



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

ESTUDIO DE PLEGAMIENTO Y ESTABILIDAD ESTRUCTURAL DE LA
PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO RADICULAR (HACD1/CAP).

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

MIKADO ALEJANDRO NIDOME CAMPOS

TUTOR:

Dr. ENRIQUE ROMO ARÉVALO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., JUNIO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Al Dr. Enrique Romo Arévalo, quién compartió conmigo su pasión por la ciencia y conocimiento, a pesar de los obstáculos en el camino ambos logramos aprender mucho uno del otro. Agradezco todo el tiempo que dedicó a mi aprendizaje y a formar a un hombre de bien. Prometo seguir trabajando arduamente y hacerlo sentir orgulloso de su labor como docente día a día.

Al Dr. Higinio Arzate, por permitirme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y apoyarme en el ámbito académico y personal cuando más lo necesité.

A mi jurado de examen de grado: Dr. Edgar Zenteno Galindo, Dra. Marta Contreras Zentella, Dr. Jesús Arenas Alatorre y Dra. Gabriela Mercado Celis; por su tiempo dedicado a leer mi tesis y por el aporte de ideas y comentarios para el enriquecimiento de este trabajo.

A la Dra. Adela Rodríguez, Dra. Patricia Cano, Dra. Alejandra Hernández y Dra. Annia Rodríguez del Instituto de Química de la UNAM, por el apoyo brindado en la realización de los experimentos de este trabajo.

A la M. en C Jaqueline Cañetas Ortega, del Laboratorio Central de Microscopía del Instituto de Física de la UNAM por el apoyo en la obtención de imágenes de microscopía.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de biología periodontal y Tejidos Mineralizados: Sonia, Rodrigo, Fabiola, Rita, Gonzalo y Mary Chuy por todo su apoyo, conocimiento compartido y consejos durante este proceso de aprendizaje. Extiendo mi más profundo agradecimiento a Lía, quien ha sido mi guía de vida en los últimos años y a quien debo infinitamente su ayuda brindada para que pudiera salir adelante en los momentos más difíciles en mi vida.

A mis compañeros de generación: Kevin, Óscar y Rafa. Gracias por su amistad, apoyo incondicional y aguantarme en este viaje.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IA202516.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me brindó como apoyo para realizar mis estudios de maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a quién le debo todo lo que soy. Gracias por darme tanto.

Dedicatorias

A mis padres, por apoyarme incondicionalmente en todos mis proyectos de vida, por creer siempre en mí y darme siempre su cariño.

A mis hermanos, Mario, Miguel, Marcos y Midori. Gracias por soportar mi forma de ser. Les dedico este trabajo para que recuerden que siempre hay que mirar hacia adelante, pero sin olvidar de dónde venimos. El límite del éxito siempre lo pondrán ustedes.

A mis amigos: Caro, Isabel, Yahir, Daniel, Raquel y Ana, quienes siempre estuvieron al pendiente de mi trabajo, de mi persona y dedicaron siempre un poco de su tiempo para visitarme, platicar conmigo y a ayudarme a salir adelante. Muchas Gracias.

Al Dr. José Arturo Fernández Pedrero y al Dr. Arturo Saracho Alarcón, por siempre apoyarme, creer en mí y brindarme la oportunidad de comenzar a hacer realidad mi sueño como docente.

Especialmente dedico este trabajo a mi mentor, el Dr. Gilberto Nidome, aunque sé que no podrás leer esto, quiero que sepas que logré alcanzar una meta más en mi vida. Espero estés muy orgulloso de mi, estés donde estés.

ÍNDICE	
Lista de abreviaturas	1
Resumen	2
Abstract	4
Introducción	6
Marco teórico	8
Periodonto.....	8
Niveles de organización estructural de las proteínas	10
Proteínas involucradas en el proceso de biomineralización del cemento radicular	11
Proteínas cemento específicas: CEMP-1 y HACD1/CAP.....	12
Planteamiento del problema y Justificación	15
Hipótesis	15
Objetivos	16
Material y métodos	17
Resultados	23
Diseño del vector pDEST42/HACD1/CAP	23
Cinética de expresión de la proteína recombinante humana hrHACD1/CAP	23
Purificación de la especie de hrHACD1/CAP de mayor peso molecular	24
Purificación de monómero de hrHACD1/CAP.....	30
Determinación de la masa molecular	39
Elaboración del modelo tridimensional teórico de hrHADC1/CAP.....	40
Determinación del contenido de estructura secundaria	43
Ensayos de desplazamiento térmico de hrHACD1/CAP (pH)	45
Comportamiento de oligomerización / monodispersidad en solución de hrHACD1/CAP	47
Prueba de actividad biológica.....	52
Caracterización morfológica de cristales inducidos con hrHACD1/CAP.....	52
Caracterización de composición de cristales inducidos con hrHACD1/CAP	56
Discusión	59
Conclusiones	64
Perspectivas	65
Referencias	66
Apéndice	71

LISTA DE ABREVIATURAS

6x-His	Bandera de seis histidinas
ALP	Fosfatasa alcalina
BMP	Proteína morfogenética de hueso
BSA	Albúmina de suero bovina
BSP	Sialoproteína ósea
HACD1/CAP	Proteína de adhesión del cemento radicular
CEMP1	Proteína del cemento 1
D.C.	Dicroísmo circular
Da	Dalton
DLS	Dispersión dinámica de luz
DTT	Ditiotreitol
EDS	Energía dispersiva de rayos X
FPLC	Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad
HEPES	Ácido(4-(2-Hidroxietil) piperazina-N-etanosulfónico
hrHACD1/CAP	Proteína de adhesión del cemento radicular recombinante humana
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodalton
M	Molar
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz – Tiempo de vuelo
μ l	Microlitro
μ g	Microgramo
mg	Miligramo
mM	Milimolar
<i>Mr</i>	Movilidad relativa
nm	Nanómetro
OCN	Osteocalcina
OPN	Osteonectina
PBS	Amortiguador de fosfatos
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poli(acrilamida dodecilsulfato de sodio
T _m	Temperatura media de desnaturalización
V5	Bandera V5 (GKPIPPLLGLDST)

RESUMEN

La finalidad de este trabajo es aportar conocimiento acerca de la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) y mediante su caracterización bioquímica poder generar las condiciones necesarias para su posterior cristalización.

