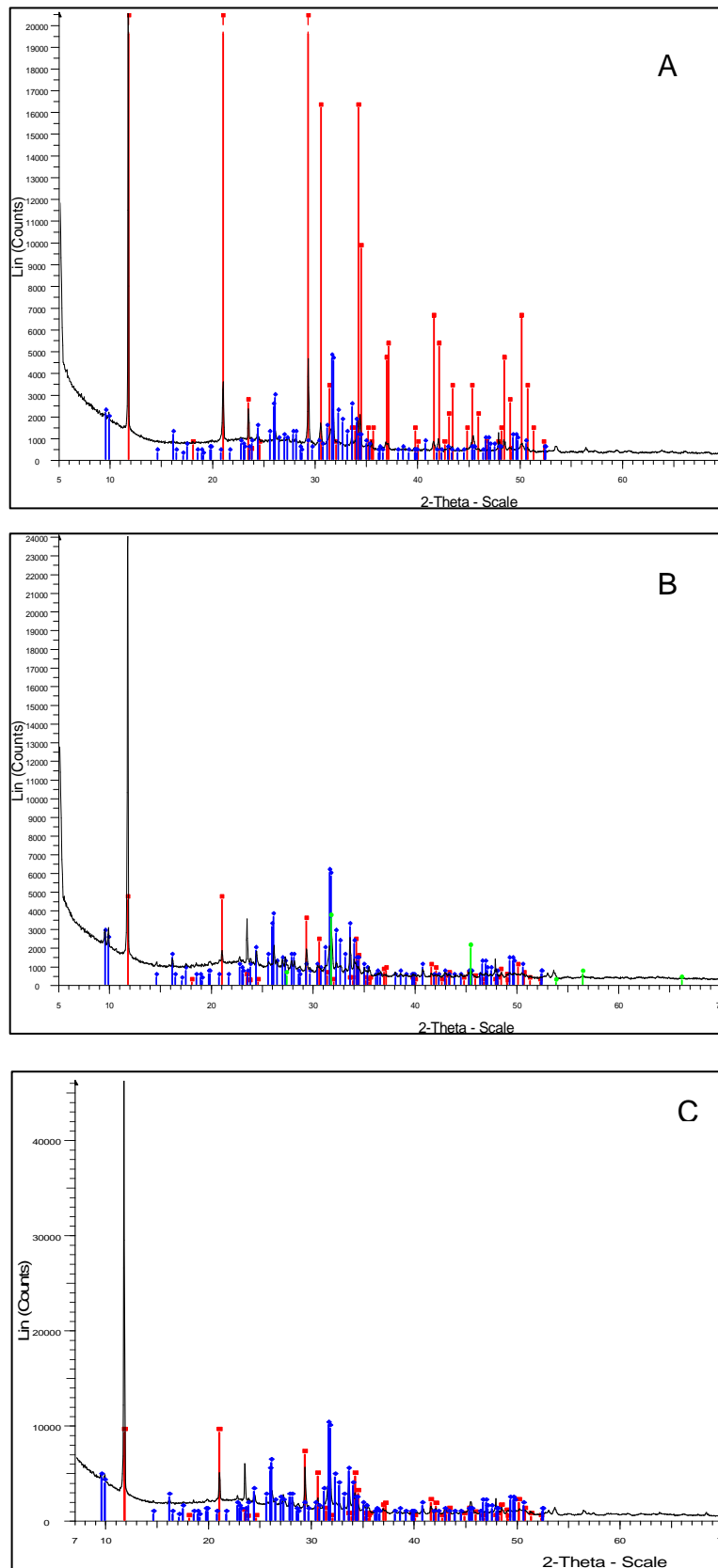
La tabla 5 (control negativo con BSA) se observan el elemento predominante es el fosforo seguido en menor proporción por él calcio. Las mediciones de la relación Ca/P indican que al igual que el grupo sin proteína (tabla 4), la fase cristalina que se formó en todos los periodos de tiempo fue fosfato dicálcico.

### **Difracción de rayos X de polvos**

Esta técnica permitió identificar la fase mineral presente en las muestras. El análisis se realizó a los periodos de crecimiento inicial (7 días), medio (30 días) y final (60 días); con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos con la relación Ca/P.

