

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



División de Estudios de Posgrado e Investigación de la
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**“ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN *IN SITU* DE FACTORES DE
MADURACIÓN DEL RNA EN CÉLULAS DERIVADAS DEL
PERIODONTO”**

TESIS

Que para Obtener el Grado
DOCTORA EN CIENCIAS

Presenta:

M. en C. MARGARITA IVET GIL CHAVARRÍA

Directores de Tesis:

HIGINIO ARZATE

JOSÉ REYES-GASGA

LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

DIRECTORES DE TESIS:

Por compartirme parte de su conocimiento y experiencia en las diferentes áreas para integrarlo en éste proyecto. Mil gracias.

HIGINIO ARZATE.

Por todo lo que implica trabajar a tu lado en el laboratorio y por brindarme la oportunidad de poder contribuir en una pequeña parte para la investigación que diriges: La Biología Periodontal

JOSÉ REYES GASGA.

Por tu disposición para que todo estuviera llevándose a cabo en orden; por proporcionarme los medios académicos para realizar este proyecto y también por tu paciencia al involucrarte en el mundo biológico.

LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

Por guiarme y dirigirme; porque en los momentos compartidos siempre había enseñanzas, soluciones, consejos, cosas positivas... así como una infinidad de posibilidades en la ciencia y en cualquier circunstancia.

A LOS INVESTIGADORES QUE CONFORMARON MIS JURADOS:

Gracias por su valiosa contribución y supervisión, las cuales han sido de gran importancia en las distintas etapas de mi investigación doctoral.

Examen Doctoral

Dra. Elba Rosa Leyva Huerta
Dra. Argelia Almaguer Flores
Dr. Luis Alberto Gaitán Cepeda
Dr. Juan Carlos Hernández Guerrero
Dr. Luis Felipe Jiménez García

Examen de Candidatura

Dr. Octavio Álvarez Fragoso
Dra. Patricia Tato Saldívar
Dr. Javier Ambrosio Hernández
Dr. Juan Arcadio Molina Guarneros
Dr. Juan Carlos Guerrero Hernández
Dr. Higinio Arzate

Comité Evaluador de Avances

Dra. Laurie Ann Ximenez Fyvie
Dr. Juan Arcadio Molina Guarneros
Dr. Juan Carlos Guerrero Hernández

ASESORÍA ACADÉMICA Y TÉCNICA

Porque con su ayuda, sugerencias, cuestionamientos, comentarios y críticas ...enriquecieron en múltiples aspectos el presente trabajo.

Facultad de Ciencias

Dra. Lourdes Segura Valdéz
Dra. Lourdes Agredano Moreno
M.en C. Reyna Lara Martínez
M. en C. Cynthia Ceja

Instituto de Ciencias Físicas UNAM

Dr. Eduardo Villarreal Ramírez

Instituto de Física

Dr. Ramiro García García
Dra. Gaby Estela Tiznado Orozco
Dra. Josefina Arellano Jiménez
M. en C. Manuel Aguilar Franco
M. en C. Roberto Hernández
M. en C. Samuel Tehuacanero
M. en C. Cristina Zorrilla
M. en C. Jacqueline Cañetas
Sr. Pedro Mexía Hernández
Sr. Diego Quiterio

Centro de Investigación en Química Aplicada

Dr. Arturo Ponce Pedraza

Universidad del Papaloapan

Dr. Erick Juárez Arellano

APOYOS FINANCIEROS

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Por la beca otorgada: 2006-2-2008-2

Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal

Por la beca otorgada: 6 meses

APOYO ADMINISTRATIVO

DEPeI Facultad de Odontología

Por facilitarme los múltiples trámites requeridos:
Anita, Laura, Luz, Gaby y Vicky.

Dedicatorias

A MI HERMOSA Y AMADA FAMILIA

Mis Padres, por ese amor infinito, la fortaleza, alegría, nobleza y paciencia que me demuestran a cada día. Son lo mejor de mi vida.

Hermanos y Cuñados, por su gran sensibilidad, solidaridad, apoyo y porque siempre nuestros corazones estarán unidos y así todo es posible!
Con admiración a las 2 nuevas y extraordinarias mamás de este año.

DE FORMA MUY ESPECIAL A:

Quetzalli, Ximena, Saúl, Daniel, Gonzalo, Isaac y al **Bomboncito** que está por nacer; porque todos son "increíbles" y por inspirarme los sentimientos más bellos que existen!

A TI, EDUARDO

Porque gracias a ti, amo más a la vida.

A MIS GRANDES AMIGOS

Porque hemos creado sentimientos indestructibles, a pesar del tiempo y la distancia... siempre están conmigo.

Dr. RAFAEL GARCÍA RUIZ

Por su incondicional apoyo, por todas nuestras pláticas y por el gran cariño y admiración que le tengo.

AL BALLETO "TMENI ALEF"

Porque se han convertido en una experiencia muy grata, divertida y de frecuentes emociones.

Enrique Sánchez Ochoa, por hacernos parte de tu creatividad, de tus espontáneas e intrépidas ideas.

Y por supuesto... a todas las **Chicas BDSS!!**

	Número de Página
Abstract	1
Resumen	2
Abreviaturas	3
Introducción	6
Antecedentes	8
• Tejidos Periodontales Mineralizados	8
• Biomineralización	9
• Proteínas Involucradas en la Biomineralización de Tej. Periodontales	10
• CAP	11
• CEMP1	11
• Arquitectura Nuclear	13
• Transcripción y Factores de Maduración del pre-mARN	14
Planteamiento del Problema	17
Objetivo	18
Desarrollo Experimental	19
• I). Cultivo Celular (Cm y Ob)	19
• II). Fijación Celular	20
• III). Tinciones	21
• IV). Inmunofluorescencias y Confocal	21
• V). Microscopía Electrónica de Transmisión	22

Resultados y Discusión	25
• Morfología Nuclear y Nucleolar	26
• Inmunolocalización de CAP y CEMP1	28
• Patrón Nuclear Moteado en Cm y Ob	31
• Factores de Maduración en Inactividad Transcripcional	35
Conclusión	37
Bibliografía	38
Publicaciones 2006-2010 Relacionados con el Campo de Estudio: BIOLOGÍA BUCAL	44

ABSTRACT

Cementoblasts (CM) and Osteoblasts (OB) give rise to the mineralizing periodontal tissues known as cement and alveolar bone, respectively. Although both cell types express the same major extracellular matrix proteins serving as template that allows the growth of hydroxyapatite crystals, it was recently reported that cementoblasts also express two novel proteins known as Cement Attachment Protein (CAP) and Cement Protein 1 (CEMP1) that may play an important role in mineralization, and could represent a specific molecular marker. Here we use immunofluorescence and confocal microscopy of SR splicing factors to analyze whether there are also cellular features characterizing both cell types. CM and OB show an intranuclear typical speckled pattern during interphase that is dissociated or altered after inhibition of transcription throughout mitosis or by the use of actinomycin D. However, they are different in nuclear size and number of speckles. While CEMP1 is localized in CM in the cytoplasm and nucleus and CAP only in the cytoplasm, both proteins were not observed in OB. Nuclear features may be a reflection of differences in transcriptional and splicing activity of both mineralizing cell types.

RESUMEN

Los cementoblastos (Cm) y osteoblastos (Ob) dan lugar a los tejidos periodontales mineralizados: cemento radicular y hueso alveolar, respectivamente. Aunque ambos tipos de células expresan las principales proteínas de la matriz extracelular, funcionando como templete que permite el crecimiento de cristales de hidroxapatita; se reportó recientemente, que los cementoblastos también expresan dos nuevas proteínas: la proteína de adhesión del cemento (CAP) y la proteína del cemento 1 (CEMP1). Dichas proteínas desempeñan un papel importante en la mineralización y podrían representar un marcador molecular específico. En este trabajo, observamos la especificidad y localización de CAP y CEMP; así como las diferencias en la actividad transcripcional, determinada por la distribución de los factores de maduración del ARN en cada línea celular. Los estudios se hicieron en inmunofluorescencia y microscopía electrónica de transmisión con los cuales mostramos algunos rasgos celulares que caracterizan a ambos tipos de células. Tanto en los Cm como en los Ob se identificó un típico patrón nuclear moteado (PNM) durante la interfase; este PNM se disocia en mitosis y se modifica después de la inhibición de la transcripción a través del uso de actinomicina D. Sin embargo, nuestros resultados muestran que los Cm y los Ob son diferentes en tamaño nuclear, en el número de motas y por lo tanto, en su expresión genética. Corroboramos que CEMP1 y CAP son específicas de Cm; determinamos que CAP se localiza en citoplasma y CEMP1 esta presente no sólo en el citoplasma sino también en núcleo; ninguna de las dos proteínas se observaron en Ob. Todas estas características nucleares, son consecuencia de la expresión genética a nivel celular, permitiendo conocer más acerca de la biología periodontal en dos tipos de células mineralizantes.

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpos
Act-D	Actinomicina – D
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARN pol I	ARN polimerasa I
ARN pol II	ARN polimerasa II
ASF/SF2	Alternative Splicing Factor/Splicing Factor 2 Factor de Splicing Alternativo/ Factor de Splicing 2
BSP	Bone Sialoprotein Sialoproteína Ósea
Cm	Cementoblastos
CAP	Cementum Attachment Protein Proteína de Adhesión del Cemento
CEMP1	Cementum Protein 1 Proteína del Cemento 1
COL	Colágena
CP	Proteína del Cemento (Actualmente CEMP1)
FN	Fibronectina
HA	Hidroxiapatita

hrCEMP1	Human Recombinant CEMP1 CEMP1 Recombinante Humana
ICG (GIC)	Interchromatine Granules Gránulos Intercromatinianos
IF	Inmunofluorescencia
IUE	Inmunolocalización Ultraestructural
LPD	Ligamento Periodontal
mARN	Ácido Ribonucléico Mensajero
MC	Microscopía Confocal
ME	Matriz Extracelular
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
M_r	Movilidad relativa
NS	Nuclear Speckle Patrón Moteado
Ob	Osteoblastos
OCN	Osteocalcina
OCP	Octacalcium Phosphate Fosfato Octacálcico
ONC	Osteonectina
OPN	Osteopontina
PCG (GPC)	Perichromatine Granules Gránulos Pericromatinianos
PCF (FPC)	Perichromatine Fibrils Fibras Pericromatinianas

PD	Patrón Difuso
PNC	Proteínas No Colágenas
PNM	Patrón Nuclear Moteado
pre-mARN	Ácido Ribonucléico pre-mensajero
rADN	Ácido Desoxirribonucléico Ribosomal
rARN	Ácido Ribonucléico Ribosomal
RNP	Ribonucleoproteína
RRM	RNA Recognition Motif Motivo de Reconocimiento del ARN
snRNPs	Small Nuclear Ribonucleoproteins Pequeñas Ribonucleoproteínas Nucleares
snoRNPs	Small Nucleolar Ribonucleoproteins Pequeñas Ribonucleoproteínas Nucleolares
SPARC	Secreted Protein Acid Rich in Cysteins Proteína Ácida Secretada Rica en Cisteínas
SR	Serina y Arginina

INTRODUCCIÓN

El “periodonto”, al cual se le refiere como la estructura de soporte del diente; se conforma de cuatro diferentes tejidos, dos tejidos mineralizados: cemento radicular y hueso alveolar; y dos tejidos blandos: ligamento periodontal y encía (Cho y col. 2000, Nazan y col. 2000, Sodek y col. 2000). El desarrollo de cada uno de éstos tejidos, a lo largo de la raíz del diente, involucra la expresión coordinada de diferentes líneas celulares provenientes del folículo dental. (Piche y col. 1989, Somerman y col. 1990, Lang y col. 1995, Rahime y col. 1997). Cada tejido, es resultado del flujo de expresión genética; iniciando en el núcleo celular con la formación de los pre-ARN a partir del ADN. Posteriormente, mediante la transcripción (metilación del extremo 5', *splicing* y poli-adenilación del 3') se procesa la maduración de pre-mARN a mARN y finalmente se lleva a cabo la traducción a proteínas que son exportadas fuera de la célula. (Misteli T., 2004).

El conjunto de las proteínas que se organizan de forma extracelular, conforman una matriz llamada Matriz Extracelular (ME) sirviendo como templete o plantilla; contando con las características precisas para la constitución y funcionalidad de cada tejido. En el caso del hueso alveolar y del cemento radicular que son tejidos mineralizados; implica la regulación de diversos aspectos; tanto de las características de la matriz extracelular, así como de las condiciones del medio ambiente; tales como: composición, organización, temperatura, pH, flujo de iones, etcétera. En conjunto, conforman un medio ambiente óptimo, siendo cada uno de ellos determinante para la nucleación, crecimiento y regulación (tamaño y forma) de los cristales de hidroxapatita. (Peixin Zhu y col., 2004; Bosshardt D., 2005; Carole P. y col., 2009)

Las células responsables de la biomineralización del hueso alveolar y cemento radicular son, los osteoblastos (Ob) y cementoblastos (Cm) respectivamente; los antecedentes de expresión de proteínas para éstas líneas celulares, referían hasta hace algunos años, los mismos marcadores biológicos; tales como: Colagéna tipo I (COL I y COL III) y otro grupo de proteínas no colágenas (Osteocalcina-OCN, Osteopontina-OPN, Osteonectina-ONC o SPARC, Sialoproteína Ósea-BSP, Fibronectina-FN, etc.) (Nanci y col, 1999, Hunter y col., 2010). Lo cual explica, que ambos tejidos se conforman por la misma fase inorgánica: Hidroxiapatita; sin embargo, presentan diferencias estructurales, dadas por la organización cristalina distinta, la cual es apta para la fisiología de cada tejido. Existen investigaciones enfocadas en encontrar, purificar y caracterizar marcadores biológicos entre éstos dos tipos celulares; así como determinar su participación en la mineralización de los tejidos periodontales; actualmente se han reportado dos proteínas: 1). Proteína de Adhesión del Cemento (CAP) y 2). Proteína del Cemento 1 (CEMP1); las cuales se sugieren como marcadores específicos de los cementoblastos. (Mc Allister 1990 y col., Arzate y col., *FASEB* 1992; Arzate y col., *Bone and Mineral* 1992 y col., Arzate y col. 2002).

Si la especificidad de estas dos proteínas (CAP y CEMP1), corresponde a una sola línea celular (Cm); es posible entonces, conocer éstas diferencias de expresión proteica a partir de su dinámica nuclear que es donde inicia el proceso genético y molecular (Spector y col. 1993, Spector, 2003). Es primordial determinar algunos aspectos representativos de la expresión genética; tales como: actividad transcripcional. Esto es posible analizar mediante la distribución de factores de maduración del ARN, ya que representa una parte importante de la biología celular periodontal en los diferentes tipos celulares.

Se han caracterizado diversas líneas celulares y tejidos mediante dicha distribución de factores de maduración del ARN o de splicing en núcleos interfásicos, obteniendo el “Nuclear Speckle” (NS) o como le llamaremos en lo subsiguiente, Patrón Nuclear Moteado (PNM) (Spector y col. 1990, Spector y col. 1991, Jiménez-García y col. 1993). El PNM es una estructura nuclear dinámica, dependiente de la transcripción y se interpreta como la huella fenotípica de la actividad genotípica. La conformación del PNM, se modifica de acuerdo a la distribución de las diferentes familias de proteínas encargadas de la transcripción y *splicing* para madurar los pre-mARNs. Dicha organización cambia cada que aumenta, disminuye o se detiene la actividad transcripcional (Lamond y col. 2003).

ANTECEDENTES

La biogénesis periodontal está determinada por la regulación genética, expresando proteínas que a su vez conformarán la matriz extracelular (ME). Las características en composición y organización de la ME, son determinantes para la formación de cada tejido. Los Cm y Ob, comparten marcadores moleculares similares que tienen alta afinidad por la hidroxiapatita y de esta manera mineralizan el cemento radicular y hueso alveolar. De tal forma, el estudio a nivel de núcleo celular, que es donde inicia el flujo de información genética para la mineralización, representa un aspecto importante para la investigación de la biología celular de Cm y Ob, así como la actividad transcripcional y la especificidad de proteínas (CAP y CEMP1) en los dos linajes celulares, que generan los tejidos periodontales mineralizados.

Por lo tanto, describiremos brevemente algunos conceptos, eventos celulares y procesos moleculares que anteceden el presente trabajo, de lo más general a lo más específico.

TEJIDOS PERIODONTALES MINERALIZADOS

El Hueso Alveolar: es el tejido que contiene las raíces de los órganos dentarios, por lo cual representa el soporte primario de los dientes. Constituye parte del sistema de inserción, junto con el ligamento periodontal y cemento radicular. Está sujeto a un continuo remodelamiento debido a la demanda de procesos de resorción y aposición. Está constituido por dos fases: 1) La Orgánica en un 70%; conteniendo principalmente fibras de colágena, proteínas no colágenas y agua. 2) La Inorgánica en un 30%; constituida por hidroxiapatita, presente en cristales de forma cilíndrica con diámetros de 20 a 70 Å y longitudes de 50 a 100 Å. El hueso alveolar está innervado, cuenta con irrigación sanguínea y vasos linfáticos (Sodek y col., 2000).

El Cemento Radicular: cubre las raíces de los órganos dentarios, también tiene una fase mineral de hidroxiapatita 25% y una orgánica en un 75%, de proteínas colágenas y no

colágenas; además de agua. Llega a tener un grosor en cervical de 10 a 15 μm . y en apical de 50 a 200 μm . Presenta muchas características comunes con el hueso alveolar, pero a diferencia de éste, carece de aporte sanguíneo directo, así como de inervación y drenaje linfático; además no sufre resorción pero sí se deposita durante toda la vida (Diekwisch T.G., 2001). El cemento radicular se clasifica por la presencia o ausencia de células:

-Acelular. Se encuentra en la porción coronal y media de la raíz, se insertan en él fibras extrínsecas (principalmente Fibras de Sharpey) conectándose a la lámina dura del hueso alveolar.

-Celular. El cemento celular estratificado se encuentra en el tercio apical de la raíz. Contiene fibras intrínsecas, extrínsecas y cementocitos, las cuales proveen un mecanismo de anclaje. (Nazan y col., 2000).

Anteriormente se sugería que estaba regulado de forma similar que el hueso alveolar porque expresaban las mismas proteínas (Nanci A., y col.1999). Sin embargo, CAP y CEMP1, han sido reportadas como específicas del cemento radicular, desempeñando un papel importante en la biomineralización de éste tejido.

BIOMINERALIZACIÓN

La biomineralización es definida como “El estudio de la formación, estructura y propiedades de sólidos inorgánicos depositados en sistemas biológicos” (Stephen Mann, 2001); por lo tanto, la interacción entre biomoléculas y componentes inorgánicos resulta de gran importancia. La fase orgánica es fundamental, ya que la composición y organización de las proteínas además de constituir el scaffold o plantilla para la nucleación; también, controlan el crecimiento, la regulación, la inhibición y la forma de los cristales de HA que corresponden a la fase inorgánica. La biomineralización se ve influenciada además, por aspectos bioquímicos del medio ambiente; tales como: temperatura, pH, concentración, flujo de iones, etcétera, y que en conjunto propician las condiciones para la mineralización (Orme C.A. y col., 2001).

La biomineralización es un sistema complejo, debido a que las proteínas involucradas son diversas y aunque la mayoría de ellas han sido caracterizadas, resulta insuficiente conocer completamente su dinámica e interacción; principalmente, el determinar la existencia de una alta especificidad en la interacción proteína-cristal. Dicha interacción, es la que da lugar a las diferentes organizaciones cristalinas de HA cuya fórmula es: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y propicia para la

conformación de los diferentes tejidos como: huesos, (largos, cortos, compactos, esponjosos), esmalte, dentina, cemento radicular y hueso alveolar; teniendo cada uno de ellos características y funcionalidad diferentes (Hunter G. y col., 2010).

PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA BIOMINERALIZACIÓN DE LOS TEJIDOS PERIODONTALES (CAP, CEMP1)

En la biomineralización del hueso alveolar y del cemento radicular, la organización de las proteínas que constituyen la matriz extracelular (ME) es determinante para la nucleación de HA. (Peixin Z. y col., 2004; Carole P. y col., 2009). Particularmente hablando de tejidos periodontales, hasta hace algunos años se encontraba que los Cm y los Ob expresaban las mismas proteínas; algunas de ellas enlistadas en el Esquema 1. Tales proteínas regulan la biomineralización de tejidos con fases orgánicas e inorgánicas similares, pero con propiedades y estructura diferentes.

	Ob	Cm
Sialoproteína Ósea	+	+
Osteocalcina	+	+
Osteopontina	+	+
Fosfatasa Alcalina	+	+
Colágena-I	+	+
Colágena-XII	+	+
Fibronectina	+	+
Osteonectina	+	+

Esquema 1. Lista de proteínas que expresan los Cm y Ob para la biomineralización del Cemento Radicular y Hueso Alveolar, respectivamente.

Sin embargo, se han reportado dos proteínas como marcadores específicos de los Cm, la Proteína de Adhesión al Cemento (CAP) y la Proteína del Cemento 1 (CEMP1). (Arzate y col., 1998; Saito y col., 2001; Barkana y col., 2000; Álvarez y col., 2007; Carmona y col., 2007, Villarreal y col. 2009).

CAP

Estudios realizados en 1990 hablan de la existencia de una proteína de adhesión al cemento de 56 kDa (Mc Allister y col., 1990; Saito M. y col., 2001), de la cual observaron su capacidad de unirse a superficies desmineralizadas y mineralizadas para comprobar su adherencia a la dentina, encontrando que se une específicamente a dentina mineralizada e hidroxiapatita sintética (Pitaru y col. 1992); a ésta proteína se le llamó CAP (Proteína de Adhesión al Cemento), la cual es una proteína cemento específica y que además se generó un anticuerpo monoclonal contra ésta (Arzate y col. 1992). Posteriormente se aisló una línea celular derivada de un cementoblastoma humano; esas células producen una matriz extracelular mineralizada similar al cemento, sintetizando y secretando una proteína de ~56 kDa (Arzate y col., 1992). Al comparar los cementoblastos aislados del cementoblastoma con osteoblastos de hueso alveolar, se encontraron las siguientes diferencias: 1). Los cementoblastos mineralizan estructuras esféricas y los osteoblastos en forma de placa, aun cuando su relación Ca/P es similar, 2). Los anticuerpos contra la proteína CAP reconocen a los cementoblastos; mientras que los anticuerpos contra osteopontina reconocen a los osteoblastos (Arzate y col., 1998).

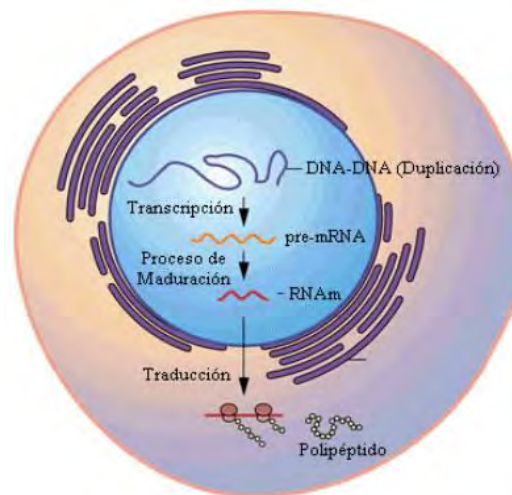
CEMP1

En trabajos posteriores, se generó un anticuerpo policlonal en conejo contra la CP de 56 kDa. La distribución de esta proteína ocurre a través de la longitud del cemento radicular, es decir, en la parte apical (zona celular) y en la porción cervical (acelular); también se distribuye en células progenitoras cementoblásticas tanto *in vivo* como *in vitro* (Arzate y col., 2002). La CP regula las características morfológicas de la matriz extracelular mineralizada depositada *in vitro*, modificando los cambios composicionales de la relación Ca/P de los cristales de hidroxiapatita. (Álvarez-Pérez y col., 2003). Estos datos en conjunto, sugieren que la CP juega un papel clave durante la mineralización de la matriz extracelular en la formación del cemento radicular. La caracterización de la CP se realizó utilizando el anticuerpo policlonal anti-CP, producido en conejo y expresado en *E. coli*, para crear una biblioteca de cDNA construida con mRNA obtenido a partir de las células derivadas del cementoblastoma humano. Los resultados de las clonas mostraron un cDNA de 1374bp llamado Proteína del Cemento 1 (CEMP1, anteriormente CP y CP-23). (Álvarez-Pérez y col., 2006); evidencias recientes sugieren que la CEMP1 juega

un papel como regulador en la diferenciación y mineralización *in vitro*, cambiando el fenotipo celular al transfectar fibroblastos gingivales humanos a un tipo de células mineralizantes, produciendo hidroxiapatita biológica. (Carmona-Rodríguez y col., 2007).

La proteína purificada a partir de cementoblastos (hrCEMP1) y sobreexpresada en fibroblastos gingivales, tiene una M_r de 50,000. La caracterización de ésta indicó que su estructura secundaria se compone principalmente de hojas beta (55%), mientras que las conformaciones al azar y alfa hélice corresponden al 35% y 10% respectivamente. Se demostró que hrCEMP1 se encuentra N-glicosilada, fosforilada y posee gran afinidad por la hidroxiapatita. También ahora se sabe que desempeña un papel importante en la biomineralización, promoviendo la nucleación y formación de cristales de fosfatos de calcio, correspondientes a fosfato octacálcico, (OCP), precursor de HA (Villarreal E., y col., 2009).

Las proteínas son resultado de una cascada de eventos genéticos a partir del ADN del cual es copiado el pre-mARN, y procesado a mARN; después éste es traducido mediante ribosomas para producir un polipéptido (proteína) y algunos de éstos son exportados para conformar matrices extracelulares. Debemos tener en cuenta que el flujo de información intracelularmente inicia en núcleo y es donde se lleva a cabo la expresión genética a partir del ADN (Esquema 2).



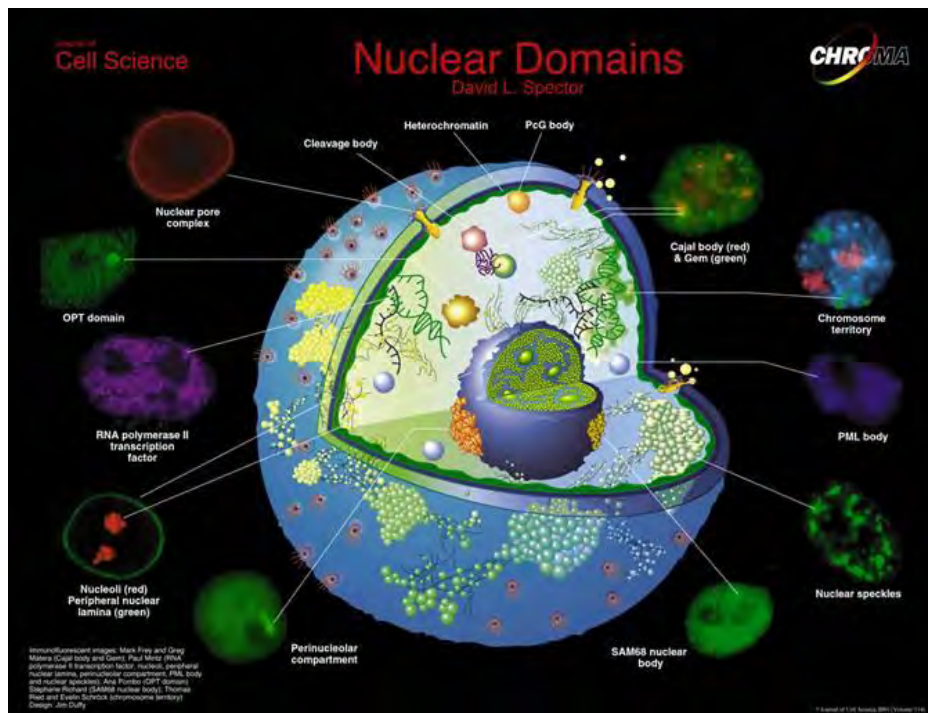
ESQUEMA 2. Flujo de Información Genética, representando la localización intracelular.

ARQUITECTURA NUCLEAR

El núcleo celular es la estructura que contiene la información genética, es altamente compartimentalizado y dinámico (Esquema 3). En los diferentes dominios del núcleo se llevan a cabo mecanismos específicos; tales como:

- Duplicación del ADN,
- Procesamiento del rARN en el nucleólo,
- Transcripción del mRNA.

Tales funciones nucleares son organizadas y coordinadas tanto espacial como temporalmente. (Spector D., y col., 2003, Stanislaw G. y col., 2005). La regulación y precisión de éstos procesos nos conducen a preguntarnos: ¿Cómo es que la función genómica se integra dentro de la arquitectura nuclear y a su vez, ésta organización estructural afecta los procesos de la expresión genética? (Misteli T., 2005). Esto precisamente ocurre en la transcripción; ya que es posible determinar la actividad transcripcional mediante el conocimiento de la distribución de los factores de transcripción en células interfásicas realizando un estudio morfológico y conformacional de las estructuras intranucleares e incluso de sus modificaciones; de esta forma obtenemos información de la dinámica celular, consecuencia de eventos moleculares.



ESQUEMA 3. Arquitectura y compartimentalización nuclear.

<http://spectorlab.cshl.edu/>

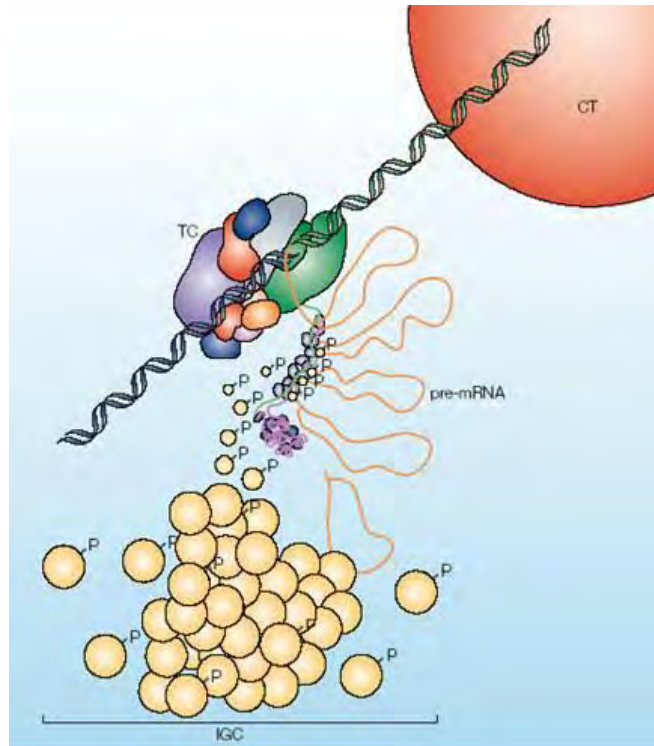
TRANSCRIPCIÓN Y FACTORES DE MADURACIÓN DEL pre-mARN.

La regulación de la expresión génica se produce en la iniciación de la transcripción; el ARN codificado a partir del ADN denominado transcrito primario (pre-mARN) no es funcional y tiene que ser procesado o madurado a mARN, para después salir al citoplasma y ser traducido a proteína (Charles N. y col., 2006). Los múltiples pasos durante la producción de ARN permiten establecer niveles de control genético; en el caso del procesamiento de los pre-mARN a mARN se llevan a cabo tres acontecimientos principales:

- 1). Adición de CAP en el extremo 5'; esto es, que al pre-mARN se agrega 7-metilguanosina, asociado con el reconocimiento de la Polimerasa II, en el dominio carboxilo terminal.
- 2). Poliadenilación en el extremo 3'; se refiere a que se añade una hilera de residuos de adenina (hasta 250), asociados con la motilidad.
- 3). *Splicing* o corte y empalme; se eliminan los intrones y se empalman los exones que son los que codificaran para una proteína (Alberts, 4ª. Edición).

El *splicing* es un proceso de transesterificación que se ejecuta en dos pasos. En el primero se cortan los sitios de unión intró-exón y en el segundo se ligan los exones; para que ocurra la reacción, se requieren factores proteicos y varios ARNs para la maduración del pre-mARN a mARN. Algunos de los principales factores de maduración, son la familia de proteínas SR, llamadas así porque son ricas en serina (S) y arginina (R), almacenándose en unas estructuras conocidas como Gránulos Intercromatinianos (GIC). Dichas proteínas interactúan y median la forma de la red proteína-intrón cruzado-exón, la cual es muy importante para la selección del sitio de corte. (Cáceres y col. 1997). Los dominios SR funcionan como activadores de *splicing* mediante la fosforilación y desfosforilación; la fosforilación mediada por cinasas y la desfosforilación por fosfatasas, como se representa en el Esquema 4 (Lamond, 2003; Misteli y col. 1998; Misteli y col. 2000).

Las proteínas SR funcionan en múltiples etapas durante el ensamble del spliceosoma, así como en el reclutamiento de las snRNPs spliceosomales y en la medición de interacciones para determinar cortes específicos en el *splicing* definiendo intrones y exones (Hastings y col., 2001).



ESQUEMA 4. Maduración de un pre-mARN. Los factores de maduración (Proteínas SR, almacenadas en los IGC)
CT-Cromatin; TC-Transcripción <http://www.lamondlab.com/>

La secuencia de las proteínas SR es:

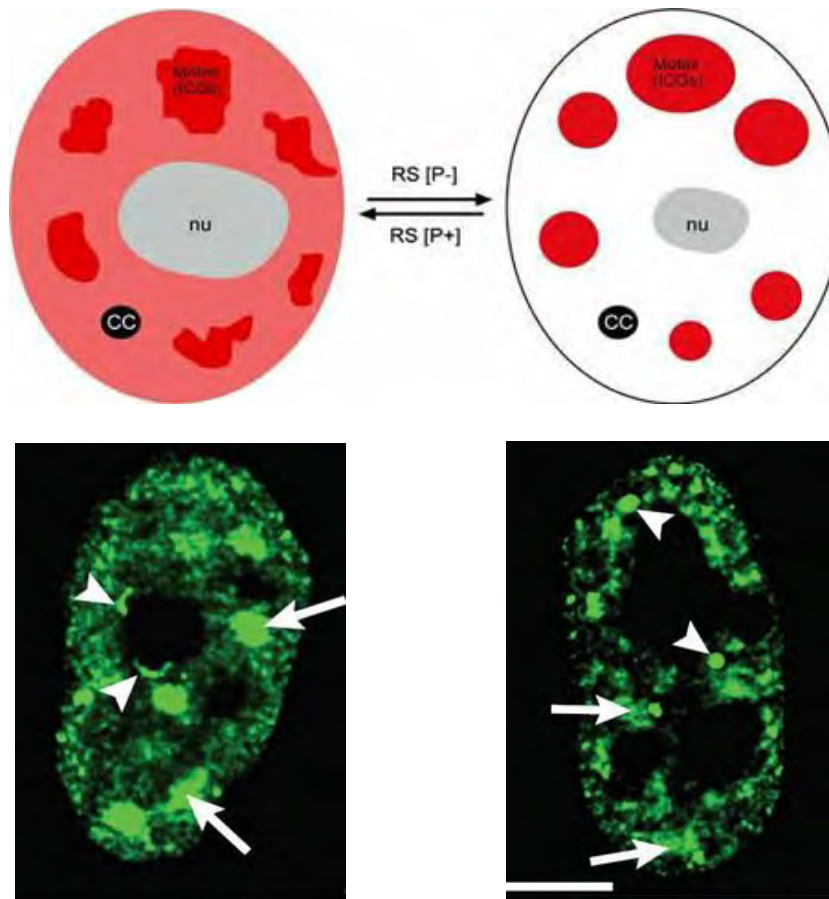
```

1  mdlsgvkkks llgvkennkk sstrapsptk rkdrsdeksk drskdkgatg essekdrgrd
61  ktrkrgsass gssstrsrss stsssgssts tgsssgssss sassrgsss tsrsssssss
121 sgspsprrr hdnrrrsrsk skppkrdeke rkrspspkp tkvhigrltr nvtkdhimei
181 fstygkikmi dmpvermhph lskgyayvef enpdeaekal khmdggqidg qeitatavla
241 pwrppprf sprrmlppp pmwrrsppm rrrsrprrr spvrrrsrp grrhrsrss
301 snssr

```

Mediante la localización celular de ésta familia de macromoléculas por medio de marcaje con anticuerpos y el uso de microscopios de fluorescencia, es posible revelar la presencia de factores de *splicing* en una distribución conocida como “Nuclear Speckle (NS)” o “Patrón Nuclear Moteado (PNM)”. El PNM es el reflejo morfológico de la actividad de transcripción y *splicing*. (Jiménez-García L.F. y col. 2007).

Las speckles o motas son estructuras dinámicas, en las cuales sus componentes proteicos continuamente participan en un ciclo entre speckles y los sitios de transcripción activa. Las modificaciones de las speckles responden a procesos de fosforilación y desfosforilación de la ARN polimerasa II y de la familia de factores de splicing (proteínas SR), variando su localización nuclear dependiente de la actividad transcripcional. (Zahler y col., 1992; Furuyama y col. 2002; Fang y col., 2004). Se conforman patrones estructurales definidos cuando hay poca actividad transcripcional; así como patrones indefinidos o morfológicamente irregulares, denominado Patrón Difuso (PD) observados cuando la célula es transcripcionalmente activa, tal y como se representa en el Esquema 5 (Jiménez-García L.F. y col., 2007; Mintz, P. y col., 2000). Esto provee un factor importante en el estudio del núcleo su organización durante la expresión genética (Mintz y col., 2000).



ESQUEMA 5. Organización del PNM, con variaciones en la morfología de las speckles, respondiendo a fosforilaciones y desfosforilaciones dependientes de la actividad transcripcional. Izquierdo, con transcripción y Derecho sin transcripción. Las inferiores son PNM en IF. (Jiménez G. y col, 2007; George T. y col., 2002)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el área odontológica, la investigación de los tejidos periodontales es un tema primordial; esto debido a que aún es necesario estudiar múltiples aspectos a nivel celular, molecular, bioquímico, etcétera; para que en el futuro, sea posible generar la opción de terapia de regeneración de tejidos. En el presente trabajo, como parte del campo de estudio de la biología periodontal, hemos decidido abundar sobre la complejidad celular de Cm y Ob; antecediendo que, ambos llevan a cabo procesos similares de expresión genética para dar lugar a la biomineralización de dos tejidos mineralizados; el Cemento radicular y Hueso Alveolar, respectivamente. Sin embargo, también hemos considerado que, estos dos tejidos, son estructural y fisiológicamente distintos.

En base a lo anteriormente mencionado, estudiamos la localización y especificidad de dos proteínas: CAP y CEMP1 que podrían ser marcadores biológicos de los Cm. De tal forma, si la expresión de estas dos proteínas es exclusiva de un tipo celular (Cm), estaría regulada genéticamente desde el núcleo celular, viéndose reflejada en la actividad transcripcional. Por lo tanto, hemos observado el dinamismo nuclear de ambas líneas celulares, específicamente mediante el análisis del procesamiento de pre-mARN a m-ARN maduro, por medio de la distribución de los factores de maduración (Familia de proteínas SR). Ésta organización intranuclear de los factores de maduración del ARN, nos conduce a conocer un aspecto de gran importancia de la arquitectura nuclear, llamado Patrón Nuclear Moteado, el PNM es una estructura dinámica que nos habla de la actividad celular de manera individual para cada línea celular.

Hemos diseñado una metodología experimental basada en Inmunofluorescencia (IF), microscopía confocal e Inmunolocalización Ultraestructural por MET, para determinar la presencia y especificidad de CAP y CEMP1; así como, la distribución de los factores de maduración del ARN mediante el análisis de los PNM, que no son conocidos en células periodontales. Asimismo, no sólo obtener el PNM, sino observar sus variaciones en diferentes condiciones; es decir, tanto en núcleos interfásicos como en mitosis. Al final, todos estos aspectos en conjunto, representan una parte de la expresión genética de Cm y Ob, contribuyendo al conocimiento de su biología celular.

OBJETIVO

Nuestro objetivo es, realizar el estudio biológico de dos líneas celulares (Cm y Ob), que dan lugar a la mineralización de los tejidos duros del periodonto (Cemento y Hueso Alveolar). Analizando principalmente dos aspectos importantes:

1). Localización celular de las proteínas CAP y CEMP1.

2). Determinar fenotípicamente la distribución de los factores de maduración del pre-mARN mediante la obtención y estudio del Patrón Nuclear Moteado. Ninguno es conocido en estas líneas celulares.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

En base a los objetivos planteados, se diseñó la siguiente metodología:

Para resolver el Objetivo 1, referente a la localización celular de las proteínas CAP y CEMP1: fue mediante el uso de anticuerpos anti-CAP y anti CEMP para realizar Inmunofluorescencia y Microscopía Confocal; así como Inmulo-localizaciones Ultraestructurales en MET, recurriendo a un segundo anticuerpo acoplado a partículas de oro.

La resolución del Objetivo 2, que consiste en determinar fenotípicamente la distribución de los factores de maduración del pre-mARN con la obtención y estudio del PNM; en primera instancia se realizó un estudio de forma general con tinciones para Núcleo (DAPI) y Nucléolo (Azul de Toluidina para RNA). Posteriormente, se hizo el análisis en inmunofluorescencia y confocal, usando el anticuerpo 3C5 para proteínas SR (Factores de Maduración del pre-mARN), y finalmente se llevó a cabo el análisis ultraestructural y de ribonucleoproteínas en MET.

1). CULTIVO CELULAR (CEMENTOBLASTOS Y OSTEÓBLASTOS)

Las líneas celulares fueron aisladas y cultivadas en el Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología. Se obtuvieron los Cm a partir de un cementoblastoma humano y los Ob de segmentos de hueso alveolar. Ambas líneas se mantuvieron incubadas con las mismas condiciones: un ambiente con 100% de humedad, a 37°C en una atmósfera con 95% de aire y 5% de CO₂, en un medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con nutrientes suplementado con SFB suero fetal bovino (10%) y una solución de antibióticos (50 µl/ml de sulfato de gentamicina y 10 µl de Antimicótico o 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina). Esto se realizó hasta que se obtuvo una línea continua y homogénea a una confluencia del 60-70 % en cada caso.

A partir de esos cultivos, se desarrollaron 2 metodologías diferentes: sembrar células en monocapa y realizar pellets o botones celulares, de acuerdo a los análisis microscópicos planeados:

- a). Sembrar células en monocapa, fue necesario para la Microscopía Óptica (Tinciones Dapi y Azul de Toluidina para RNA), Fluorescencia y Confocal.
- b). Pellets o botones celulares para Microscopía Electrónica de Transmisión.

a). Células en Monocapa.

Para llevar a cabo éste proceso se requirió todo el material estéril; para obtener las monocapas se colocaron 7 cubreobjetos horizontalmente en cada caja de petri. Las células se tripsinizaron (15 a 20 ml de tripsina) durante 5 a 7 minutos antes de sembrarlas a 37°C. Se eliminó la tripsina y se agregó nuevamente 20 ml de medio de cultivo. Finalmente, se sembraron 30 µl en cada cubreobjetos. Se incubaron durante 2 horas y posteriormente se agregó 10 ml de medio para cubrir las células. Después de estas condiciones, se incubaron a 37°C por 24 horas más antes del proceso de fijación.

b). Pellets Celulares.

Mediante un raspado manual, en un solo sentido y directo en la caja de petri se separaron las células, se colocaron en tubos ependorf. Se centrifugaron a 1200 rev/min hasta formar el pellet, se retiró el medio de cultivo y se realizaron 3 lavados con PBS de 3 minutos cada uno.

II). FIJACIÓN CELULAR.

Se llevaron a cabo tres procesos de fijación, dependiendo del procesamiento por realizar:

- a). Metanol y Acetona al 100% (para IF y MC):** Se eliminó el medio de las cajas de petri y se les agregaron 10 ml de metanol al 100%, a -20°C durante 3 minutos. Se retiró el metanol y sin enjuague intermedio, se agregaron 10 ml de acetona al 100%, a -20°C por 2 minutos. Al final se hicieron tres lavados con PBS de 10 minutos cada uno.

b).Glutaraldehído al 2.5% (para MET: Ultraestructura y Ribonucleoproteínas): se fijaron los pellets celulares con Glutaraldehído al 2.5% durante 2 horas. Finalmente se hacen 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS.

c).Paraformaldehído al 4% (para MET: Inmunolocalización Ultraestructural): la fijación fue con Paraformaldehído al 4%, también por 2 horas, se hicieron 3 lavados con PBS por 10 minutos.

III). TINCIONES

Se recurrió a dos tinciones para el estudio del Núcleo y Nucléolo.

a).DAPI. 4', 6- Diamidino-2-Fenilindole Diclorhidrato (Núcleo): Es específica para DNA. La dilución fue 1:20; usando para cada cubreobjetos 20 µl por 5 minutos. Se hizo un enjuague con buffer TBST; se realizó el montaje en portaobjetos con Vectashield, sellando con barniz, previo a la observación en microscopio.

b).Azul de toluidina para RNA .025% (Nucléolo): Esta tinción es para identificar los nucléolos. Una vez secas las monocapas celulares en los cubreobjetos; se les agregó el Azul de Toluidina para RNA en toda la superficie por 45 minutos. Al final se lavó con agua desionizada y se realizó el montaje de las muestras con resina.

IV). INMUNOFLUORESCENCIAS Y CONFOCAL.

a).Proteína CAP: Se inmulocalizó la proteína en las células en monocapa, previo se hizo un lavado con Tris 0.5M. Se utilizó anti-CAP (Arzate y col., 1992), el cual es un Ac monoclonal; a una dilución 1:20. Se incubó a 4°C toda la noche. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con buffer TBST. Posteriormente se incubó el Ac Secundario Anti-Mouse con FITC a una dilución de 1:10, a 4°C durante 1 hora sin luz en la cámara húmeda. Finalmente se hicieron 3 lavados de 10 minutos con TBST y se realizó el montaje con Vectashield sellándolo con barniz.

b).Proteína CEMP1: La metodología fue la misma que para la proteína CAP. En éste caso el anticuerpo primario es Anti-CEMP1, policlonal (Álvarez P. y col., 2006); se probaron diferentes diluciones 1:250, 1:150 y 1:50; sin embargo, se estandarizó una dilución de 1:100. El segundo anticuerpo fue Anti-Conejo IgG con FITC y se empleó a una dilución de 1:10.

c).Factores de Maduración del ARN (Familia de Proteínas SR): Las inmunofluorescencias para observar la distribución de los factores de maduración del ARN, fueron con el Anti-3C5 (Turner y col., 1987), el cual localiza la familia de proteínas SR que participan en el *splicing*. La metodología fue la misma que CAP y CEMP1, descrita previamente; con la variación que el Anti-3C5 se incubó durante 20 minutos, a una dilución 1:10 en cámara húmeda y el Anticuerpo Secundario Anti FITC 1:10.