Para cumplir con los objetivos planteados; se obtuvo la proteína de forma recombinante mediante la clonación en el plásmido pET-DEST42 y su posterior expresión en la bacteria *Escherichia coli* BL21. Como resultado de la construcción, se generó una proteína de fusión conformada por la secuencia codificante de la proteína HACD1/CAP y dos banderas (V5 y 6x-His) unidas en el extremo carboxilo terminal. La purificación de la proteína recombinante se llevó a cabo mediante el empleo de cromatografías de afinidad a hidroxiapatita, níquel y exclusión molecular, mientras que la identidad se confirmó mediante inmunodetección por Western blot.

La pureza de la proteína se confirmó por espectrometría de masas MALDI-TOF, además dicho análisis fue de utilidad para identificar en primera instancia posibles estados de oligomerización. La masa molecular de la proteína recombinante hrHACD1/CAP obtenida es de 19,375 Da y de una segunda especie de mayor peso molecular detectada es de 36,824 Da.

El siguiente paso en la caracterización bioquímica fue determinar si hrHACD1/CAP presentaba plegamiento y su porcentaje de estructura secundaria. Mediante dicróismo circular, se demostró que hrHACD1/CAP tiene un contenido de 34% de α hélices, 16% de láminas β y 50% de estructura aleatoria. Para tener una perspectiva del acomodo tridimensional de la proteína se generó un modelo tridimensional teórico que, además, permitió vincular los resultados experimentales con relación al plegamiento y formación de posibles puentes disulfuro que intervienen en las asociaciones entre la proteína.

Otro de los objetivos de este trabajo fue el investigar qué condiciones pueden modificar la estabilidad estructural de hrHACD1/CAP, para tal fin se llevaron a cabo estudios de calorimetría diferencial de barrido mediante la prueba de Thermal shift. El estudio demostró que hrHACD1/CAP incrementa su estabilidad térmica en presencia de niveles de pH cercanos al fisiológico (pH 6.4, 6.8 y 7.2).

Para completar la caracterización del plegamiento se realizaron estudios de dispersión dinámica de luz (DLS), que permitió conocer el comportamiento de hrHACD1/CAP en solución y así entender cuál es la interacción intermolecular de la proteína consigo misma.

Se demostró que hrHACD1/CAP presenta diferentes estados de oligomerización y que estos son dependientes de temperatura.

Finalmente, para determinar si hrHACD1/CAP presenta actividad biológica asociada a la mineralización, se llevó a cabo la prueba de formación de cristales de fosfato de calcio empleando el sistema libre de células de contradifusión en gel de silicato. Se demostró que hrHACD1/CAP tiene la capacidad de nucleación, regulación y dirección del crecimiento de cristales de hidroxiapatita. Se obtuvieron estructuras esferoides de diámetro que oscila entre los 400 a 800 μm , los cuales presentan un centro de nucleación a partir del cual crecen estructuras minerales tipo drusa.

Los resultados de este proyecto establecen las bases para entender el mecanismo de acción de HACD1/CAP, además se ha asentado un precedente que puede contribuir en un futuro a la cristalización de esta proteína, a su caracterización tridimensional y a comprender su función biológica específica.

ABSTRACT

The intention of this work is to provide knowledge about the cementum attachment protein (HACD1/CAP) and through its characterization to generate the necessary conditions for its subsequent crystallization.

To achieve the objectives aims; the protein was obtained through recombination by cloning in the plasmid pET-DEST42 and the subsequent expression in the bacterium *Escherichia coli* BL21. Because of the construction, a fusion protein was generated consisting of the coding sequence of the HACD1/CAP protein and two flags (V5 and 6x-His) joined at the carboxyl end. The purification of the recombinant protein was carried out using affinity chromatographies to hydroxyapatite, nickel and molecular exclusion, while the identity was confirmed by immunodetection by Western blot.

The purity of the protein was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry, in addition to this analysis was useful to identify in the first instance possible oligomerization states. The molecular mass of the recombinant protein hrHACD1 / CAP obtained is 19.375 Da and the other species with the highest molecular weight detected is 36.824 Da.

The next step in the biochemical characterization was to determine if hrHACD1/CAP presents secondary structure and the percentage of this. Using circular dichroism (CD), it was shown that hrHACD1/CAP has a content of 34% of α helix, 16% of β sheets and 50% of random coil. To have a perspective of the three-dimensional arrangement of the protein, a theoretical three-dimensional model was generated that, in addition, allowed to link the experimental results in relation to the folding and formation of possible disulfide bridges that intervene in the associations between the protein.

Another objective of this work was to investigate which conditions can modify the structural stability of hrHACD1/CAP, for this purpose differential scanning calorimetry studies were settled on using the Thermal shift test. The study showed that hrHACD1/CAP increases its stability in presence of pH levels close to physiological (pH 6.4, 6.8 and 7.2).

To complete the characterization of the folding, dynamic light scattering (DLS) studies were carried out. This study allowed to know the behavior of hrHACD1/CAP in solution and thus to understand what is the intermolecular interaction of the protein with itself. It was demonstrated that hrHACD1/CAP presents different oligomerization states and that these are temperature dependent.

Finally, to determine if hrHACD1/CAP presents biological activity associated to mineralization, the calcium phosphate crystal formation test was accomplished using the silicate gel counterdiffusion cell-free system. It was demonstrated that hrHACD1/CAP could nucleate, regulate and direct the growth of hydroxyapatite crystals. Forming spheroidal structures with a diameter ranging from 400 to 800 μm , which have a nucleation center from which druse-like mineral structures grow.

The results of this project establish the bases to understand the mechanism of action of HACD1/CAP, in addition a precedent has been established that can contribute in the future to the crystallization of this protein, to its three-dimensional characterization and to understand its specific biological function.