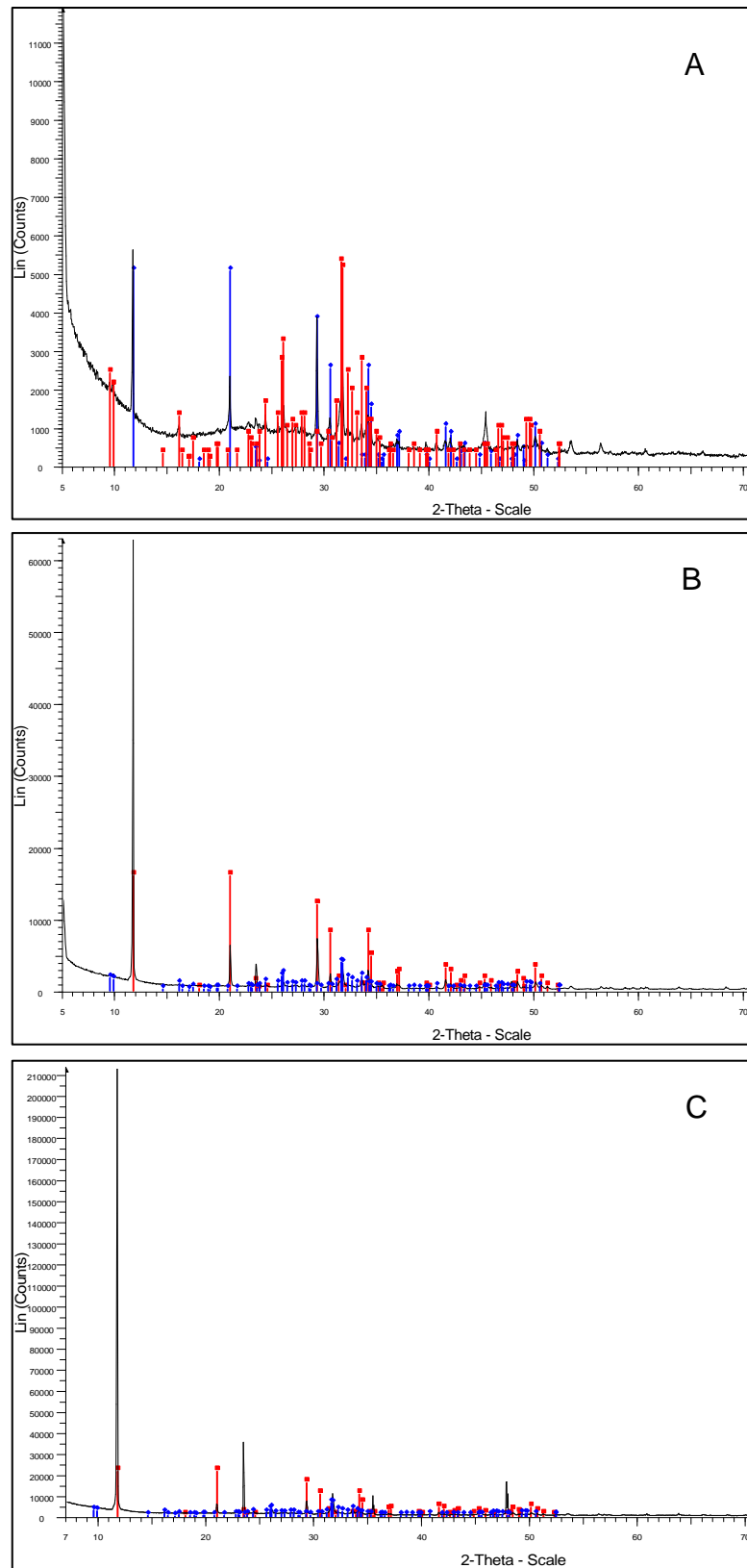
Los resultados para el grupo experimental con hrCEMP1 muestran que en el periodo inicial (7 días *Figura 25 grafica A*), la fase mineral más abundante es brushita (conteos de color rojo) seguida de fosfato octacálcico (conteos de color azul). A los 30 días de crecimiento (*Figura 25 grafica B*), hay un cambio en la fase mineral predominando el fosfato octacálcico (conteos de color azul) sobre la brushita (conteos en rojo). En este periodo de tiempo se observan trazas de cloruro de sodio (conteos de color verde), posiblemente debido a residuos del gel que quedaron incluidos en la muestra. En el periodo final de crecimiento (60 días, *Figura 25 grafica C*), el fosfato octacálcico es el mineral más abundante (conteos en azul). Esto confirma los resultados de la fase mineral presente obtenidos mediante la relación Ca/P de los cristales formados en presencia de hrCEMP1 (*Figura 25*).