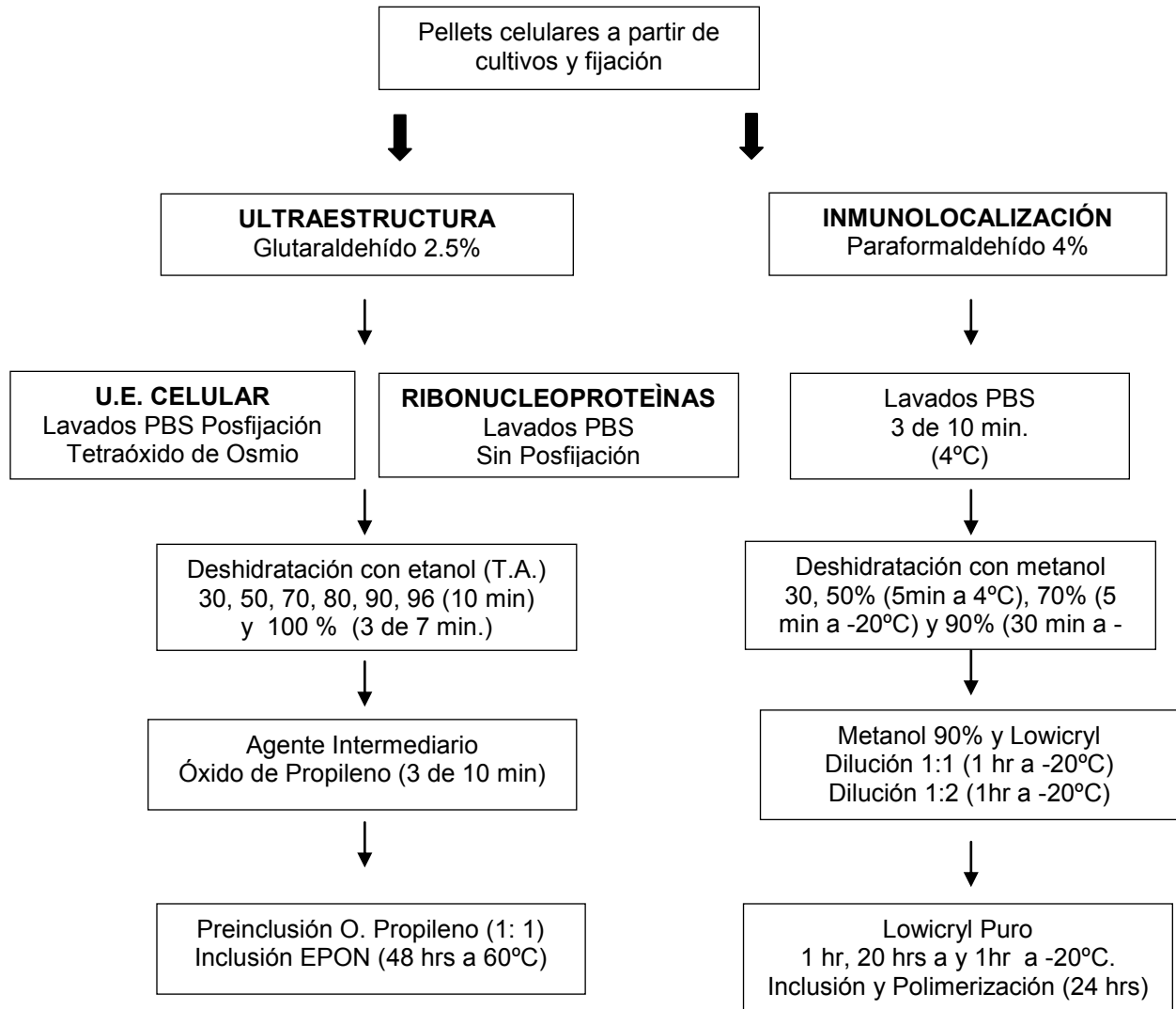
Cuando se obtuvieron los PNMs de ambas células, se decidió también obtener los PNMs pero en células tratadas con Actinomicina-D inhibiendo la transcripción; esto con la finalidad de ver los cambios en la conformación estructural. El procedimiento fue el mismo; sin embargo, al estar los cubreobjetos con las células en monocapa inmersos en el medio de cultivo, se agregó el fármaco Actinomicina D, de acuerdo a la metodología de Paul van den IJssel (Paul vd I., 2003). Esto es: Actinomicina D a una dilución de 10 µg/ml durante 4 hrs. Por lo tanto; a cada caja de petri con 10 ml de medio, se le agregaron 100 µl de la solución madre de Actinomicina D concentrada a 1mg/ml. Se dejaron por el tiempo indicado a 37°C. Posteriormente se realizaron las inmunofluorescencias llevando a cabo el mismo protocolo y se observaron en el Microscopio Confocal.

V). MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Se eligió ésta técnica para resolver 3 problemas principalmente:

- a).Inmunolocalización Ultraestructural de la CAP y CEMP1
- b).Estudio Ultraestructural del Núcleo y Nucleólo.
- c).Identificación de ribonucleoproteínas (RNPs), gránulos pericromatinianos (PCG), gránulos intercromatinianos (ICG) y fibras.

El procedimiento fue:



Después de obtener los bloques procesados, se realizó el tallado de la cara del bloque y se hicieron cortes semifinos (hasta 200 nanómetros) para visualizar en que zona hay más células; una vez ubicadas, se obtuvieron los cortes ultrafinos de 70-80 nanómetros y se montaron en rejillas.

Las rejillas se preparan previamente con un polímero, después se colocaron los cortes ultrafinos y se contrastaron de acuerdo al análisis por realizar, ya que la metodología tiene sus variantes:

a). Inmunolocalización Ultraestructural: se colocan los cortes en rejillas de níquel. Previo a la observación se tiene que observar los cortes con un contraste convencional; es decir, acetato de uranilo alcohólico 4% (10 min.), sin lavado intermedio se pasaron a uranilo acuoso 4% (10 min.), se lavaron y finalmente se dejaron en citrato de plomo 3% (10 min.) y se enjuagaron.

b). Ultraestructura: se colocan los cortes en rejillas de cobre y se contrastaron con: acetato de uranilo alcohólico 4% (10 min.); sin lavado intermedio se pasaron a uranilo acuoso 4% (10 min.), se lavaron y finalmente se agregó citrato de plomo 3% (10 min.) y se enjuagaron.

c). Ribonucleoproteínas: se observaron en rejillas de cobre y se realizó la técnica con Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); esto es; primero en uranilo acuoso 4% (3 min.), se lavaron y se agregó EDTA (18 min.), se enjuagaron, se agregó citrato de plomo 3% (1 min.) y finalmente se lavaron.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MORFOLOGÍA NUCLEAR Y NUCLEOLAR

Para la completa comprensión de la arquitectura nuclear y de los procesos genéticos que se llevan a cabo en los Cm y Ob, es necesario conocer en general la morfología de estas dos líneas celulares, así como del núcleo y los nucléolos. En la Figura 1 se pueden observar las dimensiones nucleares mediante DAPI. Los cementoblastos tienen en promedio un núcleo de $17\mu\text{m}$ y los osteoblastos entre $10\mu\text{m}$ aproximadamente. El núcleo de los Cm muestra diferentes contrastes; lo cual asociamos los conceptos de la arquitectura nuclear que define Misteli en el 2005, que ese aspecto heterogéneo se debe a la presencia de diferentes compartimentos, (Misteli, T., 2005) en cambio los núcleos de los Ob muestran homogeneidad.

Esto representa en principio una característica diferencial entre Cm y Ob; y tal como lo han mencionado algunos autores, respecto a que los detalles fenotípicos de las estructuras nucleares están relacionados a las propiedades funcionales y a los organelos subnucleares que hacen que se observe un núcleo heterogéneo, identificándose la presencia de algunas estructuras de importancia, como los nucléolos. (Korie, H. y col., 2006).

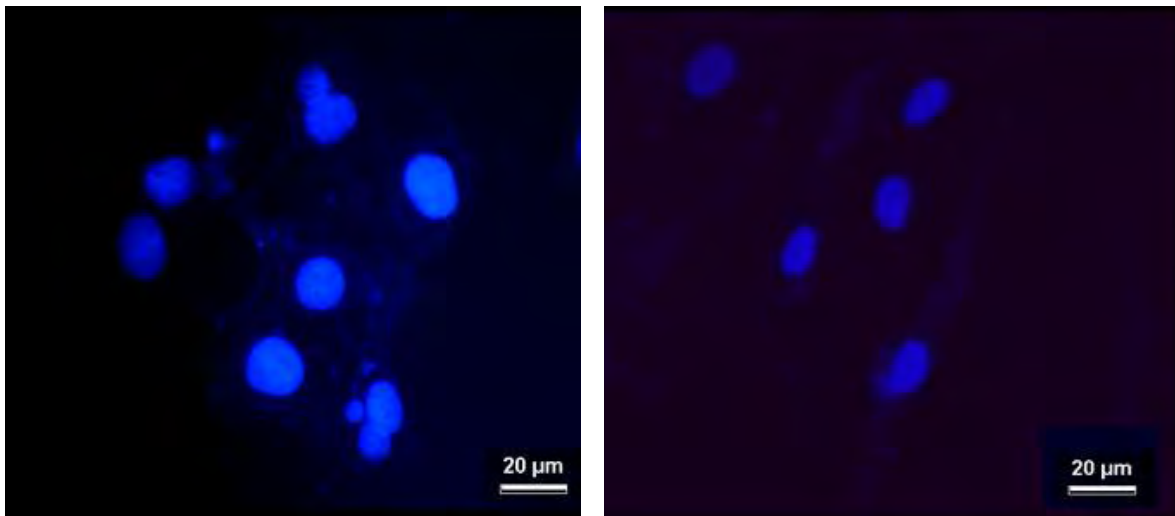


FIGURA 1. Reconocimiento e identificación de la morfología nuclear (DNA) con Tinción DAPI, mediante Microscopía Fotónica a 40X. Imagen Izquierda Cm y Derecha Ob. Nótese que en los núcleos de los Cm se perciben más heterogéneos que los de los Ob.

El nucléolo se consideró en este estudio debido a que tiene como función primordial la biogénesis de los ribosomas, los cuales traducirán a proteína un ARN mensajero (Yun W. L. y col., 2005). Es una estructura dinámica y su actividad representa también parte de la expresión genética, principalmente porque se conforma de cúmulos de genes de ADN ribosomal (rADN) y lleva a cabo transcripción mediante la ARN polimerasa I. (Jiménez García y col., 1994). Fue posible identificar los nucléolos a través de la tinción Azul de Toluidina para RNA y logramos determinar algunos aspectos relevantes, tales como que en los Cm el número de nucléolos varía, desde uno hasta tres; sin embargo, los Ob en promedio tienen uno y como máximo dos, como se muestra en la Figura 2.

La diferencia resulta significativa, porque además del ensamble ribosomal, algunos autores han descrito evidencias de que el nucléolo tiene funciones adicionales. Por ejemplo, en el 2007 se publicó que el nucléolo participa en la regulación en la mitosis, la progresión del ciclo celular y la proliferación (Francois M. B. y col., 2007). De tal forma, que analizando los resultados y las diferencias en el número de nucléolos, sugieren que los Cm, no solo tienen un núcleo más activo, sino que también pudieran estarse dividiendo con mayor frecuencia que los Ob. Finalmente es importante mencionar que la morfología está determinada por la función y por la regulación celular a diferentes niveles (Cremer T. y col., 2006).

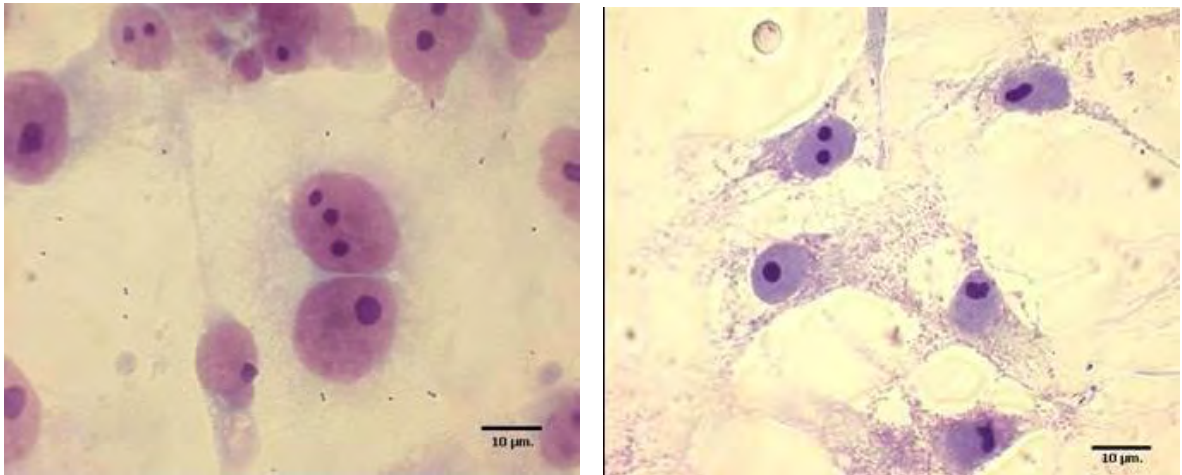


FIGURA 2. Morfología nucleolar (rDNA) con Azul de Toluidina para RNA, en Microscopia Fotónica a 40X. Imagen Izquierda Cm y Derecha Ob. Nótese que en los Cm hay presencia hasta 3 nucléolos a diferencia de los Ob que en su mayoría es uno.

INMUNOLocalIZACIÓN DE CAP Y CEMP1

Entre los Cm y los Ob hay una regulación y expresión genética distinta; y como parte fundamental de éste mecanismo, está involucrada la expresión de proteínas. Tomando en cuenta los antecedentes de las proteínas: la CAP y la CEMP1 como específicas de los Cm (Arzate H. y col., 2002; Carmona B. y col., 2007), y con posibilidad de emplearlos como marcadores moleculares, ya que hasta hace algunos años se reportaba que estas dos líneas celulares expresaban las mismas proteínas. Por lo tanto, uno de los objetivos fue inmunolocalizar CAP y CEMP1 por IF y MET en los linajes celulares.

CAP

Los resultados de inmunofluorescencia para CAP se presentan en la Figura 3, la cual muestra del lado izquierdo a los Cm localizándose la proteína, principalmente en el citoplasma y del lado derecho el resultado es negativa en Ob.

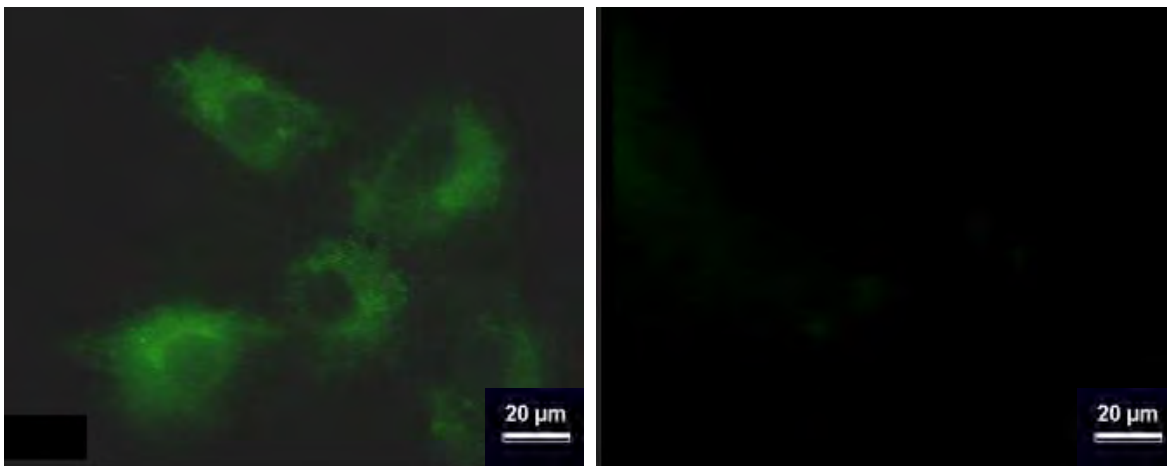


FIGURA 3. Imágenes de Fluorescencia con Ac para CAP, la cual fue positiva en Cementoblastos (Lado Izquierdo), observándose en citoplasma. En Osteoblastos (Derecha) no se obtuvo señal.

Realizamos observaciones en MET para determinar la localización de CAP, dentro de algún organelo en particular; ya que en Fluorescencia se observa de forma general en el citoplasma. Para resolver esto recurrimos a la inmunolocalización ultraestructural con partículas de oro acopladas a un segundo Ac y los resultados demostraron que CAP está presente de forma generalizada en el citoplasma y no concentrada en algún organelo. En la figura 4, se observan

2 imágenes tomadas de diferentes zonas del citoplasma de los Cm, en las cuales existen partículas de oro que se localizan donde está presente la proteína CAP.

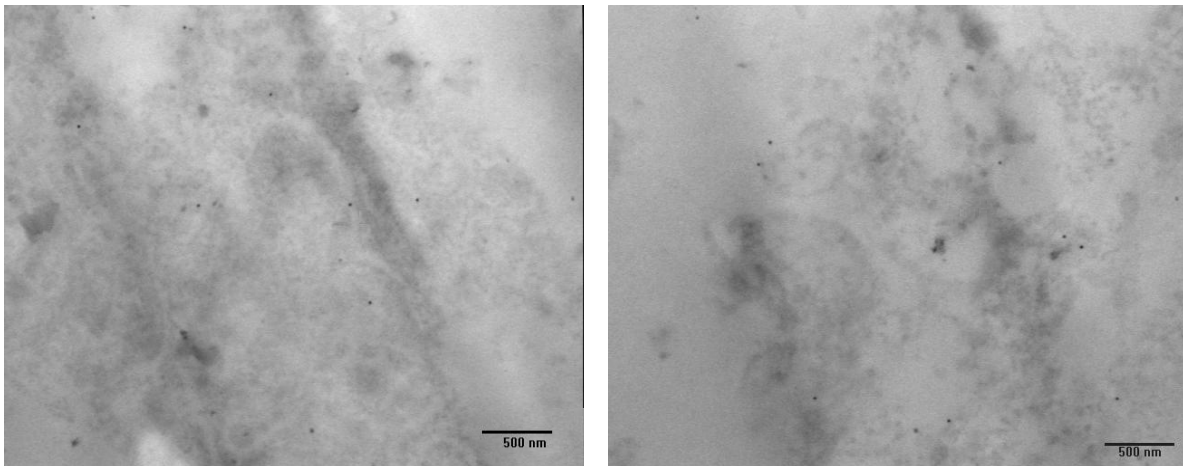


FIGURA 4. Inmunolocalización Ultraestructural en Cm, en las cuales se identifican dos zonas citoplasmáticas; En ambas se observan partículas de oro que demuestran la presencia de CAP. La Imagen Izquierda es citoplasma cerca del núcleo y la Derecha una zona de citoplasma en un extremo celular.

Las evidencias en IF y MET, confirmaron que CAP es una proteína específica de los Cm, como había sido reportado previamente (Arzate H. y col., 2000); pero además nuestros resultados sugieren que CAP es una proteína citoplasmática, lo cual permite relacionarla con otras PNC, como la OCN y la OPN que desempeñan un papel importante en la formación de la matriz del cemento (Handa K. y col., 2002). La actividad biológica de ésta proteína, que no sólo promueve la adhesión sino que en conjunto con otras proteínas de matriz, permite la mineralización del cemento radicular (Saito y col., 2001), se refleja en la localización celular que hemos mostrado. Por otra parte, CAP al ser cemento-específica y por lo tanto; un marcador proteico importante, provee múltiples factores para la proliferación y diferenciación, aunque no estén completamente determinados (Kitagawa M. y col., 2006). El conocer los mecanismos proteicos de la mineralización de los tejidos periodontales y parte de la biología celular de los Cm y los Ob, como es el caso de ésta investigación, es con la finalidad de que en un futuro, se genere la posibilidad de una regeneración periodontal.

CEMP1

Las IF con el Anti-CEMP en Cm y Ob se presentan en la Figura 5, donde es posible observar que CEMP1 se encuentra altamente expresada en los Cm, localizándose en núcleo; sin

embargo, se observa una señal menor en citoplasma. La IF resultó negativa para las poblaciones de los Ob.

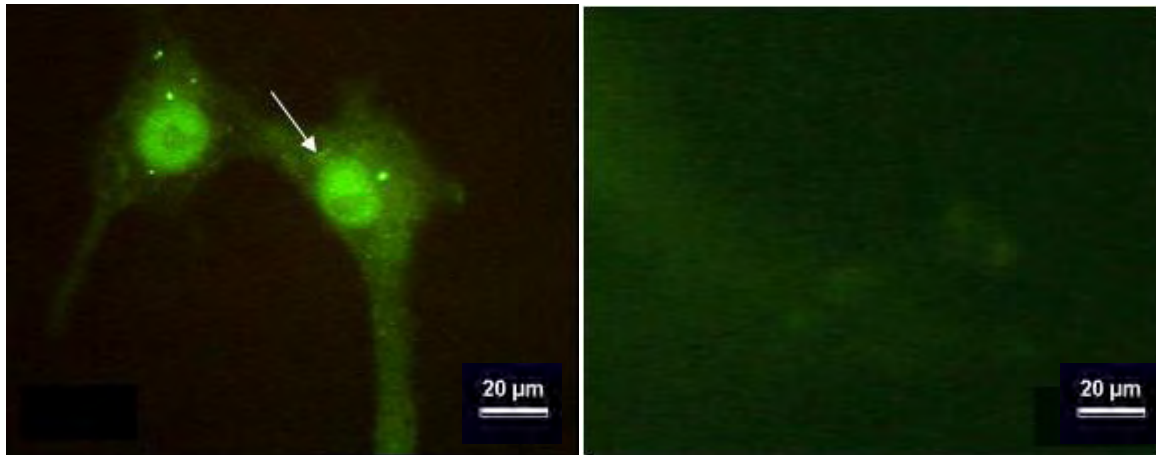


FIGURA 5. Imágenes de Fluorescencia con Anti-CEMP1. En Cm (Izquierda), localizándose en núcleo principalmente; aunque una señal menor está presente en citoplasma. En Ob (Derecha) no se obtuvo señal.

Realizamos MET en los Cm, y con Inmunolocalizaciones Ultraestructurales elucidar si CEMP1 está presente en núcleo y/o en citoplasma, mediante el acoplamiento de partículas de oro al Ac. Los resultados obtenidos evidencian señal tanto en citoplasma, (imagen del lado izquierdo) como en núcleo (imagen del lado derecho), de la Figura 6.

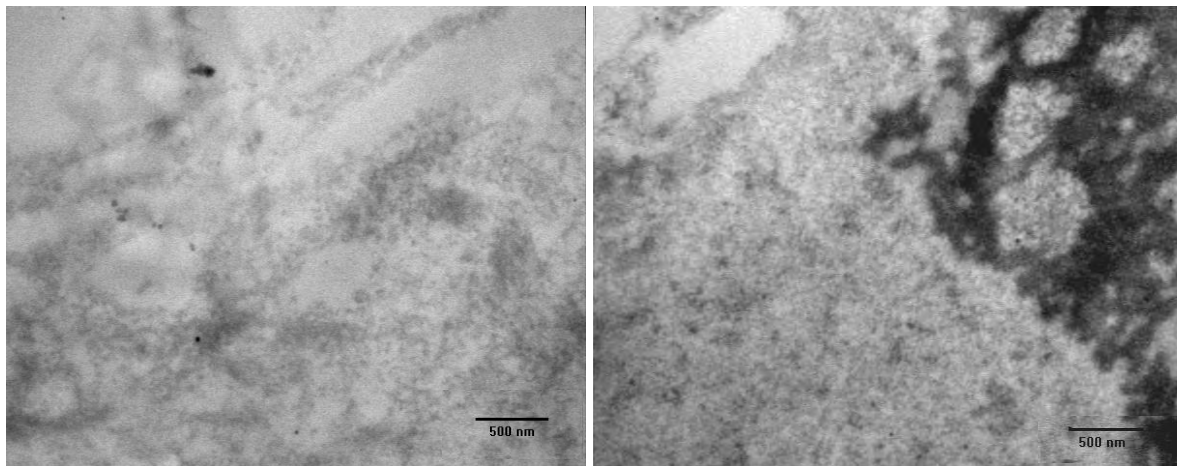


FIGURA 6. Inmunolocalización Ultraestructural en Cm. Izquierda, señal de CEMP1 en citoplasma. Derecha señal en núcleo cerca del nucléolo.

Los resultados confirmaron que la CEMP1 es específica de los Cm; y aunque teóricamente es una proteína nuclear (GenBank Acc. No. NM_001048212; HGNC: ID 32553) (Álvarez P. y col, 2006), la hemos inmunolocalizado *In Situ*, también en citoplasma, con lo cual podemos sugerir que es una proteína con mecanismos diferentes a la vía de secreción clásica; es decir, que son

independientes del Retículo Endoplásmico y del Golgi, esto lo vuelve un sistema más complejo; aunque ya se han buscado nuevas estrategias experimentales para estudiar la secreción de algunas de éstas proteínas. (Nickel W. 2003 y Nickel, 2005). Esto implica una gran importancia biológica, porque la CEMP1 finalmente es secretada y conforma parte del matriz extracelular dando lugar a la proliferación y adhesión celular (Álvarez P. y col., 2003). Asimismo se han reportado otras funciones en la mineralización; tales como que CEMP1 tiene la capacidad de modificar células a un tipo mineralizante (Carmona R. y col, 2007); también se ha demostrado que promueve la nucleación de fosfato octacálcico (OCP), precursor de hidroxiapatia (HA) y está implicada en la regulación y morfología de los cristales (Villarreal R. y col., 2009).

PATRÓN NUCLEAR MOTEADO EN Cm y Ob.

La obtención de los PNM en cada población celular se muestra en la Figura 7, en imágenes de Inmunofluorescencias con Anti-3C5; del lado superior izquierdo, núcleos de Cm y del lado superior derecho núcleos de Ob; conforme a la literatura, estas dos líneas celulares derivadas del periodonto humano, se comportan como otras células eucariontes e incluso tejidos, reportadas anteriormente con características individuales, por lo cual el PNM representa una huella genotípica (George T. y col., 2002). Sin embargo, analizando nuestros resultados se determinaron diferencias para cada línea celular, en cantidad y morfología de las speckles o motas. En los Cm (imagen izquierda) se aprecia mayor número de speckles y algunas de ellas de forma irregular, el PNM de la derecha corresponde a los Ob y se observan speckles definidas y no son muy abundantes. Se ha investigado ampliamente la relación entre la forma de las speckles y la distribución de los factores de *splicing*; como consecuencia de la actividad genética, representada en el PNM (Jackson D., 2003; Jiménez G. LF. y col., 2007). Entonces al conocer la organización de los factores de maduración del ARN (familia de proteínas SR) nos habla de la transcripción que se lleva a cabo en de cada línea celular. Por lo tanto, al analizar los PNM de cada población, podemos sugerir que los Cm, tienen una mayor actividad comparada con los Ob, esto se evidencia al observar cierta irregularidad de las speckles e incluso muestra un patrón difuso más intenso (Imágenes inferiores de la Figura 7).

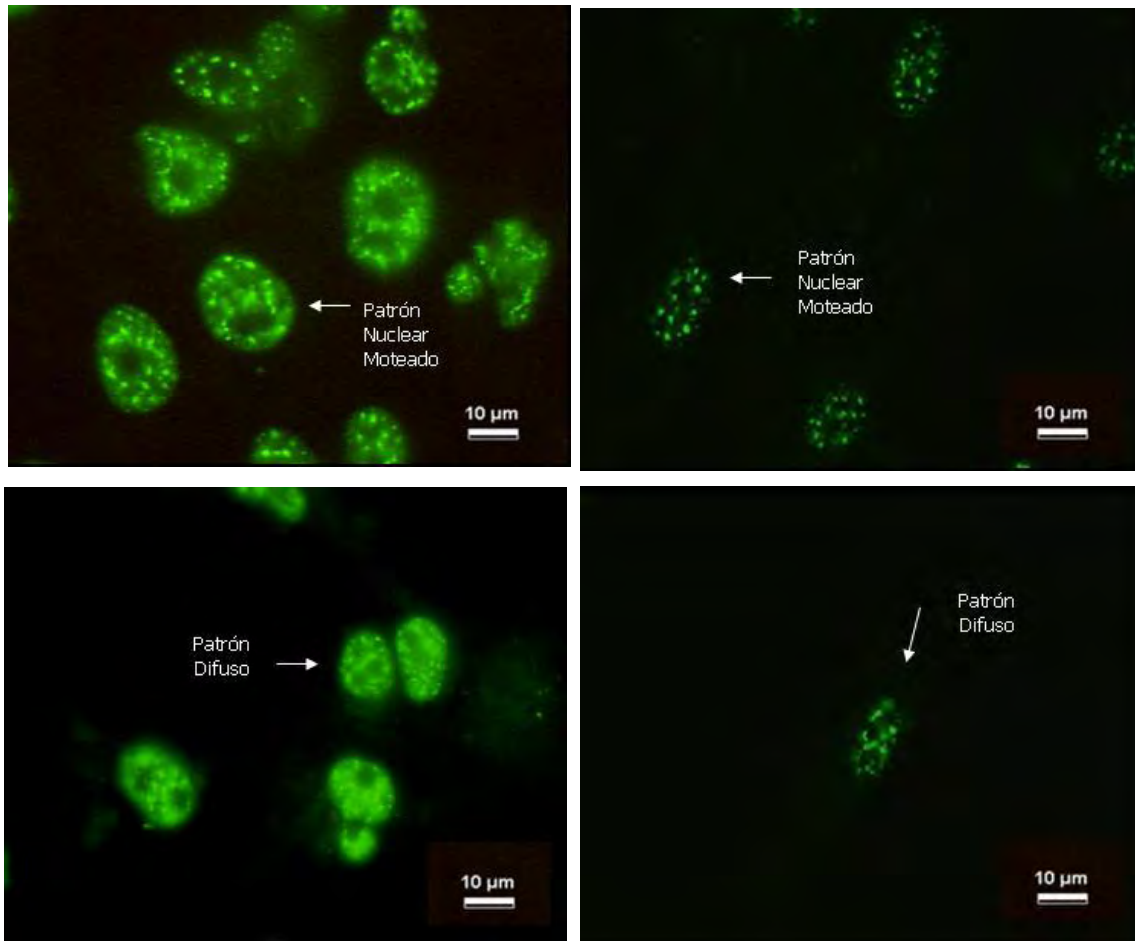


FIGURA 7. Patrón Nuclear Moteado mediante imágenes de Fluorescencia con el Anticuerpo 3C5. Núcleo de los Cm, mostrando un PNM irregular y el Patrón Difuso en las imágenes del lado izquierdo. Núcleo de los Ob del lado derecho, con un PNM regular y el P. Difuso poco intenso.

La estructura de los PNMs nos permite comprender acerca de mecanismos complejos como el *splicing* y la transcripción representados en la arquitectura nuclear de cada línea celular (Jurica M. y col., 2002); de esta manera, analizamos las diferencias observadas entre Cm y Ob, las cuales sugieren estar relacionadas principalmente a dos aspectos:

-El primero de ellos a tomar en cuenta para explicar las diferencias en la actividad transcripcional, es considerar como un factor importante el origen de las poblaciones de Cm; los cuales son derivados de un cementoblastoma. El cementoblastoma se define como una neoplasia, resultado de un proceso de proliferación anormal del cemento radicular, dando lugar a un tumor; es catalogado por la OMS (Organización Mundial de la Salud) dentro de los Tumores Benignos Odontogénicos Ecto-mesenquimáticos, incluyendo o no epitelio odontogénico. Por lo tanto, asociamos que la transcripción sea mayor debido a que, tal y como

se ha reportado en otros padecimientos humanos estudiados a nivel molecular; está ocurriendo una modificación de los factores de splicing, y como consecuencia esto propicia el origen de algunas enfermedades. (Hastings y col., 2001; Nuno y col., 2003). De manera específica, Kirschbaum-Slager, ha estudiado factores de *splicing* expresados en tumores y ha encontrado que hay una asociación entre el *splicing alternativo* de algunos genes, con los diferentes estados de tumorigénesis (Kirschbaum-Slager y col., 2004). Ésta modulación genética se ve aún más afectada en el caso de que los tumores sean malignos; basándose en evidencias a nivel celular que demuestran modificaciones en la organización de la cromatina y molecularmente se ha descrito una conexión entre *splicing* y cáncer durante la transcripción (Davie J. y col; 1999; Srebrow y col., 2006). Uno de los factores de *splicing* más estudiados es el SF2/ASF, encontrándose en el cromosoma 17 y de aproximadamente 30 kDa, perteneciendo a la familia de proteínas SR (Anchang y col., 2007; Stickeler y col., 1999); la sobreexpresión de éstos factores se ha detectado en células de osteosarcoma (Daubie y col., 2007) y en algunos tumores cancerígenos, así como en carcinoma renal papilar (Skalsky y col., 2001).

-El segundo aspecto lo relacionamos con la especificidad de CAP y CEMP1 en Cm; por lo cual podríamos sugerir que su transcripción es mayor que los Ob que no expresan éstas proteínas; y que por tal motivo los patrones nucleares de los Cm se visualizan con mayor actividad génica. Sin embargo, fisiológicamente cada tejido se está formando constitutivamente; el cemento se está depositando durante toda la vida formando anillos concéntricos alrededor de la raíz y el hueso alveolar respondiendo a procesos de resorción y remodelación (Cho y col., 2000; Sodek y col., 2000).

Con los resultados anteriores podemos describir generalmente la expresión genética en ambas líneas celulares, de forma individual. Para profundizar en la ultraestructura de los factores de transcripción recurrimos a la técnica para RNPs, pudimos observar una compartimentalización conformada por diferentes estructuras subnucleares, en Cm y en Ob. En Cm (imágenes de la izquierda Figura 8), se aprecian los Cúmulos de Gránulos Pericromatinianos (PCG) que se localizan cerca de la membrana nuclear y miden entre 30 y 50 nm. de diámetro, cuya función principal es almacenar ARNs y RNPs principalmente; estando en equilibrio entre la síntesis de ARN mensajero y su salida al citoplasma; por lo tanto, el tamaño de éstas partículas podría estar relacionado al tamaño de diferentes genes (Spector D., 1990), esto explica que se observen de distintos en los Ob (Figura 8, Imagen superior derecha).

En ambas líneas celulares, se comprobó que la morfología de las speckles está determinada por la distribución de los factores de maduración (proteínas SR) que se organizan en Cúmulos de Gránulos Intercromatinianos (ICG), denominados así por su tamaño que es entre 20 y 25 nm (Lamond A. y col., 2003). La forma irregular de algunas de ellas se debe a que están interconectados por fibras que en IF, es lo que se aprecia como un patrón difuso y que en conjunto conforman una maquinaria de *splicing* para la transcripción (Cremer T. y col., 2001). En los Ob también se observan los ICG (Figura 8, imágenes del lado derecho); sin embargo, se observan tal y como Mintz describe a las speckles con poca actividad transcripcional; esto es, esféricos y definidos. No hay presencia de fibras que denoten heterogeneidad, por lo cual se asocia éste tipo de PNM con células con poca actividad genética (Mintz P. J. y col., 2000).

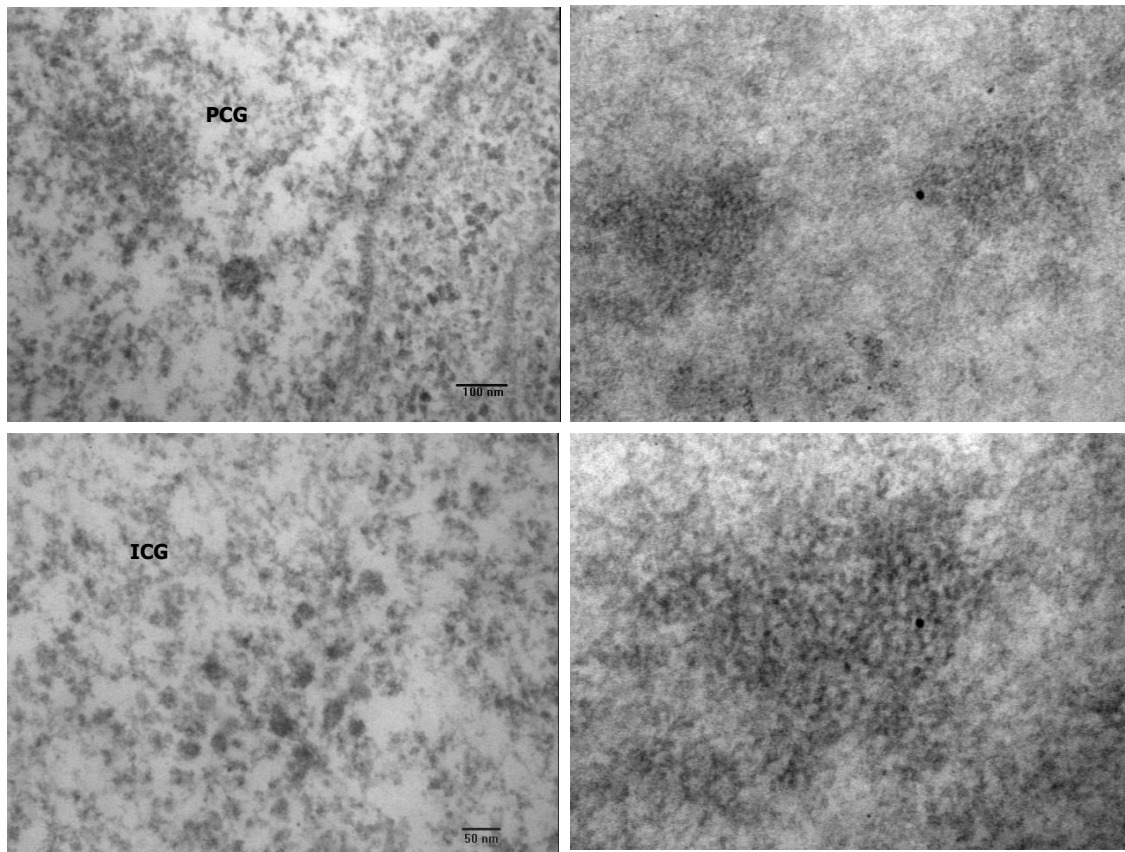


FIGURA 8. Imágenes de MET con la técnica para RNP. Cm, del lado izquierdo y Ob, lado derecho. Las superiores corresponden a Gránulos Pericromatinianos (PCG) Barra: 100 nm. y los inferiores a Gránulos Intercromatinianos (ICG). Barra: 50 nm.

FACTORES DE MADURACIÓN EN INACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL.

Se decidió hacer un estudio complementario inhibiendo la transcripción con Actinomicina D (Paul vd I., 2003; Sobell H., 1985); las imágenes evidencian las variaciones con y sin actividad transcripcional en el PNM de Cm y Ob. Otro dato relevante es son mayor número de motas observadas en los Cm que en Ob. Después de adicionar el fármaco las speckles se muestran esféricas y sin fibras alrededor en ambas poblaciones. Estudios previos realizados en hepatocitos de rata, células bronquiales, epitelio intestinal y útero, también observaron variaciones en la forma de las speckles que en inicio eran redondeadas; pero después de modificar la transcripción experimentalmente por acción hormonal, obtuvieron después speckles de forma irregular. (George T. y col., 2002). Esto se debe a que la función específica de las proteínas SR, es que por acción de fosforilaciones y desfosforilaciones, se unen a motivos de reconocimiento de ARN (RRM) indispensable para el ensamble del splicesosoma (Krämer, 1996; Dye B. y col., 2001). Con éstos resultados podemos concluir que, los factores de maduración del ARN cuando se para la transcripción, se almacenan y se mantienen en cúmulos; mientras que en actividad están migrando a los sitios de transcripción.

Estas observaciones se realizaron en Microscopía Confocal, para identificar a diferentes planos la presencia de speckles. Los resultados se presentan en la figura 9.

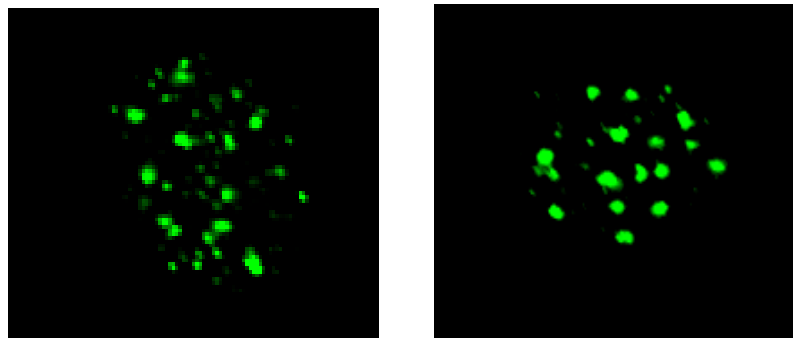


FIGURA 9. Imágenes de M. Confocal con Anti-3C5, se muestra el PNM después de inhibir la transcripción con Actinomicina D. Cm, del lado izquierdo y Ob, lado derecho.

Por último, otro proceso que involucra inactividad transcripcional, es cuando la célula entra en mitosis; cuando esto sucede, las speckles que se encuentran en el nucleoplasma se disgregan durante todas las fases de la división celular (Turner B.M., 1987). En la figura 10, es evidente que en la profase, metafase y anafase no se observa un PNM, tal y como cuando está en Interfase. Sin embargo, en la telofase se observa la iniciación de la redistribución en la cual empiezan a conformarse nuevamente las speckles, por la transcripción y *splicing* que esta reiniciando.

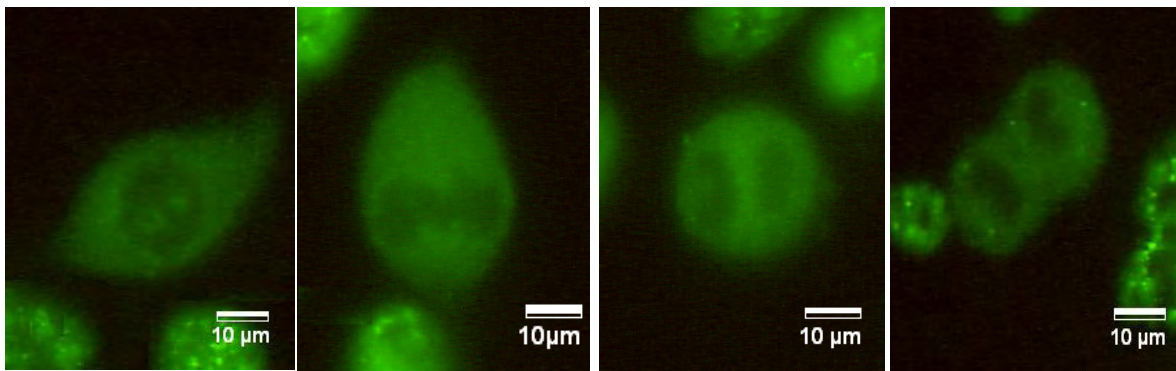


FIGURA 10. Imágenes de Fluorescencia con el Anticuerpo 3C5. Núcleo de los Cm durante las diferentes fases de la Mitosis en las cuales se disgrega el PNM, reorganizándose nuevamente en la telofase iniciando la transcripción y el *splicing*.

Tanto la inhibición de la transcripción como en la mitosis, representan dos evidencias experimentales para entender la relación entre estructura y función; ya que al observar los diferentes compartimentos subnucleares de forma activa, como es el caso de los Cm y los Ob en Interfase, son estructuras mucho más complejas que cuando no hay transcripción, ya sea inhibida por fármacos o en mitosis. Esto es precisamente lo que Misteli reporta, que cuando hay una alta complejidad funcional, sugiere una alta complejidad morfológica (Misteli T., 2000) y viceversa. Esto nos ayuda a entender parte de la biología de éstas dos poblaciones celulares mineralizantes; y de cómo los procesos de expresión génica y/o proteica (en éste caso relacionados con CAP y CEMP1) son organizados entre el espacio nuclear y como se relaciona con la arquitectura (Dundr M. y col., 2001).

CONCLUSIÓN

La integración de nuestros resultados, nos permiten concluir que en los Cm y en los Ob se llevan a cabo diferentes procesos genéticos, todos dentro de un sistema estructural nuclear, característico y específico para cada población celular. Asimismo pudimos determinar a través de análisis fenotípicos, cómo son coordinados eventos genotípicos espacial y temporalmente.

En detalle nos referimos a que, mediante el análisis del PNM de cada línea celular tenemos conocimiento de la distribución de los factores de maduración del ARN; por lo tanto de la transcripción y expresión proteica. Las evidencias sugieren que los Cm tienen una alta actividad transcripcional comparada con los Ob; lo cual asociamos tanto al origen de los Cm (cementoblastoma) y que esto sea causa de una sobreexpresión y por supuesto a la cemento-especificidad de CAP y CEMP1 que desempeñan un papel importante en la mineralización del cemento radicular.

Ultraestructuralmente resolvimos la complejidad de las speckles en Cm y Ob, identificamos que se organizan en cúmulos de gránulos correspondientes a los GIC y fibras, las cuales carecen de membranas y por ésta razón, los compartimentos son altamente dinámicos. También analizamos las variaciones morfológicas del PNM, que responde a fosforilaciones y desfosforilaciones requeridas en el splicing, así como en la inhibición de la transcripción y durante la división celular, comprobando que la arquitectura nuclear afecta la expresión genética y viceversa.

A pesar de que han sido previamente descritos los diversos procesos de la expresión celular; con el presente estudio, damos a conocer las generalidades de cómo funciona en dos poblaciones celulares, los Cm y los Ob que son de gran importancia para la mineralización de los tejidos periodontales. Nuestras aportaciones, se integran a una gran línea de investigación; colaborando en una pequeña parte de la biología celular, para que en un futuro se pueda llevar a cabo una regeneración periodontal.

BIBLIOGRAFÍA

Alberts. **Molecular Biology of The Cell**. Cuarta Edición. 2005

Anchang Hu and Xiang-Dong Fu. **Splicing Oncogenes**. *Nature Structural and Molecular Biology* Vol. 14 (3) , 2007

Arzate H, Olson S., Page R., Gown A. and Narayan S. **Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum**. *FASEB Journal* 6, 2990-2995. 1992

Arzate H, Olson S., Page R., and Narayanan **Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in culture**. *Bone and Mineral* 18; 15-30. 1992

Arzate H., Alvarez-Pérez M.A, Aguilar Mendoza ME, Alvarez-Fregoso O. **Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells *in vitro***. *J. Periodontal Res.* Vol. 33 (5): 249-258. 1998

Arzate H., M.A. Álvarez-Pérez, O. Álvarez-Fregoso, A. Wusterhaus-Chávez, J. Reyes-Gasga and L.A. Ximénez-Fyvie. **Electron Microscopy, Micro-analysis and X-ray Diffraction Characterization of Mineral-like Tissue deposited by Human Cementum Tumor-derived Cells**. *Journal of Dental Res.* 79 (1) Jan Págs. 28-34 2000

Arzate H., LF Jiménez-García, M.A, Alvarez-Pérez et al. **Immunolocalization of Human Cementoblastoma-conditioned Medium-derived Protein**. *J. Dental Res.* Vol. 81 (8): 541-546. 2002.

Álvarez-Pérez Marco A., Sandu Pitaru, O. Álvarez-Fregoso, J. Reyes-Gasga and H. Arzate. **Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line**. *Journal of Structural Biology* 143: 1-13. 2003

Álvarez-Pérez Marco A., Narayanan Sampath, Zeichner-David Margarita, Rodríguez-Carmona B. and Arzate H. **Molecular cloning, expresión and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23)**. *Bone* 38, 409-419. 2006

Barkana I., Narayanan A. S., Grosskop, Savion N. and Pitaru S. **Cementum Attachment Protein Enriches Putative Cementoblastic Populations on Root Surfaces *in vitro***. *Journal Dent. Res.* 79 (7), 1482-1488, 2000

Bosshardt D.D. **Are cementoblast a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype?**. *Journal of Dental Research*. Vol.84 No. 5 Págs. 390-406. 2005

Cáceres J.F. and Krainer A. **Mammalian pre-mRNA splicing factors.** In: **Eucariotyc mRNA Processing.** *Frontiers in Molecular Biology IRL Press* 174-212. 1997

Carmona Rodríguez B., Álvarez Pérez M.A., Narayanan A.S., Zeichner-David M., Reyes-Gasga J., Molina-Guarneros J., García-Hernández A.L., Suárez-Franco J.L., Gil-Chavarría I., Villarreal-Ramírez E., Arzate H. **Human Cementum Protein 1 induces expresión of bone and cementum proteins by human gingival fibroblast.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358, 763-769. 2007

Carole C. Perry. **From biominerals to biomaterials: the role of biomolecule-mineral interactions.** *Biochemical Society Transactions, Vol. 37 Part 4,* 2009

Charles N. Cole and John J. Scarcelli. **Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm.** *Current Opinion in Cell Biology* 18 Págs. 299-306, 2006

Cho and Philips R. Garant. **Development and general structure of the periodontum.** *Periodontology 2000 Vol. 24:* 9-27. 2000

Cremer T. And C. Cremer. **Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells.** *Nature Reviews, Genetics. Vol. 2 Págs. 292-301* 2001

Cremer Thomas, Marion Cremer, Steffen Dietzel, Stefan Müller, Irina Solovei and Stanislav Fakan. **Chromosome territories – a functional nuclear landscape.** *Current Opinion in Cell Biology* 18 Págs. 307-316. 2006.