INTRODUCCIÓN

El cemento radicular fue descrito por primera vez en 1835 por los discípulos de Purkinje como un tejido mineralizado que cubre la superficie radicular de los órganos dentarios. Sus principales funciones son proveer el anclaje para las fibras de colágena del ligamento periodontal (fibras de Sharpey), mediar en la inserción del diente al hueso alveolar, distribuir las fuerzas masticatorias y tiene un papel primordial en la reparación de la superficie radicular (Baab 1985; Page *et al*, 1978).

Se asume que el cemento radicular es similar al hueso porque comparte características tanto en composición como en estructura, ambos se componen aproximadamente de un 50% de contenido inorgánico formado por fosfatos de calcio que se encuentran en forma de cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. El otro 50% está formado por la matriz orgánica que consiste primariamente de colágenas tipo I (90%) y Tipo III (5%), las cuales, en su conjunto, desempeñan un papel estructural. Contiene, además, proteínas que participan en el proceso de biomineralización como fibronectina (FN), sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN), fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina (OC), osteonectina (SPARC) y diversos factores de crecimiento como IGF-I, IGF-II, FGFa, FGFb, PDGF y TGFβ pero no son cemento específicas (Bartold, 2006; Saygin, 2000).

A pesar de estas similitudes, el cemento radicular tiene características únicas que lo diferencian del hueso. Tiene un recambio metabólico bajo, carece de inervación, drenaje linfático, de irrigación sanguínea directa y a la fecha se han identificado dos proteínas cemento-específicas: la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) y la proteína del cemento 1 (CEMP1), que le dan su característica de ser considerado un tejido único (Bartold, 1998; Arzate *et al*, 2002).

El gen que codifica para la proteína HACD1/CAP se localiza en el cromosoma 10 región p13-14, se considera un splicing alternativo (isoforma 2) del gen HACD1 (3-hidroxiacil CoA dehidratasa 1). La proteína HACD1/CAP (UniProtKB - B0YJ81-2) está formada por 140 aminoácidos y tiene una masa molecular teórica de 14,900 Da, aunque la proteína nativa ha mostrado tener una movilidad relativa de 54,000Da, posiblemente la proteína en su forma nativa puede estar formando diversos tipos de oligómeros, en este caso podría tratarse de un trímero, aunado el peso de las posibles modificaciones post traduccionales que pueden ser generadas por un modelo de expresión eucarionte (modelo de expresión nativo), en el cual diversas moléculas como carbohidratos y grupos fosfato pueden ser añadidos a la estructura del polipéptido (Montoya *et al*, 2014), lo que resulta en el aumento de la masa molecular del producto proteico (Rath *et al*, 2009).

Se ha demostrado que esta proteína promueve la migración celular con mayor afinidad para las células del ligamento periodontal y de hueso alveolar que para fibroblastos gingivales hacia la superficie radicular, además, promueve la adhesión celular mediada por integrinas $\alpha V\beta 1$, incrementa la actividad específica de la fosfatasa alcalina y promueve la condrogénesis y mineralización en células mesenquimatosas, es decir, induce la diferenciación celular (Ivanovski, 1999).

Todos estos datos indican que la proteína HACD1/CAP tiene un papel fundamental en la homeostasis del cemento radicular y que participa activamente en procesos de mineralización, sin embargo, a la fecha no se conocen los mecanismos, estructura e interacciones con ligandos que puedan favorecer su plegamiento y actividad biológica (Arzate, 1992; Saito, 2001; Wu, 1996; Ivanovski, 1999).

MARCO TEÓRICO

Periodonto

El periodonto es un complejo sistema de tejidos, mineralizados y no mineralizados que en su conjunto proveen múltiples funciones al órgano dental, entre sus principales funciones destacan el generar soporte, estabilidad y generar resistencia a las cargas funcionales masticatorias (Cho, 2000; Nanci y Bosshardt, 2006).

El periodonto está constituido por dos tejidos no mineralizados, la encía y el ligamento periodontal y por dos tejidos mineralizados, el hueso alveolar y el cemento radicular. En un estado de salud general en homeostasis este conjunto de tejidos trabaja de forma constante y sin alteraciones. Sin embargo, de existir alguna alteración en uno de los componentes de este sistema dinámico, las funciones pueden verse disminuidas, llegando a la generación de enfermedad periodontal y la subsecuente pérdida del órgano dental de no ser restablecida la homeostasis perdida (Iwata, 2014).

Encía

Es un tejido formado principalmente por epitelio gingival y tejido conectivo que se encuentra en la cavidad oral recubriendo al hueso alveolar del maxilar y la mandíbula. Posee diversos espesores dependiendo de la posición anatómica en la cual se encuentre y su principal función es la protección de los agentes químicos, físicos y biológicos (Carranza, 1996; Cho, 2000; Pitaru, 1994; Schroeder, 1997).

Ligamento periodontal

El ligamento periodontal es un tejido conectivo especializado, el cual tiene su ubicación anatómica entre la superficie radicular dental y el hueso alveolar. Su componente principal son estructuras fibrilares de tejido conectivo dispuestas sobre la periferia de la superficie radicular dental. La disposición de estas fibras tiene múltiples direccionalidades, lo que genera un entramado reticular fibrilar. La principal función de este tejido es el ser el soporte del órgano dental, estabilizándolo con el hueso alveolar, soportar las fuerzas de la masticación y es un sistema de percepción mecano sensorial (Lindhe, 2003; McCulloch, 2000; Nanci, 2007).

Hueso alveolar

La cavidad oral está conformada por los procesos maxilares y mandibulares, dividido a su vez en procesos alveolares y cuerpo basal. En los procesos alveolares, formados tras la erupción de los órganos dentales, y que tienen la función de alojar las raíces dentales, hay una disposición en forma de paredes, una cortical interna, una externa y hueso esponjoso. Este tejido sufre un recambio y remodelación constante a lo largo de la vida del individuo, por lo tanto, se trata de un tejido dinámico. Su principal componente es un 50% de matriz inorgánica, principalmente cristales de hidroxiapatita y de 50% de una matriz orgánica, principalmente proteínas colágenas (tipo I y III) y proteínas no colágenas como sialoproteína ósea, osteocalcina, osteopontina, osteonectina y proteínas morfogenéticas de hueso, además de múltiples factores de crecimiento (Bartold, 2006; Cho, 2000).