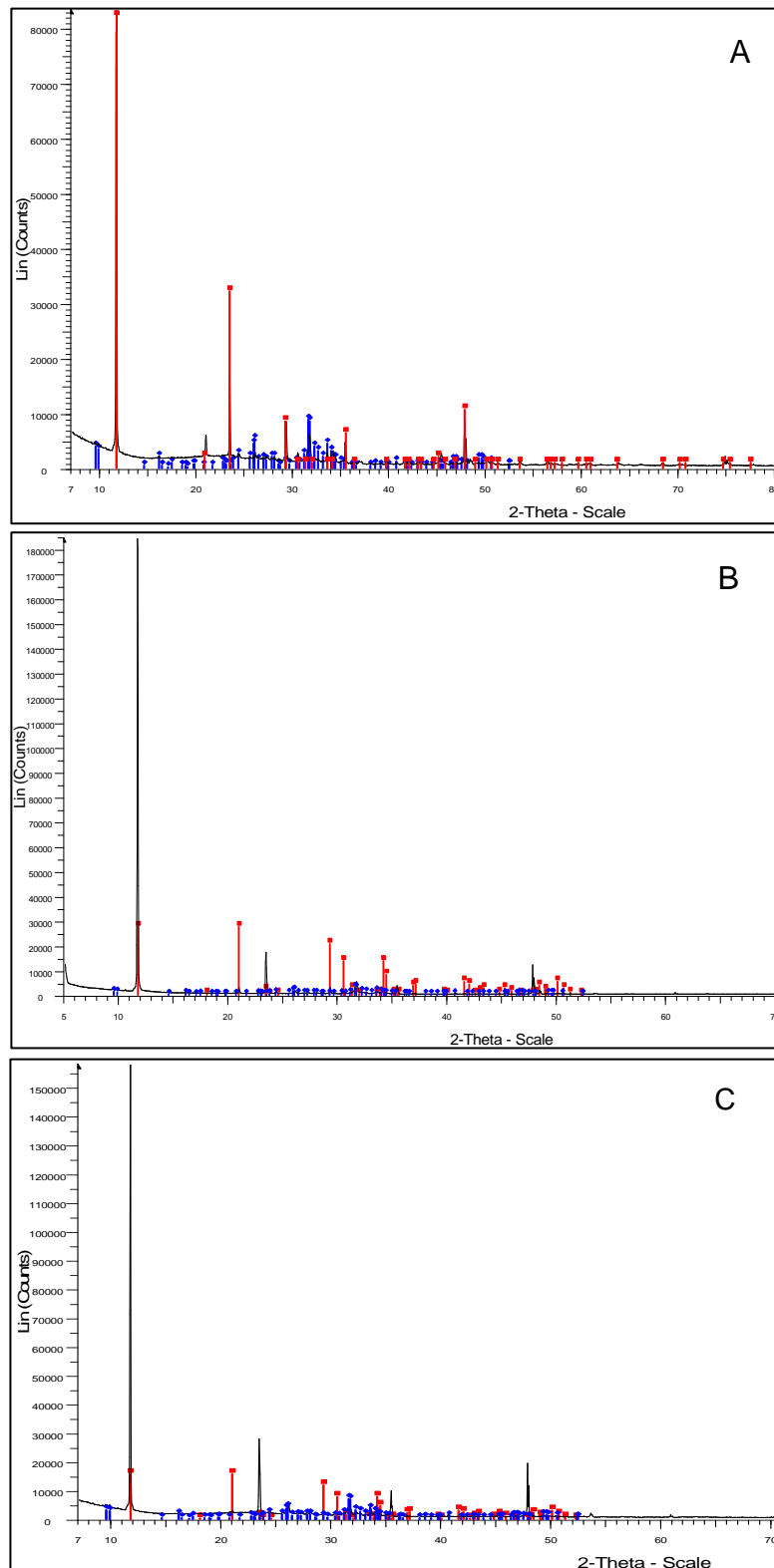
**Figura 25.** Espectros de difracción de rayos X de polvos de los cristales del grupo experimental hrCEMP1. Los picos azules corresponden a los conteos de fosfato octacálcico, los rojos a brushita y los verdes a cloruro de sodio. A) 7, B) 30 y C) 60 días de crecimiento.

En el grupo control con BSA (*Figura 26*) se observa que en los periodos de tiempo analizados (*7 días grafica A, 30 días grafica B y 60 días grafica C*) la fase mineral predominante es brushita (conteos en rojo).



**Figura 26.** Espectros de difracción de rayos X de polvos de las muestras del grupo control con BSA. Los picos azules corresponden a los conteos de fosfato octacálcico y los rojos a brushita. A) 7, B) 30, C) 60 días de crecimiento.

Los resultados de la difracción de rayos x de polvos del grupo control sin proteína hrCEMP1 son semejantes al control con BSA. En el periodo inicial (*Figura 27 grafica A*), medio (*grafica B*) y final (*grafica C*) de crecimiento se confirma que la fase mineral más abundante es brushita, pero en los dos grupos control el fosfato octacálcico no aumenta respecto al tiempo de incubación.



**Figura 27.** Espectros de difracción de rayos X de polvos de las muestras del grupo control sin proteína. Los picos azules corresponden a los conteos de fosfato octacálcico y los rojos a brushita. A) 7, B) 30, C) 60 días de crecimiento. 55

## DISCUSIÓN

El proceso de biomineralización en los vertebrados requiere de una matriz extracelular formada principalmente de colágena tipo I, la cual proporciona el andamio para el depósito de cristales de fosfato de calcio en forma de hidroxiapatita, esta es la fase mineral más estable termodinámicamente y tiene el menor grado de solubilidad de los cristales de fosfato de calcio<sup>60-66</sup>. En los sistemas biológicos, los cristales de hidroxiapatita no pueden formarse *de novo*, requieren de formas precursoras, las cuales necesitan concentraciones menores de energía y sales minerales para su formación. La formación de las fases amorfas como son los fosfatos dicálcicos (monetita y brushita), representa la etapa más soluble de los fosfatos de calcio, sin embargo, pueden servir como guías de crecimiento y aporta minerales para la formación del fosfato octacálcico (OCP)<sup>67, 68</sup>.

El fosfato octacálcico es la fase mineral de transición hacia la hidroxiapatita, pues es menos soluble que los estados amorfos, disminuye la energía de activación requerida para su formación, así como la disminución de minerales pues aporta un núcleo de crecimiento ordenado que favorece la formación de cristales de hidroxiapatita. Este proceso tiene que ser promovido y acelerado por moléculas nucleadoras y reguladoras del crecimiento de cristales de fosfato de calcio como son ciertas proteínas específicas de la matriz extracelular de los tejidos mineralizados<sup>62, 66-70</sup>. Conocer cuáles son dichas proteínas y principalmente, saber cuál es su mecanismo de acción, es una de las grandes incógnitas a dilucidar en el proceso de biomineralización.