Daubie Valéry, Roberto De Decker, Charles Nicaise and Roland Pochet. **Osteosarcoma cell-calcium signalling through tissue factor-factor VIIa complex and factor Xa.** *Federation of European Biochemical Societies* 581, Págs. 2611-2615, 2007

Davie J. R., Samuel S. K., Spencer V. A., Holth L. T., Chadee D. N., Peltier C. P., Sun J. M., Chen H. Y. and Wright J. A. **Organization of chromatin in cancer cells: role of signaling pathways.** *Biochemistry and Cell Biology* 74 (4) Págs. 265-275, 1999

Diekwisch Thomas G.H. **Developmental Biology of Cementum.** *Int.J. Dev. Biol.* 45 Págs. 695-706 2001.

Dundr Miroslav and Tom Misteli. **Functional architecture in the cell nucleus.** *Biochemical J. Vol.356 Págs. 297-310;* 2001

Dye Billy T. and Patton James G. **An RNA Recognition Motif (RRM) is required for the localization of PTB-Associated Splicing Factor (PSF) to subnuclear speckles.** *Experimental Cell Research* 263, Págs. 131-144 2001

Fang Y., Stephen Hearn and David L.Spector. **Tissue-specific expression and dynamic organization of SR Splicing Factors in *Arabidopsis*.** *Molecular Biology of the Cell* Vol. 15: 2664-2673. 2004

François-Michel Boisvert, Silvana van Koningsbruggen, Joaquín Navascués and Angus I. Lamond. **The multifunctional nucleolus.** *Nature Reviews | Molecular Cell Biology* volume 8 | july 2007

Furuyama S., J. P. Bruzik. **Multiple roles of SR in *trans* splicing.** *Molecular and Cellular Biology*, Aug. 5337-5346. 2002

George-Téllez R., M.L. Segura-Valdez, L. González-Santos, L.F. Jiménez-García. **Cellular organization of pre-mRNA splicing factors in several tissues. Changes in the uterus by hormone action.** *Biology of the Cell* 94 Págs. 99-108; 2002.

Handa K., Saito M., Yamauchi M., Kiyono T., Sato S., Teranaka T. and Sampath Narayanan. **Cementum Matrix Formation In Vivo by Cultured Dental Follicle Cells.** *Bone* Vol.31 No.5 Págs. 606-611, 2002

Hastings M. L. and Adrian R. Krainer. **Pre-mRNA splicing in the new millennium.** *Current Opinion in Cell Biology* Vol. 13 Págs. 302-309, 2001

Hastings M.L. and Kariner AR. **Pre m-RNA splicing in the new millennium.** *Curr. Opinion Cell Biology* 13, 302-309. 2001

Hunter Graeme K., Jason O. Young, Bernad Grohe, Mikko Karttunen and Harvey A. Goldberg. **The flexible polyelectrolyte hypothesis of protein - Biomineral interaction.** *In Press*, DOI: 10.1021/1a100401. 2010.

Jackson Dean A. **The principles of nuclear structures.** *Chromosome Research* 11 Págs. 387-401 2003

Jiménez-García Luis F. and David L. Spector. **In Vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism.** *Cell* 73 April Págs. 47-59; 1993.

Jiménez-García L.F., ML Segura-Valdez et al. **Nucleogénesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis.** *Molecular Biology of the Cell* Vol. 5 (9): 995-966 1994

Jiménez-García L.F., Lara-Martínez R., Gil-Chavarría I., Zamora-Cura A.L., Salcedo-Álvarez M., Agredano-Moreno L.T., Moncayo-Sahagún J. de J., Segura-Valdéz M. de L. **Biología Celular del Splicing.** *Mensaje Bioquímico* Vol. XXXI Fac. Medicina, UNAM 141-156. 2007

Jurica Melissa S. and Melissa J. Moore. **Capturing splicing complexes to study structure and mechanism.** *Methods* 28 Págs. 336-345 2002

Kitagawa Masae , Hidetoshi Tahara, Shoji Kitagawa, Hiroko Oka, Yasusei Kudo, Sunao Sato, Ikuko Ogawa, Mutsumi Miyaichi and Takashi Takata. **Characterization of established cementoblast-like cell lines from human cementum-lining cells In Vitro and In Vivo.** *Bone* 39(5):1035-1042 2006

Kirschbaum-Slager, Natanja; Lopes Graziela, Galante Pedro, Riggins Gregory and Souza Sandro. **Splicing factors are differentially expressed in tumors.** *Genetics and Molecular Research* 3 (4) Págs. 512-520, 2004

Korie E. Handwerger and Joseph G. Gall. **Subnuclear organelles: new insights into form and function.** *Trends in Cell Biology* Vol. 16 (1) January Págs. 19-26; 2006.

Krämer Angela. **The structure and functions of proteins involved in mammalian pre-mARN splicing.** *Annual Reviews Biochem* 65 Págs. 367-409, 1999

Lamond Angus and David L. Spector. **Nuclear Speckles: A Model for Nuclear Organelles.** *Nature Reviews/Molecular Cell Biology* Vol. 4: 605-612. 2003.

Lang et al. **Formation of Differentiated tissues *in vivo* by Periodontal Cells populations Cultured *in vitro*.** *J. Dent. Res.* 74 (5): 1219-1225. 1995

Mc Allister, Narayanan S., Miki Y. and Page RC. **Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum.** *J. Periodontal Res.* 25, 99-105. 1990

Mintz Paul, D. I. Spector. **Compartmentalization of RNA processing factors within Nuclear Speckles.** *Journal of Structural Biology* 129: 241-251. 2000

Misteli Tom, Cáceres JF., Clement JQ, Krainer AR., Wilkinson MF and Spector DL. **Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription *in vivo*.** *J. Cell Biology* 143 (2) 297-307. 1998

Misteli Tom. **Cell biology transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function.** *Journal of Cell Science* 113 May Págs. 1841-1849; 2000.

Misteli Tom. **The flow of gene expression.** *Nature Structural and Molecular Biology* *Nature Structural and Molecular Biology* Vol. 11 No. 3 Págs. 202-205, 2004

Misteli Tom. **Concepts in nuclear architecture.** *Bio Essays* 27 Págs. 477-487; 2005.

Nanci Antonio. **Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density.** *J. Struct. Biol.* 126, 256-269, 1999

Nazan E. Saygin, William V, et al. **Molecular and cell biology of cementum.** *Periodontology* 2000 Vol. 24: 73-89. 2000

Nickel Walter. **The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes.** *Eur. J. Biochem.*, 270 Págs. 2109-2119 2003

Nickel Walter. **Unconventional Secretory Routes: Direct Protein Export Across the Plasma Membrane of Mammalian Cells.** *Traffic 6* Págs. 607-614 2005

Nuno André Faustino and Thomas A. Cooper. **Pre-mRNA splicing and human disease.** *Genes and Development* 17, Págs. 419-437, 2003

Orme C.A., A. Noy, A. Wierzbicki, M. T. McBride, M. Grantam, H.H. Tengs, P.M. Dove and J. J. Yoreo. **Formation of chiral morphologies through selective binding of amino acids to calcite surface steps.** *Nature*, Vol 411, 2001.

Paul van den Ijssel , Robert Wheelock, Alan Prescott, Paul Russel and Roy A. Quinlan. **Nuclear Speckle localisation of the small heat shock protein $\alpha\beta$ -crystallin and its inhibition by the R120G cardiomyopathy-linked mutation.** *Experimental Cell Research* 287 Págs. 249-261. 2003

Peixin Zhu, Yoshitake Masuda and Kunihiro Koumoto. **The effect of surface charge on hydroxyapatite nucleation.** *Biomaterials* 25, 3915-3921, 2004

Piche JE, D.L. Carnes and D.T. Graves. **Initial characterization of cells derived from Human Periodontia.** *Journal Dental Research* 68 (5): 761-767. 1989

Pitaru S., N. Savion, H. Hekmati, S. Olson and S.A. Narayanan. **Binding of a cementum attachment protein to extracellular matrix components and to dental surfaces.** *Journal Periodont. Research* 27 Págs. 640-646 1992

Rahime M. Nohutcu, Laurie K. McCauley et al. **Expression of extracellular matrix proteins in human periodontal ligament cells during mineralization *in vitro*.** *J. Periodontology* Vol. 68 (4): 320-327. 1997

Saito M., Iwase M., Maslan S., Nozaki N., Yamauchi M., Handa K., Takahashi O., Sato S., Kawase T., Teranaka T. And Narayanan S. **Expression of Cementum-derived Attachment Protein in Bovine Tooth Germ During Cementogenesis.** *Bone*, Vol. 29 No. 3 Págs. 242-248 2001

Skalsky Y.M., Ajuh P. M., Parker C., Lamond A. I., Goodwin G. and Cooper C. S. **PRCC, the commonest TFE3 fusion partner in papillary renal carcinoma is associated with pre-mRNA splicing factors.** *Oncogene* 20, Págs. 178-187, 2001

Sobell Henry M. **Actinomycin and DNA transcription.** *Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 82* Págs.5328-5331, 1985

Sodek & Marc D. McKee. **Moleccullar and cellular biology of alveolar bone.** *Periodontology* 2000 Vol. 24: 99-126. 2000

Somerman, M.F. Young, et al. **Characteristics of Human Periodontal Ligament Cells *In Vitro*.** *Archs. Oral Biology* Vol. 35 (3): 241-247. 1990

Spector David L. **Higher order nuclear organization: Three-dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Cell Biology* Vol. 87 Págs. 147-151. January 1990

Spector David L., Xiang-Dong Fu and Tom Maniatis. **Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus.** *The EMBO Journal* Vol. 10 No. 11 Págs. 3467-3481 1991.

Spector D.L., O'Keefe RT, LF Jiménez-García. **Dynamics of transcription and pre-mRNA splicing within the mammalian cell nucleus.** *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.* 58:799-805. 1993

Spector D.L. **The dynamics of chromosome organization and gene regulation.** *Annual Reviews Biochem.* 72: 573-608. 2003.

Srebrow Anabella and Kornblihtt Alberto R. **The connection between splicing and cancer.** *Journal of Cell Science* 119 (13) Págs. 2635-2641, 2006

Stanislaw Gorski and Tom Misteli. **Systems biology in the cell nucleus.** *Journal of Cell Science* 118 Págs. 4083-4092; 2005.

Stephen Mann. **Biom mineralization. Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry.** School of Chemistry, University of Bristol, Bristol U.K., Oxford University Press, 2001

Stickeler Elmar, Frances Kittrell, Daniel Medina and Susan M. Berget. **Stage-specific changes in SR splicing factors and alternative splicing in mammary tumorigenesis.** *Oncogene* 18, Págs. 3574-3582, 1999

Turner B.M. and L. Franchi. **Identification of protein antigens associated with the nuclear matrix and with clusters of interchromatin granules in both interphase and mitotic cells.** *Journal of Cell Science* 87, Págs. 269-282. 1987

Villarreal-Ramírez, Eduardo, Moreno-C. A., Mas-Oliva J., Chávez-P. J.L., Narayanan S., Gil-Chavarría Ivet, Zeichner David M. and Arzate Higinio. **Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): Primary role in biom mineralization.** *Biochemical and Biophysical Res. Communications* 384. Págs. 49-54 23 April, 2009

Yun Wah Lam, Laura Trinkle-Mulcahy and Angus I. Lamond. **The nucleolus.** *Journal of Cell Science* 118 Págs. 1335-1337; 2005.

Zahler, WS Lane, JA Stolk and MB Roth. **SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors.** *Genes & Development* Vol. 6: 837-847 1992

Ivet Gil-Chavarría

Publicaciones: Período 2006-2010, correspondientes al Doctorado Avanzado relacionadas con el campo de Estudios de “BIOLOGÍA BUCAL”.

2006 Ivet Gil-Chavarría, Ramiro García-García y José Reyes-Gasga. **Comportamiento Estructural en la Unión Esmalte-Dentina en Dientes Humanos: Un Modelo Mecánico Funcional.** *Acta Microscópica Vol. 15 No. 1 Págs. 34-47, 2006*

2007 Luis Felipe Jiménez-García, Reyna Lara M., **Ivet Gil-Chavarría**, Alma Zamora C., Martha Salcedo-A., Lourdes Agredano-M., José de J. Moncayo S. y Lourdes Segura-Valdez. **Biología Celular del Splicing.** *Mensaje Bioquímico, Facultad de Medicina UNAM Vol. XXXI Págs. 141-156, 2007*

2007 Bruno Carmona-R., Marco Antonio Álvarez-P., A. S. Narayanan, Margarita Zeichner-D., José Reyes-G., Juan Molina-G., Ana Lilia García-H., José L. Suárez-F., **Ivet Gil-Chavarría**, Eduardo Villarreal-Ramírez and Higinio Arzate. **Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblast.** *Biochemical and Biophysical Research Communications 358 Págs. 763-769 2007.*

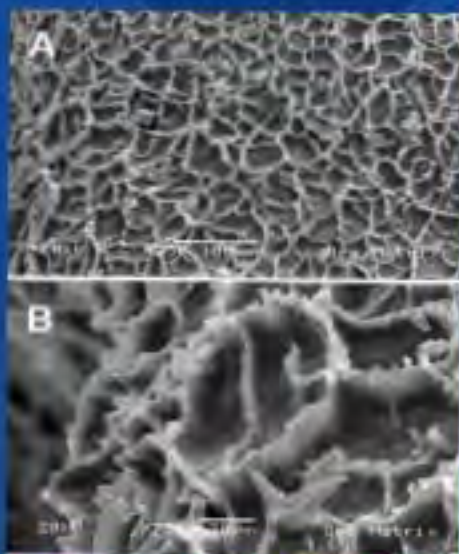
2008 José Reyes-Gasga, Georgina Carbajal, Etienne Bres, **Ivet Gil-Chavarría**, Ana Rodríguez-H., and Ramiro García-García. **STEM-HAADF electron microscopy analysis of the central dark line defect of human tooth enamel crystallites.** *Journal of Material Science: Materials in Medicine Vol. 19 No. 2, Pags. 877-882 , 2008*

2008 José Reyes-G., Ramiro García-García, M. J. Arellano-Jiménez, Elson Sánchez-Pastenes, G.E. Tiznado-Orozco, **Ivet Gil-Chavarría** and G. Gómez-Gasga. **Structural and thermal behaviour of human tooth and three synthetic hydroxyapatites from 20 to 600° C.** *Journal of Physics D. Applied Physics. 41 Octubre, 2008*

2009 Eduardo Villarreal-Ramírez, A. Moreno-Cárcamo, J. Mas-Oliva, J. L. Chávez-Pacheco, A. Sampath Narayanan, **Ivet Gil-Chavarría**, M. Zeichner David and Higinio Arzate. **Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): Primary role in biomineralization.** *Biochemical and Biophysical Res. Communications 384. Págs. 49-54 23 April, 2009*

ACTA MICROSCOPICA

ISSN: 0798 - 4545



Superficie de la dentina donde se observa la red que conforma la unión esmalte-dentina

Surface of dentin, showing the net conforming the dentin-enamel junction

L. Gil-Cherantó, R. García-García, J. Reyes-Gasga

COMPORTAMIENTO ESTRUCTURAL DE LA UNIÓN ESMALTE- DENTINA EN DIENTES HUMANOS: UN MODELO MECANICO-FUNCIONAL.

Ivet Gil-Chavarría¹, Ramiro García-García², José Reyes-Gasga²

¹División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología UNAM.

²Lab. Nuevos Materiales. Depto. Materia Condensada. Instituto de Física UNAM
Apartado Postal 20-364, 01000 México D.F., México. Tel: 5622 50 13, Fax: 5622 50 11
ivetgil@gmail.com, jreyes@fisica.unam.mx

Recibido el 22 de Febrero de 2007. Aprobado el 20 de Julio de 2007

Publicado en línea el 18 de Septiembre de 2007.

RESUMEN

Los órganos dentarios son sistemas constituidos principalmente por dentina y esmalte. La dentina es el tejido que conforma la mayor parte del diente el cual está cubierto en la porción de la corona por el esmalte, lo que les permite llevar a cabo el trabajo mecánico-fisiológico tal como la masticación. A pesar que ambos tejidos tienen la misma matriz inorgánica (Hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), éstos presentan variaciones durante su mineralización las cuales se manifiestan en diferencias estructurales significativas, produciendo túbulos en el caso de la dentina y prismas en el esmalte. De aquí que es de gran interés conocer, identificar y entender el mecanismo que mantiene unidos a estos dos tejidos. En este trabajo la zona de unión, la cual se denomina como Unión Amelodentinaria o Unión Esmalte-Dentina (UED), fue analizada por Microscopía de Luz (ML), por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y por Espectroscopía de Rayos-X (DRX) en dientes humanos. Esto nos permitió identificar el material que está presente en la UED, su composición química y su organización. Los resultados demuestran que la UED está constituida por material orgánico con una apariencia reticular la cual presenta proyecciones orgánicas y prolongaciones que emergen de la dentina hacia los espacios interprismáticos y abarcan a un grupo de prismas del esmalte. Se propone un modelo que esquematiza el diseño biológico de la UED.

Palabras Clave: Unión Esmalte-Dentina, Estructura, Microscopía Electrónica, Modelo Mecánico-Funcional.

ABSTRACT

Dental organs are systems composed by dentin and enamel mainly. Dentin is the mayor tissue component of tooth and enamel and covers the portion of the dental crown. This arrangement allows the teeth to carry out mechanical- physiological work such as chew. Although both tissues have the same organic matrix (Hydroxyapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), they exhibit variations during their mineralization processes which causes significant structural differences, producing a tubular zone in dentin and prismatic in enamel. Therefore, it is very interested to know, identify and understand the mechanism by which these two important tissues keep together. In this work the union zone, which is called amelodentinal junction or dentin-enamel junction (UED), was analyzed by light microscopy (ML), Scanning Electron Microscopy (SEM), Transmission Electron Microscopy (TEM) and X-Ray Spectroscopy in human tooth. The results gave us the composition and organization of material in the UED. A structure of organic material with reticular semblance with projections and prolongations coming from the dentin toward to inter-prismatic enamel space surrounding a set of enamel prisms. It is suggested a model to schematize the biological design of UED.

INTRODUCCIÓN

La Unión Amelodentinaria o Unión Esmalte-Dentina (UED) cuenta con una organización estructural propia para el trabajo que realiza el diente. Para entender su conformación hay que tomar en cuenta los procesos biológicos que se llevan a cabo para su formación, así como responder a preguntas tales como: ¿qué es el esmalte?, ¿qué es la dentina?, ¿con qué y cómo permanecen unidos en la pieza dental?.

A la fecha, la UED sigue siendo un tema de discusión, incluyendo la forma de definirla. Ten Cate (1) describe a la UED como una zona festoneada, al igual que Doukoudakis (2). Sin embargo, en publicaciones recientes, Marshall (3), reporta que “la UED es una estructura pobremente definida” y Gallagher (4) menciona que “La UED es una interfase crítica de dos tejidos duros”.

Las características más evidentes de los dos tejidos que conforman la UED son los siguientes. El esmalte, es el tejido externo que cubre la corona del diente, se forma por acción de la mineralización de la matriz orgánica producida por los ameloblastos. Los ameloblastos son células de origen epitelial que pierden su actividad después de finalizar la mineralización del esmalte, quedando constituido por el 96% de material inorgánico y solo 4% de material orgánico y agua. Su unidad estructural son los prismas, los cuales miden en promedio de 4 a 8 micrómetros. El esmalte presenta un grosor mayor en oclusal, principalmente en las cúspides, y se adelgaza hacia cervical. Sus características físicas son de translucidez y de impermeabilidad, además de que se le reconoce como el tejido con mayor dureza del cuerpo humano. La dentina es el tejido que constituye casi en su totalidad la estructura dental. Es un tejido mineralizado; sin embargo, la matriz proteica que induce este proceso es secretada por células mesenquimatosas llamadas odontoblastos. A diferencia de las células del esmalte, la actividad celular de los odontoblastos continúa mientras el órgano dentario tenga vitalidad pulpar. Cuenta con un 70% de material inorgánico y un 30% de sustancia orgánica y agua. Su unidad estructural son los túbulos dentinarios, los cuales contienen procesos odontoblásticos o remanentes de fluidos orgánicos. Se han descrito diferentes tipos de dentina dependiendo de su ubicación: la dentina coronaria, que está cercana a la UED y la radicular. Por su actividad fisiológica se clasifica en intertubular, peritubular y de reparación.

La UED surge durante la formación de la dentina y el esmalte; aunque se considera que desde antes de la formación de los dos tejidos involucrados “existe interacción celular entre las células de origen epitelial (ameloblastos) y las de origen mesenquimatoso (odontoblastos) mediante las fibras de Von Korff”, como lo describe Jones (5). Para la formación de los cristales se requiere del proceso denominado Biogénesis Mineral. Sin embargo Veis (6) describe dos variantes de dicho

proceso: La “Mineralización biológicamente inducida”, en el cual el cristal puede asumir orientaciones al azar así como una variedad de tamaños y la “Mineralización mediada por matriz (o matriz controlada)”, donde se genera un cristal único bien definido y orientado”. Por las características de los cristales presentes en los tejidos ya maduros, estos dos procesos de mineralización, corresponden el primero a la dentina y el segundo al esmalte. Así que ambos tejidos requieren una base orgánica para la formación de la hidroxiapatita. La matriz orgánica del esmalte está constituida según Veerappan (7) por “60% de proteínas y 40% de lípidos, donde los lípidos se identificaron en los espacios interprismáticos”. Respecto a las proteínas, la más abundante en el esmalte es la amelogenina, aunque también está la enamulina y tuftelina; pero “no hay colágena” según Ragazzoni (8). En la dentina predomina la colágena tipo I, la cual provee el soporte físico y el medio favorable para el depósito mineral (9), y otras proteínas no colágenas como la sialoproteína dentina y fosfoproteína dentina (10), además de glicoproteínas y proteoglicanos (11).

ordier (12) describe la mineralización de la matriz orgánica para el esmalte como para la dentina en la siguiente forma. “Los primeros dos pasos incluyen los procesos iniciales de nucleación y la formación de partículas de tamaño nanométrico, los cuales darán lugar a la formación del cristal. Estos procesos comprenden la nucleación heterogénea de fosfato de calcio inorgánico y de una matriz orgánica extracelular, regulados en ambos tejidos por esa matriz y expresiones celulares”. Todos estos procesos biológicos se centran en la relación entre los cristales de esmalte y dentina y en la función de las matrices orgánicas para la formación de la UED, debido a que desde la amelogénesis y dentinogénesis hay una interacción en la interfase dada por las fibras de Von Korff (13). Por lo tanto, la composición y la organización estructural que presenta la UED es el resultado de los procesos biológicos que se llevan a cabo durante la formación del diente; su

composición estructural debe corresponder a restos de la matriz orgánica necesaria para mineralizar los tejidos inorgánicos.

En este trabajo analizamos estructural y químicamente la zona de la UED por Microscopia de Luz (ML), por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) y por Microscopia Electrónica de Transmisión (MET) en dientes humanos. También se realizó el análisis por Difracción de Rayos X (DRX). Los resultados demuestran que la UED está constituido por material orgánico el cual forma un arreglo complejo con una apariencia reticular y presenta prolongaciones que emergen de la dentina hacia el esmalte y “abrazan” a un grupo de prismas del esmalte. Se propone un modelo que esquematiza la estructura de la UED.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en dientes humanos sin caries y sin fracturas coronarias, en su mayoría terceros molares retenidos y premolares, con extracción indicada para tratamiento de ortodoncia, tanto superiores como inferiores, los dientes eran de sujetos con edades comprendidas entre 18 y 35 años. Las intervenciones se realizaron en la clínica de Cirugía Maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología UNAM.

La preparación de la muestra se realizó de acuerdo a los protocolos del laboratorio de Nuevos Materiales. Para las muestras de ML se realizaron cortes de dientes en las regiones oclusal, medio o cervical, tanto en sentido longitudinal como en sentido transversal, y se seleccionaron únicamente donde estuviera presente la UED. Las muestras fueron pulidas a espejo y grabadas con ácido fosfórico al 37%, y se lavaron con agua destilada. El equipo usado fue un microscopio de luz de la marca Zeiss, modelo Axiotech, y un microscopio invertido Zeiss, modelo Axiovert 25. Para las muestras de MEB y MET, los dientes se incluyeron en resina-acrítica,

se hicieron los cortes antes mencionados y fueron pulidos a espejo.

Los siguientes pasos varían dependiendo si eran muestras para microscopia de barrido o de transmisión. En el caso de MEB, las muestras se montaron en el porta-muestras con cinta de carbón, se grabaron con ácido fosfórico y se recubrieron con una película de oro. Se usó el microscopio Jeol 5200 para su observación el cual cuenta con EDS de la marca Noran. Las muestras de MET fueron adelgazadas hasta 100 micras, después se formó una concavidad hasta adelgazar la zona más profunda en 20 micras aproximadamente y finalmente se erosionaron mediante iones de argón para perforar la zona más delgada. Se montaron en una rejilla de cobre y se recubrieron con una película delgada de carbón. Se usó el Microscopio Jeol 100CX (IFUNAM). Debido a que por el procesamiento de la muestra se eliminaba el material de la unión, éste se modificó empleando el proceso de fijación por glutaraldehído al 2.5%, con un pH entre 7.3 y 7.4, inmediatamente después de la extracción. Ya con la conservación de la estructura, se emplearon métodos físicos (separación mecánica) y químicos (ácido nítrico 5%) para la eliminación del esmalte y exponer la UED sobre la superficie de la dentina. Para el análisis por DRX, las muestras se trituraron hasta formar polvo, para obtener todas las orientaciones de los cristales de esmalte y dentina. El polvo obtenido fue tamizado con un tamiz de 325 mesh y analizados. Para este análisis se usó el Difractómetro de Rayos X Bruker, modelo D8-Advanced.

RESULTADOS

La figura 1 muestra la imagen de ML de la UED, en la cual se observa la zona festoneada y los penachos del esmalte.

Las características estructurales del esmalte (fig. 2) y la dentina (fig. 3) fueron observadas con mayor detalle por MEB en donde se identifican los prismas del esmalte y los túbulos dentinarios. En el espacio interprismático se

encuentra distribuido el material orgánico. Los túbulos dentinarios alojan en su interior a las prolongaciones de los odontoblastos (células formadoras de la dentina). Estos se presentan como orificios en las imágenes en sentido transversal y como prolongaciones en sentido longitudinal.



Fig. 1. Imagen de la zona de la UED. Note la forma festonada que presenta, se observan los penachos del esmalte y las líneas que corresponden a los túbulos de la dentina.

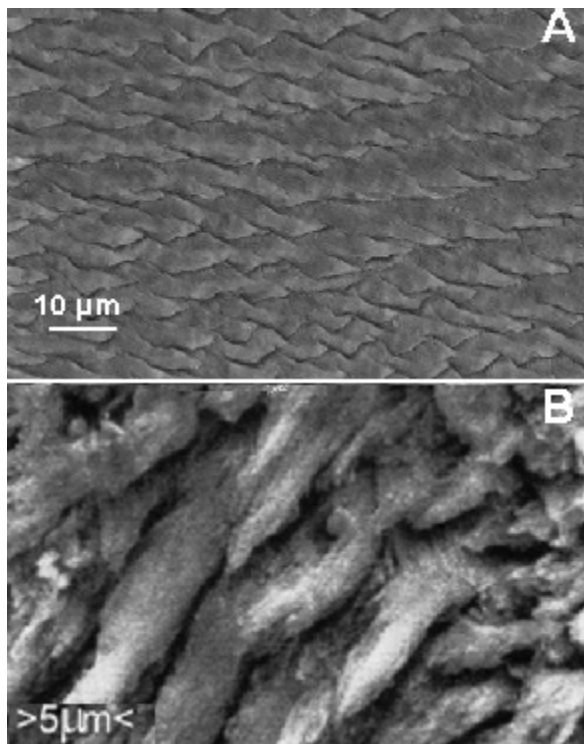


Fig. 2. Imágenes de MEB del esmalte dental humano donde se observan los prismas, la unidad estructural del esmalte, tanto en dirección transversal (A) como en longitudinal (B).

Una vez identificadas las diferencias entre el esmalte y la dentina, es más fácil describir la zona de unión entre estos tejidos, es decir la UED. Las imágenes de MEB siempre mostraron un espacio de separación entre esmalte y dentina (fig. 4). Al recorrer toda la interfase entre los dos tejidos, se observaron en algunas secciones de las muestras la presencia de un material que unen al esmalte con la dentina y viceversa.

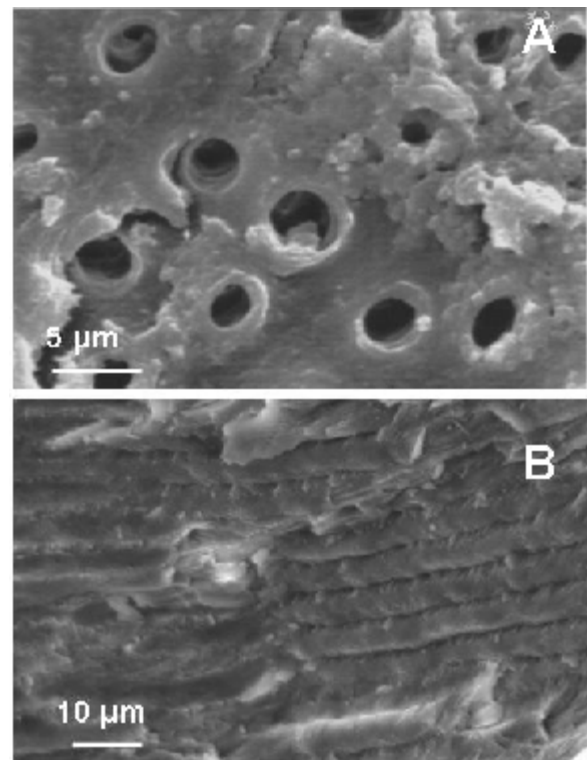


Fig. 3 humana donde se observan los túbulos dentinarios tanto en dirección transversal (A) como en longitudinal (B). Imágenes de MEB de la dentina

La figura 5 presenta la imagen de MET de la UED donde se observan las zonas correspondientes del esmalte y de la dentina y sus correspondientes patrones de difracción de electrones de área selecta. La indexación de estos patrones indica que ambos corresponden a la celda hexagonal de la hidroxiapatita y la diferencia que se observa entre ellos se debe al tamaño y distribución que presentan los cristales de hidroxiapatita en el esmalte y la dentina. En el caso del esmalte, los cristales de hidroxiapatita son del orden de micras y presentan texturización. En el caso de la dentina, los cristales de

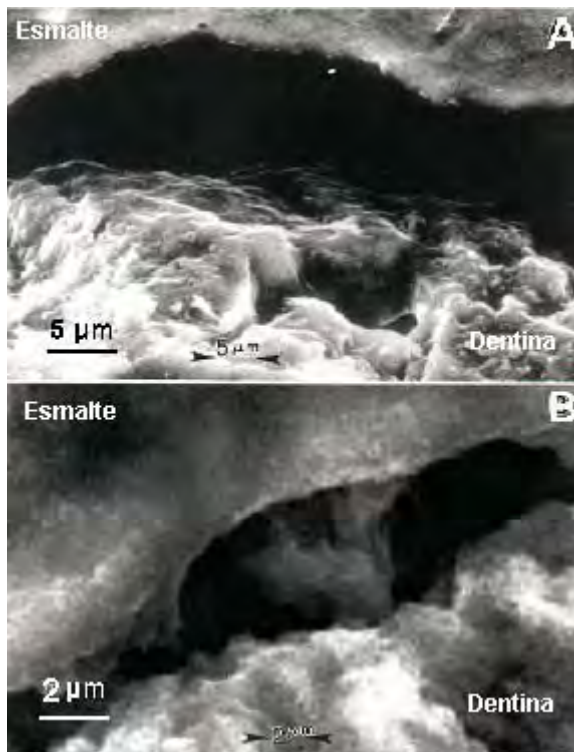


Fig. 4. Imágenes de MEB de la zona de la UED. La dentina y el esmalte se encuentran separados (A) y en ciertos casos se observaron las prolongaciones odontoblásticas entre el esmalte y la dentina (B).

hidroxiapatita son de orden nanométrico y se encuentran distribuidos al azar, dando lugar al patrón de difracción de anillos concéntricos. Estos resultados son consecuencias de los diferentes procesos de mineralización determinado por las matrices proteicas, y que, además, se manifiestan al exhibir las características tan específicas ya observadas y descritas anteriormente de cada tejido.

El análisis de difracción de rayos-X corrobora ampliamente estos resultados. La figura 6 muestra los difractogramas obtenidos para las muestras de esmalte y la dentina. La indexación de estos espectros concuerda con los obtenidos por MET ya que indica que los cristales corresponden a la celda hexagonal de la hidroxiapatita, pero con distinto tamaño de cristal y distinto arreglo. En el caso de la dentina, el espectro es menos cristalino que el del esmalte.

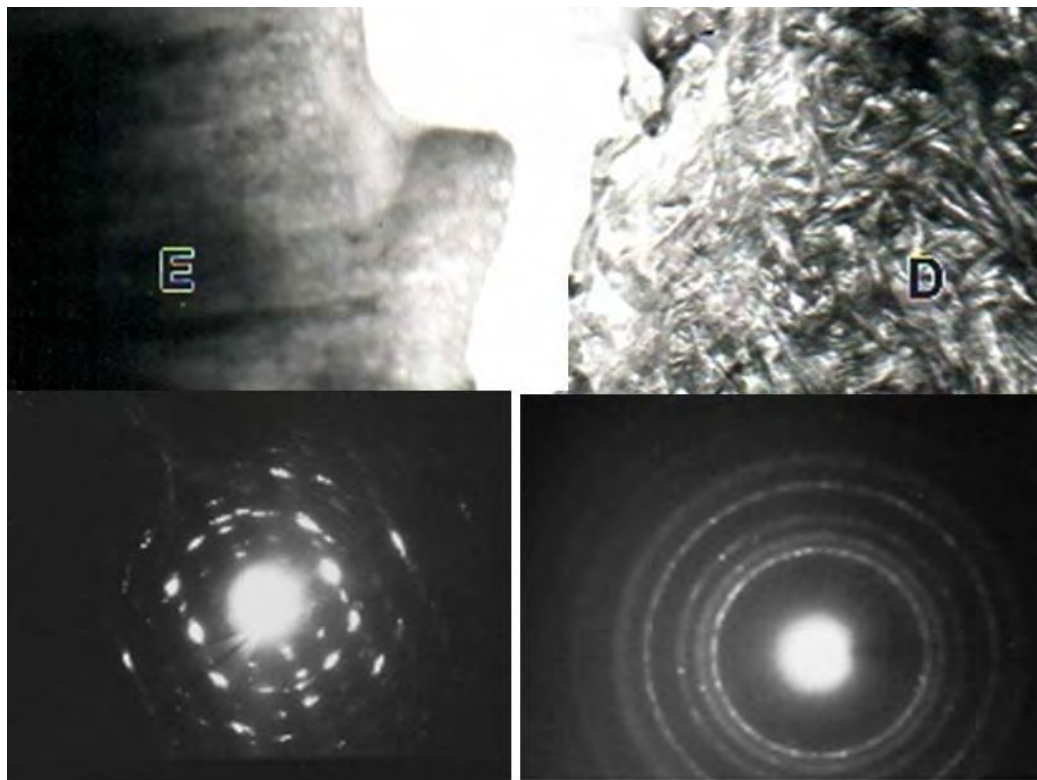


Fig. 5. Imagen de MET en campo claro de la UED donde se observan el esmalte (E) y la dentina (D), y sus correspondientes patrones de difracción. La indexación de ambos patrones de difracción corresponden a la celda hexagonal de la hidroxiapatita.

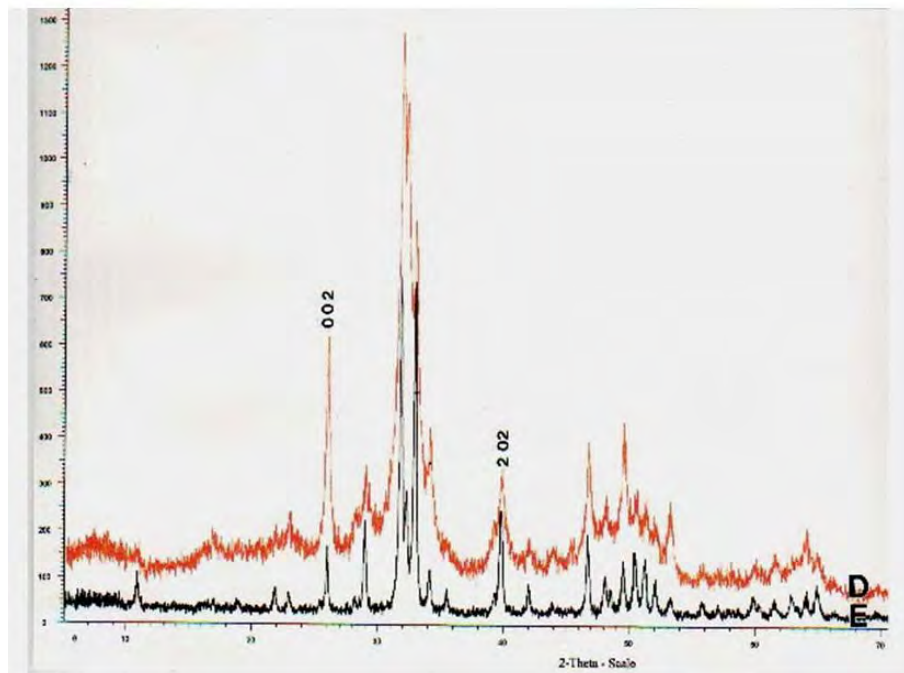


Fig. 6. Difractograma de rayos x de la dentina (D) y del esmalte (E). La indexación de estos difractogramas indica que los cristales corresponden a la celda hexagonal de la hidroxiapatita, pero con distinto tamaño de cristal y distinto arreglo.

El análisis por MET, desafortunadamente, no da mayor información puesto que, entre otras cosas, al preparar la muestra, la metodología empleada eliminaba el material orgánico presente en la UED, por lo cual se tuvieron que retomar las técnicas de MEB anteriores con las que ya se habían obtenido los resultados más favorables, pero ahora incluyendo los métodos de fijación.

Las imágenes obtenidas en MEB de la UED de muestras preparadas que incluyen el proceso de fijación, confirman que existe un material entre esmalte y dentina que presenta cierto arreglo (fig. 7).

A partir de este resultado, por medios mecánicos se eliminó de la muestra, al esmalte de la zona de la UED dejando completamente al descubierto la superficie dentinaria. Esto permitió observar el arreglo que presenta este material, tal y como se observa en la figura 8. Las prolongaciones del material presentes en la superficie de la dentina en la zona de la UED tienen dimensiones de 10-17 μm (fig. 8b) las cuales se extienden hasta la estructura prismática del esmalte. Sin embargo, la altura de estas prolongaciones o extensiones del material varían sus dimensiones de un sitio a otro en la zona de la UED,

como se observa en las zonas cervicales donde presentan una altura menor y la red que muestra la figura 8 es un poco más abierta, mientras que en las zonas oclusales e incisales, son extensiones de mayor altura (fig. 9).

Este comportamiento morfológico tiene que ver con la funcionalidad, ya que en la zona oclusal, el esmalte tiene mayor grosor para la constitución de las cúspides y resistir las fuerzas masticatorias o de incisión en el caso de los dientes anteriores.

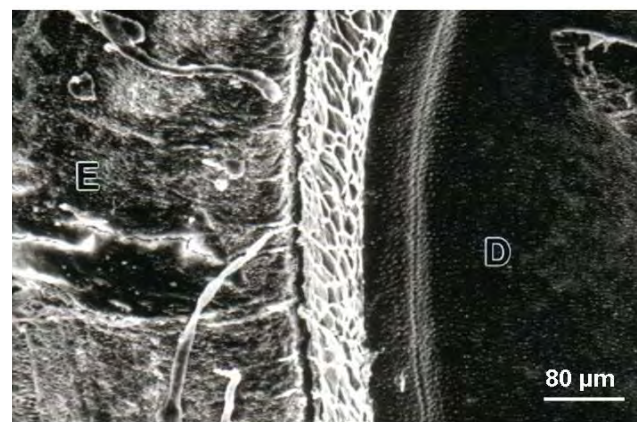


Fig. 7. Imagen de MEB de la UED de una muestra previamente fijada. Esta imagen muestra la presencia de un material de unión en la interfase entre el esmalte (E) y la dentina (D).

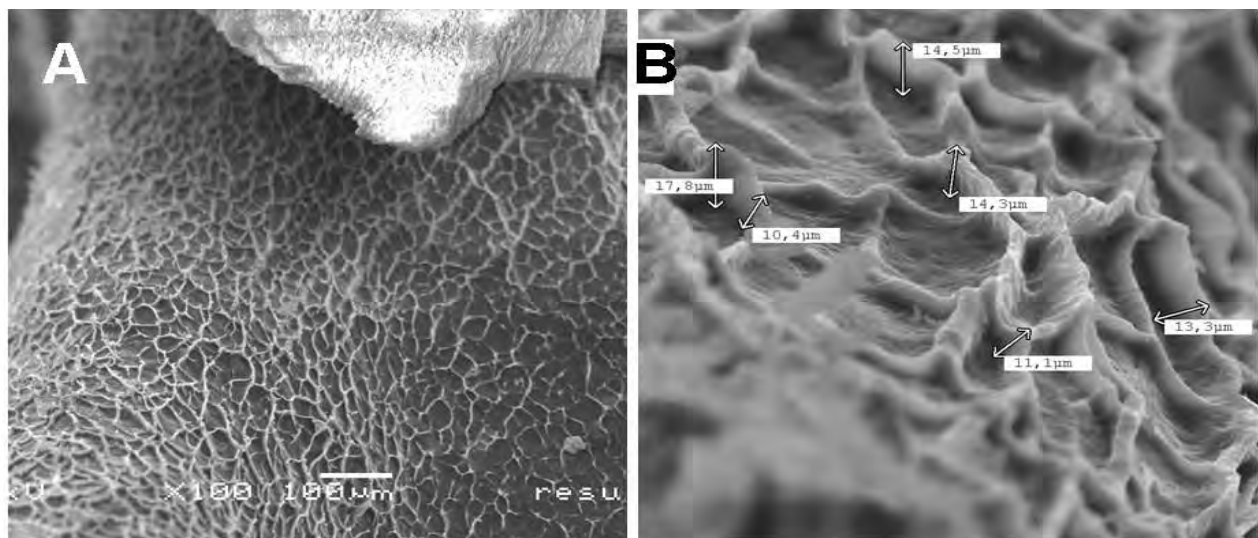


Fig. 8. Imágenes de MEB de la superficie dentinaria después de haber eliminado el esmalte. A) Imagen de la estructura reticular que presenta el material de unión en la UED. B) Dimensiones de la altura que presenta esta red con un promedio de 14 µm.

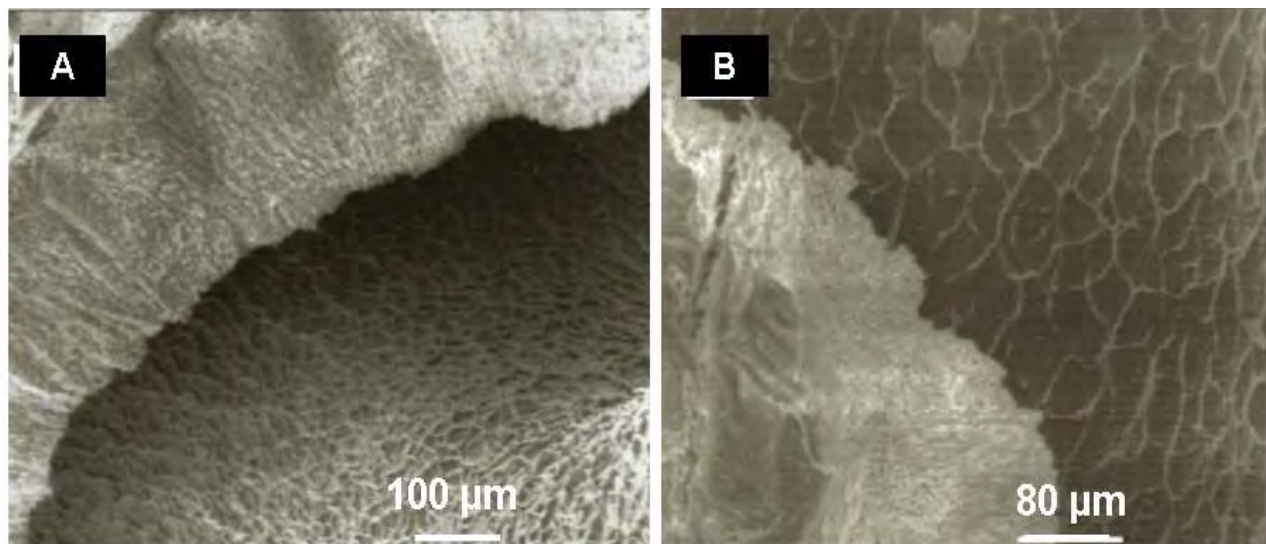


Fig. 9. Imágenes de MEB de la superficie de la dentina en la UED. A) Zona oclusal de una cúspide de un molar. B) Zona cervical del mismo molar. Nótese la diferencia en las dimensiones del arreglo que se presenta.

La figura 10 muestra el arreglo “reticular” observado en la zona de la UED. Debido a que esta red que se localiza entre los dos tejidos mineralizados, es de esperarse que su función mecánica está fuertemente relacionada con la de amortiguación, además de mantener unidos al esmalte con la dentina, conservando la estructura aún para la situación extrema de los trabajos mecánicos-fisiológicos como la masticación.

Por lo tanto, es de crucial importancia conocer su composición química. Los espectros de EDS indican que

el material de esta red lo conforma principalmente el carbono en 47.61% at., el nitrógeno en 9.67% at., y el oxígeno en 40.21% at. (fig. 11), demostrando que se trata de un material orgánico, seguramente proveniente de restos proteicos necesarios para la mineralización del esmalte y la dentina (14-17). Este material orgánico se distribuye entre los tejidos inorgánicos de tal forma que su base es sobre la dentina, emergiendo probablemente de los túbulos dentinarios y llegando hasta los espacios inter-prismáticos del esmalte formando así un sistema

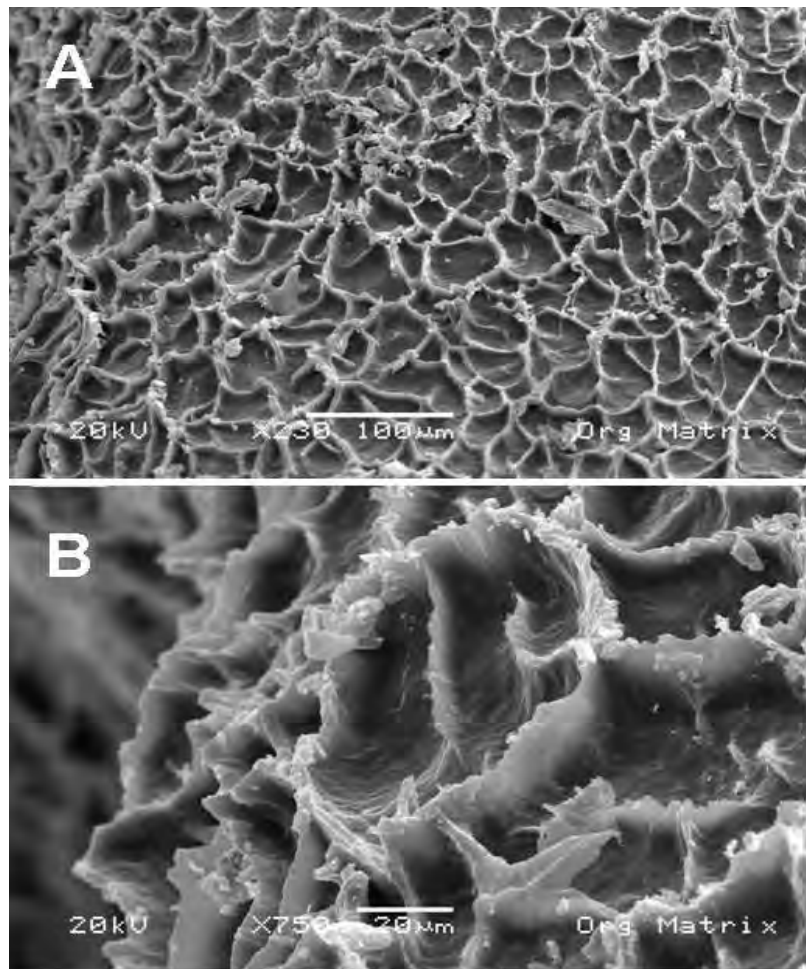


Fig. 10. Imágenes de MEB de la superficie de la dentina donde se observa la red que conforma la UED. La imagen en (B) es una ampliación de la imagen en (A).