Cemento radicular

El cemento radicular es un tejido que se encuentra sobre la superficie radicular del órgano dental, desde la unión cemento-esmalte localizada en el cuello del diente hasta el ápice de este. Está conformado aproximadamente por un 50% de contenido inorgánico constituido principalmente por hidroxiapatita y de un 50% de contenido orgánico. De este porcentaje el principal elemento es la colágena tipo I (90%), colágena tipo III (5%) y en menor proporción colágena tipo XII, proteínas no colágenas como la BSP, DMP-1, FN, OCN, ON, OPN y algunos factores de crecimiento (Arzate, 1996; Garant, 2003). A pesar de que el contenido estructural de este tejido es muy similar a la del hueso alveolar difieren en que el cemento radicular carece de irrigación, inervación y drenaje linfático propio; además, en su composición se expresan dos proteínas cemento-específicas: proteína del cemento 1 (CEMP-1) y la 3-Hidroxiacil coenzima A dehidratasa 1/ proteína de adhesión del cemento (HACD1/CAP). Estas proteínas solamente se expresan en este tejido, por lo cual deben tener un papel fundamental en procesos relacionados con la producción de cemento *de novo*, la regulación de expresión de células involucradas en el proceso de remineralización y por ende en cualquier proceso relacionado con mantener la homeostasis de este tejido. Sin embargo, debido a la disposición anatómica de dicho tejido y de la cantidad sobre la superficie radicular dental, hace muy difícil su obtención para poder aislar y estudiar a dichas proteínas cemento específicas, por lo tanto, permanece como el tejido mineralizado menos estudiado del cuerpo humano.

Niveles de organización estructural de las proteínas

Las proteínas pueden presentar cuatro niveles de organización, el primer nivel, la estructura primaria, está dada por la secuencia de aminoácidos unidos entre si mediante un enlace covalente denominado enlace peptídico. En el segundo nivel de organización, la estructura secundaria, la cadena polipeptídica opta por dos acomodos estructurales, las hélices alfa: producto de un enrollamiento helicoidal sobre si misma de la estructura primaria y la lámina beta: una disposición en zigzag de la cadena. Además, existen múltiples formaciones de giros de las cadenas polipeptídicas o acomodos aleatorios que difieren de las clasificaciones antes mencionadas (estructura aleatoria o random coil). Este tipo de organización están estabilizados por enlaces “débiles”, como lo son los puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrófobas.

La estructura terciaria es el plegamiento de la estructura secundaria en un acomodo tridimensional que hace que las proteínas monoméricas adquieran una función específica. Los enlaces característicos de este tipo de nivel de organización resaltan los puentes disulfuro y múltiples interacciones débiles, estas interacciones pueden ser modificadas por diversos agentes que se encuentren en la solución proteica, ya que, un incremento o disminución de la carga iónica de los solutos en solución puede alterar la disposición de moléculas y la interacción entre ellas, formando nuevos enlaces o rompiéndolos. En el último nivel de organización, estructuras cuaternarias, múltiples cadenas polipeptídicas con una disposición de estructura terciaria se unen mediante enlaces covalentes, formando un complejo proteico que puede llegar a tener múltiples funciones (Lehninger, 2009).

Por lo anteriormente dicho, es importante conocer cuál es el nivel de organización de una proteína, pues esto determinará en gran medida cuál es su papel dentro de un proceso biológico. Como ejemplo, podemos mencionar al proceso de mineralización, el cual se da en múltiples organismos vivos como en las conchas de algunos moluscos y en los mamíferos, en la formación de hueso, esmalte, dentina y cemento radicular dental (Atala *et al*, 2011). Dependiendo del plegamiento que adquiera la proteína (hélices alfa, láminas beta), del medio y las condiciones en las que se encuentre, podrá dar pie a que lleve a cabo diversas actividades (puede formar un sitio de unión). En el caso del proceso de mineralización se necesita en primera instancia, tomar iones minerales (calcio o fosfato) del medio en el que se encuentren o de otras biomoléculas (ácidos nucleicos, proteínas), se debe de propiciar la precipitación de sales para que se inicie la nucleación de una estructura

mineral mayor y finalmente se tiene el papel de regular, direccionar y mantener el crecimiento de las estructuras mineralizadas que componen a un organismo vivo.

Proteínas involucradas en el proceso de biomineralización del cemento radicular

Como se mencionó anteriormente en el proceso de biomineralización participan múltiples proteínas que tienen diversas funciones, desde ser las responsables de obtener sustratos minerales del medio, precipitar sales minerales, nuclear cristales de calcio y organizar la agregación y posterior crecimiento mineral. La nucleación de dichos cristales puede ser de tipo homogénea, si en el proceso se ven involucrados solamente la saturación de minerales que forman los cristales, o de tipo heterogénea si además de existir la saturación local de minerales están involucradas macromoléculas como proteínas que promueven la formación de estos cristales. Este último tipo de nucleación es el que se lleva a cabo en los seres vivos (Arzate, 2015; Nakae y Narayanan, 1991).

Fosfatasa alcalina (ALP)

Esta proteína tiene un peso de 42,190 Da (UniProtKB - P28296), mayoritariamente enriquecida en estructura secundaria de alfa hélices. Es una hidrolasa, la cual tiene la capacidad de regular las concentraciones extracelulares de fosfatos mediante la desfosforilación de diversas moléculas que se encuentran en el medio como nucleótidos, proteínas y alcaloides; esto lleva a clasificar a la ALP como un marcador del inicio del proceso de biomineralización, en el cual se reclutan moléculas minerales del medio para la formación de cristales (Whyte, 1989).

Sialoproteína ósea (BSP)

La sialoproteína ósea es un componente importante de la matriz mineralizada del hueso, dentina, cemento y cartílago calcificado. La BSP es una fosfoproteína de la matriz extracelular de hueso, aislada a partir de hueso cortical con un peso aproximado de 23,000 Da, sin embargo, presenta una movilidad relativa de 60-80,000 Da en geles SDS-PAGE, el cual muestra una gran diferencia en peso teórico obtenido a partir de su secuencia de aminoácidos (Hernández, 2011). El papel de esta proteína es el de servir como nucleador de cristales de hidroxiapatita durante el proceso de biomineralización y se le ha considerado como un marcador de la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos (Kagayama, 1998; Roach, 1994).