La función de biomoléculas de tejidos mineralizados de vertebrados e invertebrados como son la osteopontina<sup>1, 66, 69-71</sup>, osteonectina<sup>67, 70</sup>, amelogenina<sup>68, 72</sup>, sialoproteína ósea<sup>66, 67, 69, 73</sup> y una variedad de proteínas de conchas<sup>74-75</sup> han sido demostradas experimentalmente. De este modo, las biomoléculas que se cree pueden tener influencia en el proceso de mineralización tienen que ser identificadas, aisladas, purificadas, caracterizadas, clonadas y expresadas en formas recombinantes. Se tiene que determinar su distribución espacial y temporal en tejidos mineralizados así como su presencia o ausencia en tejidos no mineralizados y patológicos asociados a la formación de tejido mineral, además de realizar su inmunolocalización y/o hibridación *in*

*situ*. Esto puede sugerir su papel en la formación de biominerales. Asimismo, la molécula en estudio puede ser asociada con el proceso de mineralización *in vivo*, mediante estudios en tejidos y en organismos genéticamente modificados, donde la expresión de la molécula de interés esté alterada, disminuida o incrementada. Finalmente, pueden ser empleados estudios de mineralización con sistemas libres de células, esto tiene como finalidad esclarecer el mecanismo de acción (regulador, inhibidor o nucleador) de las moléculas de matriz de los tejidos mineralizados y así dilucidar su función en los sistemas biológicos.

En este trabajo reportamos la función de una proteína específica del cemento radicular humano: la proteína del cemento 1, en el proceso de formación de cristales de fosfato de calcio utilizando el sistema libre de células de contradifusión en gel de silicato. La existencia de múltiples reportes<sup>1- 3, 59-65</sup> confirma que este sistema simula de manera cercana las características presentes en la matriz extracelular de los tejidos mineralizados de los vertebrados, además de ser un estudio obligado para determinar la función de biomoléculas en el proceso de biomineralización<sup>59</sup>. Previamente se ha aislado y caracterizado una línea celular derivada de un cementoblastoma humano, la cual expresa el fenotipo cementoblástico<sup>76, 77</sup>. Los hallazgos físicos, químicos y morfológicos del tejido mineral depositado por estas células son diferentes al tejido depositado por células osteoblásticas humanas *in vitro*. Esta línea celular produce una proteína con una Mr 50,000, que ha sido purificada del medio condicionante y que se denominó proteína del cemento (CP). Dicha proteína promueve la adhesión de fibroblastos gingivales humanos, células del ligamento periodontal humano y células derivadas del hueso alveolar humano de una manera dosis-dependiente. Se ha postulado que esta proteína está relacionada con la proteína de adhesión del cemento (CAP), pues el anticuerpo monoclonal dirigido contra esta proteína tuvo reacción cruzada con la proteína derivada de células de cementoblastoma humano.

Células derivadas del cementoblastoma humano tratadas con un anticuerpo contra la proteína de Mr 50,000 mostraron una disminución en la actividad específica de la fosfatasa alcalina (marcador temprano de la mineralización), así como una disminución en la expresión de proteínas asociadas al proceso de biomineralización como son la osteopontina y la

sialoproteína ósea. Los resultados de este estudio demostraron que el proceso de mineralización de la línea celular cementoblástica fue inhibida parcialmente por el anticuerpo dirigido contra la especie de Mr 50,000, lo cual indica que dicha proteína es un factor que regula el depósito mineral de este linaje celular<sup>53</sup>.

Se ha demostrado experimentalmente que CEMP1 es altamente expresada a nivel de proteína y ARNm en cementoblastos, subpoblaciones de células del ligamento periodontal, así como en células progenitoras localizadas en zonas paravasculares del ligamento periodontal y en los espacios endosteales del hueso alveolar humano<sup>5</sup>. Carmona-Rodríguez y col<sup>4</sup>, examinaron la posibilidad de que la sobreexpresión de CEMP1 pudiera inducir la expresión de proteínas de matriz de hueso y cemento radicular en células con un fenotipo no osteogénico como son los fibroblastos gingivales humanos (HGF). Sus resultados demostraron que los HGF transfectados con el gen de CEMP1 expresan una proteína de aproximadamente 50 kDa, esta proteína fue identificada por medio de análisis de Western blot como CEMP1. La expresión de CEMP1 en HGF indujo un cambio hacia un fenotipo mineralizante en dicha línea celular. Los HGF que expresan CEMP1 secretan una matriz mineralizada y expresan proteínas asociadas al proceso de mineralización como ALP, BSP, CAP, OCN y OPN.

Nuestros resultados demuestran que hrCEMP1 expresada en células de *E.coli* BL21 presenta una Mr 30,000. La caracterización bioquímica de CEMP1<sup>56</sup>, indica que esta proteína presenta modificaciones postraduccionales como glicosilaciones y fosforilaciones que contribuyen en aumentar su masa molecular en 43.5%, esto tiene como consecuencia que la proteína expresada en células eucariontes como son los cementoblastos y fibroblastos gingivales humanos transfectados con el gen de CEMP1 expresen una proteína con una Mr 50,000. La identidad de la hrCEMP1 purificada de células de *E.coli* BL21 fue confirmada mediante análisis de Western blot utilizando anticuerpos contra la etiqueta de histidinas en el carboxilo terminal de la proteína recombinante y un anticuerpo dirigido contra CEMP1. Ambos anticuerpos reconocen a la proteína purificada, lo que asegura la identidad de la misma. Una vez realizada la purificación e identificación de hrCEMP1, 50 µg de esta proteína fueron cargados a una columna de cromatografía con hidroxipatita. La proteína se recuperó de la columna mediante una elución de 500 mM de fosfato de sodio, lo que demostró

que CEMP1 tiene una capacidad intrínseca de unión a la hidroxiapatita y de alta asociación a este biomaterial, este hallazgo reforzó nuestra hipótesis sobre la participación de CEMP1 en la formación de cristales de fosfato de calcio.