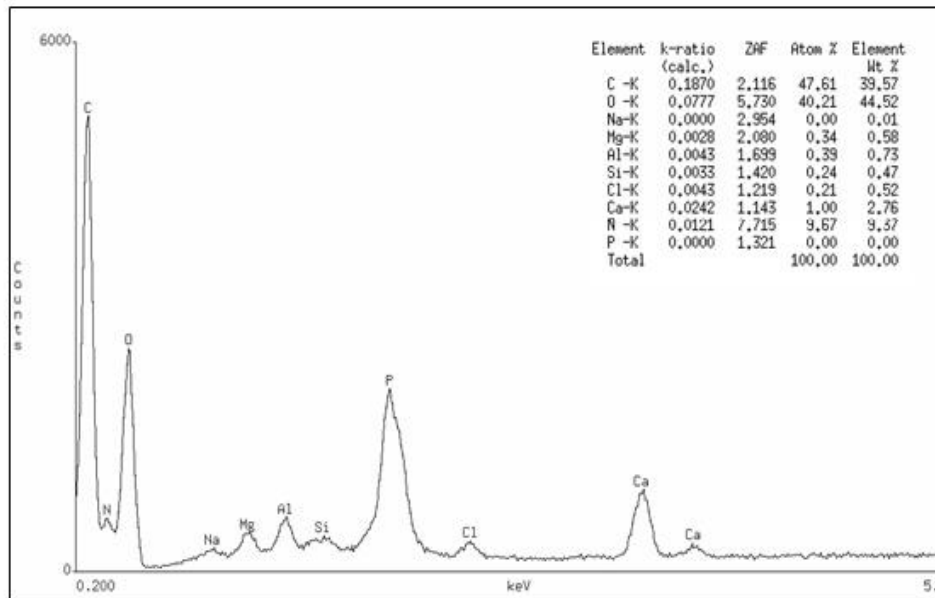


Fig. 11. Espectro de EDS con sus respectivos porcentajes tanto atómicos como de peso del material reticular observado en la superficie de la dentina y mostrado en la figura 10.

biológico funcional. Se realizaron mapeos químicos del material reticular para determinar la distribución de los elementos que lo conforman (fig. 12). De esta manera se identificó que este material sí está formado por elementos orgánicos y que la presencia de Ca y P se debe a la superficie de la dentina en la que se encuentra la UED.

DISCUSIÓN

En la UED ocurren procesos biológicos con el funcionamiento coordinado de una serie de eventos que permiten el desarrollo del esmalte y la dentina. Desde el inicio de la odontogénesis, los ameloblastos y los odontoblastos presentan interacciones celulares epiteliomesenquimatosas, estableciendo una relación estrecha mediante las fibras de Von Korff. En esta etapa dicha unión es amelodentinaria porque une a los ameloblastos con los odontoblastos. Las células secretan una matriz orgánica extracelular con la cual se llevará a cabo el depósito mineral para la formación de los tejidos, antecediendo la dentinogénesis a la amelogénesis y al finalizar la mineralización, generan y dan lugar a la unión entre esmalte y dentina.

Aunque el depósito mineral para la formación de la dentina es previo al del esmalte y sean procesos independientes, parecen llevar un orden secuencial y ambos son fosfatos de calcio, los cuales se ha reportado sintetizar mediante diferentes métodos (18). A pesar de que no hay relaciones entre los cristales de un tejido y otro, el esmalte necesita una plataforma dentinaria debido a que la organización de la matriz del esmalte se ve influenciada por la estructura de superficie de la dentina. El desarrollo de los cristales se caracteriza por las diferencias en la distribución de Ca y P, reflejando un patrón de mineralización distinto uno del otro, es decir, en tamaño, el arreglo; todo esto determina la organización del material orgánico (19), conservando cada tejido su estructura sin tener alguna relación cristalina (15). Sin embargo, Yoshihiko (16) reportó que existe en algunas zonas de la UED una conexión directa

de los cristales, revelado mediante una franja enrejada de los cristales de dentina penetrando y contactando directamente con los cristales del esmalte.

Los dos tejidos presentan, por lo tanto, estructuras diferentes que se conservan aún en zonas cercanas a la UED, a pesar de que la base inorgánica es la misma (hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).

Se ha observado que la organización cristalina del esmalte es de forma organizada, es decir, el tamaño de los cristales está bien definido y orientado y la organización de la dentina esta dada por cristales con orientaciones al azar y con una variedad de tamaños. Esos tejidos mineralizados interactúan con el material orgánico, resultado de las matrices extracelulares producidas por ameloblastos y odontoblastos; por lo tanto, la UED debe tener residuos proteicos (20, 21, 22), como colágena (23). Se ha reportado que las proyecciones que emergen de la dentina no llegan hasta el esmalte (8, 24); sin embargo, hay discrepancias respecto a esto porque otras evidencias, además de nuestras observaciones, muestran que llegan hasta el esmalte y se insertan en los espacios interprismáticos (25, 26, 27). Estas prolongaciones no están presentes en todos los espacios. Por la morfología que presenta la UED de red, cada concavidad abarca un conjunto de prismas; para tener esta organización, los cristales adoptan ciertas posiciones para permitir alojar al material orgánico en los espacios interprismáticos. A esto es a lo que se conoce como Estrías de Retzius que están dadas por las parazonas y diazonas (28).

Las prolongaciones de la red difieren en altura dependiendo de la zona en que se observe: siendo más estrecha y más alta en regiones oclusales o incisales y más abierta y de menor altura en las regiones cervicales. Esto se da en relación directa a las funciones del diente y la interacción entre los tejidos y las fuerzas dentales (29); la estructura está conformada de acuerdo a la función del tejido. La UED, constituida de elementos orgánicos y proteicos, mantiene la interfase entre dos tejidos

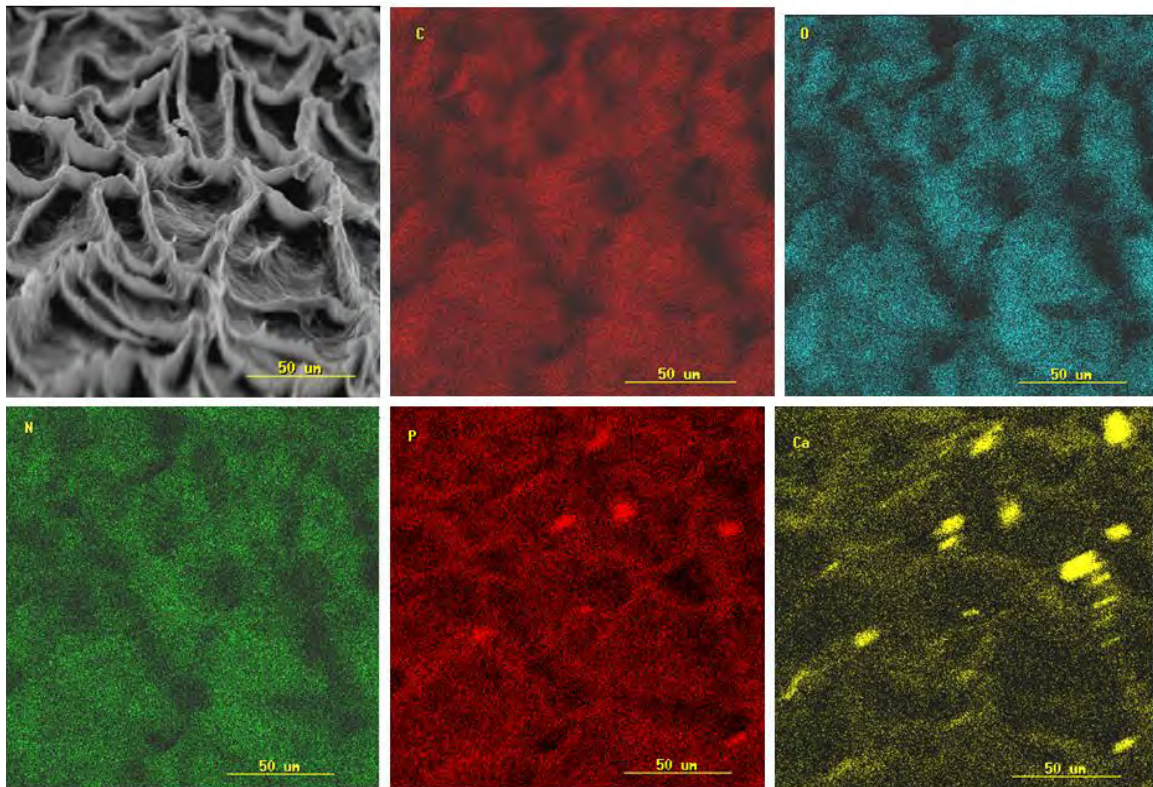


Fig. 12. Mapeo químico del material reticular observado en la superficie de la dentina mostrando la distribución de C, O, N, Ca, y P. Nótese que la señal del Ca y el P provienen de las partículas sobrepuestas a este material.

estructuralmente distintos, sin establecer relación cristalina, la cual se ha referido como zona de separación, es en realidad una zona de unión gracias a la organización estructural de sus componentes que le confiere propiedades mecánicas, a las coronas de los dientes para llevar a cabo sus funciones (30).

MODELO MECANICO-FUNCIONAL DE LA UED

Con los resultados presentados en este trabajo se propone un MODELO MECANICO-FUNCIONAL (Diseño Biológico) para la UED (fig. 13). La UED, es el resultado de la mineralización del esmalte y la dentina; siendo un material orgánico que podría contener algunos residuos proteicos (tales como colágena) debido a su funcionalidad y estructura observada. Los residuos proteicos se distribuyen de tal manera que forman una estructura reticular sobre la superficie de la dentina. Las prolongaciones de este material orgánico llegan hasta los espacios interprismáticos abarcando un conjunto de

prismas (fig. 14). La longitud de estas prolongaciones varía, siendo menores en cervical y más altas en superficies oclusales e incisales, lo cual se asocia con la anatomía y a la función que tiene cada zona del diente.

Es necesario comentar que las proyecciones que emergen de la dentina llegan hasta el esmalte pero no a todos los espacios interprismáticos ya que cada concavidad de la red orgánica abarca un conjunto de prismas. Los prismas adoptan ciertas posiciones para alojar al material orgánico en los espacios interprismáticos.

Las protuberancias de la red formada difieren en altura, es más estrecha y alta en regiones oclusales o incisales en el caso de los dientes anteriores y en cambio, la red parece ser más abierta y de menor altura en las regiones cervicales, demostrando que esta arquitectura está dada en base a las funciones de desempeño del diente, proporcionando soporte mecánico y amortiguación, para evitar la fractura del esmalte, y por ende la separación de los tejidos y la exposición de la dentina.

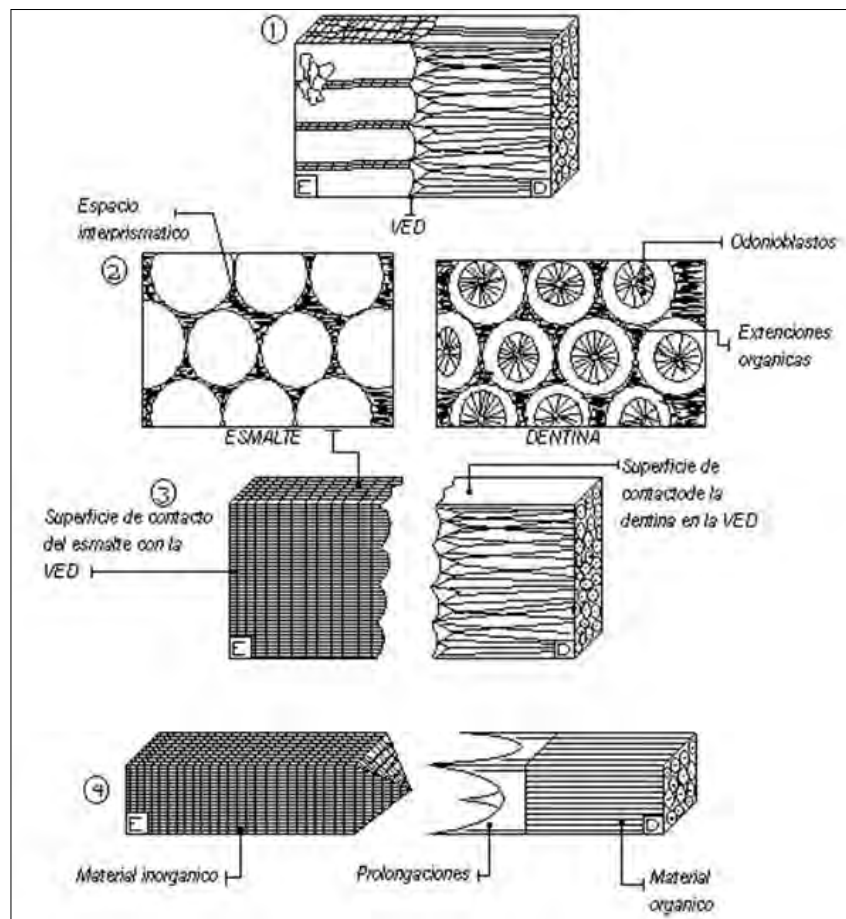


Fig. 13. Esquemización de la estructura de la UED. 1) La UED es caracterizada con una línea festoneada entre esmalte y dentina. 2) Cortes transversales del esmalte, con prismas y los espacios interprismáticos, y de la dentina, con túbulos dentinarios y prolongaciones odontoblásticas.

3) Superficies de contacto de los dos tejidos. 4) Arreglo de las prolongaciones que forman la red y que se insertan en espacios interprismáticos del esmalte.

CONCLUSIÓN

En base a los estudios realizados de MEB, DRX y EDS, se concluye que la estructura de la UED está conformada por un arreglo reticular de material orgánico que mantiene unidos a los tejidos del esmalte y la dentina. Esta red se distribuye sobre la superficie de la dentina y coincide unívocamente con los prismas, ya que a cada prolongación no corresponde un espacio interprismático, sino que ancla a un conjunto de prismas. Esta estructura de origen proteico presenta concavidades entre cada red y es la responsable del festoneado que ha caracterizado la UED. A partir de estos resultados se estableció el modelo propuesto.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a R. Hernández, J. Cañetas, C. Magaña, M. Aguilar, A. Gómez Cortés, P. Mexia y S. Tehuacanero por el apoyo técnico que nos brindaron durante la elaboración del presente trabajo. También agradecemos a la DGAPA-UNAM (Proyecto IN-117906) el apoyo económico para la realización del presente trabajo.

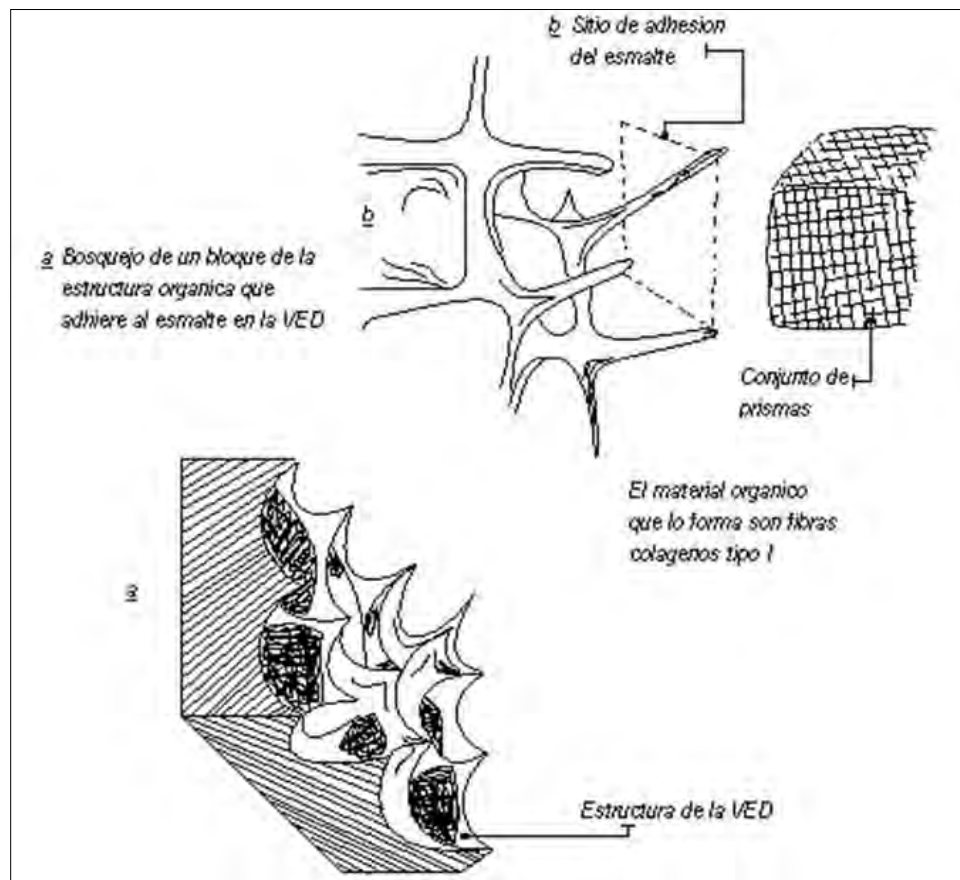


Fig. 14. Esquematización de la estructura y organización del material orgánico reticular observado en la UED dando lugar a un Diseño Biológico funcional.

REFERENCIAS

- [1] Ten Cate, Arnold R. (1993) "Histología Oral", Buenos Aires. Pág. 536.
- [2] Spyros Doukoudakis, Nikos Kranias, Margarita Spanou, Minos Stavridakis. (1997) "Morphologic characteristics of dentin at the dentin-enamel junction as viewed by scanning electron microscopy". Journal of Esthetic Dentistry Vol. 9 No.2 Págs. 94-99.
- [3] Marshall GW Jr, Balooch M., Gansky S. (2001) "Mechanical properties of the dentinoenamel junction: afm studies of nanohardness, elastic modulus, and fracture". Journal Biomed. Material Research Jan. 54 (1) Págs. 87-95.
- [4] R.R. Gallagher, S.G. Demos, M. Balooch, G.W. Marshall, Jr., S.J. Marshall. (2003) "Optical spectroscopy and imaging of the dentin-enamel junction in human third molars". J. Biomed. Mater Res. Vol. 1;64(2) Págs. 372-377.
- [5] Sheila J. Jones, Alan Boyde. (1998) "Dentin and Dentinogenesis", Volumen I, Chapter 4: Ultrastructure of dentin and dentinogenesis. Pag.81
- [6] Arthur Veis, Joseph Barss, Thomas Dahl, Mohammed Rahima and Stuart Stock. (2002). "Mineral-related proteins of sea urchin teeth: Lytechinus variegates". Microscopy Research and Technique No. 59, Págs. 342-351.
- [7] Veerappan Girija, Hsu Chin-Ying Stephen. (2003) "Characterization of lipid in mature enamel using confocal laser scanning microscopy" Journal of Dentistry No. 31 Págs. 303-311.
- [8] Ragazzoni E, Martignoni M, Cocchia D. (1995) "The morphological and histochemical characteristics of the interprismatic structures and the human enamel.

- a light microscopy study”. *Minerva Stomatologica* July-August Volumen44 No.(7-8) Págs 376.
- [9] William T. Butler. (1998) “Dentin and Dentinogenesis” Volumen II, Chapter 8: Dentin collagen, chemical structure and role in mineralization. Pag:37
- [10] Jian Q. Feng, Xianghong Luan, John Wallace, Dai Jing, Tosió Ohshima, Ashock and B. Kulkarni. (1998) “Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse (Dsp) dentin sialophosphoprotein gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein”. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 273 No. 16 April 17 Págs. 9457-9464.
- [11] Anders Linde. (1998) “Dentin and Dentinogenesis” Volumen II, Chapter 9, Noncollagenous proteins and proteoglycans in dentinogenesis. Pág.55
- [12] P. Bordier-Houllé, P. Steuer, J.M. Meyer, L. Bigeard. (2000) “High-resolution electron-microscopic study of the relationship between human enamel and dentin crystals at the dentinoenamel junction”. *Cell Tissue Res.* 301 Págs. 389 - 395.
- [13] Shroff B, Thomas HF. (1992) “Investigation of the role of Von Korff fibers during murine dentinogenesis”. *Journal of Biology Buccale* September Volumen 20 Number 3 Págs. 139-144.
- [14] Thomas G.H. Diekwish, Brett J. Berman, Steven Gentner, Harold C. Slavkin. (1995). “Initial enamel crystals are not spatially associated with mineralized dentine”. *Cell and Tissue Research* No. 279 Págs: 149-167.
- [15] P. Anderson, J. C. Elliott, U. Bose and S. J. Jones. (1990) “A comparison of the mineral content of enamel and dentine in human premolars and enamel pearls measured by x-ray microtomography”. *Archs. Oral Biology* Vol.41 No.3 Págs. 281-290.
- [16] Yoshihiko Hayashi. (1992) “High resolution electron microscopy in the dentino-enamel junction”. *Journal Electron Microscopy* 41 Págs. 387-391.
- [17] Toshihiko Inage, Takahisa Kasamo, Takahiro Yoshida, Toshikazu Suzuki, Tetsuo Sekiguchi and Takashi Takezawa. (1984) “Ultrastructural localization of alkaline phosphatase in fish enamel organ”. *J Nihon Univ Sch Dent.* 26(3) Págs. 187-201
- [18] Chen Lai, ShaoQiu Tang, YingJun Wang, Kun Wei (2005) “Formation of calcium phosphate nanoparticles in reverse microemulsions” *Materials Letters* 59 Págs. 210-214.
- [19] Arnold WH, Gaengler P. (2007) “Quantitative analysis of the calcium and phosphorus content of developing and permanent human teeth” *Ann Anat* 189 (2). Págs. 183-190.
- [20] Meyer JM, Bodier-Houille P, Cuisinier FJ, Lesot H, Ruch JV. (1999). “Initial aspects of mineralization at the dentino-enamel junction in embryonic mouse incisor in vivo and in vitro: A TEM comparative study”. *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.* Mar 35(3) Págs. 159-68.
- [21] J.P. Simmer and A.G. Finchman. (1995) “Molecular mechanisms of dental enamel formation”. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* Vol. 6 No. 2 Págs 84-108
- [22] Mary MacDougall, Darrin Simmons, Xianghong Luan, Jasón Nydegger, Jian Feng and Ting Ting Gu. (1997) “Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. (Dentin phosphoprotein DNA sequence determination)”. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 272 No. 2 Págs. 835-842 .
- [23] Chun P. Lin, William H. Douglas and Stanley L. Erlandsen. (1993). “Scanning electron microscopy of type I collagen at the dentin-enamel junction of

- human teeth”. *Journal of Histochemistry and Citochemistry* Vol. 41 No. 3 Págs: 381-388.
- [24] Margaret R. Byers and Akira Sugaya. (1995). “Odontoblast processes in dentin revealed by fluorescent Di-I”. *The Journal of Histochemistry and Citochemistry* Vol.43 No.2 Págs. 159-168
- [25] M.J. Sigal, J.E. Aubin, A.R. Ten Cate and S. Pitaru. (1984) “The odontoblast process extends to the dentinoenamel junction: an immunocytochemical study of rat dentin”. *The Journal of Histochemistry and Citochemistry*. Vol. 32 No.8 Pags.872-877.
- [26] Sigal MJ, Aubin JE, Ten Cate AR. (1985) “An immunocytochemical study of the human odontoblast process using antibodies against tubulin, actin, and vimentin”. *J. Dental R. Dec.* 64(12) Págs. 1348-55
- [27] Sigal MJ, Aubin JE, Ten Cate AR. (1984). “A combined scanning electron microscopy and immunofluorescence study demonstrating that the odontoblast process extends to the dentinoenamel junction in human teeth”. *Anat. R. Nov* 210(3) Págs. 453-62
- [28] Hanaizumi Y, Kawano Y, Ohshima H, Hoshino M, Takeuchi K, Maeda T. (1998) “Three-dimensional direction and interrelationship of prisms in cuspal and cervical enamel of dog tooth”. *Anat. Rec. Nov* 252(3) Págs. 355-368.
- [29] Xu HH, Smith DT, Jahanmir S, Romberg E, Kelly JR, Thompson VP, Rekow ED. (1998). “Indentation damage and mechanical properties of human enamel and dentin”. *J. Dental Research Mar* 77(3) Págs. 472-480.
- [30] Paul Zaslansky, Asher A. Friesem, Steve Weiner. (2006) “Structure and mechanical properties of the soft zone separating bulk dentin and enamel in crowns of human teeth: Insight into tooth function” *Journal of Structural Biology* 153. Págs. 188-199.



Oria Hernández J, Rendón Huerta E, Reyes Vivas H, Romero Álvarez I, Velázquez López I (eds.). **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXXI. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F., MÉXICO. (2007). (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

BIOLOGÍA CELULAR DEL SPLICING

Luis Felipe Jiménez García*, Reyna Lara Martínez, Ivet Gil Chavarría, Alma Leticia Zamora Cura, Martha Salcedo Alvarez¹, Lourdes Teresa Agredano Moreno, José de Jesús Moncayo Sahagún², María de Lourdes Segura Valdez
Laboratorio de Nanobiología Celular, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México D.F. 04510, México.

*lfjg@hp.ciencias.unam.mx

¹Dirección permanente: Facultad de Estudios Superiores, Iztacala, UNAM

²Dirección permanente: Colegio de Ciencias y Humanidades-Oriente, UNAM

Resumen

La presencia de genes segmentados en eucariontes trae consigo la producción de un transcrito primario o pre-mRNA que tiene que ser procesado para salir al citoplasma en forma de mRNA y ser traducido a proteína por el ribosoma. Los pasos principales de procesamiento son 1) la metilación del extremo 5', 2) la poliadenilación del extremo 3' y 3) el corte de intrones y ligado de los exones o splicing. El splicing es un proceso de transesterificación en dos pasos. En el primero se cortan los sitios de unión intrón-exón y en el segundo se ligan los exones. Para que ocurra la reacción se requieren factores proteicos y varios RNAs. La localización celular de estas moléculas por medio de marcaje y el uso de los microscopios de epifluorescencia y confocal, revela la presencia de los factores de splicing en una distribución conocida como patrón moteado. Se presenta en células en cultivo, pero también en diferentes tejidos. En ambos casos, la morfología del patrón es muy dinámica, como lo revela el uso de construcciones moleculares con la proteína fluorescente verde y depende de la actividad de transcripción y de splicing de las células. Los componentes ultraestructurales del patrón moteado corresponden a partículas ribonucleoproteicas, descritas con el microscopio electrónico de transmisión desde finales de la década de los años 1950. El patrón moteado intranuclear de factores de splicing es el reflejo morfológico de la actividad de transcripción y splicing.

Palabras clave: mRNA, núcleo, pre-mRNA, proteínas SR, ribonucleoproteínas, speckles, splicing.

Abstract

As a consequence of the presence of split genes in eukaryotes, a primary transcript should be produced and it has to be processed to be exported to the cytoplasm for translation. Major processing events are 1) 5' end methylation, 2) 3' end polyadenylation and 3) splicing. Splicing takes place as two steps of transterification. First, exon-intron junction is broken and then exons are ligated. Protein and RNA factors are required for the reaction. Cellular localization of these molecules by labelling and the use of epifluorescence and confocal microscopy, reveals the presence of splicing factors in a distribution known as speckled pattern. It has been observed in cultured cells but, recently, also in several tissues. In both cases, the morphology of the pattern is very dynamic, as revealed by molecular constructions fusing the green fluorescent protein gene to splicing factors genes and transfecting cells with them to transiently express the factor. The dynamics depend upon transcriptional and splicing activities. Ultrastructural components of the speckled pattern correspond to ribonucleoprotein particles, as previously described using the transmission electron microscope since the late 1950s. The intranuclear speckled pattern for splicing factors is the morphological reflection of transcriptional and splicing activities.

Keywords: mRNA, nucleus, pre-mRNA, ribonucleoproteins, speckles, splicing. SR proteins.

Introducción

En 1977, Roberts y Sharp encontraron que la secuencia nucleotídica de los genes de adenovirus 2 (Ad2) contenía segmentos de DNA con información para la producción de proteínas (codificantes), alternadas con secuencias que no contenían información para ello (no codificantes); es decir, los genes de estos virus estaban segmentados, partidos o arreglados en mosaico (*split genes*) [1-2]. Como consecuencia, los transcritos primarios de estos genes se producían como moléculas grandes que requerían ser cortadas para eliminar los segmentos no codificantes y ligar los segmentos codificantes. A este proceso se le denominó *splicing*. Así, el RNA mensajero (mRNA) producido a partir de esos genes tenía un tamaño menor que la misma secuencia del cual era copiado. Estos datos permitieron ofrecer una explicación para las observaciones de Darnell de principios de la década de los años 60's, de que el RNA nuclear era de mayor tamaño (el RNA gigante, gRNA) que el del citoplasma [3]. Rápidamente, estos resultados fueron confirmados por Pierre Chambon, también para los genes de mamíferos, lo que más adelante culminó en la generalización de una organización similar para los eucariontes. En 1978, Walter Gilbert propuso utilizar el término exón para las regiones que se expresan e intrón para las que son intermedias o interrumpen la lectura del mensaje genético (llamadas secuencias intermedias, *intervening sequences* o IVS) [4].

Actualmente, se conoce que los genes de eucariontes están segmentados, lo que lleva a la producción de un transcrito primario de igual tamaño que el gen, llamado RNA pre-mensajero (pre-mRNA) o RNA heterogéneo nuclear (hnRNA). Esos transcritos son procesados o madurados en tres reacciones principales que son:

a) La metilación en el extremo 5', que consiste en la adición del grupo trifosfatado 7-metilguanosa, denominado *cap*, que es necesario para la unión al ribosoma al momento de la traducción.

b) La poliadenilación en el extremo 3', que se refiere a la adición de adeninas en todos los mRNAs excepto en los de las histonas, llamada cola de poli A, la cual está formada por una secuencia de aproximadamente 50 a 250 nucleótidos. Evita la degradación del RNA

c) El *splicing*, es el proceso mediante el cual se eliminan las secuencias no codificantes o intrones (escindiéndolos del pre-mRNA) y se unen o empalman los exones para generar el RNA mensajero maduro o mRNA.

En este trabajo trataremos el tema del *splicing* y nos limitaremos al *splicing* del pre-mRNA, dejando por ahora de lado los otros dos tipos de *splicing* autocatalíticos, como por ejemplo el auto-*splicing* de *Tetrahymena*.

Biología molecular del *splicing*

El splicing ocurre en dos pasos de transesterificación

El *splicing* es un proceso que químicamente consiste de dos reacciones sucesivas de transesterificación. El corte y el empalme son dependientes de la hidrólisis de ATP y son catalizados por un gran complejo de ribonucleoproteínas llamado "spliceosoma". Este proceso dará como resultado la formación del mRNA, que será transportado al citoplasma y en donde será traducido a proteína en el caso de que ocurra *splicing* constitutivo o bien, a diversas proteínas en el caso de que se lleve a cabo *splicing* alternativo. El *splicing* se lleva a cabo en el núcleo, aunque hay reportes de que también puede ser citoplásmico [5-9].

En la figura 1 se ilustra el proceso del *splicing*. En resumen, el pre-mRNA se forma a partir de un gen segmentado y tiene varios sitios de acción *cis* o elementos de la misma secuencia. Los sitios más conservados son los dinucleótidos GU y AG en los lugares de unión exón-intrón (sitios de *splicing* 5') e intrón y exón (sitios de *splicing* 3'), respectivamente. El punto de empalme (*branchpoint*) es en general una adenina y mantiene una secuencia consenso, al menos para el caso de levaduras. Entre el sitio de empalme y el sitio del dinucleótido AG se encuentra una región rica en pirimidinas (uracilos, usualmente) llamada la región Py. En el primer paso de transesterificación, el grupo OH de la ribosa del residuo de adenina en el sitio de empalme, realiza un ataque nucleofílico hacia el sitio de *splicing* 5', generando una ruptura del enlace fosfodiéster. Al mismo tiempo, la guanina del dinucleótido realiza un enlace a través de su extremo 5' con el lado 2' del residuo de adenina en el sitio de empalme. Después ocurre la segunda reacción de transesterificación, en la cual el grupo OH del extremo del exón realiza un ataque nucleofílico hacia el sitio de *splicing* 3'. Como resultado, se libera el intrón como una estructura en forma de reata o *ariat*, al mismo tiempo que se unen los exones para generar el mRNA maduro. El intrón en forma de *ariat* se rompe nuevamente en su enlace 5'-2' y se lineariza, posibilitando que sea degradado o bien procesado nuevamente para dar lugar a un RNA pequeño nucleolar rico en uracilo (UsnoRNA) [5-8].

El splicing requiere varios factores presentes en el spliceosoma.

Para que se lleve a cabo el *splicing* se requieren varios factores, que incluyen diferentes tipos de RNA y proteínas que son:

1) Los RNA pequeños nucleares cuyas longitudes oscilan entre 60 y 300 nucleótidos y son ricos en residuos de uracilo (UsnRNAs). Los cinco tipos son: el U1snRNA, el U2snRNA, el U4snRNA, el U5snRNA y el U6snRNA. El U3snRNA participa en eventos de maduración del pre-rRNA (RNA ribosomal inmaduro o precursor). Estos RNAs son transcritos por la RNA polimerasa II, salvo el U6snRNA, que lo transcribe la RNA polimerasa III. En el núcleo, los UsnRNAs se asocian con proteínas para formar ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (UsnRNPs).

2) Las partículas ribonucleoproteicas heterogéneas nucleares (hnRNPs) que contienen RNA heterogéneo nuclear (hnRNA), son estabilizadoras, es decir, su función radica en asociarse al pre-mRNA para impedir la formación de estructuras secundarias dadas por el apareamiento de bases. De ésta manera el pre-mRNA permanece accesible para interactuar con otras moléculas.

3) Las proteínas SR (proteínas con dominios ricos en Serina y Arginina) representan una familia de factores de *splicing* que se reporta en vertebrados, invertebrados y plantas. La secuencia de aminoácidos en estas proteínas es rica en residuos de serina (S) y arginina (R) en el extremo carboxilo, formando el dominio SR. Estas proteínas tienen varios papeles reguladores en el *splicing*

como son la definición de los sitios de *splicing* y el acercamiento de las regiones de los dinucleótidos. Estas proteínas nucleares de 20 a 75 kDa, tienen capacidad de fosforilarse y se subdividen en: A) De Tipo I, las cuales presentan un solo Motivo de Reconocimiento a RNA (RRM) en el extremo amino-terminal y su dominio SR carboxilo Terminal, y B) de Tipo II, las cuales presentan dos Motivos de Reconocimiento a RNA (RRMs) y un dominio carboxilo terminal SR.

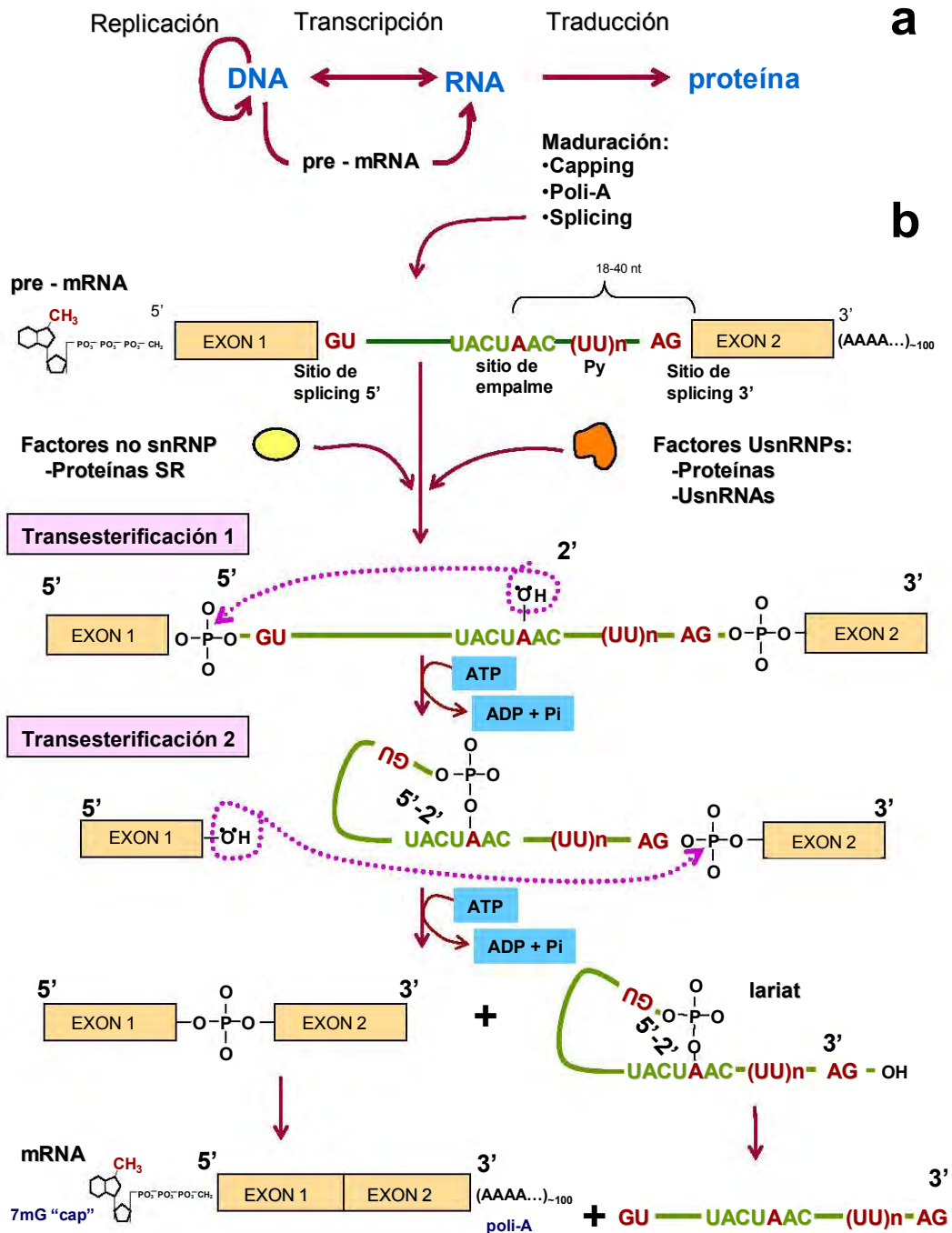


Figura 1. A) Flujo de la información genética. B) La reacción del *splicing* incluye dos pasos de transesterificación, en donde se requiere de ATP. En la reacción se libera el intrón y se ligan los exones.

Además, existen otras proteínas que pueden o no tener una estructura distinta del Motivo de Reconocimiento a RNA (RRM). En las células de mamíferos se han identificado y aislado componentes esenciales del *splicing*, tales como el factor SF2/ASF, el factor SC35 y el 9G8, los cuales han sido identificados por anticuerpos monoclonales [8, 10-30].

La figura 2 muestra los elementos del spliceosoma (a), un esquema de las proteínas SR (b) y el sitio conservado de 20 proteínas de las UsnRNPs (c).

El splicing ocurre en complejos

La figura 3 ilustra como los factores de *splicing* interaccionan con el pre-mRNA secuencialmente, formando complejos ribonucleoproteicos transitorios que permitirán que ocurran los dos pasos de transesterificación. En el primer paso se forma el complejo **E**, que se caracteriza por 1) la unión del U1snRNA de la U1snRNP al sitio de *splicing* 5'; este sitio de reconocimiento está dado por una secuencia complementaria de U1snRNA con el sitio de unión exón-intrón, provocando un apareamiento con los primeros seis nucleótidos del intrón, delimitando así el exón 1; 2) la unión del factor U2AF (que tiene el dominio SR) con el sitio Py; 3) la participación en el complejo de los factores SC35, SF2/ASF, SF1/BBP y el U2snRNP. Posteriormente, el complejo **E** se transforma en el complejo **A**, cuando el U2snRNP se une al sitio de empalme. El complejo **B1** se forma luego, cuando se asocia el trímero U4/U5/U6snRNP pre-ensamblado. Así, el U5snRNA se une al sitio de *splicing* 5' y el U6snRNA se une al U2snRNA. Este complejo forma un spliceosoma maduro. Posteriormente se forma el complejo **B2**, en donde se libera el U1snRNA, el U5snRNA se mueve del exón hacia el intrón y el U6snRNA se une al sitio de *splicing* 5'. Este paso se lleva a cabo mediante un apareamiento de aproximadamente 20 bases entre el U1snRNA y el U4snRNA. Como consecuencia, se activa el spliceosoma para llevar a cabo su catálisis. La función de U5snRNA es interactuar con secuencias del exón en el sitio del procesamiento 5' y 3'. El complejo **C1** se forma cuando se libera el U4snRNA y el U5snRNA se une al exón en el sitio de *splicing* 3'. En este punto se cataliza la transesterificación, es decir, se rompe el sitio de *splicing* 5' y se forma el *lariat*. Finalmente se forma el complejo **C2**, que contiene el trímero U2/U5/U6snRNAs, que permite el rompimiento del sitio de *splicing* 3' y se ligan los exones [8, 10-30].

Biología celular del *splicing*

Microscopía de luz de los factores de splicing en el núcleo

En células de mamíferos creciendo en cultivo, los anticuerpos contra factores proteicos de *splicing* producen imágenes con el microscopio de epifluorescencia con un patrón en forma de manchas embebidas en un ambiente difuso. Este patrón de tinción es conocido como patrón moteado (*speckled pattern*). Consta de 25 a 50 motas de entre 0.8 a 1.8 μm de tamaño, de forma irregular (Figura 4). Si se utilizan anticuerpos contra factores de *splicing* que forman ribonucleoproteínas, además de ese patrón, se tiñen los cuerpos de Cajal, que son estructuras ribonucleoproteicas de 0.5 μm de diámetro. En estudios de hibridación *in situ* se confirmó que también los RNAs que son factores de *splicing* producen un mismo tipo de tinción intranuclear [31-42]. Las *speckles* son estructuras amorfas que contienen altas concentraciones de snRNPs y proteínas relacionadas con el *splicing*. En células de mamíferos, la composición y localización intranuclear de las *speckles* responden a cambios en la transcripción del mRNA y a la fosforilación de proteínas. Además, contienen varias moléculas con un papel estructural. Los efectos de la fosforilación en las *speckles* y su función son particularmente evidentes en células de mamíferos, lo que sugiere que depende de la fosforilación de la proteína para controlar el estado físico de los *speckles* y su capacidad para proveer de factores de *splicing*. El comportamiento de las *speckles* es dinámico, puesto que varía su estructura y tamaño, además de su forma. Estos pueden variar según los niveles de expresión de genes y a la respuesta metabólica y al ambiente.

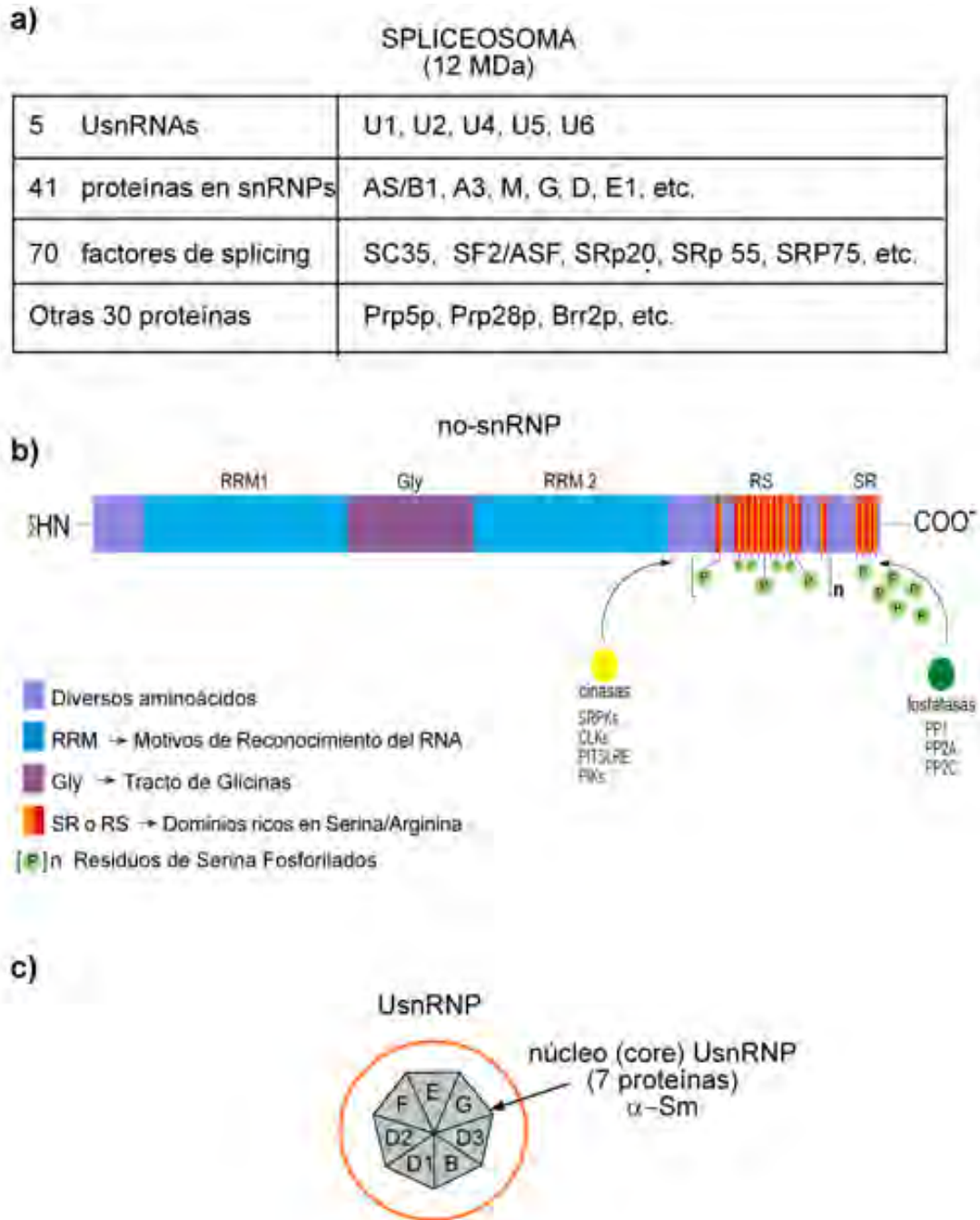


Figura 2. Composición molecular del spliceosoma. La tabla (a) muestra los diferentes elementos proteicos y de RNAs del spliceosoma. En (b) se muestra el esquema genérico de factores de *splicing* no-snRNPs (proteínas SR) con los dominios estructurales que las componen y las cinasas y fosfatasas que los modifican; en (c) se muestran las proteínas comunes a todas las snRNPs excepto el U6, que son reconocidos por los anticuerpos anti- α -Sm. De unas 20 proteínas totales de las USNRNPs, 7 forman el núcleo (*core*).