Osteocalcina (OCN)

Es una proteína de 10,963 Da, constituye de hasta el 2% del total de las proteínas del hueso. Se caracteriza por tener una unión muy fuerte a la apatita de calcio. (UniProtKB - P02818). Es producida por osteoblastos y osteoclastos, localizada principalmente en hueso alveolar, cemento radicular y dentina. Tiene la función de modular el crecimiento, tamaño y forma de los cristales de hidroxiapatita que forma estos tejidos y está completamente involucrada en el proceso de remodelación ósea (Lian, 1998).

Osteopontina (OPN)

También llamada sialoproteína ósea I (BSPI) es una proteína con un peso molecular teórico de 35,400 Da. En su secuencia contiene múltiples sitios putativos de unión a hidroxiapatita, tiene la capacidad de unirse a colágena, fibronectina y osteocalcina. Esta proteína puede ser localizada en el frente de mineralización de hueso, aunque se ha encontrado en múltiples sitios no mineralizados como el riñón y secreciones como saliva, leche y bilis. Las funciones principales de esta proteína son el regular la adhesión celular, regular la actividad osteoclástica y la regulación de la mineralización de la matriz extracelular (Bartold, 1998).

Proteínas cemento específicas: CEMP1 y HACD1/CAP

Proteína del cemento 1 (CEMP-1)

Es una proteína conformada por 247 aminoácidos, de un peso molecular teórico de 25.9 kDa. El gen que codifica para esta proteína se localiza en el cromosoma 16 región p13.3 (Arzate y Olson, 1992). Se ha demostrado que esta proteína regula la actividad de los cementoblastos, mediante la inducción de la diferenciación. Tiene una participación en el proceso de mineralización, migración y proliferación de fibroblastos gingivales; además, promueve la nucleación de cristales de fosfato octacálcico, la cual es una fase mineral predecesora de los cristales de hidroxiapatita. (Álvarez, 2006). Estudios de caracterización realizados a la proteína CEMP1 expresada de forma recombinante en *Pichia pastoris* (Romo et al, 2016), han demostrado mediante dicroísmo circular que la proteína tiene un porcentaje de estructura secundaria de 28.6% de hélice alfa, 9.9% de láminas beta y 61.5% de estructura aleatoria.

Proteína de adhesión del cemento (HACD1/CAP)

La 3-Hidroxiacil coenzima A dehidratasa 1/ proteína de adhesión del cemento, está conformada por una secuencia de 140 aminoácidos, tiene un peso molecular teórico de 14.9 kDa y una movilidad relativa de 54 kDa y tiene un punto isoeléctrico teórico de 7.82. El gen que codifica para la proteína HACD1/CAP se localiza en el cromosoma 10 región p13-14, se trata de una de las dos isoformas del gen HACD1 (Valdés *et al.* 2012), la primera de ellas se expresa en tejido muscular y se ha demostrado que cataliza múltiples reacciones en el ciclo de los ácidos grasos de cadena larga, además de participar en la formación de membranas lipídicas. Por otro lado, la isoforma 2, difiere de la secuencia canónica en los siguientes aminoácidos: 126-140: IVHCLIGIVPTSVIV → VSFPSCCFSIAVIFM (UniProtKB-B0YJ81-2)

```
      10      20      30      40      50
MGRLTEAAAA GSGSRAAGWA GSPPTLLPLS PTSPRCAATM ASSDEDGTNG
      60      70      80      90     100
GASEAGEDRE APGERRRLGV LATAWLTFYD IAMTAGWLVL AIAMVRFYME
     110     120     130     140     150
KGTHRGLYKS IQKTLKFFQT FALLEIVHCL IGIVPTSVIV TGVQVSSRIF
     160     170     180     190     200
MVLITHSIK  PIQNEESVVL FLVAWTVEI TRYSFYTFSL LDHLPYFIKW
     210     220     230     240     250
ARYNFFIILY PVGVAGELLT IYAALPHVKK TGMFSIRLPN KYNVSFDYYY
     260     270     280
FLLITMASYI PLFPQLYFHM LRQRRKVLHG EVIVEKDD
```

Secuencia de aminoácidos de la Isoforma 1 HACD1 (Entrada: UniProtKB - B0YJ81-1)

10	20	30	40	50
MGRLTEAAAA	GSGSRAAGWA	GSPPTLLPLS	PTSPRCAATM	ASSDEDGTNG
60	70	80	90	100
GASEAGEDRE	APGERRRLGV	LATAWLTFYD	IAMTAGWLVL	AIAMVRFYME
110	120	130	140	
KGTHRGLYKS	IQKTLKFFQT	FALLE	VSFPS	CCFSIAVIFM

Secuencia de aminoácidos de la isoforma 2 HACD1/CAP, en el recuadro se observan los 15 aminoácidos que diferencian a la isoforma 2 de la isoforma 1 (Entrada: UniProtKB - B0YJ81-2)

Se ha demostrado que HACD1/CAP puede tener un papel importante en el reclutamiento y diferenciación de células que contribuyen en la formación del cemento radicular; además, puede unirse a la hidroxiapatita para regular la formación de dichos cristales en el proceso de formación de cemento radicular dental, estos cristales son de suma importancia en los mecanismos de remodelación del cemento radicular y en general en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos que conforman al periodonto (Montoya *et al*, 2014; Pitaru *et al*, 1995).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

El cemento radicular permanece como un tejido pobremente caracterizado a nivel celular y molecular, sin embargo, se ha demostrado que es un tejido único, tanto a nivel histológico y por la expresión de proteínas específicas de dicho tejido: HACD1/CAP y CEMP1. Las investigaciones realizadas sobre HACD1/CAP demuestran que esta proteína es de suma importancia en el proceso de cementogénesis y tiene un uso potencial en la regeneración de tejidos mineralizados. Por lo que, la investigación sobre las interacciones con ligandos específicos que favorezcan el plegamiento e incrementen la estabilidad estructural de HACD1/CAP permitirá identificar las regiones de su estructura asociadas a su función biológica y establece las bases de su caracterización tridimensional.