La caracterización de las proteínas no colágenas asociadas a la formación de cristales de fosfato de calcio ha mostrado que comparten características en común, tales como: a) Son proteínas ácidas (contienen regiones ricas en ácido aspártico, ácido glutámico y serina), estas regiones reconocen y dirigen el crecimiento del cristal en un plano específico<sup>1, 60</sup>, b) Estas proteínas están fosforiladas y/o glicosiladas, c) Presentan tirosina-sulfatos y d) Tienen alta afinidad por la hidroxiapatita.<sup>1, 61</sup> La caracterización bioquímica de CEMP1 reveló que esta proteína comparte algunas de las características antes mencionadas: es una proteína que está altamente glicosilada, fosforilada y tiene una alta afinidad por la hidroxiapatita<sup>56</sup>; sin embargo, no es una proteína ácida, ya que posee un pI de 9.7.

Al analizar la secuencia de aminoácidos de CEMP1, identificamos regiones con aminoácidos ácidos y ricas en serina: SSTDS (residuos 4-8), STSNTSAE (residuos 17-24), EENS (residuos 147-150) y SCSGS (residuos 217-221). CEMP1 es una proteína de 247 aminoácidos, de estos, 5 residuos son ácido aspártico (2%), 9 residuos de ácido glutámico (3.6%) y 22 residuos de serina (8.9%). Estas regiones pueden estar asociadas a la unión de calcio y junto con la serina, regular la morfología de esférulas formadas por placas alargadas que crecen de un centro en común. Dado que el ácido glutámico y el ácido aspártico son más ácidos que la serina, se puede asumir que estos interactúan fuertemente con la superficie de la hidroxiapatita. En contraste, es posible que la serina interactúe con la superficie de la hidroxiapatita de dos cristales y entonces se formen campos de esférulas densas.

Eiden-Abmann y colaboradores<sup>60</sup>, demostraron que la presencia de ácido glutámico, ácido aspártico y serina en el sistema de contradifusión en gelatina induce la formación de cristales de hidroxiapatita en forma de esférulas. La serina induce el crecimiento de esférulas densas, formadas por múltiples agujas que se originan de un centro en común. El ácido glutámico revela el crecimiento de esférulas conectadas hechas de agujas que se originan de un centro en común, mientras que el ácido aspártico crea esférulas conectadas por algunas placas con un origen común. En otra investigación Gen He y colaboradores<sup>3</sup>,

realizaron ensayos de nucleación de cristales de fosfato de calcio inducidos con la proteína DMP1 (proteína de matriz de dentina 1). Al analizar la secuencia de aminoácidos de esta proteína localizaron cuatro regiones ácidas: ESNES (residuos 376-380), ESQES (residuos 386-390), DSQDS (residuos 431-435) y QESQSEQDS (residuos 414-422). Durante las primeras horas después de iniciada la nucleación solo se observaron fosfatos de calcio amorfos. A partir del primer día y hasta el tercer día se observaron una serie de fases cristalinas intermedias o de transición. Después de una semana de incubación se formaron estructuras semejantes a esférulas hechas de placas cuya composición fue hidroxiapatita.

Nuestros resultados demuestran la formación de esférulas desde el día 7, manteniéndose hasta el último periodo de tiempo observado (60 días). La relación Ca/P de los cristales inducidos con hrCEMP1 indica que la fase mineral que se formó en todos los tiempos fue fosfato octacálcico, el cual es el estado de transición hacia hidroxiapatita. El análisis con difracción de rayos X en polvos demostró una transformación de brushita (la cual es la fase mineral más soluble de los fosfatos de calcio) hacia fosfato octacálcico a los 30 días, mientras que a los 60 días la fase mineral predominante fue fosfato octacálcico.

El estudio de mineralización realizado por Sivakumar Gajjeraman y colaboradores<sup>2</sup> utilizando el sistema de contradifusión en gel de silicato con la proteína hrDMP1, mostró que a los 7 días de crecimiento se formó una fase amorfa. A los 14 días el precipitado se transformó gradualmente en esférulas de un tamaño de 90  $\mu\text{m}$  aproximadamente. A partir del día 44 y hasta el final de sus mediciones (día 60) ya no se observó un cambio en el tamaño de las esférulas. En este periodo de tiempo se llevó a cabo una transformación hacia hidroxiapatita pobremente calcificada y posteriormente al día 60 a hidroxiapatita altamente cristalina.

En suma, nuestros datos confirman que CEMP1 es una proteína que juega un papel importante en la nucleación de cristales de fosfato octacálcico y enfatizan su relevancia en la regulación del crecimiento de cristales y su arreglo. Asimismo, el presente estudio plantea nuevas preguntas acerca de la formación del cemento radicular, por lo que en el futuro será importante el determinar las interacciones del mineral con esta proteína novel.



Estos datos, colocan a CEMP1 como un posible agente terapéutico y se apoyan en las evidencias que muestran a esta proteína como un factor importante en el proceso de mineralización biológica del cemento radicular e inductor de cambios en células no osteogénicas hacia un fenotipo mineralizante.

## CONCLUSIONES

Se ha logrado desarrollar una metodología para expresar y purificar la proteína hrCEMP1 en la cantidad y pureza necesaria para desarrollar los experimentos en el sistema de contradifusión en gel de silicato.