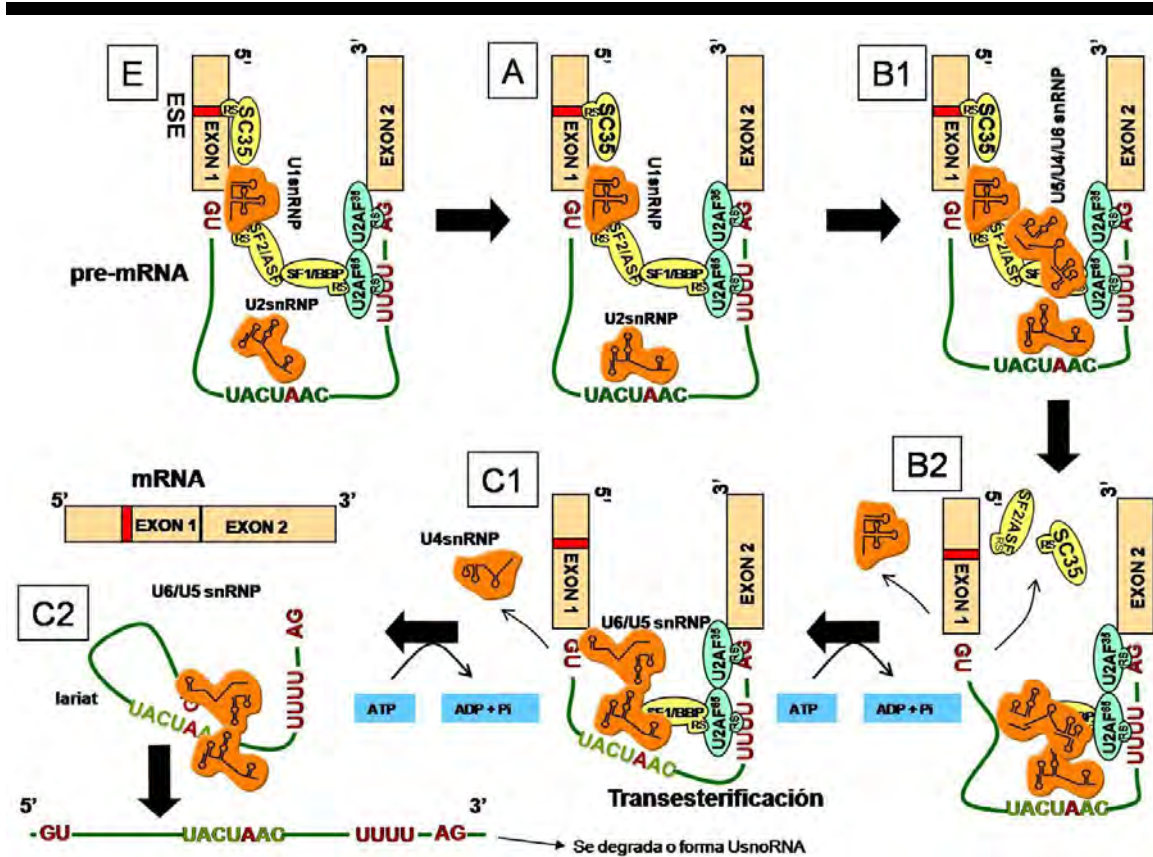


Figura 3. Biología Molecular del *splicing*. El *splicing* ocurre de manera secuencial en varios pasos en el spliceosoma (complejos E→A→B1→B2→C1→C2). Los factores no snRNPs (U2AF^{65/35}, verde), proteínas SR, (amarillo) - ambas con el dominio RS- y los factores snRNP (naranja), participan en el reconocimiento y acercamiento de los sitios de unión intrón-exón, para que ocurran los dos pasos de transesterificación.

Microscopía electrónica de ribonucleoproteínas intranucleares.

Desde que se empezó utilizar el microscopio electrónico para el análisis fino de células, la estructura nuclear mostró una complejidad mucho mayor que la observada con el microscopio de luz. En particular en 1969, Bernhard inventó un método de contraste ultraestructural que permitió distinguir las partículas que contienen RNA y proteínas (ribonucleoproteínas, RNPs) de las que no presentan esta composición. Confirmó la naturaleza ribonucleoproteica del nucléolo y de otras partículas denominadas gránulos pericromatinianos (PCGs), observados por primera vez por Watson en 1962 y de los gránulos intercromatinianos (ICGs) observados por primera vez por Swift en 1958. Además, observó la naturaleza ribonucleoproteica de unos cuerpos nucleares de aproximadamente 0.5 μm de diámetro, a los que llamó cuerpos enrollados o espiralados y que más tarde recibieron el nombre de cuerpos de Cajal debido a que Ramón y Cajal los describió por primera vez en 1903, como cuerpos accesorios del nucléolo, trabajando con el microscopio de luz. Asimismo, Bernhard también observó unas partículas fibrosas, no vistas hasta entonces, a las que denominó fibras pericromatinianas (PCFs) (Figura 5) [43-48].

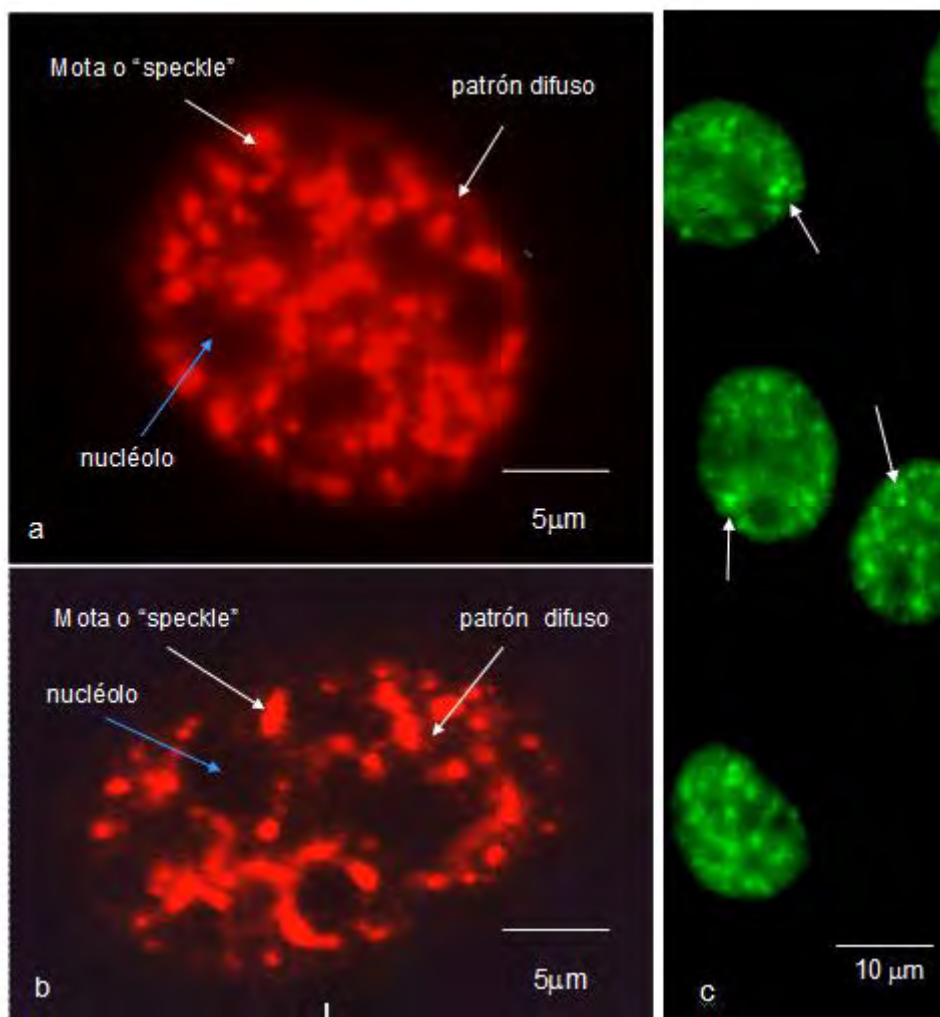


Figura 4. Patrón moteado o *speckled* en células HeLa. observado con microscopía de epifluorescencia (a, c) o microscopía confocal (b). Inmunolocalización contra factores de *splicing* no-snRNPs (factor SC35, a-b) o factores snRNPs (c). Las motas en donde se concentra la marca, están embebidas en un ambiente difuso. En c, además se tiñen los cuerpos de Cajal (flechas). El nucléolo es negativo a la tinción.

Microscopía de luz y electrónica

El uso de métodos de inmunomarcaje fluorescente y ultraestructural de proteínas con anticuerpos y de ácidos nucleicos con hibridación *in situ*, así como la utilización del microscopio confocal para el análisis de muestras fluorescentes permitió más adelante reconocer que el patrón moteado y la ultraestructura fina estaban relacionados. Así, el patrón moteado observado con el microscopio de fluorescencia y con el confocal, corresponde a los gránulos intercromatinianos (motas grandes) y a las fibras pericromatinianas (ambiente difuso de tinción) observadas con el microscopio electrónico de transmisión [39-42].

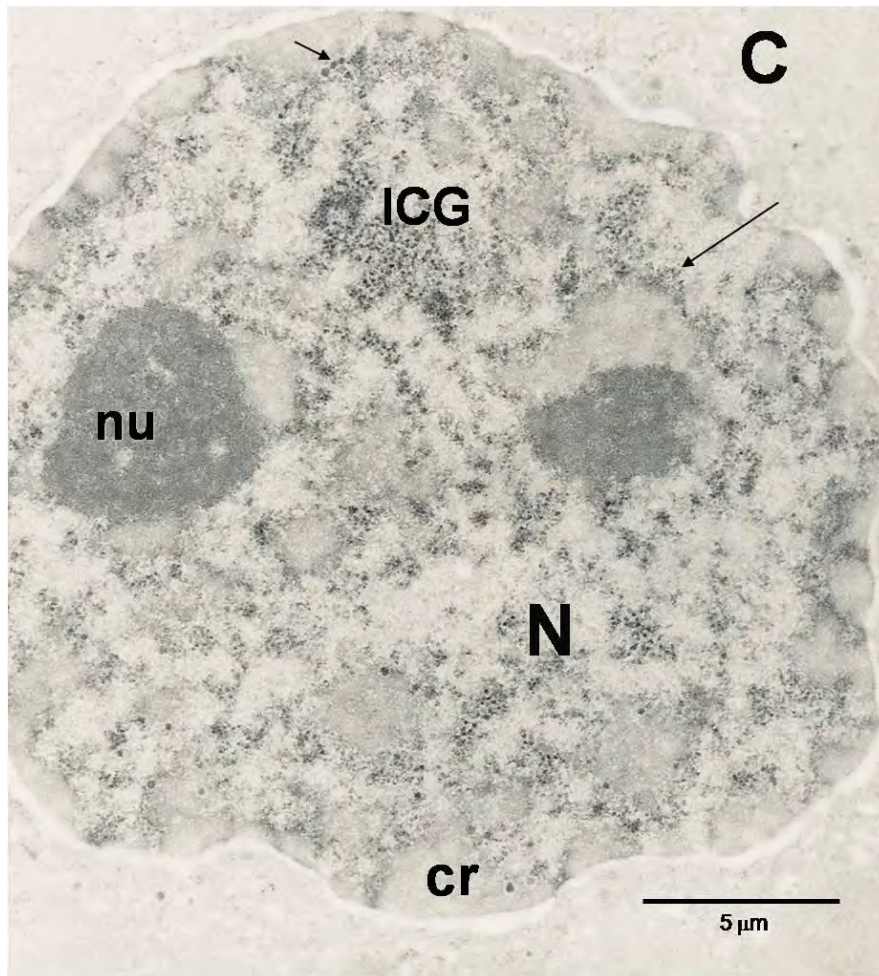


Figura 5. Ribonucleoproteínas intranucleares. Ultraestructura de un núcleo (N) interfásico contrastado con el método de Bernhard para ribonucleoproteínas. La cromatina (cr) es clara. El nucléolo (nu), los gránulos intercromatinianos (ICG), las fibras pericromatinianas (flecha grande) y los gránulos pericromatinianos (flecha pequeña) están formados por RNPs. C, citoplasma. Cortesía de los Dres. G. Vázquez-Nin y O. Echeverría, Facultad de Ciencias, UNAM.

Composición molecular de las partículas nucleares

Los gránulos intercromatinianos (ICG) son estructuras nucleares que se organizan en cúmulos en los espacios intercromatinianos del núcleo, que miden entre 20-25 nm de diámetro y juegan un papel muy importante en el ensamblado, modificación y almacenamiento de proteínas involucradas en el procesamiento del pre-mRNA. Entre los constituyentes de estos gránulos, están partículas ribonucleoproteicas pequeñas nucleares (snRNPs), factores de *splicing* de la familia SR (como el factor SC35) y la subunidad grande de la RNA polimerasa II en su forma hiperfosforilada. Los ICGs han sido sometidos a análisis proteómicos, donde se han podido identificar 146 proteínas. Las proteínas son de diferentes tipos y entre ellas se encuentran las proteínas de la familia SR, que están involucradas en el reconocimiento del RNA y del dominio SR [34, 36, 49]. Se ha observado que si existen una acumulación de factores de *splicing* como el de las proteínas SR hiperfosforiladas en los sitios de síntesis, los ICGs se desensamblan, lo que altera la coordinación entre la transcripción y el *splicing* del pre-mRNA en núcleos de mamíferos [50].

Las fibras pericromatinianas (PCFs) fueron descritas por Monneron y Bernhard (1969) como “la expresión morfológica extranucleolar de la transcripción”. Estas estructuras tienen un diámetro de 3 a 5 nm y están situadas preferencialmente en la periferia de algunos grumos de cromatina compacta. Pueden ser observadas al microscopio electrónico de transmisión, donde son detectadas en sitios de transcripción por la incorporación de uridina tritiada o la 5-bromouridina 5' trifosfatada, lo que nos indica la presencia de transcritos nacientes [34, 40, 41, 43-48]. Se ha visto que hay una relación directa en la densidad de estas estructuras con el rango de síntesis de pre-mRNA, además de que puede ser estimulada o inhibida por la acción de varios tipos de drogas y hormonas. Aunado a esto, en estudios bioquímicos y de autorradiografía para ubicar los sitios de transcripción, se ha observado que las PCF migran hacia los espacios intercromatinianos mientras el RNA inicia la maduración.

Los cuerpos de Cajal fueron observados por primera vez por Ramón y Cajal en 1903, quien los describió como cuerpos accesorios del nucléolo. Fueron re-descritos ultraestructuralmente por Monneron y Bernhard (1969) como agregados esféricos de 0.3- 0.5 μm de diámetro, contrastados por el procedimiento de acetato de uranilo, EDTA y citrato de plomo y están formados por fibras de 40-60 nm de espesor, localizados en la zona intercromatiniana, sin relación aparente con el nucléolo. Los cuerpos de Cajal contienen moléculas que participan en la biogénesis del RNA nuclear. Hay evidencias que sugieren que tienen un papel en la modificación y ensamblaje de snRNPs. También se encuentran snoRNPs, involucradas en el procesamiento del rRNA. Sin embargo, existe la dificultad de identificar su actividad enzimática, debido a que sus componentes no son del todo específicos. En estos cuerpos se han localizado: fibrilarina (proteína específica del nucleolo), p80 coilina (específica de este cuerpo) y factores de *splicing* (U1, U2, U4, U6, y U5), así como el U3snRNA nucleolar, (precursores del U14 en plantas). Estas estructuras se disgregan durante la mitosis y se ensamblan de nuevo durante la fase G1 del ciclo celular [34, 40-44, 46, 48, 51].

Dinámica intranuclear de los factores de *splicing*

Desde que Spector [37] encontró que las motas o *speckles* contienen gran cantidad de factores de *splicing*, se pensó que tal vez ese podría ser el sitio en donde ocurre este proceso. Sin embargo, las motas o *speckles* del patrón moteado no son un sitio donde se incorpore rápidamente uridina tritiada o bromouridina, lo que indica que la transcripción no ocurre ahí. Por otro lado, en la periferia o ambiente difuso en el que se encuentran embebidas sí hay transcripción. Como la transcripción y el *splicing* están acoplados y en realidad el *splicing* es un evento cotranscripcional, se descarta que éste ocurra en las motas pero sí en la parte difusa. Más aún, para los sitios del patrón moteado al que se asocian los transcritos de pre-mRNA y de mRNA, se llevaron a cabo experimentos en los que se infectaron células HeLa con adenovirus-2. Los adenovirus infectan células de primates en un ciclo lítico que dura entre 24 y 36 horas aproximadamente. En la fase temprana (E) se producen varios transcritos, pero destaca el de la proteína E1A. Durante la fase tardía (L) se produce la unidad de transcripción mayor tardía (MLTU, por sus siglas en inglés). Esta unidad de transcripción puede producir hasta 14 distintos mRNAs maduros por *splicing* alternativo y de hecho, en este tipo de virus se descubrió la presencia de genes partidos y el *splicing* en 1977. Volviendo a los experimentos mencionados, conforme transcurría el tiempo de infección, los transcritos virales –y el DNA de una hebra detectados por hibridación *in situ* ocupaban varios sitios dentro del núcleo. Sin embargo, no ocupaban los territorios del patrón moteado sino que los factores de *splicing*, es decir, el patrón moteado se reorganizaba. Esto sugirió que por el contrario, los factores de *splicing* se desplazaban hacia los sitios de producción de RNA viral, generando nuevos dominios de actividad de transcripción y de *splicing*. Adicionalmente, la transfección transitoria de células COS-1 con el gen de β -tropomiosina (que normalmente no lo expresa) corroboró la reorganización de factores de *splicing* conforme transcurría el tiempo de transfección. Entonces se sugirió la hipótesis de que los factores de *splicing* debían moverse hacia los sitios de transcripción mediante un mecanismo de reclutamiento [52].

Posteriormente se encontró que la inhibición de la transcripción por drogas y del *splicing* por microinyección de oligonucleótidos contra un U1snRNA también producían un re-arreglo en el patrón moteado [53-55], así como la presencia de intrones determina también ese reclutamiento [55]. El reclutamiento de factores de *splicing* a sitios de transcripción activa dependía además de la fosforilación tanto de los factores de *splicing*, como del dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II, que mantiene un acoplamiento molecular [56-71]. Los procesos de transcripción y *splicing* del pre-mRNA están espacial y temporalmente coordinados, y la fosforilación de las proteínas regula la actividad y la localización subnuclear de los factores de *splicing* del pre-mRNA en los subcompartimientos nucleares. Se ha comprobado que la sobreexpresión de la cinasa CLK/STY provoca la redistribución de factores de *splicing* de un patrón moteado a un patrón difuso y cuando la RNA pol II es inhibida, los factores de *splicing* snRNPs y no snRNPs se redistribuyen en motas redondas, lo cual indica que los factores se almacenan. Más adelante, se transfectaron células con una construcción molecular que incluía al gen del factor de *splicing* SF2/ASF y la proteína verde fluorescente (GFP) y se registraron los movimientos mediante video. Los resultados indicaron que los factores de *splicing* se movían intensamente en el núcleo celular y su morfología y movimiento dependían de la actividad de transcripción de la célula [72-73].

De manera similar, la distribución de los factores de *splicing* durante la mitosis se podría explicar por el movimiento de éstos durante períodos de transcripción activa e inactiva. Más aún, el fenómeno de movimiento de factores de procesamiento hacia sitios de transcripción activa parece aplicarse a la maduración del pre-rRNA, pues durante la nucleogénesis en la etapa de telofase durante la mitosis, los factores de maduración del pre-rRNA en forma de cuerpos prenucleolares, se asocian con las regiones organizadoras del nucléolo (NOR) que se encuentran en actividad de transcripción intensa [74].

El patrón moteado en tejidos

Además de presentarse un patrón intranuclear moteado para los factores de *splicing* en células en cultivo, George en 2002, encontró durante sus estudios de doctorado que este patrón también se presenta en el núcleo de células que se encuentran formando parte de un tejido en varios órganos estudiados, como el hígado, el páncreas y el útero [75]. Además, la morfología celular de este patrón moteado en tejidos depende de la actividad de transcripción y del *splicing*. En efecto, en células epiteliales del útero de rata, durante la etapa de estro, cuando el estradiol circulante es muy alto y la actividad transcripcional por lo mismo es elevada, la morfología del patrón moteado presenta motas irregulares embebidas en un ambiente difuso. Por el contrario, durante la etapa de diestro, cuando el estradiol circulante está en su nivel más bajo y por ello la actividad de transcripción y *splicing* es muy baja, el patrón moteado adquiere las características de un patrón en donde las motas son muy redondas y el ambiente de tinción difusa es bajo (Figura 6). Más aún, en células epiteliales de ratas a las que se les ha eliminado los ovarios, los núcleos son similares a los que se presentan en etapa de diestro, con motas muy redondas y un ambiente difuso muy escaso. El patrón cambia rápidamente si se activan la transcripción y el *splicing* por inyección de 17β -estradiol [75], similar a lo que ocurre en células en cultivo.

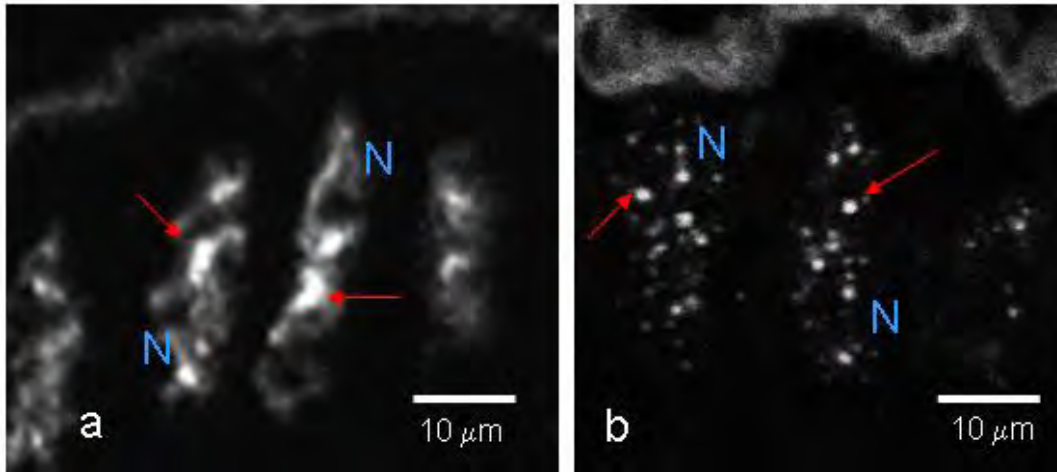


Figura 6. Organización celular de factores de *splicing* en el núcleo de células epiteliales de endometrio de rata. En los núcleos (N) de células en (a) proestro, las motas son irregulares en forma (flechas), mientras que en células en (b) diestro, son redondas.

Un modelo para la biología celular del *splicing*

Un modelo para el *splicing in situ* incluye la presencia de un patrón moteado conformado por motas irregulares con gran cantidad y actividad de movimiento de factores de *splicing* que se encuentran almacenados ahí. Los factores se mueven por fosforilación del dominio RS hacia sitios de transcripción por acoplamiento con la fosforilación del CTD de la RNA polimerasa II. En este caso, las motas son irregulares. Si se defosforilan, los factores regresan a las motas. En ausencia de transcripción y *splicing* el patrón moteado pierde la parte difusa y las motas son redondas (Figura 7).

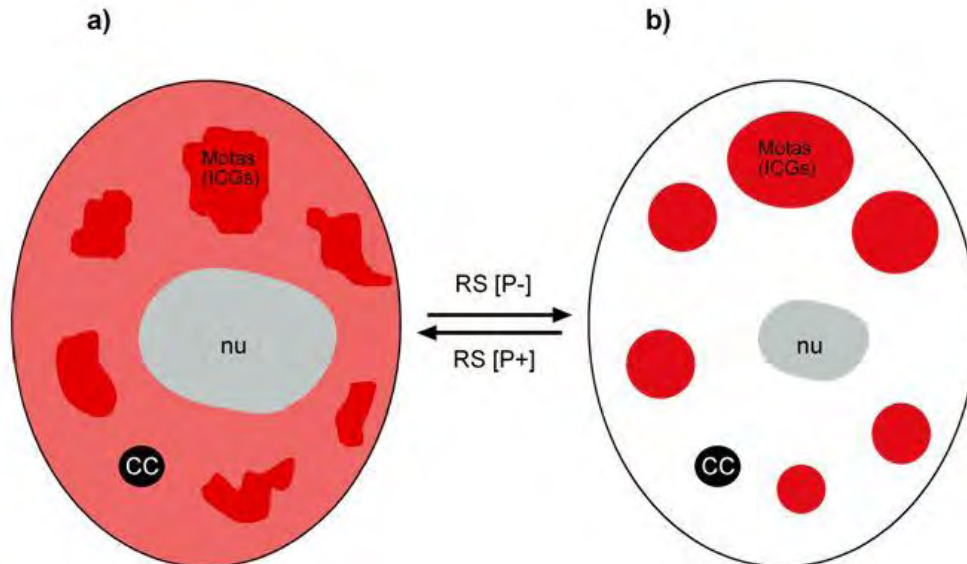


Figura 7. Modelo de la organización intranuclear de los factores de *splicing* en células con actividad transcripcional y de *splicing* activas (a) e inactivas (b). Los factores de *splicing* fosforilados producen patrón moteado (rojo brillante) y difuso (color rojo opaco), mientras que defosforilados producen un patrón moteado que pierde la parte difusa. ICGs, gránulos intercromatinianos; nu, nucléolo; CC, cuerpos de Cajal.

Referencias

1. Chow, L.T., Gelinas, R.E., Broker, T.R. and Roberts, R. J. (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12, 1-8.
2. Berget, S.M., Moore, C. and Sharp, P.A. (1977). Splicing segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 3171-3175.
3. Scherrer, K., Latham, H. and Darnell, J.E. (1963). Demonstration of an unstable RNA and of a precursor to ribosomal RNA in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 49, 240
4. Gilbert, W. (1978). Why genes in pieces? *Nature* 271, 501.
5. Reed, R. (2000). Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 340-345.
6. Hastings, M.L., and Krainer, A.R. (2001). Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 302-309.
7. Brow, D. A. (2002). Allosteric cascade of spliceosome activation. *Annu Rev Genet* 36, 333-60.
8. Lewin, B. (2008). *Genes IX*. Jones and Bartlett, Boston.
9. Eran, M., and T. Misteli. (2005). Splicing Misplaced. *Cell* 122, 317-318.
10. Fu, X.D. (1995). The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA* 7, 663-680.
11. Fu, X.D., and Maniatis, T. (1990). Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature* 343, 437-441.
12. Fu, X.D., and Maniatis, T. (1992). Isolation of a complementary DNA that encodes the mammalian splicing factor SC35. *Science* 256, 535-8.
13. Ge, H., and Manley, J.L. (1990). A protein factor, ASF, controls alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. *Cell* 62, 25.
14. Graveley, B.R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* 6(9), 1197-211.
15. Gui, J.F., Lane, W.S., and Fu, X.D. (1994). A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature* 369, 678-682.
16. Jurica, M., and Moore, M. (2002). Capturing splicing complexes to study structure and mechanism. *Methods* 28, 336-345.
17. Krainer, A.R., and Maniatis, T. (1985). Multiple factors including the small nuclear ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* 42, 725-736.
18. Krainer, A.R., Conway, G.C., and Kozak, D. (1990). Purification and characterization of SF2, a human pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev*, 6, 837.
19. Krämer, A., Keller, B.W., Appel, K., and Lührmann, R. (1984). The 5' terminus of the RNA moiety of U1 small nuclear ribonucleoprotein particles is required for the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* 38, 299-307.
20. Krämer, A., and Utans, U. (1991). Three protein factors (SF1, SF3 y U2AF) function in pre-splicing complex formation in addition to snRNPs. *EMBO* 10, 1503.
21. Krämer, A. (1996). The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Ann Rev Biochem* 65, 367-409.
22. Tacke, R., Chen, Y., and Manley, J.L. (1997). Sequence-specific RNA binding by an SR proteins requires RS domain phosphorylation: Creation of and SRP40-specific splicing enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 1148-1153.
23. Tacke, R., Manley, J.L. (1999). Determinants of SR protein specificity. *Curr Opin Cell Biol* 3, 358-62.
24. Trigon, S., Serizawa, H., Conaway, J.W., Conaway, R.C., Jackson, S.P., and Morange, M. (1998). Characterization of the residues phosphorylated in vitro by different C-terminal domain kinases. *J Biol Chem* 273(12), 6769-75.
25. Wang, J., Xiao, S.H., and Manley, J.L. (1998). Genetic analysis of SR protein ASF/SF2: Interchangeability of RS domains and negative control of splicing. *Genes Dev* 11, 334-344.
26. Will, C.L., and Luhrmann, R. (2001). Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 3, 290-301.

27. Yeackley, J.M., Tronchere, E., Olesen, J., Dyck, J.A., Wang, H.Y., and Fu, X.D. (1999). Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine rich pre-mRNA splicing factors. *J Cell Biol* 145, 447-455.
28. Zamore, P.D., and Green, M.R. (1989). Identification, purification and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 9243.
29. Zhang, G., Taneja, K.L., Singer, R.H., and Green, M.R. (1994). Localization of pre-mRNA splicing in mammalian nuclei. *Nature* 372, 809-812.
30. Zhou, Z., Lawrence, J.L., Gygi, S.P., and Robin, R. (2002). Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome *Nature* 419, 182-185.
31. Hall, L.L., Smith, K.P., Byron, M., and Lawrence, J.B. (2006). Molecular Anatomy of a Speckle. *The Anatomical Record Part A*, 288A, 664-675.
32. Handwerger, K.E., and Gall, J.G. (2006). Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Cell Biology* 16 (1), 19-26.
33. Huang, S., and Spector, D.L. (1992). U1 and U2 small nuclear RNAs are present in nuclear speckles. *PNAS USA* 89, 305-308.
34. Lamond, A.I., and Spector, D.L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Bio* 4, 605-612.
35. Mintz, P.J., and Spector, D.L. (2000). Compartmentalization of RNA processing factors within nuclear speckles. *J Struct Biol* 129, 241-251.
36. Saitoh, N., Spahr, C.S., Patterson, S.D., Bubulya, P., Neuwald, A.F., and Spector, D.L. (2004). Proteomic analysis of interchromatin granule clusters. *Mol Biol Cell* 15, 3876-3809.
37. Spector, D.L., Schrier, H., and Busch, W.H. (1983). Immunoelectron microscopic localization of snRNPs. *Biol Cell* 49, 1-10.
38. Spector, D.L. (1990). Higher order nuclear organization: three-dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 147-151.
39. Spector, D.L., Fu, X.D., and Maniatis, T. (1991). Associations between distinct pre mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO* 10, 3467-3481.
40. Spector, D.L. (1993). Macromolecular domains within the cell nucleus. *Ann Rev Cell Biol* 9, 265-315.
41. Spector, D.L. (2001). Nuclear domains. *J Cell Sci* 114, 2891-2893.
42. Spector, D.L. (2006). Cellular bodies. *Cell* 127, 1070.
43. Fakan, S. (1994). Perichromatin fibrils are in situ forms of nascent transcripts. *Trends Cell Biol* 4, 86-90.
44. Fakan, S., Lesser, G., and Martin, T.E. (1984) Ultrastructural distribution of nuclear ribonucleoproteins as visualized by immunocytochemistry on thin sections. *J Cell Biol* 98, 358-362.
45. Fakan, S., and Puvion, E. (1980). The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. *Int Rev Cytol* 65, 255.
46. Monneron, A., and Bernhard, W. (1969). Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J Ultrastruct Res* 27, 266-288.
47. Puvion, E., and Puvion-Dutilleul, F. (1996). Ultrastructure of the nucleus in relation to transcription and splicing: roles of perichromatin fibrils and interchromatin granules. *Exp Cell Res* 229, 217-225.
48. Vázquez-Nin, G.H., Echeverría, O.M., and Jiménez-García, L. El núcleo celular Interfásico. En *Biología Celular y Molecular*, Jiménez-García, L.F. y Merchant, H. Prentice Hall, México. 341-394.
49. Bergman, D.B., Du, L., Van der Zee, S., and Warren, S.L. (1995). Transcription-dependent redistribution of the large subunit of RNA polymerase II to discrete nuclear domains. *J Cell Biol* 129, 287-298.
50. Sacco-Bubulya, P., and Spector, D.L. (2002). Disassembly of interchromatin granule clusters alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing. *J Cell Biol* 156, 425-436.
51. Gall, J.G. (2000) Cajal bodies: the first 100 years. *Ann Rev Cell Dev Biol* 16, 273-300.

52. Jiménez-García, L.F., and Spector, D.L. (1993). In vivo evidence that transcription and splicing are coordinated by a recruiting mechanism. *Cell* 73, 47-59.
53. Spector, D. L., O'Keefe, RT, Jiménez-García, L.F. (1993). Dynamics of transcription and pre-mRNA splicing within the mammalian cell nucleus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58, 799-805.
54. O'Keefe, R.T., Mayeda, C.L., Sadowski, A.R., Krainer, A.R., and Spector, D.L. (1994). Disruption of pre-mRNA splicing in vivo results in reorganization of splicing factors. *J Cell Biol* 124, 249-260.
55. Huang, S., and Spector, D.L. (1996). Intron-dependent recruitment of pre-mRNA splicing factors to sites of transcription. *J Cell Biol* 131, 719-732.
56. Bentley, D., (1999). Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA. *Current Opinion in Cell Biology* 11, 347-351.
57. Cáceres, J.F., Misteli, T., Sreaton, G.R., Spector, D.L., and Krainer, A.R. (1997). Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *J Cell Biol* 138, 225-238.
58. Cho, E.J., Kobor, M.S., Kim, M., Greenblatt, J., and Buratowski, S. (2001). Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Genes Dev* 15(24), 3319-29.
59. Cho, E.J., Takagi, T., Moore, C.R., and Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzymes is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 11, 3319-3326.
60. Cho, E.J., Rodríguez, C.R., Takagi, T., and Buratowski, S. (1998). Allosteric interactions between capping enzyme subunits and the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 15, 3482-7.
61. Dahmus, M.E. (1996). Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 271, 19009-19012.
62. Komarnitsky, P., Cho, E.J., and Buratowski, S. (2000). Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* 14(19), 2452-60.
63. Misteli, T., and Spector, D.L. (1996). Serine/Threonine phosphatase 1 modulates the subnuclear distribution of pre-mRNA splicing factors. *Mol Biol Cell* 7, 1559-1572.
64. Misteli, T., and Spector, D.L. (1997). Protein phosphorylation and the nuclear organization of pre-mRNA splicing. *Trend Cell Biol* 7, 135-138.
65. Misteli, T., and Spector, D.L. (1999). RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. *Mol Cell* 3, 697-705.
66. Misteli, T. (2000). Cell Biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J Cell Sci* 113, 1841-1849.
67. Murray, M., Kobayashi, R., and Krainer, A.R. (1999). The type 2C Ser/Thr phosphatase PP2C γ is a pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev* 13, 87-97.
68. Robert, F., Blanchette, M., Maes, O., Chabot, B., and Coulombe, B. (2002). A human RNA polymerase II-containing complex associated with factors necessary for spliceosome assembly. *J Biol Chem* 277(11), 9302-6.
69. Schroeder, S.C., Schwer, B., Shuman, S., and Bentley, D. (2000). Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes Dev* 14, 2435-40.
70. Reed, R. (2003). Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Current Opinion in Cell Biology* 15, 326-331.
71. Maniatis, T., and Reed, R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416, 499-506.
72. Misteli, T., Cáceres, J.F., and Spector, D.L. (1997). The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* 387, 523-527.
73. Carmo-Fonseca, M., Platani, M., and Swedlow, J.R. (2002). Macromolecular mobility inside the cell nucleus. *Trends in Cell Biol* 12(11), 491-494.
74. Jiménez-García, L.F., Segura-Valdez, M. de L., Ochs, R.L., Rothblum, L.I., Hannan, R., and Spector, D.L. (1994). Nucleogenesis: U3 snRNA-containing prenucleolar bodies move to sites of active pre-rRNA transcription after mitosis. *Mol Biol Cell* 9, 955-966.

75. George-Tellez, R., Segura-Valdez, M.L., González-Santos, L., and Jiménez-García, L.F. (2002). Cellular organization of pre-mRNA splicing factors in several tissues. Changes in the uterus by hormone action. *Biol Cell* 94, 99-108.

Semblanza del Dr. Luis Felipe Jiménez García



El Dr. Luis Felipe Jiménez García es Profesor Titular “C” de tiempo completo en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Es biólogo, maestro y doctor en ciencias de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Realizó su tesis de doctorado en el Departamento de Farmacología del Baylor College of Medicine en el Centro Médico de Texas en Houston. Posteriormente realizó una estancia posdoctoral en el laboratorio de Cold Spring Harbor, en Nueva York. Ha impartido más de 100 cursos de licenciatura y posgrado, dirigido varias tesis de licenciatura, especialidad, maestría y doctorado y ha publicado más de 40 artículos de investigación sobre temas de biología celular y molecular., en particular sobre núcleo celular y nucléolo en revistas como *Cell*, *Molecular Biology of the Cell*, *Experimental Cell Research*, *Journal of Cell Sciences*, entre otras. También ha publicado capítulos de libros como el de *Cells: a laboratory manual*, *Atomic Force Microscopy* de la serie *Methods in Molecular Biology*. Asimismo, ha coordinado la publicación del libro *Biología Celular y Molecular* y el libro de *Conocimientos Fundamentales de Biología*, Ha publicado también los libros de *Hibridación in situ ultraestructural*, *El aparato reticular endocelular de Camillo Golgi*, *Biología Celular y Molecular del Aparato de Golgi*. Obtuvo la Distinción Universidad Nacional en Docencia en Ciencias Naturales. Es investigador Nacional nivel 2 y nivel D del programa PRIDE de la UNAM. Ha sido coordinador de investigación y coordinador general del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias y fundador del actual Departamento de Biología Celular. También fue fundador del laboratorio de Nanobiología Celular de la Facultad de Ciencias. Actualmente es coordinador del programa de posgrado de la Especialidad en Microscopía Electrónica en Ciencias Biológicas de la UNAM y presidente de la Sociedad Iberoamericana de Biología Celular. Fue también presidente de la Sociedad Mexicana de Microscopía. Su área de trabajo es la biología celular y molecular del núcleo y del nucléolo.

Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts

Bruno Carmona-Rodríguez ^a, Marco Antonio Álvarez-Pérez ^a, A. Sampath Narayanan ^b,
Margarita Zeichner-David ^c, José Reyes-Gasga ^d, Juan Molina-Guarneros ^e,
Ana Lilia García-Hernández ^a, José Luis Suárez-Franco ^a, Ivet Gil Chavarría ^a,
Eduardo Villarreal-Ramírez ^a, Higinio Arzate ^{a,*}

^a *Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Odontología, UNAM, Cd. Universitaria, Coyoacán, México, D.F. 04510, Mexico*

^b *Department of Pathology, School of Medicine, UW, Seattle, USA*

^c *Center for Craniofacial Molecular Biology, School of Dentistry, USC, Los Angeles, USA*

^d *Instituto de Física, UNAM, Mexico*

^e *Facultad de Medicina, UNAM, Mexico*

Received 17 April 2007

Available online 11 May 2007

Abstract

We recently presented evidence showing that a human cementoblastoma-derived protein, named Cementum Protein 1 (CEMP1) may play a role as a local regulator of cementoblast differentiation and cementum-matrix mineralization. This protein was shown to be expressed by cementoblasts and progenitor cells localized in the periodontal ligament. In this study we demonstrate that transfection of CEMP1 into human gingival fibroblasts (HGF) induces mineralization and expression of bone and cementum-matrix proteins. The transfected HGF cells had higher alkaline phosphatase activity and proliferation rate and they expressed genes for alkaline phosphatase, bone sialoprotein, osteocalcin, osteopontin, the transcription factor Runx2/Cbfa1, and cementum attachment protein (CAP). They also produced biological-type hydroxyapatite. These findings indicate that the CEMP1 might participate in differentiation and mineralization of nonosteogenic cells, and that it might have a potential function in cementum and bone formation.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Cementum Protein 1 (CEMP1); Mineralization; Human gingival fibroblasts; Bone; Cementum

Cementum is a unique avascular mineralized connective tissue that covers the root dentine and provides the interface through which the root surface is anchored to the collagen Sharpey's fibers of the periodontium. The complex processes that regulate normal cementum metabolism remain unclear to date. Cementum-forming cells (cementoblasts) have the primary function of making and secreting the extracellular matrix proteins required for cementum mineralization. Several proteins have been implicated in the process of cementogenesis; these include collagens types I and III, alkaline phosphatase (ALP) [1,2], phosphopro-

teins like osteopontin (OPN) and bone sialoprotein (BSP), and osteocalcin (OCN) [3,4]. It has been suggested that these phosphoproteins are necessary for the initiation and maturation of crystal formation [5,6].

Recently we isolated and characterized a human Cementoblastoma-derived protein which we referred as Cementum Protein 1 (CEMP1), and CP-23 (GenBank Accession No. [NM_001048212](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001048212); HGNC: ID 32553) [7]. CEMP1 is highly expressed at the protein and mRNA levels in cementoblasts, subpopulations of periodontal ligament cells, as well as in progenitor cells located in the paravascular zone of the periodontal ligament and endosteal spaces of bone [8]. In vitro experiments showed that the CEMP1 promotes cell attachment and differentiation

* Corresponding author. Fax: +52 5556225563.

E-mail address: harzate@servidor.unam.mx (H. Arzate).

[9,10]. This protein has also been implicated in regulating the deposition rate, composition, and morphology of hydroxyapatite crystals formed by putative human cementoblast cells [10]. However, the physiological function of CEMP1 is not clear. The finding that CEMP1 is synthesized by cementoblast cells and by restricted periodontal ligament cell population indicated that CEMP1 may play a role as a local regulator of cell differentiation and extracellular matrix mineralization. We have examined this possibility in this study and we show that overexpression of CEMP1 induces expression of bone and cementum-matrix proteins in nonosteogenic cells such as human gingival fibroblasts.

Materials and methods

Cell culture. Human gingival fibroblasts (HGF) were isolated and grown as previously described [11]. Cells between the 2nd and 5th passage were used for the experiments. The cells were grown in medium with 10% FBS (cell proliferation) or in mineralizing media (10% FBS, 10 mM β -glycerophosphate and 50 μ g/mL of freshly prepared ascorbic acid).

Construction of pcDNA40-CEMP1-6xHis expressing vector and transfection into human gingival fibroblast cells. The coding region of CEMP1 (GenBank Accession No. NM_001048212) was subcloned into the pENTR/SD/D vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). The resultant pENTR/SD/D-CEMP1 cDNA construct was ligated into a pcDNA40 (+) vector (CEMP1-pcDNA40 (+)) with a 6xHis tag-COOH terminal (Invitrogen, Carlsbad, CA). The plasmid, pcDNA40-CEMP1, was transfected into HGF cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Control HGF cells were transfected with pcDNA40 (+) vector. Stably expressing cells were selected with 600 μ g/mL of G418 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) up to eight weeks.

Cell proliferation. To determine whether HGF-CEMP1-pcDNA40 (+) and HGF-pcDNA40 (+) alone have different proliferation rates, cells were plated at 2.5×10^3 into 48-well culture plates and incubated overnight in 10% FBS. Cells were harvested by trypsinization (0.05% trypsin and 0.02% EDTA) and counted in a model ZBI coulter counter (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Cell number was assessed at 0, 24, 48, 72, and 96 h.

Northern blot. Northern blot was performed as described elsewhere [7]. Briefly, RNA was extracted using an Oligotex Direct mRNA Mini Kit (Quiagen, Valencia CA). Five micrograms of mRNA was size-fractionated by electrophoresis, transferred onto N^+ nylon membranes and UV-crosslinked. The blots were pre-hybridized at 68 °C and hybridized overnight with a full length CEMP1 cDNA probe, DIG-labeled (500 ng/mL). Blots were washed twice, 5 min each in $2 \times$ SSC ($1 \times$ SSC: 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7.0, 0.1% SDS) and twice 5 min each in $0.1 \times$ SSC/0.1% SDS at 68 °C. DNA–RNA hybrid, was detected with anti-DIG-AP conjugated antibody (1:10,000 diluted). Signal detection was performed with CDPStar (Boehringer Mannheim, Germany) ready to use. They were then exposed to X-ray films.

In situ hybridization. HGF-CEMP1-pcDNA40 (+) and HGF-pcDNA40 (+) cells cultured as described above were plated at low density (5×10^2) in 8-well Lab-Tek chamber slides and cultured for 3 days. Slides were treated with Proteinase K (20 μ g/mL) for 30 min, washed in PBS, fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h, and washed with 0.1 M triethanolamine (TEA), pH 8.0; with acetic anhydride in 0.1 M TEA, pH 8.0, followed by PBS. The antisense and sense digoxigenin (DIG)-labeled CEMP1RNA probes were synthesized according to the labeling protocol in a kit (DIG Labeling Kit; Roche). Sections were prehybridized for 1 h at 68 °C and then incubated with Dig-labeled probe overnight at 68 °C, followed by a stringency wash. Hybridization signal was detected with alkaline phosphatase conjugated anti-Dig and visualized with NBT/BCIP (Roche) under a light microscope [12].

Mineralization assays. HGF-CEMP1-pcDNA40 (+) and HGF-pcDNA40 (+) were plated at high density (2×10^5) in 24-well plates and

allowed to attach for 1 day. Cells were treated with DMEM medium supplemented with 10% FBS and mineralizing media. Cells were cultured for 3, 7, and 14 days. At each term the cells were fixed in 96% ethanol for 10 min, and insoluble calcium nodules were detected using a saturated solution of Alizarin red S pH 4.2 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Residual stain was removed with PBS and the presence of nodules was documented by light microscopy.

Energy-dispersive X-ray micro-analysis. The composition of the mineral in the extracellular matrix formed by HGF-CEMP1-pcDNA40 (+) and HGF-pcDNA40 (+) was analyzed by means of a Leica-Cambridge 440 scanning electron microscope fitted with a Pentafet energy-dispersive X-ray micro-analysis microprobe. All analyses were carried out at 20 kV for 300 s [13].

Alkaline phosphatase activity. HGF-CEMP1-pcDNA40 (+) and HGF-pcDNA40 (+) cells were plated at 2×10^4 in 24-well culture plates and cultured for 3, 7, and 14 days in the conditions described above. Alkaline phosphatase activity (ALP) was determined as described by Lowry et al., [14]. The activity was expressed as nanomoles of *p*-nitrophenol per minute per milligram of protein. Protein content was determined using BSA as standard as described elsewhere [15].

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). HGF-CEMP1-pcDNA40 (+) and HGF-pcDNA40 (+) cells were plated in six-well plates at 5×10^4 density, and cultured described above. Total cellular RNA was isolated using RNeasy Mini Kit (Quiagen, Valencia CA, USA) as previously described [16]. One μ g of total RNA was used to perform one-step RT-PCR (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol during 35 cycles in a thermal cycler (MJ Research, Watertown, MA, USA). Previously published primer sequences and reaction conditions were used for amplification of the following molecules: ALP, OCN, OPN, COL I, BSP, Cbfa1 [16], GAPDH, CEMP1 [7], and CAP. The β -actin was used as internal control under the same conditions.

Western blot. Human gingival fibroblasts (HGF-CEMP1-pcDNA40 (+) and HGF-pcDNA40 (+) alone) were treated as described above and cultured during 3, 7, and 14 days and conditioned media collected as described elsewhere [8]. At term, Phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM), 5 μ M leupeptin and 10 μ g/ml aprotinin were added to the conditioned media. Total protein concentration was determined using BSA as a standard as described elsewhere [15]. Equal amounts of total protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with rabbit antiserum to human recombinant CEMP1 antibody, mouse anti-6xHis (C-term) monoclonal antibody HRP, goat anti-human alkaline phosphatase, mouse anti-bovine CAP (3G9), rabbit anti-human OPN (LF-123), rabbit anti-human BSP (LF-100), both a gift from Dr. Larry W. Fisher (NIH, Bethesda, MD, USA), and mouse anti-human OCN. Peroxidase-conjugated-goat-anti rabbit or goat anti-mouse IgG were used and secondary antibody detection was performed using enhanced chemiluminescent HRP substrate (Millipore, Billerica, MA). The reference protein (GAPDH) was used as internal control.

Statistical analysis. Data were analyzed using Student's *t* test. Data were shown as means \pm SE from at least three independent experiments. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses were performed with Sigma Stat V 3.1 software (Jandel Scientific Ashburn, VA).

Results

Expression of CEMP1 in human gingival fibroblast cells

Cells transfected with CEMP1 contained a band of approximately 5.0 Kb size, and this band was not present in mRNA obtained from HGF cells transfected with empty pcDNA40 vector (Fig. 1A). *In situ* hybridization using an antisense probe corresponding to the coding sequence of human CEMP1 revealed high-level expression in the

transfected HGF (Fig. 1B-a). No expression was found in cells transfected with pcDNA40 empty vector (Fig. 1B-b).