HIPÓTESIS

La identificación de condiciones físicas y químicas que favorezcan el plegamiento y estabilidad estructural de la proteína HACD1/CAP permitirán tener las bases para llevar a cabo la solución de la estructura tridimensional de la proteína.

OBJETIVOS

Objetivo General: Determinar los estados de plegamiento – oligomerización de hrHACD1/CAP

Objetivos específicos

- Obtener a la proteína HACD1/CAP de forma recombinante utilizando como sistema de expresión a la bacteria *Escherichia coli* BL21.
- Identificar a la proteína recombinante hrHACD1/CAP y purificarla a homogeneidad.
- Determinar la masa molecular y confirmar la pureza de esta por espectrometría de masas MALDI-TOF.
- Identificar por medio de ensayos de desplazamiento térmico niveles de pH que modifiquen la estabilidad estructural de hrHACD1/CAP.
- Determinar el contenido de estructura secundaria mediante dicroísmo circular.
- Determinar el grado de monodispersidad/oligomerización/agregación de la proteína en solución mediante dispersión dinámica de luz.
- Generar un modelo tridimensional teórico *ad initium* de la proteína y comparar con los resultados experimentales de plegamiento y estructura secundaria.
- Realizar pruebas de actividad biológica asociadas a mineralización en un sistema libre de células.

MATERIAL Y MÉTODOS

Expresión de la proteína hrHACD1/CAP

Se crecieron células de *Escherichia coli* de la cepa BL21 que contenían el vector de expresión pDEST42/HACD1/CAP a 37 ° en medio LB (Luria-Bertani), adicionado con 100 µg/ml de ampicilina, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a λ de 600 nm, en ese momento se adicionó IPTG a una concentración final de 1mM para que se iniciara la expresión de hrHACD1/CAP. El cultivo se incubó 24 horas a 37 °C en agitación constante a 200 rpm. La recuperación de las bacterias se realizó mediante centrifugación, en ciclos de 15 min a 7000 rpm. Finalmente, se re-suspendió el botón celular con amortiguador de lisis (100mM de NaCl, 20 mM de fosfato de sodio y 2 mM PMSF), empleando 1.5 ml del amortiguador por cada gramo de biomasa, se homogeneizó y el botón celular fue sometido a 3 ciclos de sonicado, (potencia del 50%, intermitencia de 70 y tiempo de 3 min) con un equipo de vibración ultrasónica (Sonic Ruptor 250 Ultrasonic Homogenizer. OMNI International). Posteriormente el lisado celular se centrifugo a una velocidad de 7000 rpm en un ciclo de 10 min a una temperatura de 4°C (Multifuge 3S-R Heraeus) para separar la fase soluble de los restos celulares. El sobrenadante fue sometido a una nueva centrifugación, esta vez a 14,000 rpm en un ciclo de 10 min a de 4°C (Centrifuge 5417R Eppendorf) para clarificar el medio. Con este procedimiento se pudo obtener en la fase soluble las proteínas citoplasmáticas. Finalmente se llevó a cabo la cuantificación de proteínas de la fase soluble mediante el método de Bradford, utilizando un espectrofotómetro DU® 640 Spectrophotometer Beckman a una longitud de onda UV de 595 nm.

Cinética de expresión de la proteína hrHACD1/CAP.

Se realizó la cinética de expresión de hrHACD1/CAP para comparar cambios en el perfil electroforético del cultivo sin la inducción de la proteína recombinante y 24, 48 y 72 horas posteriores a la inducción con IPTG, empleando electroforesis SDS-PAGE 15%.

Identificación de hrHACD1/CAP.

Para confirmar la identidad de la proteína recombinante, se empleó el cultivo de 24 horas de inducción, debido a que el perfil electroforético mostraba la mayor diferencia de expresión de proteínas en comparación al cultivo sin inducir. Se empleó inmunodetección por Western Blot con anticuerpos específicos dirigidos contra hrHACD1/CAP: α 3G9

anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína HACD1/CAP bovina, α CAP anticuerpo policlonal dirigido contra la proteína HACD1/CAP humana, α Péptido anticuerpo policlonal dirigido contra la región de 15 aminoácidos que no se presenta en el splicing 1 de HACD1 y α His anticuerpo policlonal dirigido contra la bandera de Histidinas de la proteína recombinante hrHACD1/CAP.

Purificación de hrHACD1/CAP.

Debido a que en el perfil de expresión se identificó que la proteína se presentaba en dos especies (monómero y una especie de mayor peso molecular) se realizaron dos protocolos de purificación, uno para cada especie.

Purificación de la especie de hrHACD1/CAP de mayor peso molecular.

El extracto crudo de proteína fue preparado en un amortiguador de PBS 1X adicionado con 100mM de NaCl, 1ug/ml de PMSF, DNAsa y RNAsa 5ug/ml cada uno pH 6.8.

El primer paso de purificación consistió en una cromatografía de intercambio catiónico usando una columna XK16 (General Electric®) con un volumen de 15 ml de Hidroxiapatita de 60-180 μ m (HA-Ultrogel®, Sigma®). El flujo de elución, presión y absorbancia a 280 nm fue controlado con un equipo de FPLC (ÄKTA start General Electric ®) la visualización del cromatograma se llevó a cabo mediante el programa Unicorn start (General Electric ®). En este primer paso se usó un gradiente lineal de fosfato de sodio pH 6.8 de 25 mM a 500 mM adicionado con 100mM de NaCl.

En el segundo paso de purificación se empleó una cromatografía de afinidad a iones metálicos. Utilizando una columna de 20 ml HisPrep FF 16/10 (GE) con una fase estacionaria de agarosa-Níquel. La elución fue realizada con PBS 1X adicionado con 100mM de NaCl pH 6.8 mediante gradiente lineal de 10 mM a 200mM de imidazol. Las condiciones de la cromatografía fueron controladas con el equipo de FPLC ÄKTA start.

En el último paso de la purificación se hizo con una cromatografía de intercambio catiónico con una columna de 3ml de carboximetil celulosa CM-650c (TSK-GEL TOYOPEARL® CM-650M. SUPELCO®), empleando una bomba peristáltica Dynamax a un flujo de 0.5ml por minuto, utilizando un gradiente escalonado de acetato de sodio de 60 mM, 80 mM, 100 mM, 200 mM y 300 mM adicionados con 100mM de NaCl pH 5.