En conjunto los resultados de este trabajo muestran que hrCEMP1 tiene un papel importante en el proceso de mineralización. Esta proteína es fundamental para la síntesis de cristales de fosfato octacálcico en forma de esférulas formadas por múltiples placas que tienen su origen en un núcleo en común. Dadas las características de crecimiento de los cristales inducidos con hrCEMP1, se puede determinar que esta proteína es responsable de la nucleación y regulación del crecimiento de cristales de fosfato octacálcico.

CEMP1 comparte características con proteínas asociadas al proceso de mineralización, como su alta afinidad a cristales de hidroxiapatita y el contenido en su secuencia de aminoácidos de regiones ácidas y ricas en serina.

## REFERENCIAS

1. Hunter G, Goldberg H. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8562-8565.
2. Gajjeraman S, Narayanan K, Hao J, Qin C, George A. Matrix macromolecules in hard tissue control the nucleation and hierarchical assembly of hydroxyapatite. *J Biol Chemistry*. 2007; 282: 1193-1204.
3. He G, Dahl T, Veis A, George A. Nucleation of apatite crystals *in vitro* by self-assembled dentin matrix protein 1. *Nature*. 2003; 2: 552- 558.
4. Carmona-Rodríguez B, Álvarez-Pérez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, Molina-Guarneros J, García-Hernández A, Suárez-Franco J, Chavarría I, Villareal E, Arzate H. Human cementum protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblast. *BBRC* 2007; 358: 763-769.
5. Arzate H, Jiménez-García LF, Álvarez-Pérez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. Immunolocalization of human cementoblastoma-conditiones médium derived protein. *J Dent Res* 2002; 81; 541-6.
6. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissue in health and disease. *Periodontology* 2000 2006; 40: 11-28.
7. Cho M-I, Garant PR. Development and general structure of periodontum. *Periodontology* 2000. 2000 24: 9-27.
8. Nanci, A. Ten cate's oral histology: Development, structure, and function. Mosby 2007.
9. Carranza FA, Neuman MG. *Clinical periodontology*. 8th edition. Section one. The Norma Periodontum. W.B. Saunders Company 1996 U.S.A.
10. Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontology* 2000. 2006; 40: 29-49.
11. McCulloch CAG, Lekic P, McKee MD. Role of physical forces regulating the form and funtion of the periodontal ligament. *Periodontology* 2000. 2000; 24: 56-72.
12. Lindhe J. *Periodontología clínica e implantología odontológica*. En: Karting K, Lang KP, Editorial Médica Panamericana. España 2003: pp 19-67.
13. Nakae H, Narayanan AS, Raines E, Page RC. Isolation and partial characterization of mitogenic factors from cementum. *Biochemistry* 1991; 20: 7047-7052.
14. Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontology* 2000 2000; 24: 73-98.
15. Bartold PM and Narayanan AS. *Biology of the periodontal connective tissues*. Quintessence Publishing Co, Inc. 1998 Carol Stream, Illinois, USA.
16. Garant PR. *Oral Cells and Tissues*. Quintessence Books Chapter 7: Root formation and cementogenesis. Quintessence Publishing Co, Inc 2003.
17. Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. *Histología y embriología bucodental* Capítulo 4. Editorial médica panamericana. España 1999.
18. Zeichner-David M. Regeneration of periodontal tissues: Cementogenesis revisted. *Periodontology* 2000. 2006; 41:196-217.
19. Arzate H, Portilla-Robertson J, Aguilar-Mendoza ME. Recombination of epithelial root sheath and dental papilla cells *in vitro*. *Arch Med Res* 1996 27; 573-577.
20. Bosshardt DD. Are cementoblast a subpoblation of osteoblast or a unique phenotype? *J Dent Res* 2005; 84; 390-406.
21. Kagayama M, Sasano Y, Zhu JX, Hirata M, Mizohuchi I, Kamakura S. Epithelial rest colocalize with cementoblast forming acellular cementum but not with cementoblast forming cellular cementum. *Acta Anat* 1998; 163; 1-9.
22. Thomas HF. Root formation. *Int J Dev Biol* 1995; 38: 231-237.
23. McCulloch CA. Origins and functions of cells essential for periodontal repair: the role of fibroblasts in tissue homeostasis. *Oral Dis* 1995; 1: 271-278
24. Melcher AH. On the repair potencial of periodontal tissues. *J Periodontol*. 1976; 47: 256-260.
25. Melchor AH. Cells of periodontum: their role in the healing of wounds. *Ann R Coll Surg Engl* 1985; 67: 130-131.
26. Pitaru S, McCulloch CA, Narayanan AS. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodontal Res* 1994; 29; 81-94.
27. Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 474-484.
28. Schroeder EH. Origin, Structure and distribution of cementoblasts and its possible role in local periodontal treatment. *Periodontology Today* 1988: 32-40.
29. Arzate H, Chimal-Monroy J, Hernández-Lagunas L, Díaz de León L. Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenquymal cells. *J Periodontol Res* 1996; 31: 144-148
30. Wu D-Y, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan SA. Characterization of a collagenous cementum-derived attachment. *J Bone Mineral Res* 1999: 11; 686-692.