Western analysis using an anti-6XHis monoclonal antibody (Fig. 1C, lane 2), and a polyclonal antibody against hrCEMP1 (Fig. 1C, lane 4) revealed the presence of a protein migrating with ~50 kDa protein corresponding to the molecular size of CEMP1.

Cell proliferation

To determine if expression of CEMP1 affected HGF proliferation, we measured the rate of proliferation. The HGF expressing CEMP1 proliferated at higher rate at all times tested, and the rate was ~2-fold as much as cells transfected with the empty vector (Fig. 2A).

CEMP1 expression induces mineralization phenotype

HGF transfected with CEMP1-pcDNA40 (+) and control HGF were cultured in mineralizing media and examined by Alizarin red S staining. Calcium nodules characteristics of “mineralizing-like” cells were detected in cells expressing CEMP1 (Fig. 2B-a, b, and c). They were not detected in control HGF cells transfected with the empty vector (Fig. 2B-d, e, and f). We determined the composition and Ca/P ratio of the mineralized extracellular matrix deposited. HGF expressing CEMP1 revealed prominent energy peaks for calcium and phosphorous similar to

those for biological apatite (Fig. 3A). HGF-CEMP1 cells had 68, 70, and 63 atomic percentage of Ca^{2+} at 3, 7, and 14 days of culture respectively, whereas phosphorous represented 24, 21, and 32 atomic percentage. The Ca/P ratio values were of 1.7, 1.2, and 1.9 at 3, 7, and 14 days of culture, respectively, and correspond well with the biological hydroxyapatite value. Control cultures showed negligible amounts of Ca^{2+} (0.7, 0.0, and 0.25 at 3, 7, and 14 days, respectively); whereas phosphorous represented 0.31, 0.36, and 0.99 of atomic percentage at 3, 7, and 14 days of culture. The Ca/P ratio represented 0.2, 0.0, and 0.1 at 3, 7, and 14 days of culture.

CEMP1 expression promotes alkaline phosphatase activity in human gingival fibroblast cells

ALP activity of cells expressing CEMP1 after 3, 7, and 14 days was of 4, 5, and 4.5-fold as much as controls (Fig. 3B). These differences were statistically significant ($P < 0.001$, $n = 3$).

Characterization of the phenotype expressed by HGF cells expressing CEMP1

Since HGF cells transfected with CEMP1 showed a mineralized-like cell phenotype, we limited our analysis to genes that have been associated with as bone and cementum. One-step RT-PCR using primers for the housekeep-

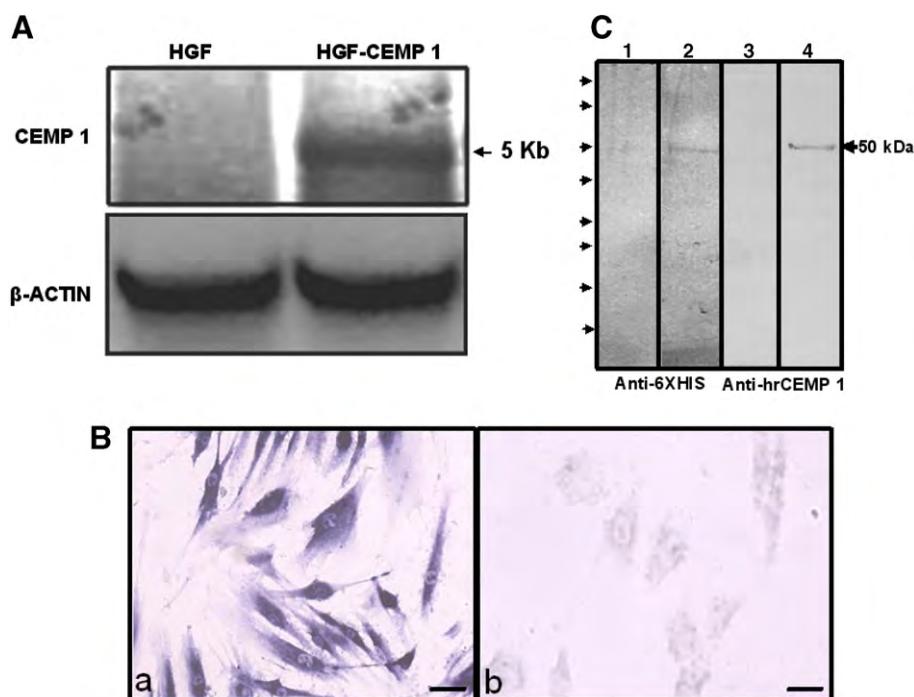


Fig. 1. Northern blot confirmed that HGF were stably expressing CEMP1 mRNA protein after transfection and cell selection with G418 were performed (A). CEMP1 mRNA transcripts are only expressed in HGF (B-a). Human gingival fibroblasts transfected with empty pcDNA40 vector do not express CEMP1 transcripts (B-b). Bar = 100 μm . Western blots for 6XHis-COOH and CEMP1. HGF transfected with CEMP1 protein expressed a 50 kDa species (C, lanes 1 and 3, respectively, for anti-6XHis-COOH and anti-CEMP1). HGF transfected with pcDNA40 empty vector were negative with the antibodies tested (C, lanes 1 and 3, respectively, for anti-6XHis-COOH and anti-CEMP1). Arrows from top to bottom indicate 250, 148, 60, 52, 42, 30, 17, and 6 kDa.

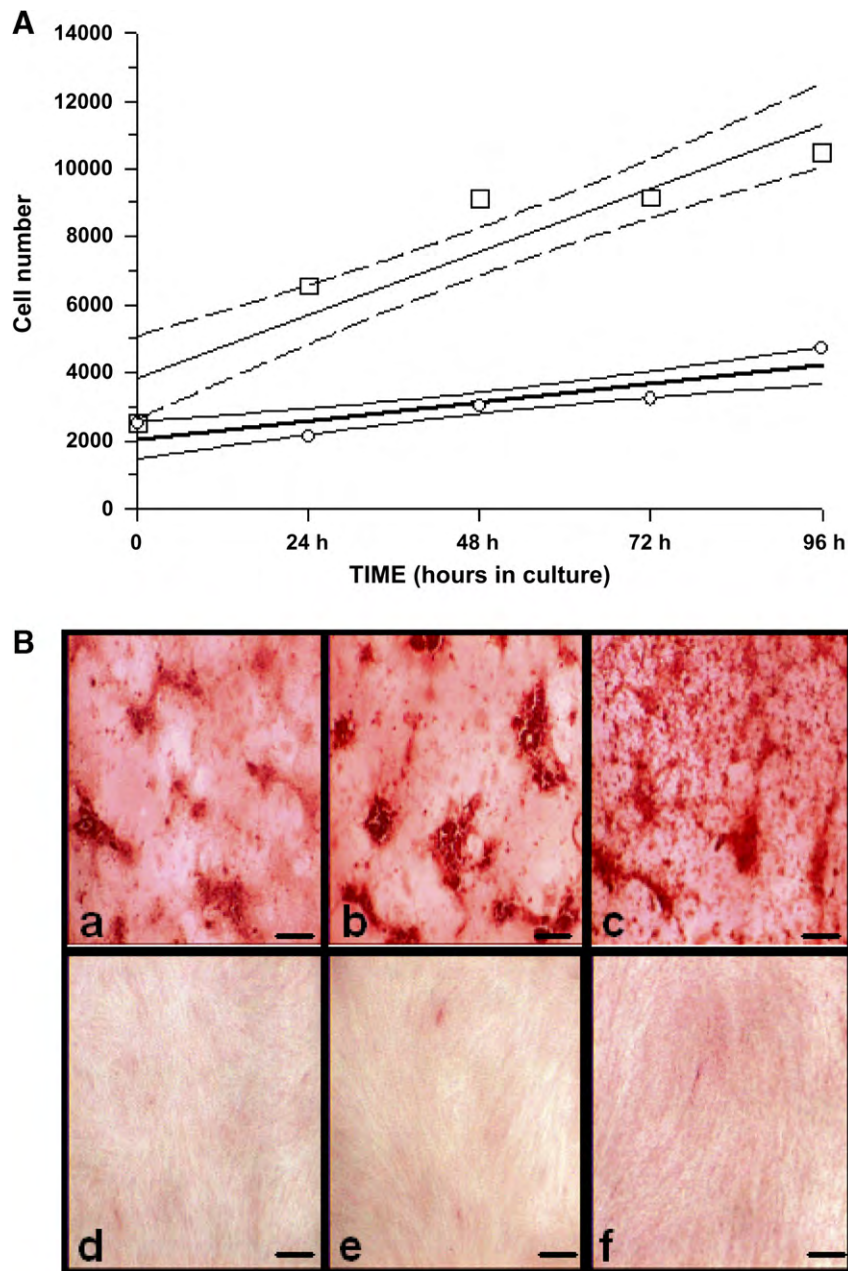


Fig. 2. (A) Transfection and stable expression of human CEMP1 on HGF enhances their proliferation rate. Human gingival fibroblasts expressing CEMP1 gene (□) showed a linear growth which was drawn (correlation coefficient $r=0.90$) and the regression equation was computed ($y = 1852(x) + 3854$). The 95% confidence intervals are shown (dashed lines). Human gingival fibroblasts transfected with empty vector (○) showed the same linear growth (correlation coefficient $r = 0.81$) and the regression equation was computed ($y = 547(x) + 2012$). The 95% confidence intervals are shown (solid lines). (B) CEMP1 protein expression promotes calcium nodule formation by human gingival fibroblasts. Panel of HGF transfected with CEMP 1, cultured for 3, 7, and 14 days and stained with Alizarin red S to detect insoluble calcium nodules (B-a, b, and c). Control HGF transfected with empty pcDNA40 vector stained as described (B-d, e, and f for 3, 7, and 14 days of culture respectively). Bar = 100 μm .

ing gene GAPDH along with primers for the gene being analyzed were used. Fig. 4A shows that, as expected, the only mRNA expressed by HGF cells is collagen type I, with the exception of a slight band of alkaline phosphatase after 14 days in culture. All “mineralized-tissue” markers tested were expressed in CEMP1 transfected HGF at all stages tested. CAP mRNA was strongly expressed after 3 days in culture. The bone specific transcription factor and mineralizing marker Cbfa1 was also expressed in these cells

and the level of expression was similar at 3, 7, and 14 days of culture.

Western blot

We performed Western blots to determine if expression of mRNAs is associated with protein production. Fig. 4B shows that with the results obtained using RT-PCR analysis, the CEMP1-transfected cells express ALP, BSP, CAP,

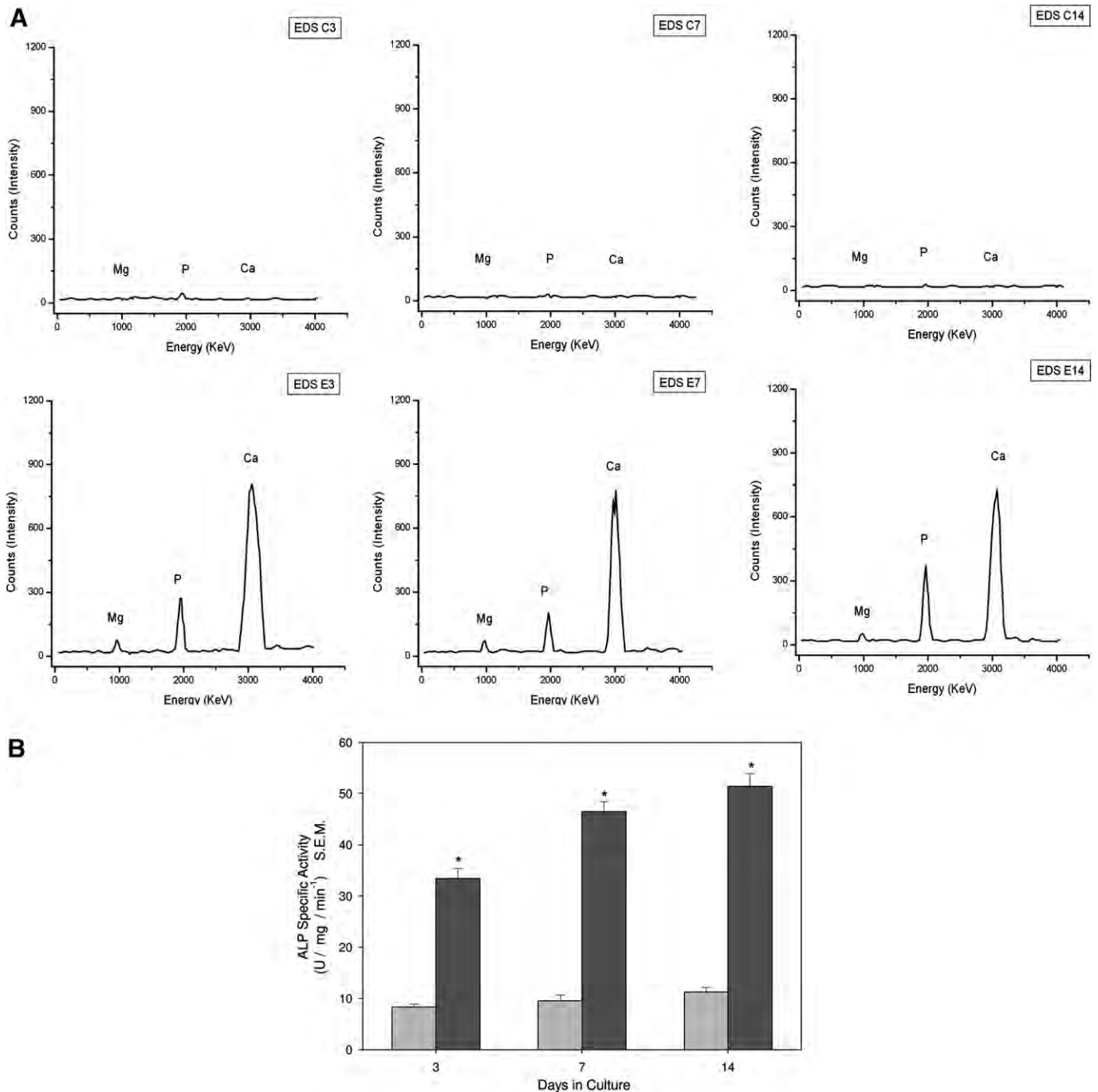


Fig. 3. Representative energy-dispersive X-ray microanalysis spectrum of mineralized areas of control HGF cultured for 3, 7, and 14 days (A, upper panel) transfected with pcDNA empty vector. Prominent energy peaks for calcium and phosphorous similar to those for biological hydroxyapatite were determined in mineralized selected areas of HGF transfected with CEMP1 at 3, 7, and 14 days of culture (A, lower panel). (B) ALP specific activity determined by biochemical method in HGF transfected and stably expressing CEMP1 had ALP activity by, 4, 4.5, and 5-fold higher (■) compared to HGF transfected with pcDNA empty vector (□) at 3, 7, and 14 days of culture, respectively ($n = 3$). * $P < 0.001$.

CEMP1, OCN, and OPN at all days tested. These proteins were not detectable in the control HGF. OCN levels were at maximum value at the end of 14 days. CAP, a protein shown to be expressed in cementum, and CEMP1 were also present at all culture times, reaching highest levels after 14 days.

Discussion

Our data show that HGF overexpressing CEMP1 express ALP, OCN, BSP, and CAP. Because these proteins are not present in untransfected cells in significant levels, our results indicate that transfection of CEMP1 induces

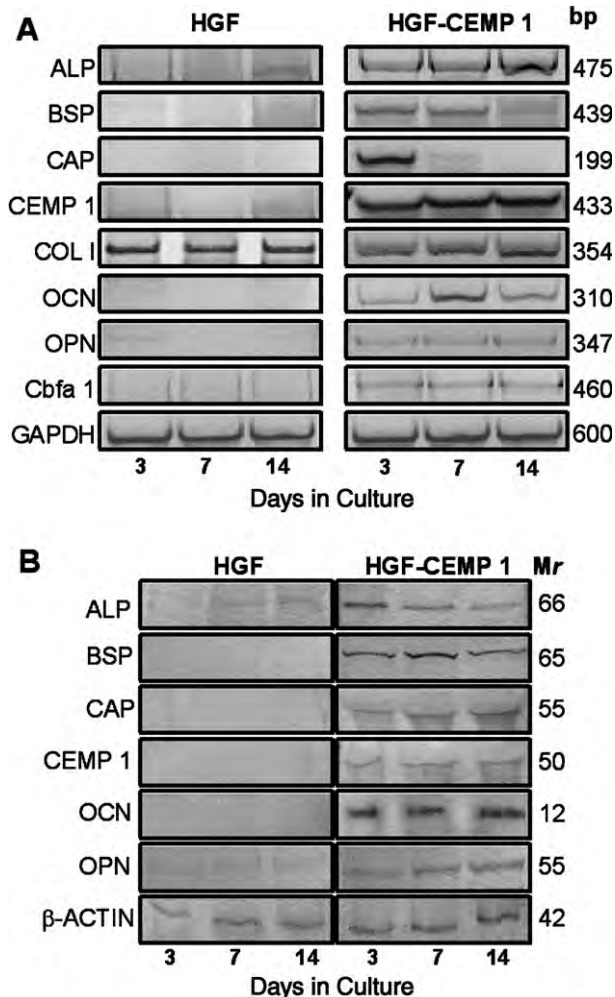


Fig. 4. Representative image of RT-PCR analysis of extracellular matrix mRNA expression in both HGF-CEMP1-pcDNA40 (+) and HGF-pcDNA40 (+) alone. ALP, BSP, CAP, type I COL, CEMP1, OCN, and OPN, molecules characteristic of osteoblastic and cementoblastic phenotype (A). (B) Genetically modified human gingival fibroblasts secrete cementum and bone-associated molecules. Western blot analyses of ALP, BSP, CAP, CEMP1, OCN, and OPN expression. Molecules were detected in the conditioned medium. Analyses were performed at 3, 7, and 14 days of culture.

expression of these proteins. These results are consistent with the possibility that the CEMP1 participates in the mineralization process of human putative cementoblasts in vitro [10]. They also explain the wide distribution of CEMP-1 throughout cementum and its expression by putative cementoblastic populations in vivo and in vitro [7,8].

We examined a wide variety of genes involved in mineralization. Transfection of CEMP1 resulted in induction of ALP activity. This early-stage differentiation marker, increased significantly, indicating that CEMP1 expression may stimulate differentiation to a “mineralizing-like” cell phenotype and its increase is also associated to the continuous growth of cementum [17]. The possibility that addition of organophosphates such as β -glycerophosphate to the cultures alone is responsible for the mineralization is

excluded because CEMP1 transfected HGF produced biological-type hydroxyapatite, as revealed by the prominent energy peaks for Ca^{2+} and P and Ca/P ratios similar to those for biological apatite [18]. Furthermore, HGF transfected with vector alone did not produce the hydroxyapatite crystals.

Proteins such as OCN, BSP, and OPN which have affinity for the mineral phase that control the nucleation; crystal growth and mineral maturation of the apatite crystals were also expressed. Maximum levels of BSP expression occur during initial stages of mineralization and diminish at the onset of mineralization [19]. Osteocalcin reached highest expression level at the initial stages of the mineralization process; however, protein levels increased in a time-dependent manner and reached maximum level at the onset of mineralization, indicating that it probably acts as a promoter and as inhibitor/moderator of mineralization [20]. In contrast, OPN mRNA maintained low expression levels during the initial culture period and decreased at the mineralization stage. However, OPN protein level manifested time dependent increase. Expression of type I collagen mRNA was higher in control HGF at the early stage of culture and then became similar to the CEMP1 transfected HGF cells at later days in culture. These results support the concept that in matrix-mediated mechanisms for mineral formation, type I collagen defines the framework for mineral deposition, and by itself is not sufficient to support nucleation of hydroxyapatite [21]. From these results we infer that CEMP1 expression in HGF cells provides a microenvironment that favors calcium crystallization mainly by the participation of acidic proteins such as OPN, BSP, and OCN.

CEMP1 also induces Cbfa1 expression. The Cbfa1 is a transcription factor necessary for mineralization of bone and cartilage [22]. It was expressed at the mRNA level at all time points tested in CEMP1 transfected HGF although, 2-fold higher levels of expression were observed at middle stages of mineralization. Although Cbfa1 has been thought of as an osteoblast-specific factor, its expression has been detected in odontoblasts, periodontal ligament cells and cementoblasts [23]. This molecule plays an important role in early specification of the mineralizing cell phenotype and our results indicate that CEMP1 regulates expression of Cbfa1. The finding that CAP was expressed at the mRNA and protein levels through the culture terms indicates that CEMP1 may regulate CAP expression during the mineralization, suggesting that it may be a positive regulator of the mineralization process. This is consistent with the recent findings showing that human-derived cementoblasts express CEMP1 [24]. Expression of CEMP1 also increases proliferation. Increased proliferation upon expression of a gene not normally expressed in cells appears to be a common phenomenon, because the expression of osterix in NIH3T3 fibroblasts and bone marrow stromal cells results in an increased rate of proliferation [25].

Our report demonstrates for the first time that CEMP1 can promote osteoblastic and/or cementoblastic cell differentiation of HGF *in vitro*. This work is fundamentally different from others which have used BMP-2, BMP-7, and Runx2 genetically engineered nonosteogenic cells such as skin and human gingival fibroblasts to promote its *in vivo* conversion to a mineralizing osteoblastic phenotype and initiate osteogenesis *in vivo* [26]. Nevertheless, our results show that CEMP1 expression into HGF has the potential to overcome cell source and indicates that CEMP1 may be necessary for induction of matrix mineralization and conversion of nonosteogenic cells to a mineralizing phenotype *in vitro*.

Finally, our report is the first one demonstrating that CEMP1 can promote proliferation and differentiation of adult HGF to a “mineralizing-like” cell phenotype and we have provided evidence that CEMP1 expression has the ability to induce formation of mineralized nodules and calcium deposition in nonosteogenic cells. These results suggest that CEMP1 might have a potential function in cementum and bone formation.

Acknowledgments

This study was supported by funds from DGAPA-UNAM IN204705-3, CONACyT 48638 to H.A.; DE012346 to M.Z.D.; DE08229, DE13069 to A.S.N.

References

- [1] K.A. Johnson, L. Hesse, S. Vaingankar, C. Wennberg, S. Mauro, S. Narisawa, J.W. Goding, K. Sano, J.L. Millan, R. Terkeltaub, Osteoblast tissue-nonspecific alkaline phosphatase antagonizes and regulates PC-1, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279 (2000) R1365–R1377.
- [2] D. Miao, A. Scutt, Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage, *J. Histochem. Cytochem.* 50 (2002) 333–340.
- [3] D.D. Bosshardt, S. Zalzal, M.D. McKee, A. Nanci, Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum, *Anat. Rec.* 250 (1998) 13–33.
- [4] A. Nanci, Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density, *J. Struct. Biol.* 126 (1999) 256–269.
- [5] H.I. Roach, Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bonesialoprotein in bone mineralization and resorption, *Cell. Biol. Int.* 18 (1994) 617–628.
- [6] J. Chen, Q. Zhang, C.A. McCulloch, Sodek, Immunohistochemical localization of bone sialoprotein in foetal porcine bone tissues: comparisons with secreted phosphoprotein I (SSP-I, osteopontin) and SPARC (osteonectin), *Histochem. J.* 23 (1991) 281–289.
- [7] M.A. Álvarez-Pérez, S. Narayanan, M. Zeichner-David, B. Rodríguez Carmona, H. Arzate, Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23), *Bone* 38 (2006) 409–419.
- [8] H. Arzate, L.F. Jiménez-García, M.A. Álvarez-Pérez, A. Landa, I. Bar-Kana, S. Pitaru, Immunolocalization of a human cementoblastoma conditioned medium-derived protein, *J. Dent. Res.* 81 (2002) 541–546.
- [9] H. Arzate, J. Chimal-Monroy, L. Hernández-Lagunas, L. Díaz de León, Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells, *J. Periodont. Res.* 31 (1996) 144–148.
- [10] M.A. Álvarez Pérez, S. Pitaru, O. Álvarez Fregoso, J. Reyes Gasga, H. Arzate, Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line, *J. Struct. Biol.* 143 (2003) 1–13.
- [11] A.S. Narayanan, R.C. Page, Biochemical characterization of collagens synthesized by fibroblasts derived from normal and diseased human gingiva, *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 5464–5471.
- [12] M. Zeichner-David, K. Oishi, E. González, Z. Su, V. Zakartchenko, L.S. Chen, H. Arzate, P. Bringas, Role of Hertwig’s epithelial root sheath cells in tooth root development, *Dev. Dyn.* 228 (2003) 651–663.
- [13] F.J. Cuisinier, R.W. Glaisher, J.C. Voegel, J.L. Hutchinson, E.F. Bres, R.M. Frank, Compositional variations in apatites with respect to preferential ionic extraction, *Ultramicroscopy* 36 (1991) 297–305.
- [14] O.H. Lowry, N.R. Roberts, M.-L. Wu, W.S. Hixon, E.J. Crawford, The quantitative histochemistry of brain I. Enzyme measurement, *J. Biol. Chem.* 207 (1954) 19–37.
- [15] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [16] H. Arzate, M.A. Alvarez, A.S. Narayanan, Cyclosporin A promotes mineralization by human cementoblastoma-derived cells in culture, *J. Periodont. Res.* 40 (2005) 218–224.
- [17] T. Van den Bos, W. Beertsen, Alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament: age effect and relation to cementum growth rate, *J. Periodont. Res.* 34 (1999) 1–6.
- [18] T. Van den Bos, G. Handoko, A. Niehof, L.M. Ryan, S.P. Coburn, M.P. Whyte, W. Beertsen, Cementum and dentin in hypophosphatasia, *J. Dent. Res.* 84 (2005) 1021–1025.
- [19] H. Arzate, M.A. Álvarez-Pérez, O. Álvarez-Fregoso, A. Wusterhaus-Chávez, J. Reyes-Gasga, L.A. Ximénez-Fyvie, Electron microscopy, micro-analysis and X-ray diffraction characterization of the mineral-like tissue deposited by human cementum tumor-derived cells, *J. Dent. Res.* 79 (2000) 28–34.
- [20] B. Ek-Rylander, M. Flores, M. Wendel, D. Heinegard, G. Andersson, Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion *in vitro*, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 14853–14856.
- [21] A. George, J. Hao, Role of phosphophoryn in dentin mineralization, *Cell. Tissue. Org.* 181 (2005) 232–240.
- [22] A.L. Bronckers, M.A. Engelse, A. Cavender, J. Gaikwad, R.N. D’Souza, Cell-specific patterns of Cbfa1 mRNA and protein expression in postnatal murine dental tissues, *Mech. Dev.* 101 (2001) 255–258.
- [23] M. Kitagawa, H. Tahara, S. Kitagawa, H. Oka, Y. Kudo, S. Sato, I. Ogawa, M. Miyaichi, T. Takata, Characterization of established cementoblasts-like cells from human cementum-lining cells *in vitro* and *in vivo*, *Bone* 39 (2006) 1035–1042.
- [24] Q. Tu, P. Valverde, J. Chen, Osterix enhances proliferation and osteogenic potential of bone marrow stromal cells, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 341 (2006) 1257–1265.
- [25] P.H. Krebsbach, K. Gu, T. Renny, R.T. Franceschi, R.B. Rutherford, Gene therapy-directed osteogenesis: BMP-7 transduced human gingival fibroblasts form bone *in vivo*, *Hum. Gene. Ther.* 11 (2000) 1201–1210.
- [26] R.B. Rutherford, M. Moalli, R.T. Franceschi, D. Wang, K. Gu, P.H. Krebsbach, Bone morphogenetic protein-transduced human fibroblasts convert to osteoblasts and form bone *in vivo*, *Tissue. Eng.* 8 (2002) 441–452.

STEM-HAADF electron microscopy analysis of the central dark line defect of human tooth enamel crystallites

Jose Reyes Gasga · Georgina Carbajal-de-la-Torre ·
Etienne Bres · Ivet M. Gil-Chavarria ·
Ana G. Rodríguez-Hernández · Ramiro Garcia-Garcia

Received: 31 October 2005 / Accepted: 17 May 2007 / Published online: 1 August 2007
© Springer Science+Business Media, LLC 2007

Abstract When human tooth enamel is observed with the Transmission Electron Microscope (TEM), a structural defect is registered in the central region of their nanometric grains or crystallites. This defect has been named as Central Dark Line (CDL) and its structure and function in the enamel structure have been unknown yet. In this work we present the TEM analysis to these crystallites using the High Angle Annular Dark Field (HAADF) technique. Our results suggest that the CDL region is the calcium richest part of the human tooth enamel crystallites.

Introduction

Human tooth enamel is composed by 96 wt% of inorganic material, mainly hydroxyapatite (HAP), and 4% of organic material, consisting essentially by two classes of proteins: amelogenins and enamelin. Enamel is formed by prisms in

the size range of tenths of microns, which run from the enamel–dentin junction to the enamel surface. These prisms are formed by many elongated-plate-like crystallites whose diameter is from 50 nm to 100 nm wide and from 300 nm to 500 nm long, approximately. The enamel crystallites are observed with the transmission electron microscope (TEM), exhibiting a line of 1–1.5 nm width along their centers [1–6]. This line has been named as “central dark line” (CDL), although its contrast is focusing dependent: it is dark in under-focus, disappears when the image goes through focus, and it is white in over-focus [4], resembling the Fresnel fringes behavior in a phase-contrast image. The observance of this CDL both in plan view (transversal) and along cross-sectioned view (longitudinal) enamel samples indicates that it certainly corresponds to a plane but not to a line. However, “central dark line” has been the name used to identify it.

In order to visualize its structure, the CDL has been attributed to the presence of planar defects such as dislocations and grain boundaries [7–9], to the presence of a layer of octocalcium phosphate (OCP) in dentine crystals [10], and more recently to the presence of a central planar defect which was observed in human tooth enamel crystals using Atomic Force Microscopy [11]. The study of this “line” in the human tooth enamel crystallites is of particular interest because it represents a zone that undergoes preferential dissolution during early stages of the carious process [6, 9, 12, 13]. Therefore the knowledge of its structure, properties and chemical composition is crucial to understand the role that it plays on the enamel structure and, even, to combat and prevent the carious process.

In this work we carried out the structural analysis of the CDL by TEM with the aim of find the differences, if there is one, between the enamel HAP and its CDL. We have used the techniques of high resolution TEM images

J. R. Gasga (✉) · G. Carbajal-de-la-Torre ·
I. M. Gil-Chavarria · A. G. Rodríguez-Hernández ·
R. Garcia-Garcia
Instituto de Física, UNAM, Apartado Postal 20-364,
01000 Mexico, DF, Mexico
e-mail: jreyes@fisica.unam.mx

G. Carbajal-de-la-Torre · E. Bres
Laboratoire de Structure et des Propriétés de l'État Solide CNRS
UMR 8008, Université des Sciences et des Technologies de Lille,
Bâtiment C6, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

I. M. Gil-Chavarria · A. G. Rodríguez-Hernández
Facultad de Odontología, UNAM, Unidad de Posgrado,
Circuito de la Investigación Científica, Cd, Universitaria,
04510 Coyoacan, Mexico, DF, Mexico

(HRTEM) and high angle annular dark field (HAADF) images produced in a scanning transmission electron microscope (STEM) unit, which will be referred as STEM-HAADF hereafter. STEM-HAADF is a technique that allows us observing of electron-beam-sensible samples with considerable reduced electron-beam damage, which is very important in the case of enamel where the interaction with the TEM electron beam produces severe structural changes in a short time [5, 6, 9]. We must mention that the analysis with characteristic X-ray by energy dispersive spectroscopy (EDS) in TEM around the CDL has been already carried out [14], but the results on its chemical composition were not as conclusive as in the case reported in this work.

The STEM-HAADF image is formed by detecting the electron flux scattered in angles that are function of the atomic number Z through the Z^2 dependence [15]. Thus, the annular HAADF detector in a STEM produces incoherent images of crystalline materials with strong compositional information [16–19] representing an elemental map (Z -contrast image) which can be quantified using an appropriated cross section [20]. Therefore, the reversal contrasts normally observed in the N-beam phase contrast of HRTEM by thickness and defocus images are not presented in STEM-HAADF images. In the case of enamel, then, the region with brighter contrast in STEM HAADF images will indicate the presence of the heaviest element, i.e. regions with high concentrations of Ca ions ($Z = 20$). Regions with P ($Z = 15$), O ($Z = 8$), and lighter elements will produce a gray contrast.

Experimental procedure

In order to perform the TEM analysis, human tooth enamel was milled in an Agate mortar, calcinated at 200 °C for removing any organic material, and filtered through a 325 mesh grid. The powder was supported on Cu grids that

were covered previously with a lacey plastic and carbon films. Afterwards these Cu grids, already with the enamel powder, were re-covered again with a carbon film of 20 nm thick to minimize both electron beam damage and electrical charge effects produced during TEM observation of the enamel grains [6, 9, 12, 21]. A JEOL-FEG-2010-EX microscope was used for HRTEM and STEM-HAADF observations. This microscope is equipped with Schottky-type field emission gun, ultra-high resolution pole piece ($C_s = 0.5$ mm), and a scanning transmission electron microscope (STEM) unit with high angle annular dark field (HAADF) detector operating at 200 kV. The Digital Micrograph (DM) software from GATAN was used for digital image processing and statistics measurements.

Results

For TEM of the enamel sample in powder all that have to be done is to defocus the image of the enamel crystallite under observation every moment to see the CDL contrast, and the observation has to be so quickly because the electron beam damage [15]. Figure 1 shows the HRTEM images of two the enamel crystallites. It is worth mentioning that the CDL is always observed together with the $[10\bar{1}0]$ fringes, whose periodicity is 0.817 nm.

Figure 2 shows the best HRTEM image obtained for an enamel crystallite with some traces of a CDL (indicated by the arrow). The indexing of the Fast Fourier Transform (FFT) of this image (Fig. 2b), taken with the DM software, indicates that the image is along the $[1\bar{2}10]$ zone axis of the hydroxyapatite unit cell. Using once again the DM software this image can be processed to enhance the CDL contrast, as shown in Fig. 3. However, although these images are very impressive, the analysis of the CDL structure is not simple because the related information is part of the diffuse scattering.

Fig. 1 HRTEM images of two human tooth enamel crystallites. The CDL is indicated by the arrow

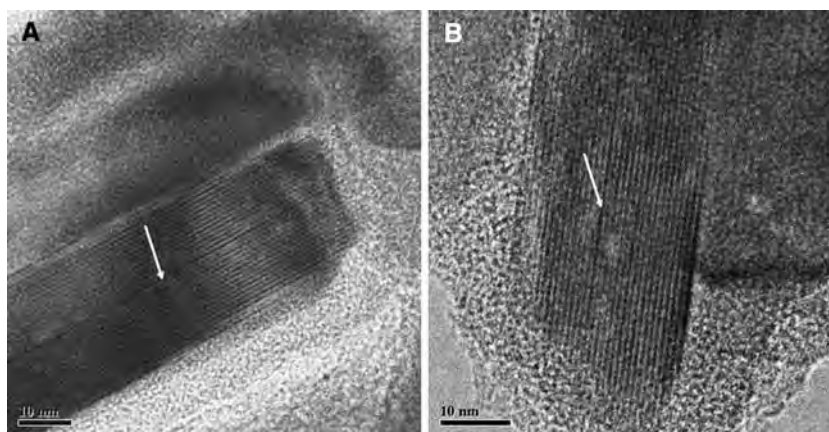


Fig. 2 (a) HRTEM image of one of the human tooth enamel crystallite where the CDL (indicated by the arrow) can be observed. (b) FFT of the image in (a) indicating that the image is along the $[1\bar{2}10]$ zone axis of the HAP unit cell

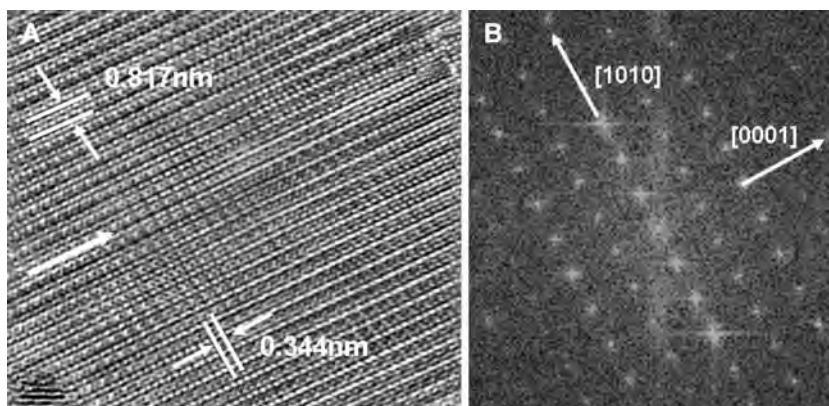
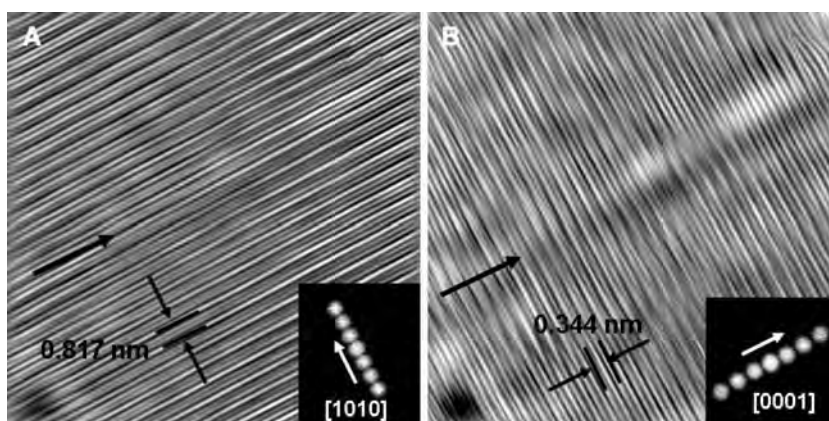


Fig. 3 Images processed from Fig. 2a using the FFT shown in Fig. 2b. The filters used for the processing are shown in the insets. (a) $[10\bar{1}0]$ lines, (b) $[0001]$ lines. The arrows in the images indicate the CDL positions and in the insets indicate the direction



To get better information on the structure of the CDL, let us analyze the STEM-HAADF images of the enamel crystallites based on their contrast. Figure 4 shows the comparison of the contrast in TEM images and their corresponding STEM-HAADF. Note the reverse in contrast shown in these two types of images, for example the black in TEM image (Fig. 4a) is white in the STEM-HAADF image (Fig. 4b). The whiter zone in the STEM-HAADF image shown in Fig. 4b corresponds to the CDL, which indicates that the structure of the CDL is such that it contains more calcium than the rest of the enamel crystallite. Using the DM software, the image shown in Fig. 4b was processed to enhance its contrast. The results are shown in Fig. 5. In all the cases the contrast for the CDL was the brightest one.

In order to obtain more information from the TEM and STEM-HAADF images of the CDL, we measured the inter-linear periodicity observed in these two types of images (Fig. 6). Note in Fig. 6 that the mean value for this periodicity in the HRTEM images was of 0.877 nm with a standard deviation of 0.071, while in the STEM-HAADF images it was of 0.863 nm with a standard deviation of 0.0298. These values are bigger than the one reported for the $[10\bar{1}0]$ fringes of HAP, which correspond to 0.817 nm. What would be the meaning of this result? The way to

obtain a HRTEM image is allowing many reflections through the objective aperture, so the lines observed in this image are produced by an interference process of these reflexions, and although their periodicity is related with the atomic spacing, the meaning for an increment as the one observed in this work is not straightforward. However, in the case of the STEM-HAADF images, the lines represent the periodicity of the atomic rows of Ca. Therefore, it is quite clear that the enamel crystallite shows an increment in its lattice parameter with respect to the HAP unit cell.

Discussion

The STEM-HAADF images show that the CDL is richer in calcium than the rest of the enamel crystallite. It is well known that the inorganic material of the human tooth enamel is mainly composed of HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, although stoichiometrically speaking, HAP in enamel does not correspond to the previous chemical formulae because many elements such as Mg, Na, and Cl are also included in its unit cell. Thus, a carbonated or deficient HAP, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_3\text{OH}$, was suggested as a better representing compound. Both HAP and carbonated HAP (c-HAP) have a Ca/P ratio of 1.67 [22–24].

Fig. 4 Comparison between the TEM (a) and STEM-HAADF (b) images of the same human tooth enamel crystallite. Note the reverse of contrast between them and the contrast shown by the CDL

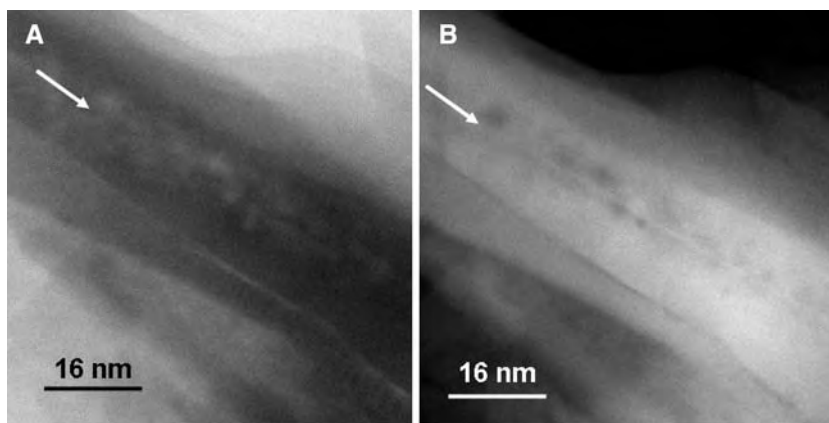


Fig. 5 Four processed images from the STEM-HAADF image shown in figure 4b to enhance its contrast. Note that in all the cases the contrast of the CDL is the brightest one.

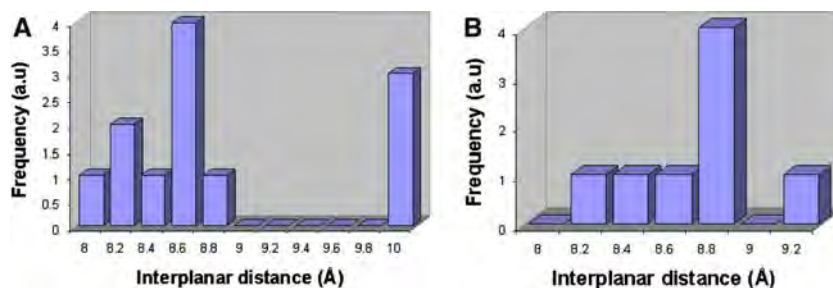
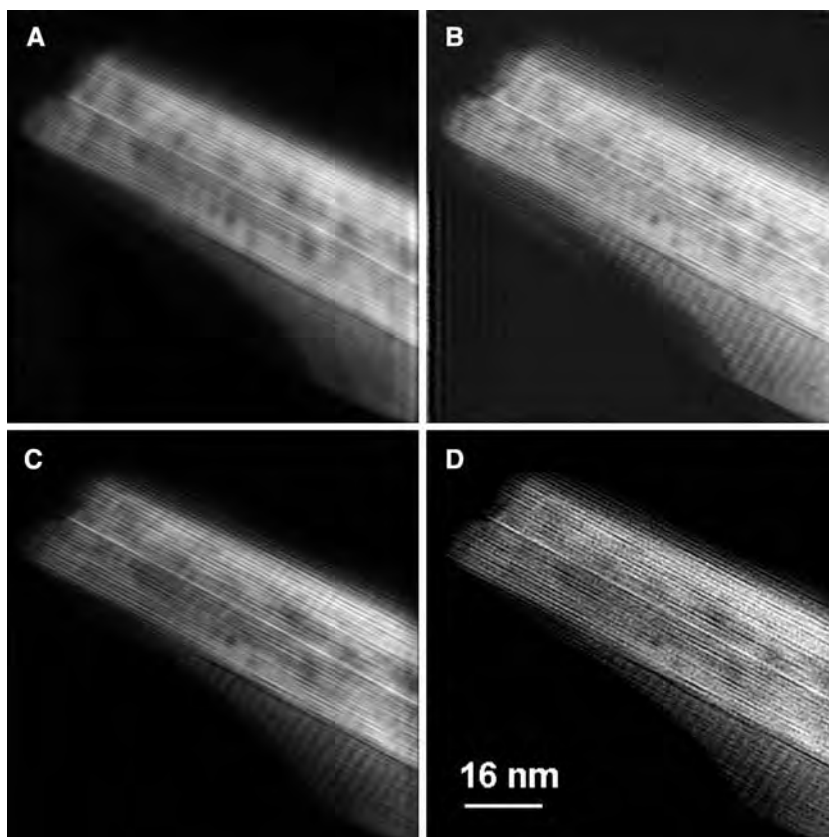


Fig. 6 Frequency distribution of the inter-linear periodicity observed both in the HRTEM images (a) and the STEM-HAADF images (b) where the CDL was observed. For HRTEM images the mean value

was 0.877 nm with a standard deviation of 0.071. For STEM-HAADF images, the mean value was 0.863 nm with a standard deviation of 0.0298

Based on some experimental results that indicated that HAP is able to grow in an epitaxial way on the surface of OCP [25, 26], it has been suggested that the CDL observed in the nanometric-sized grains of human tooth enamel corresponds to the growth of HAP on a one unit-cell-thick layer of OCP [27–30]. A CDLs model such as this would fit quite well with the HRTEM observations. Structurally speaking there are some similarities between the unit cells of HAP (hexagonal $P6_3/m$, $a = 9.418$, $c = 6.884$ Å) and OCP, whose chemical formulae is $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6(\text{H}_2\text{O})_5$ (triclinic P1, $a = 19.87$, $b = 9.63$, $c = 6.87$ Å; $\alpha = 90.13^\circ$, $\beta = 92.13^\circ$, $\gamma = 108.36^\circ$), so it is not difficult to suggest how an HAP–OCP interface can be built [28, 29]. However, a CDL structure related with OCP does not agree quite well with the results that presented in this work. The Ca/P ratio in OCP is 1.33; i.e. it has less calcium than in HAP, where it is of 1.67. The concentration of atoms of Ca in the OCP (~ 4.09 Ca atoms/nm³) is also much lower than in HAP (~ 18.86 Ca atoms/nm³). This also excludes the presence of an OCP layer as reported by Bodier-Houllé et al. [10] in developing dentine.

One possible explanation for our results could be the existence of a structural defect located at the CDL at which an increase of Ca concentration is observed. Fernández et al. [29] have already proposed the existence of structural defect in the HAP–OCP interface. An X-ray topography investigation of natural apatite [31] have shown the presence of grain boundaries and a large density of dislocations with probable Burgers vectors $\mathbf{b} = a[11\bar{2}0]$ and $\mathbf{b} = c[0001]$. On the other hand, HRTEM studies on human tooth enamel crystals [9] have shown the existence of two types of planar defects: (1) a twin boundary parallel to the $(1\bar{1}00)$ plane, and (2) a low angle grain boundary with an angle of 1.74° between $(1\bar{1}00)$ planes on the two sides of the crystals. Such these two defects are consistent with the contrast of the CDL, additional that CDL type-like contrast has been also observed in dislocations of grain boundaries of NiO [32]. All this, together with our results, confirm the fact that CDL type contrast could be observed in crystals without OCP layers or with OCP layers with Ca-rich defect at the interface. However the relationship between an OCP layer and the presence of defects still remains as an open question. Are these Ca-rich defects really formed during the transformation of OCP into HAP?

Conclusion

STEM-HAADF images presented in this work indicated a rich concentration of Ca around the CDL region. This is a strongly experimental support against the model which would like to interpret the CDL observance as an effect associated to a OCP planar structure surrender by the

environment of HAP since the Ca/P ratio is bigger in HAP (1.67) than in OCP (1.33). Moreover, the results here presented indicate the possible existence of structural defects rich in Ca at the zone of the CDL, which opens the possibility of existence of a HAP–OCP interface with a high density of Ca-rich structural defects.

Acknowledgements We acknowledge to L. Rendón, C. Magaña, R. Hernández, J. Cañetas, S. Tehuacanero, P. Mexía, and M. Aguilar for their technical help. We thank the Laboratorio Central de Microscopía of the IFUNAM for electron microscopy facilities. We also acknowledge the economical support from DGAPA-UNAM under the project IN-117906.