En cada paso de cromatografía, las muestras de interés fueron visualizadas mediante electroforesis y geles SDS-PAGE al 15% e inmunodetección por Western Blot, utilizando los anticuerpos α 3G9, α CAP, α Péptido y α His.

Purificación de monómero.

El extracto crudo de proteína fue preparado en un amortiguador de PBS 1X adicionado con 1ug/ml de PMSF, DNAsa y RNAsa 5ug/ml cada uno pH 6.8.

El primer paso de purificación consistió en una cromatografía de intercambio catiónico usando una columna XK16 (General Electric®) con un volumen de 15 ml de Hidroxiapatita de 60-180 μ m (HA-Ultrogel®, Sigma®). El flujo de elucion, presión y absorbancia a 280 nm fue controlado con un equipo de FPLC (ÄKTA start General Electric ®) la visualización del cromatograma se llevó a cabo mediante el programa Unicorn start (General Electric ®). Se empleó un gradiente escalonado de 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM y 500 mM de fosfato de sodio pH 6.8.

Para el segundo paso de purificación se empleó una cromatografía de exclusión molecular con la columna HiPrep Sephacryl S-100 HR (GE Healthcare Life Sciences), empleando PBS 1X como eluyente y un flujo de 0.5ml/min.

Como último paso de purificación de la proteína, se realizó una cromatografía de intercambio catiónico con una columna HiScale 16/20 (General Electric ®), con un volumen de 3 ml de Hidroxiapatita de 60-180 μ m (HA-Ultrogel®, Sigma®), Se empleó un gradiente escalonado de 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM y 500 mM de fosfato de sodio pH 6.8.

En cada paso de cromatografía, las muestras de interés fueron visualizadas mediante electroforesis y geles SDS-PAGE al 15% e inmunodetección por Western Blot, utilizando los anticuerpos α 3G9, α CAP, α Péptido y α His.

Determinación de la masa molecular.

La masa molecular de la proteína hrHACD1/CAP fue determinada empleando espectrometría de masas MALDI-TOF (Matriz Assisted Laser Desorption / Ionization-time of flight). Se empleó una solución de hrHACD1/CAP purificada a una concentración de 1mg/ml dializada en amortiguador de HEPES 10 mM pH 6.8. La matriz inicial empleada en el procedimiento fue ácido 2' 5' – Dihidroxibenzoico y las proteínas de referencia utilizadas para calibrar el equipo fueron taumatina (22,653.43 Da) y lisozima (14,721.13 Da). Finalmente, para el análisis de la relación masa/carga (m/z) para el ion molecular se hizo el empleo del espectrómetro de masas Microflex Bruker Daltonics.

Elaboración del modelo tridimensional teórico de hrHADC1/CAP.

Se utilizó el servidor informático I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) para realizar la construcción de la estructura tridimensional de la proteína hrHACD1/CAP, empleando la secuencia de aminoácidos de la misma. A partir del modelo que generó el servidor, se realizó la visualización y análisis del mismo mediante el software UCSF Chimera versión 1.11.2rc. Utilizando el modelo teórico se hizo un análisis del porcentaje de estructura secundaria y dimensiones de la molécula.

Determinación del contenido de estructura secundaria.

El contenido de estructura secundaria fue determinado mediante Dicroísmo Circular (D.C.) en el espectro de luz UV lejano (190-260nm). La muestra se preparó dializando la proteína purificada contra amortiguador HEPES a 10 mM, pH 7.2, a una concentración de 0.2 mg/ml. El espectro de dicroísmo se obtuvo en un espectropolarímetro Jasco J -710, utilizando una cubeta de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico. El espectro final fue el promedio de tres acumulaciones individuales realizadas cada nanómetro a una velocidad de barrido de 20 nm/min.

El procesamiento de los datos se realizó con el software en línea Dicroweb® que utiliza múltiples algoritmos para determinar el contenido de estructura secundaria en la muestra analizada. Entre los cuales se encuentran K2D (Neural Network), que es ideal en proteínas que tienen en su estructura un alto contenido de hélices α .

Ensayos de desplazamiento térmico de hrHACD1/CAP (pH).

Los ensayos de desplazamiento térmico se realizaron con la finalidad de identificar si los niveles de pH pueden modificar la estabilidad estructural de hrHACD1/CAP. Para dicho fin, se utilizó el sistema Stock Options pH Screen HR2-241 (Hamptom Research), el cual tiene como parámetro inicial un pH de 2.0 y aumenta gradualmente en su escala en valores de 0.2 hasta llegar a un pH final de 11.0, teniendo un total de 45 condiciones. Se empleó como reportero el fluoróforo SYPRO Orange S5695 (Sigma). Los ensayos de desplazamiento térmico se realizaron en una microplaca de 96 pozos de RT-PCR donde se cargó 10 μ l en 45 pozos con cada una de las 45 soluciones del sistema Stock Options pH Screen. A estos pozos, se le agregó a cada uno 10 μ l de una solución de hrHACD1/CAP (0.5mg/ml en amortiguador de HEPES 10mM, pH 7.2), adicionada con el fluoróforo SYPRO Orange a una dilución final de 1:1000. La medición de la temperatura media de desnaturalización (T_m) se llevó a cabo en un termociclador de PCR de tiempo real (StepOne Plus Real Time PCR system, Applied Biosystems) y la programación se realizó con el software StepOne (Applied Biosystems) utilizando un ciclo de calentamiento para cada condición desde 25°C hasta 96°C con una lectura por cada grado centígrado de incremento. El análisis se llevó a cabo mediante la construcción de derivadas negativas para obtener la T_m de cada una de las condiciones probadas.

Comportamiento de oligomerización/monodispersidad en solución de hrHACD1/CAP.

Para dilucidar el comportamiento de hrHACD1/CAP en solución y su interacción proteína-proteína que puede resultar en un aumento en su radio hidrodinámico debido a la formación de diversas especies como monómeros, dímeros u otros oligómeros se llevó a cabo el estudio de dispersión dinámica de luz.