31. Saito M, Iwase M, Maslan N, Nozaki N, Yamamuchi M, Handa K, Takahashi O, Sato S, Kawase T, Terenaka T, Narayanan S. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone* 2001; 29: 242-248.
32. Arzate H, Olson SW, Page RC, Narayanan S. Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in cultura. *Bone and Mineral Res* 1992; 18: 15-30.
33. Weiner S, Traub W. Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils. *FEBS Lett* 1986; 206: 262-266.
34. Bonucci E. Calcification in biological systems, Florida Estados Unidos. CRC press 1992.
35. Low MG. The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1989; 988: 427-454
36. Sela J, Schwartz Z, Swain LD, Boyan BD. The role of matrix vesicles in calcification. En Bonucci E. Calcification in biological systems. Florida, Estados Unidos CRC press 1992.
37. Whyte MP, Peck WA Alkaline phosphatase: physiological role explored in hypophosphatais. *Bone and mineral research*. Amsterdam Holanda Elsevier 1989; 6: 175-218.
38. Miao D, Scutt A. Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *The Journal of histochemistry & cytochemistry* 2002; 50: 333-340.
39. Nociti FH, Berry JE, Foster BL, Gurley KA, Kingsley DM, Takata T, Miyauchi M, Somerman MJ. Cementum: A phosphate-sensitive tissue. *J Dent Res* 2002; 81: 817-821
40. van den Boss T, Beertsen W. Alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament: age effect relation to cementum growth rate. *J Period Res* 1999; 34: 1-6.
41. van den Boss T, Handoko G, Niehof A, Ryan LM, Coburn SP, Whyte MP, Beertsen W. Cementum and dentin in hypophosphatesia. *J Dent Res* 2005; 84: 1021-1025.
42. Groeneveld MC, Everts V, Beertsen W. Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingiva of the rat molar: Its relation to cementum formation. *J Dent Res* 1995; 74: 1374-1381.
43. Wuttke M, Muller S, Nitsche P, Paulsson M, Hanisch FG. Structural characterization of human recombinant and bone-derived bone sialoprotein. *J Biol Chem* 2001; 276: 36839- 36848.
44. Ganss B, Him RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999; 10: 79-98.
45. Lian BJ, Stein GS, Stein J, van Winjen AJ. Osteocalcin gene promoter: Unloding the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation. *J Cell Bio Supplements* 1998; 30/31: 62-72.
46. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of bone. *Periodontology* 2000 2000; 24: 99-126..
47. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biology* 2000; 19: 615-622.
48. Gehron P. Cell-mediated calcification *in vitro*. En: Bonucci E. Calcificación in biological systems. Florida, Estados Unidos CRC press 1992.
49. Arzate H, Álvarez-Pérez MA, Aguilar-Mendoza ME, Álvarez-Pérez O. Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells *in vitro*. *J Periodont Res* 1998; 33: 249-258
50. Ivanovski S, Komaki M, Bartold PM, Narayanan AS. Periodontal-derived cells attach to cementum attachment protein via  $\alpha 5 \beta 1$  integrin. *J Period Res* 1999; 34: 154-159.
51. Handa K, Saito M, Yamauchi M, Kiyono T, Sato S, Terenka T, Narayanan AS. Cementum matrix formation *in vivo* by cultured dental follicle cells. *Bone* 2002; 31: 606-611.
52. Pitaru S, Pritzki A, Bar-Kana I, Grosskopf A, Savion N, Narayanan AS. Bone morphogenetic protein 2 induces the expression of cementum attachment protein in human periodontal ligament clones. *Connect Tissue Res* 2002; 43: 257-64.
53. Álvarez-Pérez MA, Pitaru S, Álvarez-Fregoso O, Reyes Gasga J, Arzate H. Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line. *J Struct Biol* 2003; 143: 1-13.
54. Komaki M, Kang M, Narayanan AS. Role of MAP Kinases  $p42^{erk-2}/p44^{erk-1}$  in cementum-derived attachment-protein-mediated cell attachment. *J Dent Res*. 2000; 79: 1789-1793.
55. Álvarez-Pérez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Carmona-Rodríguez B, Arzate H. Molecular cloning, expresión and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP23). *Bone* 2006; 38: 409-419.
56. Villareal-Ramírez E, Moreno A, Mas-Oliva J, Chávez-Pacheco J, Narayanan AS, Gil-Chavarría I, Zeichner-David M, Arzate H. Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): Primary role in biomineralization. *BBRC* 2009; 384: 49-54.
57. Kémoun P, Laurencin-Dalcioux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Cote-Auriol F, Briand-Mesange F, Gadelorge M, Arzate H, Narayanan AS, Brundel G, Salles JP. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel Matrix derivatives (EMD) *in vitro*. *Cell Tiss Res* 2006; 329: 283-94.
58. Kitagawa M, Kudo Y, Ogawa I, Abiko Y, Miyauchi M, Takata T. Effect of F-spondin on cementoblastic differentiation of human periodontal ligament cells. *BBRC* 2006; 309: 1050-1056.
59. Silverman L, Boskey A. Diffusion systems for evaluation of biomineralization. *Calc Tiss Int* 2004 75; 494-501.
60. Eiden-ABmann S, Viertelhaus M, HeiB A, Hoetzer K, Felsche J. The Influence of amino acids on the mineralization of hydroxyapatite in gelatin. *J Inor Biochem*. 2002; 91: 481-486.