References

1. E. RÖNNHOLM, *J. Ultrastruct. Res.* **6** (1962) 249
2. M. U. NYLEN, E. D. EANES and K. A. OMNELL, *J. Cell. Biol.* **18** (1963) 109
3. A. F. MARSHALL and K. R. LAWLESS, *J. Dent. Res.* **60** (1981) 1773
4. D. G. A. NELSON, G. J. WOOD, J. C. BARRY and J. D. B. FEATHERSTONE, *Ultramicroscopy* **19** (1986) 253
5. E. F. BRÈS, W. G. WADDINGTON, J. C. VOEGEL, J. C. BARRY and R. M. FRANK, *Biophysics* **1** (1986) 1105
6. T. YANAGISAWA and Y. MIAKE, *J. Electron Microsc.* **52** (2003) 605
7. E. F. BRÈS, J. L. HUTCHISON, J.-C. VOEGEL and R. M. FRANK, *Journal de Physique* **51** (1990) C1-97
8. E. F. BRÈS, W. G. WADDINGTON, J.-C. VOEGEL, J. C. BARRY and R. M. FRANK, *Biophys. J.* **50** (1986) 1185
9. E. F. BRÈS, J. C. BARRY and J. L. HUTCHISON, *Ultramicroscopy* **12** (1984) 367
10. P. BODIER-HOULLÉ, P. STEUER, J.-C. VOEGEL and F. J. G. CUISINIER, *Acta Cryst.* **D54** (1998) 1377
11. C. ROBINSON, S. CONNELL, J. KIRKHAM, R. SHORE and A. SMITH, *J. Mater. Chem.* **14** (2004) 2242
12. D. B. SCOTT, J. W. SIMMELINK and V. NYGAARD, *J. Dent. Res.* **53** (1974) 165
13. J.-C. VOEGEL and R. M. FRANK, *Calcif. Tissue Res.* **24** (1997) 19
14. A. BELIO-REYES, L. VARGAS-ULLOA, L. F. JIMENEZ-GARCIA and J. REYES-GASGA, *Latin-Am. J. Metallurgy Mater.* **19** (1999) 52
15. M. S. ISAACSON, M. OHTSUKI and M. UTLAUT, in “Introduction to the Analytical Electron Microscopy”, edited by J. J. HREN, J. I. GOLDSTEIN and D. C. JOY (Plenum Press, New York, 1979) p. 343
16. V. CREWE, J. P. LANGMORE and M. S. ISAACSON, in “Physical Aspects of Electron Microscopy and Microbeam Analysis”, edited by B. M. SIEGEL and D. R. BEMAN (Wiley, New York, 1975) p. 47
17. A. Howie, *J. Microsc.* **117** (1979) 11
18. J. M. COWLEY, *Ultramicroscopy* **2** (1976) 258
19. S. J. PENNYCOOK, S. D. BERGER and R. J. CULBERTSON, *J. Microsc.* **144** (1986) 229
20. S. J. PENNYCOOK and D. E. JESSON, *Ultramicroscopy* **37** (1991) 14
21. J. REYES-GASGA and R. GARCIA-GARCIA, *Radiat. Phys. Chem.* **64** (2002) 359
22. L. F. LOZANO, M. A. PEÑA-RICO, A. HEREDIA, J. OCOTLAN-FLORES, A. GOMEZ-CORTES, R. VELÁSQUEZ, I. A. BELIO and L. BUCIO, *J. Mater. Sci.* **38** (2003) 4777

23. C. P. LIN, B. S. LEE, S. H. KOK, W. H. LAN, Y. C. TSENG and F. H. LIN, *J. Mat. Sci.* **11** (2000) 373
24. F. H. LIN, C. J. LIAO, K. S. CHEN and J. S. SUN, *Biomaterials* **19** (1998) 1101
25. M. IIJIMA, H. THODA and Y. MORIWAKI, *J. Cryst. Growth* **116** (1992) 319
26. M. IIJIMA and Y. MORIWAKI, *J. Cryst. Growth* **194** (1998) 125; *J. Cryst. Growth* **198–199** (1999) 670
27. Y. MIAKE, S. SHIMODA, M. FUKAE and T. AOBA, *Calcif. Tissue Int.* **53** (1993) 249
28. A. G. RODRIGUEZ-HERNANDEZ, M. E. FERNANDEZ, G. CARBAJAL DE LA TORRE, R. GARCIA-GARCIA and J. REYES-GASGA, in “Electron Microscopy of Molecular and Atom-Scale Mechanical Behavior, Chemistry and Structure”, edited by D. C. MARTIN, D. A. MULLER, P. A. MIDGLEY and E. A. STACH, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* **839** (2005), P6.10.1
29. M. E. FERNÁNDEZ, J. A. ASCENCIO, C. ZORRILLA-CAN-GAS, R. GARCÍA-GARCÍA and J. REYES-GASGA, *Acta Cryst. B* **59** (2003) 175
30. G. H. NANCOLLAS, *Pure Appl. Chem.* **64** (1992) 1673
31. P. P. PHAKEY and J. R. LEONARD, *J. Appl. Cryst.* **3** (1970) 38
32. M. RÜHLE and S. L. SASS, *Philos. Mag. A* **49** (1984) 759

Structural and thermal behaviour of human tooth and three synthetic hydroxyapatites from 20 to 600 °C

J Reyes-Gasga¹, R García-García¹, M J Arellano-Jiménez¹,
E Sanchez-Pastenes¹, G E Tiznado-Orozco^{1,2}, I M Gil-Chavarria^{1,2}
and G Gómez-Gasga³

¹ Instituto de Física, UNAM. Apdo Postal 20-364, 01000, México DF, Mexico

² Facultad de Odontología, UNAM. Unidad de Posgrado. Circuito de la Investigación Científica, Cd. Universitaria. 04510 Coyoacán, México DF, Mexico

³ Escuela Superior de Física y Matemáticas, IPN Edificio 9, UP Adolfo López Mateos 7730, México DF, Mexico

E-mail: jreyes@fisica.unam.mx

Received 6 August 2008, in final form 23 September 2008

Published 29 October 2008

Online at stacks.iop.org/JPhysD/41/225407

Abstract

The structural and thermal properties of human tooth enamel, dentine and three synthetic hydroxyapatite samples with Ca/P ratios of 1.57 (Ca deficiency), 1.67 and 1.77 (Ca excess), respectively, were analysed in the temperature range from 20 to 600 °C to have information on the parameters involved in the ionic/electrical conductivities reported for human tooth enamel between 200 and 350 °C approximately. Studies were carried out through x-ray diffraction, thermo-gravimetric analysis, differential scanning calorimetry, Fourier transform infrared spectroscopy and temperature programmed desorption. Chemical analysis was performed by x-ray characteristic energy dispersive spectroscopy. Results indicate a strong correlation between the removal of the OH⁻ groups from the hydroxyapatite unit cell and the expulsion of absorbed water and lattice water registered during heating.

1. Introduction

Hydroxyapatite (HAP) is the main constituent of human bone, dental enamel and dentine. It is a dielectric material that can be used as an insulator in electronic systems and in bioelectronic sensors and devices because of its biocompatibility [1]. Because electronic components must function at temperatures ranging from room temperature to several hundred degrees, characterization and understanding of the temperature dependence of HAP's electrical properties, as well as its structural and compositional stability, is paramount.

Previous impedance analyses and transmission electron microscopy (TEM) works have shown that the electric resistivity of tooth enamel (which is 96% hydroxyapatite by weight) drops ten orders of magnitude between 200 and 350 °C as the temperature increases from room temperature to 500 °C

[2–6]. Enamel is thus an electrically insulating dielectric material with a conductivity of 10¹⁵ W cm of resistivity at room temperature, and 10⁵ W cm, i.e. semiconductor behaviour, above 350 °C. This change in electrical behaviour does not cause any changes in the hexagonal nature of the crystalline structure of HAP, as reported by Reyes-Gasga, García and co-workers through *in situ* heating x-ray diffraction (XRD) studies of human tooth enamel from 100 to 800 °C [6, 7]. Then, the reported dielectric–semiconductor transition is a result of the underlying electronic characteristics of the material, which can be used for a viable technical application as has been done with some alloys, for example, in the field of thermostats.

Human dental enamel is composed of HAP to the extent of 96% by weight and the remaining 4% consists of water and organic material (mainly protein) [8]. The stoichiometry composition of HAP in enamel does not correspond to the chemical formula Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ of synthetic HAP because many elements, such as magnesium, sodium and chlorine,

⁴ Author to whom any correspondence should be addressed.

are also included in its unit cell [9–11]. In fact, many authors [7, 12, 13] have suggested tooth enamel to be a calcium-deficient and carbonate-containing HAP containing some amounts of Ca^{2+} , PO_4^{3-} and CO_3^{2-} . After maturation, fragments of some acidic proteins called enamelines and tuftelins remain inside the enamel and act as ‘glue’ between crystallites throughout the rod structure and extend from the dentine enamel junction to the enamel surface. Most free water within enamel is located within the protein matrix.

Similarly, human dental dentine is composed 74% by weight of HAP and the remaining 26% consists of water and organic material (mainly protein type I collagen, NH (amide III), $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ and C=O (amide I), and C–H functional groups [14]). Dentine has also been indicated as a calcium-deficient HAP containing different amounts of HPO_4^{2-} and CO_3^{2-} ions, the amount of CO_3^{2-} being greater in dentine than in enamel. Cl^- ions are not found in dentine and the content of Mg^{2+} is greater than in the enamel [11].

In this work we have selected, in addition to the enamel and dentine human tooth samples and the synthetic HAP sample with a Ca/P ratio of 1.67 (i.e. the one corresponding to the molecular formula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), one sample below (1.57) and one sample above (1.77) this ratio, and the structural and thermal results have been correlated with the reported dielectric–semiconductor transition for human tooth enamel [4, 6].

2. Experimental procedure

HAP has been sintered through several methods around the world [15, 16]. Most of them include the use of calcium chloride (CaCl_2) salt and potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) to produce the precipitation of a white powder which, after drying, is sintered at 900°C [17]. In this work we followed the Tsilius method which employs the reaction of calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) suspension and phosphoric acid solution (H_3PO_4) [18, 19]. HAP samples with Ca/P ratios of 1.57 (a sample with 6% less Ca), 1.67 and 1.77 (a sample with 6% more Ca) were obtained by phosphoric acid (H_3PO_4) at 0.3 M and three solutions of calcium hydroxide at 0.47 M, 0.5 M and 0.53 M, respectively. The solution of phosphoric acid was dropped into the calcium hydroxide suspension at a constant rate of 7 ml min^{-1} with continued stirring. For a Ca/P of 1.57, pH was maintained at 5, i.e. an excess of phosphoric acid; for 1.67 it was 7, i.e. a neutral solution; and for 1.77 it was 8.5, i.e. a basic solution. Calcium hydroxide suspension was always maintained at 40°C during the process. A jelly-like product of white colour was obtained after 48 h. The liquid was filtered and the sediment was dried at 100°C in 24 h, milled in an agate mortar and the powder was filtered with a strainer of 325-mesh grid.

Human tooth enamel and dentine powder were harvested from clean adult teeth extracted for orthodontic reasons. Enamel and dentine were mechanically separated from each other. After separation, they were milled in an agate mortar and filtered with a strainer of 325-mesh grid.

For thermo-gravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC) analysis, 2.0 g of the powder was

set in the DUPONT equipment model 910. The temperature programmed desorption (TPD) analyses were done in an ISRI equipment model RIG-100 with argon flow to detect water desorption as a function of temperature. In this case the technique is known as thermal programmed dehydration [20], where the thermal conductivity coefficient of argon is used as a reference pattern for the sample’s detachment. A heating rate flow of $10^\circ\text{C min}^{-1}$ was used. To obtain the Fourier transform infrared (FTIR) spectra in the range $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, 1 mg of powder from each sample was mixed in 30 mg of KBr according to the specifications of the infrared spectrometer NICOLET NEXUS 470. A SPECTRA TECH DRIFT cell was used for variation of temperature with periods of 2 h at each of the chosen temperatures.

The XRD analyses of the powder were carried out using the XRD equipment Bruker model D8-Advanced with monochromatic $\text{Cu}_{(\text{K}\alpha)}$ radiation ($\lambda = 0.154\text{ nm}$). The diffraction patterns were scanned with a step size of 0.02° (2θ) and 25 s of counting time per step using the Bragg–Brentano geometry. The a -axes were calculated from the positions of the (2 0 0) and (3 0 0) reflections, the c -axes from the positions of the (0 0 2) and (0 0 4) reflections. Silicon reflections were used as a reference. The chemical analysis of the samples was performed with the equipment for x-ray energy dispersive spectroscopy (EDS) NORAN-EDS that is attached to a low-vacuum scanning electron microscope (LV-SEM) Jeol 5600LV. The samples were observed with a voltage of 30 kV and at a pressure of 20 Pa and no thin film cover was used for their SEM.

3. Results

3.1. X-ray and EDS analyses

Figure 1 shows the XRD diffractograms obtained at room temperature of enamel and dentine and of the three synthetic HAP samples. The (hkl) indexes shown in this figure correspond to the x-ray powder diffraction file (PDF) card number 09-0432, which contains all the accepted crystallographic data for HAP. Note in figure 1 that the differences between the diffractograms of sample 1.67 and dentine are bigger than in the case of enamel. The sharpness of the enamel XRD peaks is explained on the basis of the size of the crystals, which is larger in enamel than in dentine.

Additionally in figure 1, the diffractogram of the sample with Ca/P = 1.57 (named 1.57 hereafter) shows some peaks of tricalcium phosphate in minor proportion besides the HAP peaks, indicating that $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ exists in this sample in addition to HAP; the diffractogram of the sample with Ca/P = 1.67 (named 1.67 hereafter), shows the presence of HAP only; and the diffractogram of the sample with Ca/P = 1.77 (named 1.77 hereafter), shows the existence of CaO in a very minor proportion additional to HAP. Further XRD analyses (results not shown) indicated that HAP was stable in the sample 1.57 until 800°C , in the sample 1.67 until 1100°C and in the sample 1.77 until 900°C . At 1200°C HAP was transformed into β -whitlockite, and into α -tricalcium phosphate after 1400°C .

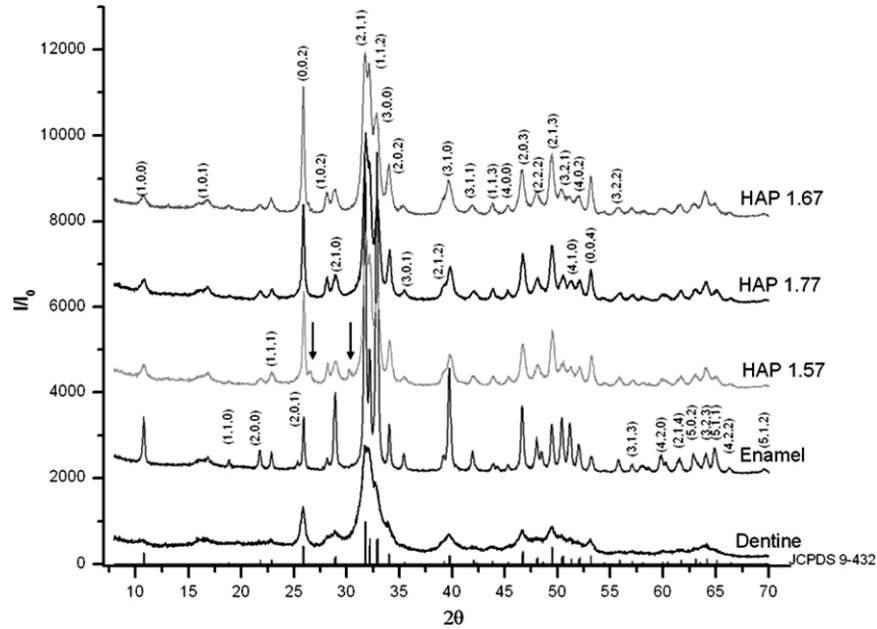


Figure 1. XRD diffractograms obtained at room temperature of the synthetic, human tooth enamel and human tooth dentine samples. The peaks are identified with the corresponding (h, k, l) planes of the x-ray PDF card number 09-0432. The arrows in the spectrum of sample 1.57 indicate the tricalcium phosphate peaks.

The crystal size can be calculated in first approximation from figure 1 for each case using the relation:

$$D = \frac{K\lambda}{(\text{FWHM}) \cos \theta}, \quad (1)$$

where D is the size of the crystal in the perpendicular direction to the reflecting planes, K is a proportionality constant factor close to unity, the FWHM of the peak measured in radians (theoretically corrected from the instrumental broadening) and λ is the wavelength of the x-rays used (0.154 nm for $\text{Cu}_{(\text{K}\alpha)}$). Results indicated that the average crystal size for enamel is the largest (24.5 nm) while for dentine it is the smallest (4.1 nm). Synthetic samples presented a crystal size of approximately 10 nm.

The corresponding hexagonal unit cell parameters ‘ a ’ and ‘ c ’ for each sample can be calculated as a function of h, k and l from figure 1 using the relation:

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{4(h^2 + hk + k^2)}{3a^2} + \frac{l^2}{c^2}. \quad (2)$$

Here d_{hkl} is the interplanar distance between the planes (hkl) . The results are shown in table 1. The columns ‘% a ’, ‘% c ’ and ‘% V ’ indicate the percentage differences between the calculated values for the parameters ‘ a ’ and ‘ c ’ and the volume ‘ V ’ and those calculated for the hexagonal unit cell with the parameters of the x-ray PDF card number 09-0432. The ‘+’ sign indicates ‘expansion’ and the ‘-’ sign indicates ‘contraction’ of the unit cell. The hexagonal unit cell of human enamel presented an expansion along the a -axis (0.32%) and contraction along the c -axis (−0.29%), while dentine presents expansion in both the a -axis (0.21%) and the c -axis (0.58%). It is worth noting that sample 1.67, which is assumed to be the one with the stoichiometric Ca/P ratio of HAP, shows an expansion of 0.29% along the c -axis.

Table 1. Unit cell parameters calculated from each diffractogram shown in figure 1 using equation 2. The columns ‘% a ’, ‘% c ’ and ‘% V ’ indicate the percentage differences between the calculated values for the parameters a and c and the volume V of the hexagonal unit cell with respect to the parameters from the x-ray card PDF number 09-0432 shown in the first column. The sign ‘+’ indicates expansion in unit cell and ‘-’ contraction.

	a (nm)	c (nm)	V (nm ³)	% a	% c	% V
PDF 09-432	0.942	0.688	1.586	0	0	0
Enamel	0.945	0.686	1.592	0.32	−0.29	0.38
Dentine	0.944	0.692	1.602	0.21	0.58	1.01
HAP 1.57	0.943	0.691	1.596	0.11	0.44	0.63
HAP 1.67	0.942	0.690	1.591	0	0.29	0.32
HAP 1.77	0.942	0.684	1.577	0	−0.53	−0.57

Figure 2 shows the EDS spectra from the samples and those corresponding to enamel and dentine indicate the presence of Mg and Na in addition to Ca, P and O. All the samples presented C. It is well known that the hexagonal unit cell of HAP allows the substitution of Ca^{2+} ($r_{\text{Ca}^{2+}} = 99$ pm) by potassium (K^+) ($r_{\text{K}^+} = 138$ pm) and sodium (Na^+) ($r_{\text{Na}^+} = 102$ pm) ions, PO_4^{3-} ($r_{\text{PO}_4^{3-}} = 115$ pm) by carbonates (CO_3^{2-}) ($r_{\text{CO}_3^{2-}} = 178$ pm) and magnesium (Mg^{2+}) ($r_{\text{Mg}^{2+}} = 79$ pm) ions and OH^- ($r_{\text{OH}^-} = 151$ pm) by carbonates (CO_3^{2-}) and chloride (Cl^-) ($r_{\text{Cl}^-} = 181$ pm) ions [20]. Miyaji *et al* [21] have indicated, for example, that the substitution of PO_4^{3-} and OH^- by CO_3^{2-} produces a contraction in the a -axis and the expansion of the c -axis of the hexagonal unit cell and the elimination of OH^- ions without substitution produces the contraction of the c -axis. However we are not in a position at this moment to indicate that a possible substitution of PO_4^{3-} by CO_3^{2-} and Mg ions and the presence of lattice water are responsible for the expansion in the a -axis and the contraction in the c -axis observed in enamel, nor that the substitution of

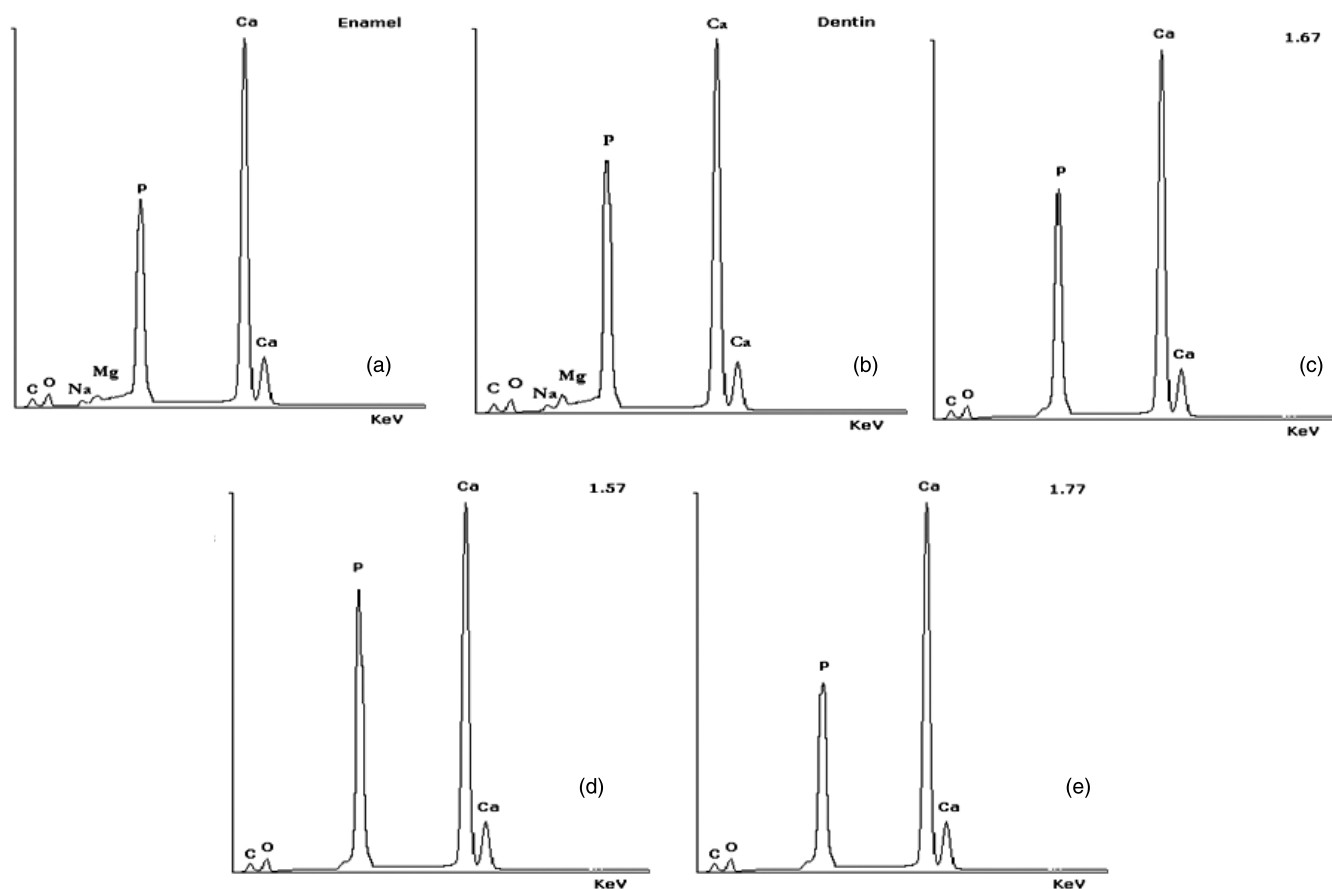


Figure 2. EDS spectra from human tooth and synthetic samples. (a) Enamel, (b) dentine, (c) sample 1.67, (d) sample 1.57 and (e) sample 1.77. Note the presence of Mg and Na in the enamel and dentine samples. C and O were present in all samples.

OH^- and PO_4^{3-} by CO_3^{2-} and the diminution of Ca atoms can produce the expansion of the *a*- and *c*-axes observed in dentine. In synthetic samples, a possible substitution of PO_4^{3-} and OH^- ions by CO_3^{2-} could be occurring, together with the excess (sample 1.77) and reduction (sample 1.57) of Ca ions.

3.2. Thermal treatment

3.2.1. TGA analysis. The TGA curves of the samples (figure 3) show differences in the amount of weight loss and in the associated slopes. The slope for dentine is steeper than for enamel, but the slope for enamel is similar to the Ca/P samples. The slope for sample 1.77 is steeper than for samples 1.67 and 1.57.

Enamel presented a total weight loss of 6% from room temperature (RT) to 900 °C, and at least four slopes are observed in the TGA plot (figure 3). The first slope indicates a fast 1% weight loss from RT to almost 100 °C. The second slope indicates a slow 0.5% weight loss from 100 to almost 300 °C. The third slope is again a fast 2% weight loss from 300 to 400 °C. Finally, the fourth slope is again a slow 2.5% weight loss from 400 to 900 °C. FTIR, DSC and TPD observations (described in more detail below) and the existing literature reports indicate that the weight loss from room temperature to 200 °C with a mean value at 100 °C is due to the removal of absorbed water [22–24], whereas the weight loss from 200 to 600 °C (with a mean value at 300 °C) is due to the

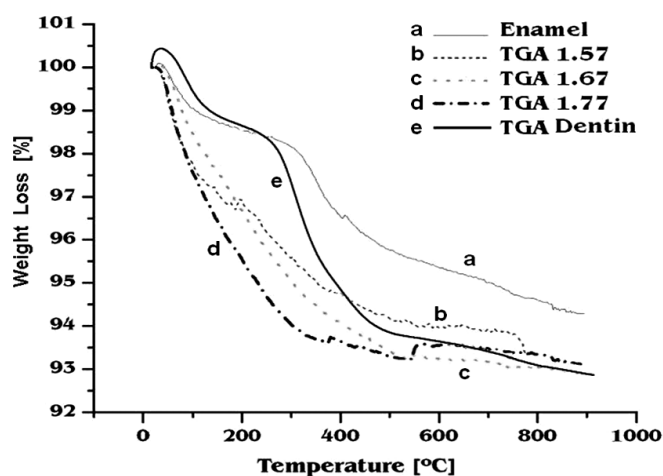


Figure 3. TGA graphics of the samples in the temperature range from RT to 900 °C. Note the different weight loss velocities in each case.

decomposition of organic matter and lattice water [20, 22–26]. The total organic matter in enamel is decomposed from 250 to 450 °C, with the maximum rate at 350 °C [24, 25]. The slope observed at roughly 700 °C can be assigned to the decomposition of carbonate compounds [22, 24, 26, 27].

Dentine presents five different slopes. The first slope goes from RT to 100 °C (1% of weight loss), the second slope is from 100 to 250 °C approximately (0.5% of weight loss), the

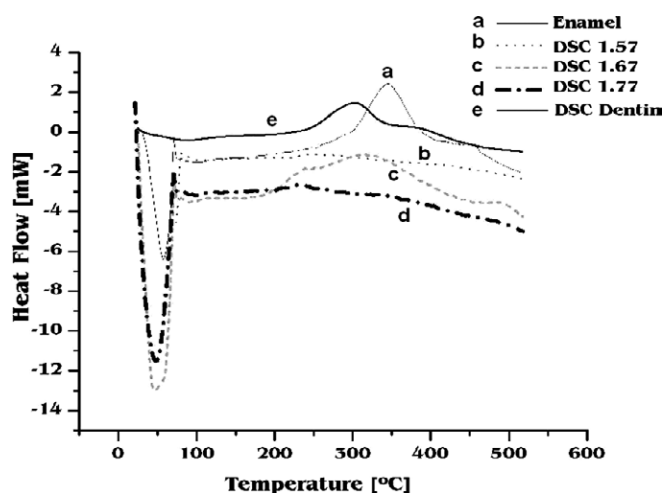


Figure 4. DSC graphics of the samples in the temperature range from RT to 500 °C. The presence of the exothermic peak is quite clear in the case of enamel.

third slope goes from 250 to 350 °C (3% of weight loss), the fourth slope is from 350 to 450 °C (1.5% of weight loss) and the fifth slope is observed after 450 °C and over 900 °C (1% of weight loss). The first slope, as in the case of enamel, is produced by the absorbed water [20, 22]. The weight loss from 200 to 450 °C, which includes the third and the fourth slopes, can be assigned to organic material and eventually to the lattice water [20, 22] and the decomposition of dentinal carbonate [28]. The fifth slope includes a possible transformation to tricalcium phosphate [29].

Ca/P samples present a continuous weight loss of approximately 7%, although three different slopes can be deduced. For sample 1.57, the first slope indicates a 3% weight loss from RT to 100 °C; the second slope is again a loss of 3% from 100 to 450 °C and the third slope is almost horizontal from 450 to up 900 °C. For sample 1.67, the first slope is from RT to 250 °C (4.5% weight loss), the second slope is from 250 to 500 °C (2% weight loss) and the third slope is almost horizontal from 500 to 900 °C. For sample 1.77, the first slope is from RT to 300 °C approximately (6% weight loss), the second slope from 300 to 550 °C (0.5% weight loss) and the third slope is almost horizontal from 550 to 900 °C. Therefore, the total weight loss in the synthetic samples is reached around 550 °C. All weight lost in these samples can be described by the loss of adsorbed water (up to 200 °C) followed by lattice water (up to 450 °C) mainly [22].

3.2.2. DSC analysis. DSC plots of all the samples are shown in figure 4. Enamel presents a pronounced exothermic peak from 300 to 400 °C, with a maximum around 350 °C, and a small one around 450 °C. Our FTIR and TPD results (described below) suggest that the first peak results from the elimination of organic material, and the second peak is related to the expulsion of lattice water. This interpretation is consistent with the weight loss pattern observed in the TGA experiments (see figure 3).

Dentine also presents a pronounced exothermic peak from 250 to 350 °C with a maximum around 300 °C and a small

shoulder around 400 °C. The first peak can be related to the organic material and the second to the lattice water and dentinal carbonate. Sample 1.67 presents a broad band, which seems to be the convolution of three exothermic peaks: one from 200 to 300 °C with the maximum at 250 °C, another from 250 to 400 °C with the maximum at 300 °C, and a small one around 500 °C. The peaks at 250 and 300 °C must be related to the expulsion of absorbed water and lattice water. The one at 500 °C should be related to the release of traces of water.

The DSC plots of the other two Ca/P samples are quite different from the one for enamel and dentine, but very similar among them. They present a broad band that indicates that the expulsion of absorbed water and lattice water is produced gradually, in a continuous manner. It is important to note that the area under the curve on each peak is related to the enthalpy of the sample. In this case, at constant volume of the sample, the amount is exactly the heat transfer of the processes that has taken place.

3.2.3. FTIR analysis. FTIR spectra of enamel and dentine (figure 5) showed the characteristic bands for PO_4^{3-} and OH^- due to HAP (see table 2) plus the carbonate (1545, 1460, 1415 and 870 cm^{-1}), organic material (C–H bands at 2930 and 2860 cm^{-1}) and adsorbed molecular water (3400 and 1634 cm^{-1}) bands. The differences in intensity of the C–H and water bands are produced by the corresponding differences in organic materials content (4% for enamel and 33% for dentine). CO_3^{2-} bands are common in biological apatites due to CO_2 in the environment [30, 31] and/or by a thermal decomposition product of carbonate ions that were retained in the enamel and dentine structures [32, 33]. The CO_2 band at 2326 cm^{-1} consists of two peaks: one is produced by $^{12}\text{CO}_2$ and the second is produced by $^{13}\text{CO}_2$ that is shifted to a lower λ because of the larger mass of $^{13}\text{CO}_2$. The carbonate bands at 1545 and 1460 cm^{-1} correspond to the incorporation of CO_3^{2-} at the OH^- position (A-type) and those at 1460 and 1419 cm^{-1} to the occupation of PO_4^{3-} sites in the apatite structure (B-type) [20, 34]. The band at 876 cm^{-1} has been assigned to both types of incorporation [35].

Thermal behaviour from 20 to 600 °C of the FTIR spectra of enamel and dentine is shown in figure 6. Absorbed water is completely gone around 400 °C in both cases, while organic material disappears up to 500 °C. Another fact is the sharpening of the CO_2 ion: it appears above 200 °C in enamel, reaching a maximum at 450 °C and diminishing at 600 °C. In dentine, it is always shown. PO_4^{3-} bands at 1090 and 1040 cm^{-1} become less sharp. In enamel, CO_3^{2-} bands at 1460 and 870 cm^{-1} are always present but growing less intense as temperature rises. The band at 1546 cm^{-1} is not observed after 200 °C. In dentine, these bands are also observed but the bands at 1415 cm^{-1} are not well defined while the bands at 870 cm^{-1} are always diminishing. The water band gradually changes with increasing temperature and the OH^- band at 3540 cm^{-1} becomes sharper because of the disappearance of absorbed water.

The FTIR spectra of the Ca/P samples from 20 to 600 °C are shown in figure 7. They are quite similar and also show the characteristic HAP bands plus the CH_2 , CO_3^{2-} and CO_2

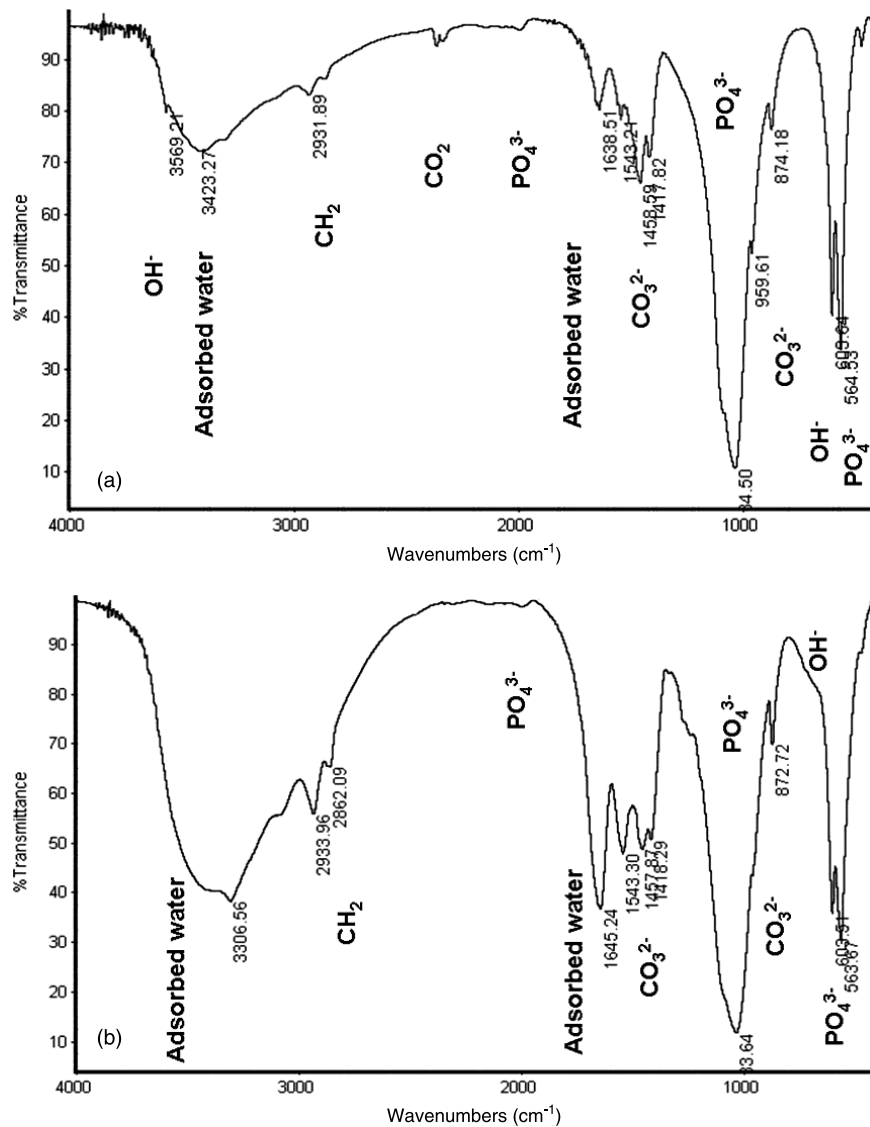


Figure 5. FRTIR graphics for human tooth enamel (a) and dentine (b). Note that the presence of collagen is greater in dentine than in enamel as expected.

bands. In this case, the CH_2 signal is coming from the synthesis method where some part of the hydrogen of the phosphoric acid solution (H_3PO_4) recombined with carbon from the environment. Both the adsorbed water and the CH_2 bands disappeared before 350°C . In sample 1.57 the CO_3^{2-} ion is always observed but diminishes during the heating treatment. The band at 870 cm^{-1} diminishes after 200°C . In sample 1.67 the band at 870 cm^{-1} always diminishes and disappears after 500°C . In sample 1.77, the 1415 cm^{-1} band is always observed but is not well defined; a rough definition is observed after 350°C and becomes broad at 600°C . The band at 870 cm^{-1} is always decreasing and disappears at 600°C . The FTIR spectra show the sharpening of the CO_3^{2-} bands during heating but it disappears around 600°C . The signals from CO_2 ions are always shown in sample 1.57 although their numbers are decreasing. In sample 1.67 it is small before 400°C , but increases afterwards. In sample 1.77, the CO_3^{2-} bands reach a maximum at 350°C and diminish afterwards. In the case of the OH^- , the band at 3540 cm^{-1} presents an increment as the

absorbed water disappears. In the three samples, after 400°C the OH^- band becomes less intense.

It is clear from these results that the OH^- ions are modified in all the samples together with the content of water. There are traces of the incorporation of CO_3^{2-} both in the OH^- position (A-type) and in the PO_4^{3-} sites (B-type) of the apatite structure, which modify the number of OH^- ions in the samples.

3.2.4. TPD analysis. TPD plots of the samples are shown in figure 8. Enamel presents two bands of water desorption (similar to the DSC graphics shown in figure 5): one is a broad band with a maximum around 200°C that corresponds to the expulsion of adsorbed water, the other shows a maximum around 450°C that corresponds to the expulsion of lattice water. Dentine also presents two bands, although the first one, from 100 to 300°C , seems to be the overlapping of three bands with maxima at 200 , 225 and 250°C . This band is related to the expulsion of adsorbed water and water related to organic material. The second band is observed from 300 to above

Table 2. Peaks, bands and assignments observed in the FTIR spectra for HAP.

Peak (cm ⁻¹)	Assignments
3800–3000	Adsorbed water molecules (broad absorption peak at 3400 cm ⁻¹)
3756	Asymmetric stretching mode (ν_3) for water associated with HAP
3657	Symmetric stretching mode (ν_1) for water associated with HAP
3660	OH ⁻ groups bonded to the Ca ²⁺ ions replaced by water molecules (stretching mode)
3570–3560	Stretching mode (ν_2) of the hydroxyl group
3492	Adsorbed water molecules (broad absorption peak at 3400 cm ⁻¹)
2950–2850	Stretching vibrations of a double bond C–H
2380–2320	Asymmetric stretch of CO ₂
2140	Harmonic overtone or combination PO ₄ ³⁻ band
2070–1989	Harmonic overtone 2(ν_3) or combination PO ₄ ³⁻ band ($\nu_1 + \nu_3$)
1650	C=O stretching, collagen
1646, 1595	Bending mode, ν_2 for water associated with HAP
1542	NH band coupled with CN stretching, collagen
1545–1539	Bending mode (ν_4) of CO ₃ ²⁻ in A-type for carbonated apatites
1458–1450	CH ₂ bend, collagen
1460–1454	Bending mode (ν_3) or (ν_4) of CO ₃ ²⁻ in B-type for carbonated apatites
1410–1420	Stretching mode (ν_3) of CO ₃ ²⁻ in carbonated apatites
1090–1032	Triply degenerated asymmetric stretching mode, ν_3 , of the P–O bond of the PO ₄ ³⁻
962	Non-degenerated symmetric stretching mode, ν_1 , of the P–O bonds of the PO ₄ ³⁻ group
875	Characteristic bending mode (ν_6) or (ν_2) of the CO ₃ ²⁻ carbonate group in A- and B-type in carbonated apatite
868	Stretching mode ν_3 of the CO ₃ ²⁻ carbonate group in carbonated apatite
631	Vibrational mode, ν_L , of the hydroxyl group
602–561	Triply degenerated bending mode, ν_4 , of the O–P–O bonds of the PO ₄ ³⁻ group
472–462	Double degenerated bending mode, ν_2 of the O–P–O bonds of the PO ₄ ³⁻ group

550 °C with the maximum around 450 °C and related to the expulsion of water dissolved in the lattice.

For the Ca/P samples, the TPD plots present only one sharper band with a more definite maximum of water desorption, although some of them could be produced by the overlapping of at least two peaks. For sample 1.57 there is a band from room temperature to 300 °C with the maximum position between 200 and 275 °C; for sample 1.67 it was registered from room temperature to 350 °C with a maximum close to 270 °C and for sample 1.77 it was observed from 50 to 275 °C with a maximum around 225 °C. These plots show the result of the expulsion of absorbed water and lattice-dissolved water from the chemical reaction of the OH radical expelled from the sample structure during heating.

4. Discussion

It is well known that synthetic HAP and other ceramics behave as dielectrics because their ionic–covalent bonding produces very low electrical conductivity and their resistivity differs by a factor as large as 10¹²–10²⁰ Ω cm in comparison with metals. However, the electrical conductivity increases in these ceramics when the temperature is raised because the thermal energy necessary for charge migration is provided by the system. In the samples of human tooth enamel, which is mostly composed of HAP, the electrical conductivity change has been reported at two different temperatures: 250 °C in the electron microscope and at 350 °C in a thermal analysis impedance experiment [4, 36]. This significant difference of 100 °C is produced because the electron microscope beam transfers

enough energy–momentum comparable to that provided by only heating in an impedance experiment.

The response of human tooth enamel and dentine to heating treatment can be summarized as follows. From room temperature to approximately 200 °C, adsorbed water is expelled; from 200 to 600 °C, removal of water from the lattice and organic material is present; and above 600 °C, the decomposition of carbonate compounds takes place. In the case of Ca/P samples, the expulsion of adsorbed water and lattice water is present from room temperature to 500 °C. Above 500 °C some traces of water are still measured. The water observed above 220 °C is explained by considering that some of the OH⁻ ions expelled from the structure can interact among them to give water as a product. Sadlo *et al* [37] suggested that O⁻ ions are located at the OH⁻ site with a vacancy on the nearest OH⁻ site and that their reaction takes place at temperatures above 330 °C [38]. Another possibility is the reactions between two OH⁻ ions giving water and free O²⁻ as a product; these O²⁻ ions react again with other OH⁻ because of their chemical affinity.

In the case of thermally assisted observations in the electron microscope, and considering the electron–atom interaction, Reyes-Gasga and García-García [5] have reported that OH⁻ ions are easily removed from the HAP lattice with relatively small electron beam energy, followed by Ca²⁺ and PO₄³⁻ at higher energies. Therefore, because adsorbed water and lattice water expulsion are registered at the temperatures reported for the electrical conductivity of enamel, the detached material related to the conductivity in human enamel is strongly related to the OH⁻ ion movement.

Moreover, structural measurements at temperatures above and below 250 °C have indicated that the conductivity changes

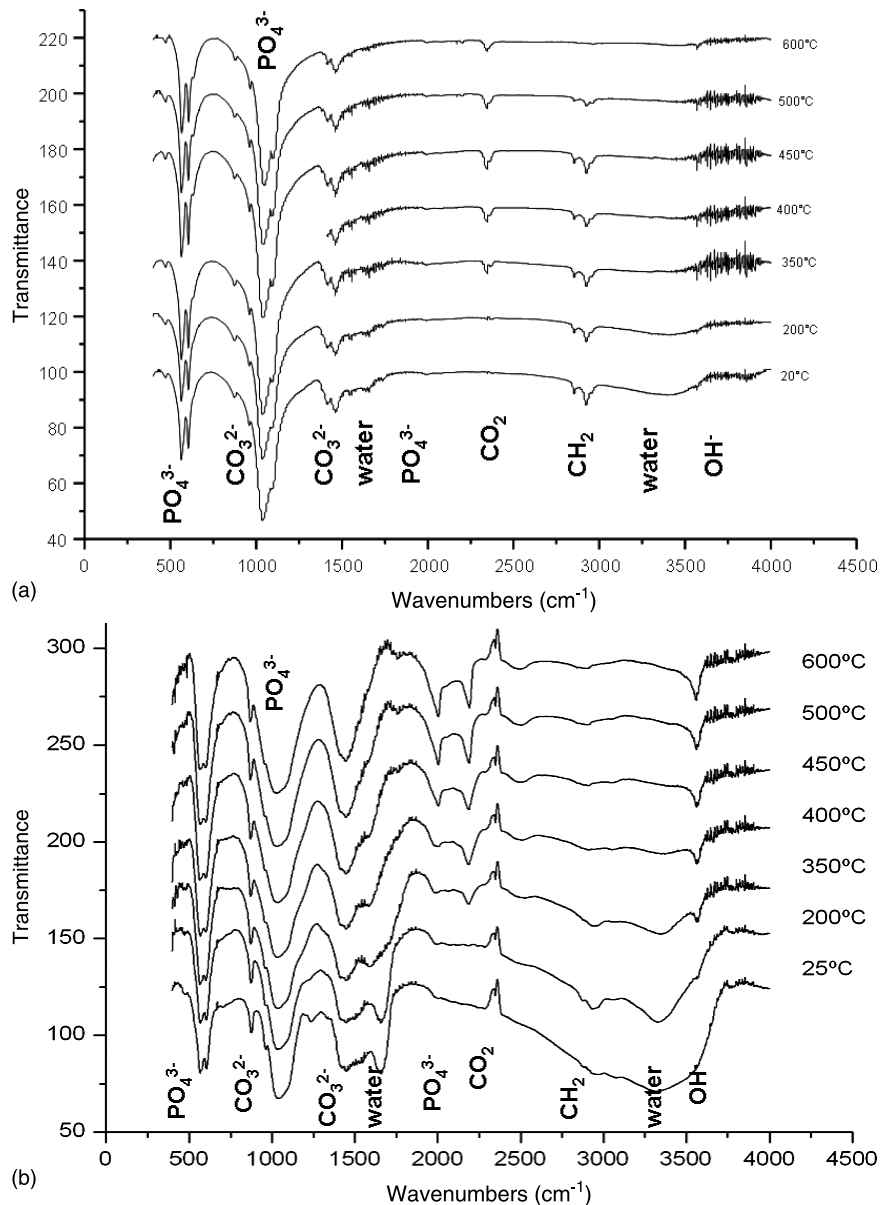


Figure 6. FRTIR graphics for human tooth enamel (a) and dentine (b) in the temperature range from RT (25 °C) to 600 °C.

registered in enamel are reversible: enamel samples above the temperature transition will again develop insulating properties upon cooling [4]. Given that enamel conductivity at this temperature is produced mainly by the OH⁻ ion movement, this reversible behaviour is produced by the non-significant change in the HAP lattice parameters and the water adsorption and desorption, which are also reversible in this temperature range [20]. However, this same water movement modifies the HAP unit cell above 500 °C and the human tooth enamel conductivity will be gradually limited by the degradation of the HAP structure after many on/off, as has also been experimentally reported [4, 36]. As similar results were presented by dentine and synthetic HAP samples, these samples should exhibit the conductivity characteristics exhibited by enamel.

Additionally, TEM *in situ* heating of the enamel samples reveals the presence of ramified carbon filaments, or 'bushes',

grown on the enamel surface at 200 °C [4]. The bushes nucleate as very small filaments and coarsen over time and their aggregation exhibits a Laplacian type behaviour [39, 40]. As heating increases, the volume of the bushes increases and ultimately leads to the formation of black spheres at 500 °C. Reyes-Gasga *et al* [4] indicated that the bushes grew by the aggregation of ionized hydrocarbon molecules on the electrical charged enamel surface insulator, and thus, structurally speaking, they are not HAP related. Moreover, the observation of these electron-beam-assisted bushes has been reported in other insulating materials such as glasses when they are exposed to the electron beam bombardment in a TEM [39, 40].

In this paper, an important relationship between the appearance of bushes and the insulator-to-electrical transition is observed: both the bushes and the electrical conductivity in enamel are observed at the temperature where absorbed

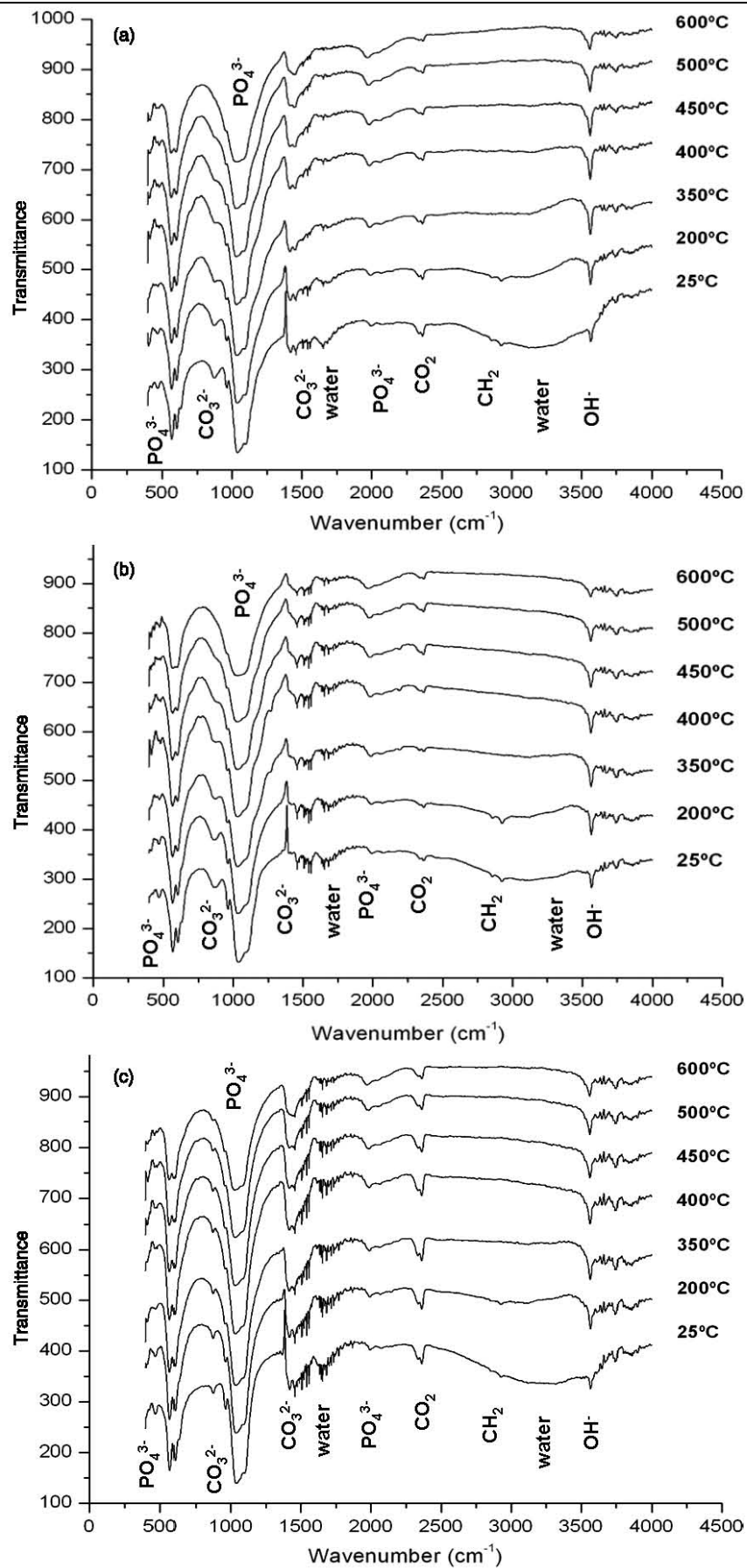


Figure 7. FTIR graphics for the synthetic hydroxyapatite samples in the temperature range from RT to 600 °C. (a) Sample 1.57, (b) sample 1.67 and (c) sample 1.77. Note the behaviour of the O–H groups.

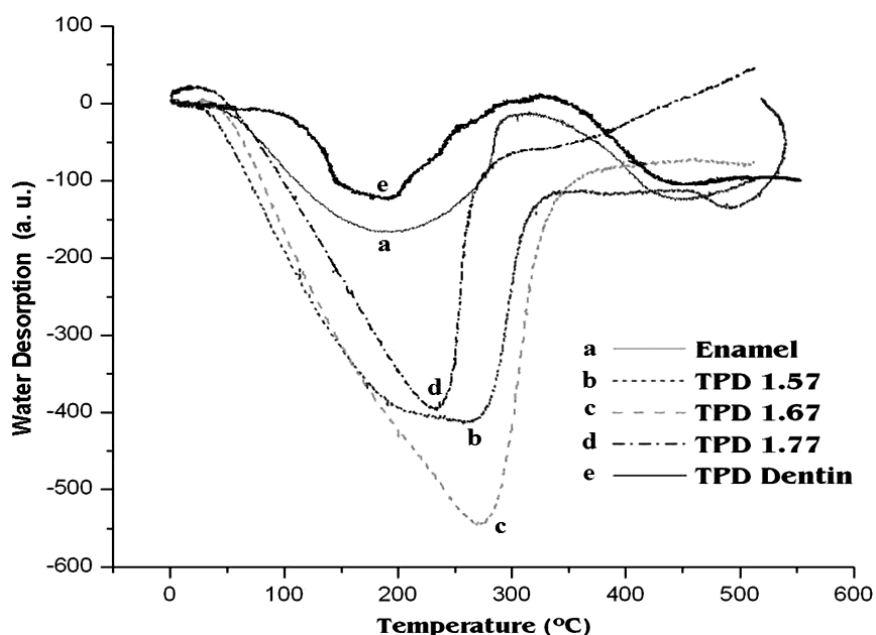


Figure 8. TPD graphics of the samples in the temperature range from 100 up to 700 °C. Note the existence of a double band in enamel.

water and lattice water are released from the structure of the sample. Then, the bushes should appear because the dielectric behaviour of the enamel enables the accumulation of carbon at the surface of the sample and growth following the trajectory of the electric field lines which are aligned in a perpendicular direction to the sample surface. As the temperature rises and the sample becomes electrically conductive, absorbed water and lattice water are released to the surrounding. Therefore, thermal conditions, the presence of hydrocarbon molecules and vapour from lattice water produce the morphology shown by these bushes (see figure 4 of [4]).

5. Conclusions

Release to the surroundings of absorbed water and lattice water (that results from the reaction of expelled OH^- ions) present during heating of the human tooth enamel suggests that they are responsible for the thermal conductivity and electric and/or ionic conductivity reported at 250 °C in the environment of the electron microscope (vacuum of 10^{-10} Torr approximately) and at 350 °C in air in the impedance experiment. Because the expelled or absorbed water and lattice water are also observed in dentine and synthetic HAP samples, variations in their conductivities must also be observed, but surely with some variations in temperature accordingly with the variations registered in the velocities of weight loss, as the thermal plots show.

Acknowledgments

The authors thank Dr R Velázquez-Castillo, Dr Lindsay A Haugland and Dr Edwin R García for useful comments on the interpretation of the data. They also thank A Gómez Cortés, R Hernández Reyes, C Magana Zavala, E Morales G, P Mexía Hernández, S Tehuacanero Nuñez, M Aguilar Franco,

J Cañetas, C Flores Morales and J Ocotlán for technical help with this work, and the financial support from DGAPA-UNAM under contract IN-111808.

References

- [1] Hontsu S, Matsumoto T, Ishii J, Nakamori M, Tabata T and Kawai H 1997 *Thin Solid Films* **295** 214–7
- [2] Reyes-Gasga J, Reyes-Reyes M and García-García R 2000 *Mater. Res. Soc. Symp.* **599** 91–6
- [3] Ducheyne P, Radin S, Heughebaert M and Heughebaert J C 1990 *Biomaterials* **11** 244–54
- [4] Reyes-Gasga J, García G R and Vargas-Ulloa L 1997 *Phil. Mag. A* **75** 1023–40
- [5] Reyes-Gasga J and García-García R 2002 *Radiat. Phys. Chem.* **64** 359–67
- [6] Reyes-Gasga J, García-García R, Alvarez-Fregoso O, Chavez-Caravayar J A and Vargas-Ulloa L 1999 *J. Mater. Sci.* **34** 2183–8
- [7] Sobel A E, Hanok A, Kirshner H A and Fankuchen I 1949 *J. Dent. Res.* **28** 61–7
- [8] He L H and Swain M V 2007 *Biomaterials* **28** 4512–20
- [9] Murray M M 1935 *J. Biochem.* **29** 1567–71
- [10] Burnett G W and Zenewitz J A 1958 *J. Dent. Res.* **37** 590–600
- [11] Gutierrez-Salazar M P and Reyes-Gasga J 2003 *Mater. Res.* **6** 367–73
- [12] Ragazzoni E, Martignoni M and Cocchia D 1995 *Minerva Stomatologica* **44** 376–80
- [13] Kinney J H, Marshal S J and Marshall G W 2003 *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **14** 13–29
- [14] Camerlingo C, Lepore C M, Gaeta G M, Riccio R, Riccio C, De Rosa A and De Rosa M 2004 *J. Dentistry* **32** 399–405
- [15] Kamikana K, Yoko T, Tanaka K and Fujiyama J 1989 *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **24** 827–30
- [16] Newesley H 1977 *J. Oral Rehab.* **4** 97–104
- [17] Arends J, Christoffersen J, Christoffersen M R, Eckert H, Fowler B O, Heughebaert J C, Nancollas G H, Yesinowski J P and Zawacki S J 1987 *J. Crystal Growth* **84** 512–32
- [18] Zhou J, Zhang X, Chenn J, Zeng S and De Groot K 1993 *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **4** 83–90

- [19] Prieto-Valdes J J, Victorero-Rodriguez A and Guevara-Carrio J 1995 *J. Mater. Res.* **10** 2174–7
- [20] LeGeros R Z, Bonel G and Legros R 1978 *Calcif. Tissue Res.* **26** 111–8
- [21] Miyaji F, Kono Y and Suyama Y 2005 *MRS-Bull.* **40** 209–20
- [22] Holager J 1970 *J. Dent. Res.* **69** 546–8
- [23] Lozano L F, Peña-Rico M A, Heredia A, Ocotlan-Flores J, Gomez-Cortes A, Velázquez R, Belio I A and Bucio L 2003 *J. Mater. Sci.* **38** 4777–82
- [24] Corcia J T and Moody W E 1974 *J. Dent. Res.* **53** 571–80
- [25] Ying D, Chuah G K and Hsu C Y S 2004 *J. Dentistry* **32** 41–6
- [26] Lin C P, Lee B S, Kok S H, Lan W H, Tseng Y C and Lin F H 2000 *J. Mater. Sci.* **11** 373–81
- [27] Lin F H, Liao C J, Chen K S and Sun J S 1998 *Biomaterials* **19** 1101–7
- [28] Johansen E and Armstrong W D 1964 *J. Dent. Res.* **43** 1007–20
- [29] Lim J J and Liboff A R 1972 *J. Dent. Res.* **51** 509–14
- [30] De Bruijn J D, Bovell Y P and Van Blitterswijk C A 1994 *Biomaterials* **15** 543–50
- [31] Chakraborty S, Bag S, Pal S and Mukherjee A K 2006 *J. Appl. Cryst.* **39** 385–90
- [32] Holcomb D W and Young R A 1980 *Calcif. Tissue Int.* **31** 189–201
- [33] Dowker S P E and Elliot J C 1983 *J. Solid State Chem.* **47** 164–73
- [34] Mayer I, Schneider S, Sydney-Zax M and Deutsch D 1990 *Calcif. Tissue Int.* **46** 254–7
- [35] Narasraju B and Phebe D E 1996 *J. Mater. Sci.* **31** 1–21
- [36] Muster D (ed) 1992 *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. Hard Tissue Repair and Replacement* (Amsterdam: Elsevier)
- [37] Sadlo J, Callens F, Michalik J, Stachowicz W, Mattys P and Boesman E 1998 *Calcif. Tissue Int.* **63** 409–15
- [38] Shi J, Klocke A, Zhang M and Bismayer U 2003 *Am. Mineral.* **88** 1866–71
- [39] Banhart F 1994 *Phil. Mag. Lett.* **69** 45–51
- [40] Banhart F 1995 *Phys. Rev. E* **52** 5156–60



Characterization of recombinant human cementum protein 1 (*hrCEMP1*): Primary role in biomineralization

Eduardo Villarreal-Ramírez^a, Abel Moreno^b, Jaime Mas-Oliva^c, Juan Luis Chávez-Pacheco^a, A. Sampath Narayanan^d, Ivet Gil-Chavarría^a, Margarita Zeichner-David^e, Higinio Arzate^{a,*}

^a Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados, Facultad de Odontología, UNAM, México D.F. 04510, Mexico

^b Instituto de Química, UNAM, México D.F. 04510, Mexico

^c Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México D.F. 04510, Mexico

^d Department of Pathology, School of Medicine, University of Washington, Seattle 98195, USA

^e Center for Craniofacial Molecular Biology, University of Southern California, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 April 2009

Available online 23 April 2009

Keywords:

Cementum

Biomineralization

Cementum protein 1

Mineralized tissues

Hydroxyapatite

Octacalcium phosphate

Periodontal regeneration

ABSTRACT

Cementum protein 1 (CEMP1) has been recently cloned, and *in vitro* experiments have shown functions as regulator of cementoblast behavior and inducer of differentiation of non-osteogenic cells toward a cementoblastic/osteoblastic phenotype. In this study, we have produced a full-length human recombinant CEMP1 protein in a human gingival fibroblast cell line. The purified protein (*hrCEMP1*) has a M_r 50,000. Characterization of *hrCEMP1* indicates that its secondary structure is mainly composed of β -sheet (55%), where random coil and alpha helix conformations correspond to 35% and 10%, respectively. It was found that *hrCEMP1* is *N*-glycosylated, phosphorylated and possesses strong affinity for hydroxyapatite. Even more important, our results show that *hrCEMP1* plays a role during the biomineralization process by promoting octacalcium phosphate (OCP) crystal nucleation. These features make CEMP1 a very good candidate for biotechnological applications in order to achieve cementum and/or bone regeneration.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Cementum is a unique avascular mineralized connective tissue that covers the root surface of teeth and provides the interface through which the root surface is anchored to collagen Sharpey's fibers of the periodontal ligament. Nevertheless, the complex processes that regulate cementogenesis and normal cementum metabolism remain unclear to date. Recent evidence indicates that cementum formation is critical for appropriate maturation of the periodontium [1]. Recently we have isolated and characterized a human cementum protein which we named Cementum Protein 1 (CEMP1), (GenBank Accession No. NP_001041677; HGNC: ID 32553) [2]. Antibodies against this protein recognize the cementoid layer and adjacent cementoblastic cell layer, cementocytes, progenitor cells located near the blood vessels in the periodontal ligament, cells located in the endosteal spaces of human alveolar bone, dental follicle-derived cells and human periodontal ligament cells [2–4]. CEMP1 mRNA is highly expressed in cementoblasts, subpopulations and progenitor cells of the human periodontal ligament [5]. *In vitro* experiments showed that CEMP1 promotes cell attachment, differ-

entiation [6,7], and deposition rate, composition, and morphology of hydroxyapatite crystals formed by human cementoblast cells [7]. Since CEMP1 is synthesized by cementoblast cells and, a restricted periodontal ligament cell subpopulations (cementoblast precursors), it is suggested that this molecule is a cementum-specific biological marker and it might play a role as regulator of cell differentiation. Furthermore, CEMP1 transfection into non-osteogenic cells such as adult human gingival fibroblasts results in differentiation of these cells into a “mineralizing” cell phenotype [8]. Although the physiological function of CEMP1 is not completely understood, it is our hypothesis that this molecule plays an important role during the cementogenesis process and also as an inducer of the formation of mineralizing nodules and calcium deposition during hydroxyapatite formation. Therefore, the aim of the present study was to characterize the physico-chemical characteristics of *hrCEMP1* expressed in a human gingival fibroblast cell line and determine post-translational modifications and their influence on CEMP1's functional properties during the mineralization process.

Materials and methods

Expression and purification of CEMP1. The open reading frame of CEMP1 (GenBank Accession No. NP_001041677), was subcloned

* Corresponding author. Fax: +52 5556225563.

E-mail address: harzate@servidor.unam.mx (H. Arzate).

into the pENTR/SD/D vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) and the resultant pENTR/SD/D-CEMP1 cDNA construct ligated into a pcDNA40(+) vector pcDNA40-CEMP1(+). Human gingival fibroblasts (HGF) were isolated and grown as previously described [3]. The plasmid pcDNA40-CEMP1(+) was transfected into human gingival fibroblasts cells as described elsewhere [8].

Recombinant human CEMP1 protein collected from conditioned media of HGF expressing CEMP1 was purified by Ni²⁺ affinity chromatography (HiTrap Chelating HP column, Invitrogen, Carlsbad, CA). Determination of protein purity was performed by 12% SDS-PAGE.

Western blot analysis. Recombinant human CEMP1 (10 µg) was separated by 12% SDS-PAGE and electroblotted onto Immobilon-P (PVDF) nitrocellulose membrane (Millipore Corp., Bedford, MA). Anti-hrCEMP1 and anti-6XHis (C-term) polyclonal antibodies were used to specifically identify the CEMP1 gene product and the fused histidines. Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG was used and secondary antibody and detection was performed as previously described [2].

Hydroxyapatite affinity chromatography. To determine if hrCEMP1 has affinity to hydroxyapatite, an Econo-Pac CHT-II cartridge (1 mL) (Bio Rad, Hercules, CA) was used. The column was equilibrated with 10 mM sodium phosphate, pH 7.2. Fifty micrograms of purified hrCEMP1 was loaded and unbound proteins removed with a solution containing 10 mM sodium phosphate, pH 7.2. Bound proteins were eluted with a solution containing 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 M sodium phosphate, pH 7.2. Fractions were subjected to 12% SDS-PAGE and Western blotting.

Circular dichroism spectroscopy. hrCEMP1 protein was dissolved in PBS, pH 7.4, at 200 µg/mL. The concentration was calculated from the absorption at 280 nm using an extinction coefficient of 28,125 M⁻¹ cm⁻¹ and deduced from the amino acid sequence [9]. CD spectra were recorded in thermostatted (25 °C) quartz cells of 1-mm optical path length within a wavelength range of 190–260 nm using a AVIV62DS spectropolarimeter. The molar ellipticity (θ) expressed in degrees·cm²·dmol⁻¹ was calculated on the basis of a mean residue of M_r 50,000. Five spectra were accumulated to improve the signal to noise ratio. A baseline with buffer (PBS, pH 7.4) was recorded separately and subtracted from each spectrum. The program CONTIN was used to calculate secondary structure content [10].

Dynamic light scattering (DLS). Light scattering experiments were performed using a Zetasizer Nano S (Malvern Instruments, Ltd., UK) molecular sizing instrument which employs a 4 mw, 633 nm semiconductor laser as light source and NIBS technology (Malvern Instruments, Ltd., UK) [11]. During experiments the temperature was held at 25 (0.1 °C) via a Peltier unit. Data analysis was performed using the Zetasizer Nano S DTS software package (Malvern Instruments, Ltd., UK).

Presence of cysteine disulfide bonds. Human recombinant CEMP1 at a 2.5 mM concentration was dissolved with 6 M guanidine-HCl containing 200 mM DTT. The protein was reduced at 37 °C overnight, and boiled for 5 min before the protein was loaded into a gel filtration column (1.5 × 10 cm Sephadex G-10, Pharmacia, Uppsala, SW) equilibrated with 300 mM acetic acid. The reduction state of hrCEMP1 was assessed by quantitation of thiols using an assay for dithiodipyridine. Briefly, hrCEMP1 was incubated with 6 M guanidine-HCl, 10 mM EDTA, 120 mM Na₂HPO₄, pH 6.6, and DTPD (4,4'-dithiodipyridine) added to a final concentration of 500 nM. Samples were incubated for 30 min at 25 °C and the A₃₂₄ was monitored to estimate the number of cysteine residues present.

Glycosylation analysis. Carbohydrates contained in hrCEMP1 were determined using the ECL glycoprotein detection system (Amersham Biosciences, UK). Briefly, samples were separated by 12% SDS-PAGE and electro-transferred as described above. Oxida-

tion was carried out in the dark with 10 mM sodium metaperiodate dissolved in 100 mM acetate buffer, pH 5.5. Samples were treated with biotin hydrazide to incorporate biotin into the oxidized carbohydrate and biotin was detected by the horseradish peroxidase-conjugated streptavidin system using enhanced chemiluminescence (ECL, Millipore Corp., Bedford, MA).

Release of N-linked oligosaccharides. N-Glycans were released from 200 µg of hrCEMP1 by enzymatic cleavage using peptide N-glycosidase F (Calbiochem® Glycoprotein Deglycosylation kit, Merck Biosciences Ltd., Nottingham, UK). The protein was resuspended with 10 µL of 250 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 and 2.5 µL of denaturation solution (2% w/v SDS, 1 M β-mercaptoethanol). The mixture was heated at 100 °C for 5 min. One unit of PNGase F was added and incubated for 24 h at 37 °C. The N-linked glycosylation pattern of hrCEMP1 was resolved by 12% SDS-PAGE.

hrCEMP1 phosphorylation. According to 'in silico' analysis, hrCEMP1 possesses multiple potential phosphorylation sites. Eighteen phosphorylation sites (10 serine, 8 threonine) were predicted by the NetPhos 2.0 program [2]. Tyrosine is not present in the hrCEMP1 amino acid sequence. To determine if serine and threonine phosphorylation is present in hrCEMP1, hrCEMP1 secreted to the media and purified by Ni²⁺ affinity chromatography was used. Human recombinant CEMP1 was subjected to 12% SDS-PAGE and electrotransferred as described above. Membranes were blocked as described, and incubated with primary polyclonal antibodies against phosphothreonine and phosphoserine (Zymed, San Francisco, CA, USA). After washing, membranes were incubated with the horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody. Membranes were washed and detection of secondary antibody performed as previously described.

hrCEMP1 effect on apatite formation. To determine if hrCEMP1 promotes apatite formation, a capillary counterdiffusion system was used [13–15]. Briefly, 1% (w/v) agarose gel containing 20 µg/mL of hrCEMP1 was poured into the capillaries (0.5 mm diameter and 30 mm long). The ends of the capillaries were injected with 100 mM CaCl₂ and 100 mM NaH₂PO₄. All experiments were carried out at 37 °C. After 7 days, the crystals were recovered by dissolving the gel in hot milli Q water and air-dried.

Energy-dispersive X-ray micro-analysis (EDX). The composition of crystals formed by induction of hrCEMP1 into the capillaries was analyzed using a Jeol 5600 scanning electron microscope fitted with a detector of energy dispersive X-ray microanalysis microprobe. All analyses were performed at 20 kV for 300 s [16]. Crystals were analyzed in low vacuum and the calcium/phosphate (Ca/P) ratio was calculated from the intensity of the peaks present in the EDX pattern. After determining the composition of the crystals, they were covered with a thin gold film, 100 nm thick, to avoid electron disturbances that could interfere with the SEM images.

Electron diffraction pattern by transmission electron microscopy. Crystals were mounted on carbon-coated 150-mesh gold grids and examined for diffraction techniques. D-spacings of diffraction patterns were calibrated against those used as gold standard with identical diffraction conditions. The mineral phase was analyzed by means of a JEOL 100 CX analytical transmission microscope employing 100 kV.

Results and discussion

Isolation of human CEMP1 by recombinant expression

Previously, we have expressed hrCEMP1 in a prokaryotic expression system; however, this system is not able to express the full-length recombinant CEMP1 [2]. In this study, human recombinant CEMP1 was expressed in human-derived gingival fibroblasts as a secreted 6XHis fusion protein and latter purified

by affinity chromatography using a Ni²⁺ column. The yield of recombinant CEMP1 per liter of serum-free media was about 1 mg. After SDS–PAGE and coomassie blue staining, the protein presented a M_r 50,000 (Fig. 1A, lane 2). The identity of the human recombinant protein was determined by Western blot analysis using a specific polyclonal antibody against the 6XHis tag (Fig. 1A, lane 3) and a specific polyclonal antibody against *hrCEMP1* (Fig. 1A, lane 4). Both antibodies recognized a single protein species of M_r 50,000 which is almost twice the theoretical molecular mass deduced from the cDNA sequence (25.9 kDa) [2]. This data shows that we are able to produce the full-length recombinant human CEMP1 in high yields using a human gingival fibroblasts-derived cell line.

hrCEMP1 secondary structure

Circular dichroism of *hrCEMP1* showed that the spectra bands present its maximum value at 218 nm. This determines that the secondary structure present in *hrCEMP1* is mainly composed of β -sheet. CD spectra analysis revealed 10% α -helix, 32.4% β -anti-parallel, 5.8% β -parallel, 16.7% β -turn and 35% random coil (Fig. 1B). This result was consistent even when different concentrations of trifluoro ethanol (20% and 40%) were used in order to determine if a change in the structure could be induced. Recently, it has been show that proteins with high percentages of random coil structure are multifunctional and allow proteins to have diverse binding properties such as SIBLING and HMGI(Y) [16,17]. This feature might explain why *hrCEMP1* regulates crystal growth and composition of hydroxyapatite crystals [7]. CEMP1 also induces the expression of proteins related to mineralization and promotes *in vitro* osteoblastic and/or cementoblastic cell differentiation of HGF [8].

Dynamic light scattering and cysteine disulfide bonds

Dynamic light scattering analysis revealed that *hrCEMP1* aggregates mainly as 6.50 nm particles. Such aggregates are

contributed by one type of molecule with a M_r 50,000 (Fig. 1C). Our results showed that *hrCEMP1* did not react with sulfhydryl groups. Therefore, all cysteine residues present in *hrCEMP1* might be linked to disulfide bridges. Disulfide bridges generally play a role stabilizing protein structure [18–20]. From our results we infer that disulfide bridges contribute to *hrCEMP1*'s secondary structure stabilization.

hrCEMP1 glycosylation and N-linked oligosaccharides

According to *in silico* analysis (NetNGlyc, neural net bioinformatic program) [12], *hrCEMP1* possesses two N-glycosylation sites Asn-X-Ser/Thr in amino acids 20 and 25. After digestion of the protein with PNGase F, our results demonstrate that *hrCEMP1* is a glycoprotein with a M_r 50,000 and shifted from M_r 50,000 (Fig. 2C) to a M_r 39,000 species (Fig. 2F and G), which represents 22% of N-glycosylation of *hrCEMP1*. O-linked glycosylation (Ser/Thr) predicted 13 sites by *in silico* analysis. After digestion with endo- α -N-acetylgalactosaminidase, α 2–3,6,8,9-neuraminidase, β 1,4-galactosidase, and β -N-acetylglucosaminidase, there were no changes in *hrCEMP1*'s M_r (2H). Western blots performed with the digestions described above, cross-reacted with anti-CEMP1 polyclonal antibody (Fig. 2I).

By comparison with the theoretical protein molecular mass for *hrCEMP1* (25.9 kDa) deduced from the cDNA sequence, a contribution of 43.5% by post-translational modifications is present in *hrCEMP1*. However, it is important to consider that V5 epitope and 6XHis tag included into the vector contribute with 5 kDa to the M_r of *hrCEMP1*. Although the precise role of attached carbohydrates in *hrCEMP1* is unknown, glycosylation may affect *hrCEMP1*'s function during the mineralization process. Glycans have been associated to this process because their anionic surface can bind a large number of Ca²⁺ ions and regulate hydroxyapatite crystal growth [21]. Glycans are also implicated in the regulation of endochondral ossification, bone remodeling and fracture healing [22].

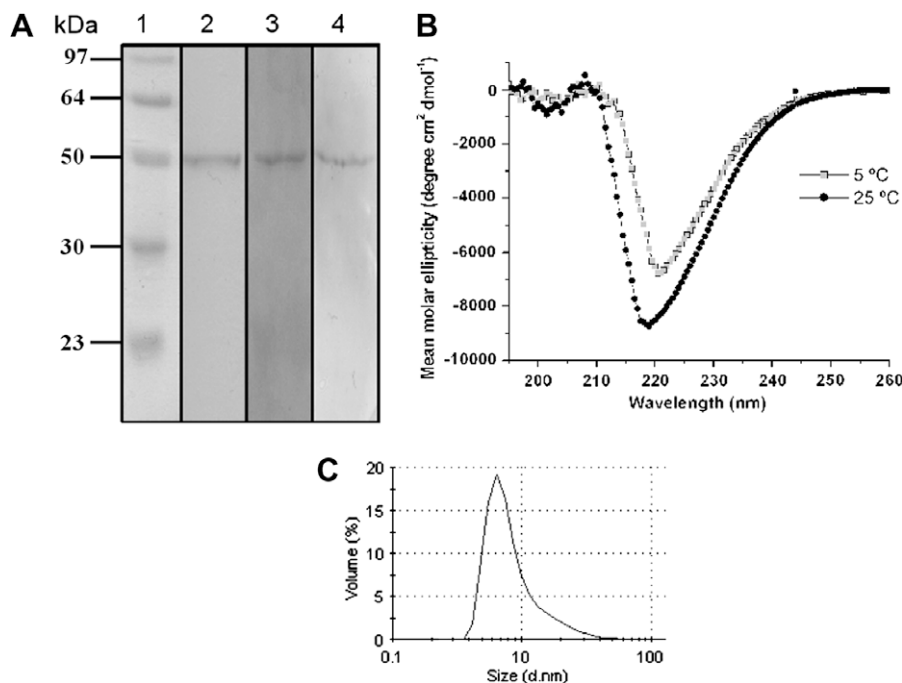


Fig. 1. SDS–PAGE showed a M_r 50,000 species representing *hrCEMP1* (A, lane 2). Western blot confirmed the identity of *hrCEMP1*. Anti-6XHis antibody (A, lane 3), anti-*hrCEMP1* (A, lane 4). Circular dichroism revealed that *hrCEMP1* is mainly structured as β -sheet and random coil (B). Dynamic light scattering shows that *hrCEMP1* aggregates mainly at 6.50 nm and represents a single molecule of M_r 50,000 (C).

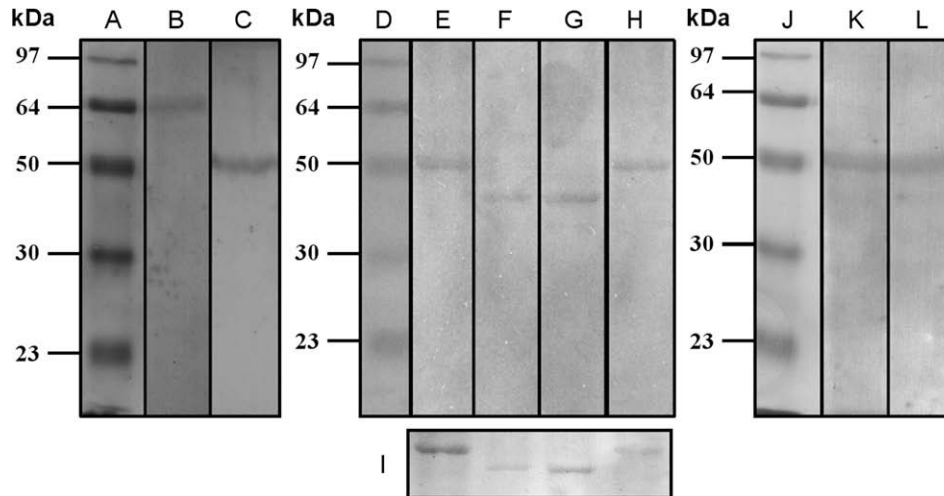


Fig. 2. Transferrin glycoprotein control (B). Human recombinant CEMP1 represents a glycoprotein (C). Deglycosylation of *hrCEMP1*. Human recombinant CEMP1 SDS-PAGE silver stained (D). Incubation of *hrCEMP1* with a mixture of *N*-linked and *O*-linked deglycosylated enzymes shows a M_r 11,000 difference respect to untreated samples (E). *N*-Deglycosylated enzyme shows a change of *hrCEMP1*'s by 43.5% (F). *O*-Deglycosylated shows no change in *hrCEMP1*' M_r (G). Western blot shows that species mentioned above cross-reacted with anti-*hrCEMP1* polyclonal antibody (H). Western blot reveals that *hrCEMP1* is phosphorylated at threonine (I) and serine residues (J).

hrCEMP1 phosphorylation

Detection of phosphorylation was done using anti-phospho-serine and threonine antibodies. Our data indicates that both antibodies cross-reacted with the *hrCEMP1* M_r 50,000 species (Fig. 2K and L). The presence of phosphate favors Ca^{2+} binding to the protein [23,24] and proteins associated to the mineralization process such as: BSP, OPN and DSSP are highly phosphorylated at the threonine and serine residues [25]. This data suggests a role for *hrCEMP1* at the early stages of mineralization during octacalcium phosphate formation (OCP).

Human recombinant CEMP1 possesses strong affinity for hydroxyapatite

Previous results have shown that CEMP1 plays a role during the mineralization process [7]. The data presented in Fig. 3 shows that *hrCEMP1* purified from HGF/CEMP1 conditioned media possesses affinity for hydroxyapatite and the species with a M_r 50,000 was recovered only when the column was washed with 300 mM sodium phosphate pH 7.2 (Fig. 3B). The identity of the eluted protein as *hrCEMP1* was confirmed using the polyclonal antibodies against 6XHis tag and *hrCEMP1* (Fig. 3C and D), respectively. Proteins not

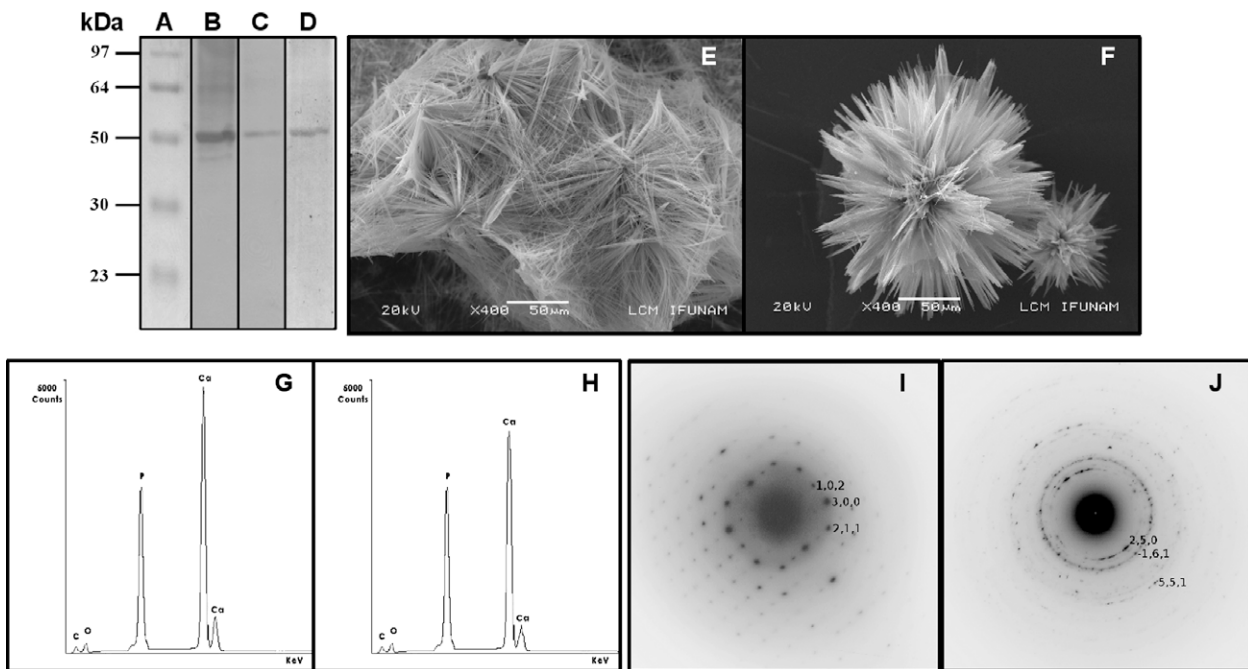


Fig. 3. Hydroxyapatite affinity of *hrCEMP1*. SDS-PAGE Coomassie-stained *hrCEMP1* (B). CEMP1 binding to hydroxyapatite column (C). Eluted fraction cross-reacted with anti-*hrCEMP1* polyclonal antibody (D). Hydroxyapatite crystal morphology shows raft-plaque-like features of control crystals (E). Crystals formed in presence of *hrCEMP1* acquired a druse and needle-like morphology (F). EDX analyses reveal prominent peaks of P and Ca^{2+} for control crystals which represent hydroxyapatite (G). Crystals formed in presence of *hrCEMP1* correspond to OCP (H). Electron diffraction pattern of hydroxyapatite monocrystal (I) and OCP experimental crystals formed under *hrCEMP1*'s induction (J).

related to the mineralization process elute at lower concentrations of sodium phosphate [26], whereas proteins implicated with the biomineralization process elute at concentrations between 200 and 300 mM sodium phosphate. Accordingly to this result, *hrCEMP1* expressed in a prokaryote system present the same affinity to hydroxyapatite (data not shown), as the protein expressed in eukaryotic cells. These results indicate that *hrCEMP1* possesses intrinsic properties to bind to hydroxyapatite even without post-translational modifications.

hrCEMP1 effect on apatite formation

The morphology of apatite crystals grown in absence of *hrCEMP1* had raft-plaque-like shape and microscopic crystals with a globular-spherulite-like shape (Fig. 3E). However, crystals grown in the presence of *hrCEMP1* showed drusa-like shape and a combined drusa-like and needle-like morphology (Fig. 3F). Human recombinant CEMP1 induces the formation of polymorphous crystals as confirmed by X-ray diffraction. Elemental analysis performed with EDX determined the Ca/P ratio to be 1.67 for control crystals, equal to the theoretical Ca/P ratio of 1.67 for hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) according to ICDD file: PDF#24-0033 (Fig. 3G). Whereas, experimental conditions using *hrCEMP1* determined that the crystals are OCP, ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_65\text{H}_2\text{O}$) and EDX elemental analysis determined a Ca/P ratio of 1.33 according to ICDD file: PDF#26-1056 (Fig. 3H). Furthermore, diffraction patterns for the crystals formed under control and experimental conditions were analyzed and index assigned. Diffraction patterns for the control conditions represent hydroxyapatite according to the Miller index (*hkl*: 1 0 2; *hkl*: 3 0 0 and *hkl*: 2 1 1) with interplanar distances of 3.17 Å, 2.72 Å and 2.81 Å, respectively (Fig. 3I). Crystals formed in presence of *hrCEMP1* represent OCP according to the Miller index (*hkl*: 2 2 1; *hkl*: -1 2 2 and *hkl*: -4 -4 1) with interplanar distances of 3.74 Å, 2.94 Å and 2.15 Å, respectively (Fig. 3J).

Taken all together, these results demonstrated that biologically active *hrCEMP1* plays a role during the biomineralization process, that it is required for the synthesis of needle-shaped OCP crystals and responsible for OCP crystal nucleation activity. OCP is found to be a transient phase during the growth of biological crystals. In small crystals, OCP is completely transformed into HA by hydrolysis and can only be detected in larger crystals because of its slow kinetics of transformation. OCP has also been presumed a necessary precursor of biological apatites in both normal (enamel, dentine, cementum, and bone) and pathological (e.g., phosphatic renal stones) calcifications.

The initial basis of CEMP1's as a possible therapeutic agent rests on evidence showing that CEMP1 has a role during the biological mineralization process of cementum-like tissue, and that induces *in vitro* phenotypic changes from non-osteogenic cells to an osteoblastic/cementoblastic phenotype [8]. Accordingly, other molecules related to the mineralization process such as BMP-2, 4 and 7 have been established to induce reparative/regenerative mineralized tissue formation [27]. Sustained delivery of BMP-2 using gene therapy has shown to induce bone formation *in vivo* [28]. Recombinant human amelogenin protein (rHAM(+)), has also been shown to be effective to induce *in vivo* regeneration of all tooth-supporting tissues after creation of an experimental periodontitis model in dogs, where the recruitment of mesenchymal progenitor cells is a key factor during the formation of regenerated periodontal tissues [29]. Amelogenin and other proteins such as OCN, BSP and OPN have the ability to bind and to regulate hydroxyapatite crystal growth and nucleation as well as to promote mineralization [30,31]. New therapeutic strategies such as the use of PLGA scaffolds for tissue engineering applications could be applied to demonstrate the ability of a single protein to bring about regeneration of mineralized tissues. These strategies could pave the way

for development of new therapeutic devices for treatment of periodontal and bone diseases based on recombinant human CEMP1.

Conclusions

Studies on the function and structure of CEMP1 have been hampered by the difficulties in the isolation of protein from human and/or bovine cementum, due mainly to its low metabolic turnover rate, the amount of tissue being deposited and, its entrapment in hydroxyapatite. In this study, we showed the production, purification and characterization of a full-length *hrCEMP1* employing for its synthesis an eukaryotic system. In addition, we demonstrated that CEMP1 is post-translational modified, *N*-glycosylated and phosphorylated. We also showed that *hrCEMP1* plays a role during the mineralization process by promoting OCP crystal growth. These results provide the basis for future studies analyzing the potential characteristics of this novel protein towards new therapeutic strategies in order to treat individuals affected by disorders affecting mineralized tissues and to promote regeneration of cementum and/or bone in adult tissues.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Pedro Bosch and Dr. José Reyes. This study was supported by funds from DGAPA-UNAM (IN200908), CONACyT 48638 to H.A. and 82888 to A.M.

References

- [1] D.D. Bosshardt, S. Zalzal, M.D. McKee, A. Nanci, Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum, *Anat. Rec.* 250 (1998) 13–33.
- [2] M.A. Alvarez-Perez, S. Narayanan, M. Zeichner-David, B. Carmona-Rodríguez, H. Arzate, Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23), *Bone* 38 (2006) 409–419.
- [3] A.S. Narayanan, R.C. Page, Biochemical characterization of collagens synthesized by fibroblasts derived from normal and diseased human gingiva, *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 5464–5471.
- [4] M. Zeichner-David, K. Oishi, E. González, Z. Su, V. Zakartchenko, L.S. Chen, H. Arzate, P. Bringas, Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development, *Dev. Dyn.* 228 (2003) 651–663.
- [5] H. Arzate, L.F. Jiménez-García, M.A. Alvarez-Pérez, A. Landa, I. Bar-Kana, S. Pitaru, Immunolocalization of a human cementoblastoma conditioned medium-derived protein, *J. Dent. Res.* 81 (2002) 541–546.
- [6] H. Arzate, J. Chimal-Monroy, L. Hernández-Lagunas, L. Díaz de León, Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells, *J. Periodont. Res.* 31 (1996) 144–148.
- [7] M.A. Alvarez Pérez, S. Pitaru, O. Alvarez-Fregoso, J. Reyes Gasga, H. Arzate, Anticementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line, *J. Struct. Biol.* 143 (2003) 1–13.
- [8] B. Carmona-Rodríguez, M.A. Alvarez-Pérez, A.S. Narayanan, M. Zeichner-David, J. Reyes-Gasga, J. Molina-Guarneros, A. García-Hernández, J. Suárez-Franco, I. Gil Chavarría, E. Villarreal-Ramírez, H. Arzate, Human cementum protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358 (2007) 763–769.
- [9] P. Mendoza-Espinosa, A. Moreno, R. Castillo, J. Mas-Oliva, Lipid dependant disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein CI derived peptides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365 (2008) 8–15.
- [10] S.W. Provencher, J. Glöckner, Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism, *Biochemistry* 20 (1981) 33–37.
- [11] A. Moreno, J. Mas-Oliva, M. Soriano-García, C. Salvador-Oliver, V.M. Bolaños-García, Turbidity as a useful optical parameter to predict protein crystallization by dynamic light scattering, *J. Mol. Struct.* 519 (2000) 243–256.
- [12] N. Blom, T. Sicheritz-Ponten, R. Gupta, S. Gammeltoft, S. Brunak, Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence, *Proteomics* 4 (2004) 1633–1649.
- [13] L. Silverman, A.L. Boskey, Diffusion systems for evaluation of biomineralization, *Calcif. Tissue Int.* 75 (2004) 494–501.
- [14] C.E. Tye, K.R. Rattray, K.J. Warner, J.A.R. Gordon, J. Sodek, G.K. Hunter, H.A. Goldberg, Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 7949–7955.
- [15] J.M. García-Ruiz, Counterdiffusion methods for macromolecular crystallization, *Methods Enzymol.* 368 (2003) 130–154.

- [16] F.J. Cuisinier, R.W. Glaisher, J.C. Voegel, J.L. Hutchison, E.F. Brès, R.M. Frank, Compositional variations in apatites with respect to preferential ionic extraction, *Ultramicroscopy* 36 (1991) 297–305.
- [17] A.K. Dunker, Z. Obradovic, The protein trinity-linking function and disorder, *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 805–806.
- [18] Q.Q. Hoang, F. Sicheri, A.J. Howard, D.S.C. Yang, Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure, *Nature* 425 (2003) 977–980.
- [19] E. Hohenester, P. Maurer, C. Hohenadl, R. Timpl, J.N. Jansonius, J. Engel, Structure of a novel extracellular Ca⁽²⁺⁾-binding module in BM-40, *Nat. Struct. Biol.* 3 (1996) 67–73.
- [20] B. Kaufmann, S. Müller, F. Hanisch, U. Hartmann, M. Paulsson, P. Maurer, F. Zaucke, Structural variability of BM-40/SPARC/osteonectin glycosylation: implications for collagen affinity, *Glycobiology* 14 (2004) 609–619.
- [21] C.C. Chen, A.L. Boskey, Mechanisms of proteoglycan inhibition of hydroxyapatite growth, *Calcif. Tissue Int.* 37 (1985) 395–400.
- [22] W.J. Grzesik, C.R. Frazier, J.R. Shapiro, P.D. Sponseller, P.G. Robey, N.S. Fedarko, Age-related changes in human bone proteoglycan structure: impact of osteogenesis imperfecta, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 43638–43647.
- [23] M.A. Torres-Quintana, S. Lécolle, M. Goldberg, Effects of inositol hexasulphate, a casein kinase inhibitor, on dentine phosphorylated proteins in organ culture of mouse tooth germs, *Arch. Oral. Biol.* 43 (1998) 597–610.
- [24] S. Jono, C. Peinado, C.M. Giachelli, Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 20197–20203.
- [25] M. Zeichner-David, F. Hall, R. Williams, F. Thiemann, S. Yen, M. MacDougall, H.C. Slavkin, Characterization of protein kinases involved in dentinogenesis, *Connect. Tissue Res.* 33 (1995) 87–95.
- [26] S. Hjerten, O. Levin, A. Tiselius, Protein chromatography on calcium phosphate columns, *Arch. Biochem. Biophys.* 65 (1956) 132–155.
- [27] M. Nakashima, Induction of dentin formation of canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic protein (BMP)-2 and 4, *J. Dent. Res.* 73 (1994) 15515–15522.
- [28] B. Yue, B. Lu, K.R. Dai, X.L. Zhang, C.F. Yu, J.R. Lou, T.T. Tang, BMP2 gene therapy on the repair of bone defects of aged rats, *Calcif. Tissue Int.* 77 (2005) 395–403.
- [29] A. Haze, A.L. Taylor, S. Haegewald, Y. Leiser, et al., Regeneration of bone and periodontal ligament induced by recombinant amelogenin after periodontitis, *J. Cell. Mol. Med.* (2009), doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00700.x.
- [30] Q.Q. Hoang, F. Sicheri, A.J. Howard, D.S. Yang, Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure, *Nature* 425 (2003) 977–980.
- [31] G.K. Hunter, H.A. Goldberg, Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 8562–8565.