61. Tartaix P, Doulaverakis M, George A, Fisher L, Butler W, Qin C, Salih E, Tan M, Fujimoto Y, Spevak L, Boskey A. *In vitro* effects of dentin matrix protein-1 on hydroxyapatite formation provide insights into *in vivo* functions. *J Biol Chem.* 2004; 279: 18115-18120.
62. Teng S, Shi J, Chen L. Formation of calcium phosphates in gelatin with a novel diffusion system. *Coll and Surf.* 2006; 49: 87-92.
63. Boskey A. Hydroxyapatite formation in a dynamic collagen gel system: Effects of type I collagen, lipids and proteoglycans. *J Phys Chem.* 1989; 93: 1628-1635.
64. Boskey A, Boyan D, Schwartz Z. Matrix Vesicles promote mineralization in a gelatin gel. *Calcif Tissue Int.* 1997; 60: 309-315.
65. Beniash E, Simmer J, Margolis H. The effect of recombinant mouse amelogenins on the formation and organization of hydroxyapatite crystals *in vitro*. *J Struct Biol* 2005; 149: 182-190.
66. Boskey AL, Maresca M, Ulrich W, Doty SB, Butler WT, Prince CW. Osteopontin-hydroxyapatite interactions *in vitro*. Inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner.* 1993; 22: 147-159.
67. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J.* 1996; 317: 59-64.
68. Iijima M, Moriwaki Y, Wen HB, Fincham AG, Moradian-Oldak. Elongated growth of octacalcium phosphate crystals in recombinant amelogenin gels under controlled ionic flow. *J Dent Res* 2002; 81: 69-73.
69. Boskey AL. Osteopontin and related phosphorylated sialoproteins: effects on mineralization. *Ann NY Acad Sci.* 1995; 760: 249-256.
70. Termine JD, Kleinman K, Whitson SW. Osteonectin a bone specific protein linking mineral to collagen. *Cell.* 1981; 26: 99-105.
71. Hunter GK, Goldberg HA. The inhibitory activity of osteopontin on hydroxyapatite formation *in vitro*. *Ann NY Acad Sci.* 1995; 760: 305-308.
72. Hunter GK, Curtis HA, Grynias MD, Simmer JP, Fincham AG. Effects of recombinant amelogenin on hydroxyapatite formation *in vitro*. *Calcif Tissue Int.* 1999; 65: 226-231.
73. Tye CE, Rattray KR, Warner KJ, Gordon JA, Sodek J, Hunter GK, Goldberg HA. Delineation of the hydroxyapatite nucleating domains of bone sialoprotein. *J Biol Chem.* 2003; 278: 7949-55.
74. Arias JL, Fink DJ, Xiao SQ, Heuer AH, Caplan AI. Biomineralization and eggshells: cell-mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix. *Int Rev Cytol.* 1993; 145: 217-250.
75. Gotliv BA, Addadi L, Weiner S. Mollusk shell acidic proteins: in search of individual functions. *Chem-Biochem.* 2003; 4: 522-529.
76. Arzate H, Alvarez-Pérez MA, Alvarez-Fregoso O, Reyes-Gasga J, Ximénez-Fyvie LA. Electron microscopy, micro-analysis and X-ray diffraction. Characterization of the mineral-like tissue deposited by human cementum tumor-derived cells. *J Dent Res* 2000; 79: 28-34.
77. Arzate H, Alvarez-Pérez 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: 249-58.

## APÉNDICE: Fórmulas de reactivos.

- **Medio LB (Luria Bertani)**

10 gr de peptona

5 gr de extracto de levadura

10 gr de NaCl

1 litro de agua destilada

Esterilizar en autoclave 15 minutos a 120°C.

- **Buffer de ruptura celular (Binding buffer)**

20 mM de fosfato de sodio

50 mM de cloruro de sodio

pH final 7.8

Resuspender el botón celular en 4 ml de buffer de ruptura por cada 100 ml de medio de cultivo.

- **Inhibidores de proteasas**

PMSF (Fenilmetilsulfonilfluoruro): inhibidor de las serina-proteasas.

N-etilmaleimida: inhibidor de cisteína-proteasas.

Aprotinina: Inhibidor de las serina-proteasas.

Leupeptina: inhibidor de las serina y cisteína-proteasas.

Pepstatina: inhibidor de las aspartil-proteasas.

- **Fórmula para preparar gel de silicato de sodio: (para un gel)**

2 ml de Metasilicato de sodio 1.06 gr/ml

1.8 ml de HEPES buffer 10 mM pH 7.4

0.2 ml de HEPES buffer 10mM pH 7.4 más azida de sodio 1%.

1.08 de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M.

Mezclar los componentes e inmediatamente después agregar al cassette y esperar a que gelifique a temperatura ambiente. En el caso del grupo experimental y control negativo las proteínas se resuspendieron en HEPES buffer 10 mM pH 7.4 y se agregó antes de gelificar la solución.

- **Solución de Cloruro de Calcio:**

100 mM de cloruro de calcio en HEPES buffer 10 mM, pH 7.4.

- **Solución de Bloqueo**

50 ml de TBST

2.5 gr de leche descremada

- **TBST**

20 ml de TBS 10x pH 7.6

180 ml de H<sub>2</sub>O dd

300 µl de Tween 20

- **Solución de revelado con DAB**

40 ml de PBS 1x.

50 µl de Peróxido de Hidrógeno

100 µl de Cloruro de Níquel al 8%

250 µl de Diaminobencidina

---Detener la reacción con agua desionizada.---

- **Amortiguador para electro-transferencia de proteínas**

Tris base 1.41 g

Glicina 6.72 g

Metanol 100 ml

Aforar a 500 ml