Para realizar este estudio se utilizó el equipo de Dispersión Dinámica de Luz "Zetasizer Nano" (Malvern Co) y el programa informático Zetasizer Family Vol 7 para la visualización y el análisis de los datos. Para el estudio se emplearon 400 μ L de hrHACD1/CAP purificada a una concentración 0.75 mg/ml resuspendida en amortiguador de fosfato de sodio 10mM pH 6.8. Se emplearon 4 temperaturas diferentes, 20, 25, 30 y 37 °C y diez lecturas para cada una.

Prueba de actividad biológica: Caracterización morfológica de cristales inducidos con hrHACD1/CAP

Se utilizó el sistema de contradifusión en gel de silicato para determinar si hrHACD1/CAP tiene actividad biológica relacionada con la capacidad de actuar como un nucleador y/o regulador de cristales de fosfato de calcio.

Este sistema consiste en el empleo de dos vidrios de 7 cm x 9 cm x 3mm, los cuales llevan entre ellos un marco de neopreno y 6 pinzas metálicas para fijar los componentes y evitar fugas. Dentro del sistema se forma un gel compuesto de 2 ml de metasilicato de sodio 1.06 gr/ml, 2 ml de HEPES 10mM pH 7.4 y 1.08 ml de H₃PO₄. En la parte superior del sistema se colocan 5 ml de la solución de difusión, la cual está compuesta de 200 mM de cloruro de calcio preparado en amortiguador de HEPES 10mM, pH 7.4.

En el interior del gel de silicato de sodio se adiciona la proteína purificada a una concentración de 20 ug/ml. Las pruebas se incubaron durante tres periodos de tiempo diferentes (10, 14 y 21 días) a 37°C. Transcurrido el periodo de tiempo para la formación de los cristales, éstos se recuperaron del gel de silicato y fueron almacenados para su posterior procesamiento y análisis con microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar su morfología tridimensional.

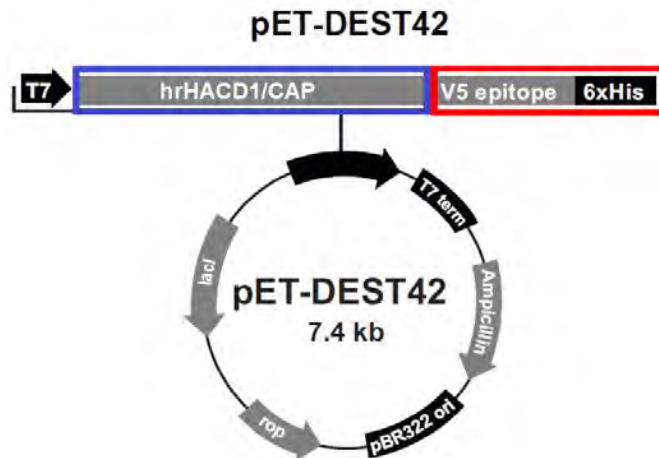
Caracterización de composición de cristales inducidos con hrHACD1/CAP

Los cristales formados en el sistema de contradifusión en gel de silicato fueron analizadas mediante análisis de energía dispersiva de rayos X (EDS) para determinar su composición elemental y ratio calcio / fósforo (Ca/P) para determinar su grado de mineralización. Además, para conocer su composición elemental exacta, los cristales fueron analizados mediante Microscopía Electrónica de Transmisión de alta resolución (HRTEM). Se utilizó un microscopio JEOL JEM-2010, con un cañón Termoiónico LaB₆, a un voltaje de aceleración de 200 kV. Se determinó la distancia interplanar a partir de la transformada rápida de Fourier y con ayuda del software Digital Micrograph se midieron las distancias interplanares, corroborando con ello la fase cristalina de las estructuras analizadas.

RESULTADOS

Diseño del vector pDEST42/HACD1/CAP.

El vector de expresión pDEST42/HACD1/CAP (Imagen 1) adiciona un aproximado de 4 kDa a la proteína recombinante (<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/12276010>), debido a la fusión en el extremo carboxilo terminal de dos banderas: V5 (GKPIPNPLLGLDST) y 6xHis (HHHHHH). Dichas banderas sirven para la identificación y purificación de la proteína recombinante (Bornhorst, 2000). Por lo tanto, el peso molecular esperado para hrHACD1/CAP es de aproximadamente 20 kDa.



```
1 MGRLTEAAAAGSGSRAAGWAGSPPTLLPLSPTSPRCAATMASSDEDGTNG
51 GASEAGEDREAPGERRRLGVLATAWLTFYDIAMTAGWLVLAIAMVRFYME
101 KGTHRGLYKSIQKTLKFFQTFALLEVSFPSCCFSAIVIFMGKPIPNPLLGLDST
151 LDSTHHHHHH
```

Imagen 1. Mapa del vector pET-DEST42/HACD1/CAP y secuencia hrHACD1/CAP (Secuencia de la proteína en azul, en rojo subrayado bandera v5 y en rojo bandera de seis histidinas).

Cinética de expresión de la proteína recombinante humana hrHACD1/CAP.

Se realizó la cinética de expresión de hrHACD1/CAP (Imagen 2A) mediante electroforesis y geles SDS-PAGE 15% a partir del cultivo de *E. coli* tomando una muestra del mismo cada 24 horas desde el momento previo a la inducción (día cero) hasta las 72 horas. Se observa que a partir de las 24 horas de inducción se presenta un perfil de expresión distinto donde sobresale una proteína con una *Mr* de 20 kDa que se mantiene hasta las 72 horas de cultivo.

Se empleó el cultivo de 24 horas para confirmar la identidad de la proteína recombinante mediante Western Blot (Imagen 2B) con la batería de anticuerpos específicos contra hrHACD1/CAP. El resultado del Western blot empleando los 4 anticuerpos antes mencionados dio positivo para la proteína de *Mr* de 20kDa, pero también identificó a otra especie con una *Mr* cercana a 40kDa. A partir de este resultado se hipotetizó que lo observado se trataba de una especie con un mayor peso molecular para la proteína recombinante. Por lo que se decidió realizar la purificación de las dos especies por separado, con dos metodologías distintas que se presentan a continuación.

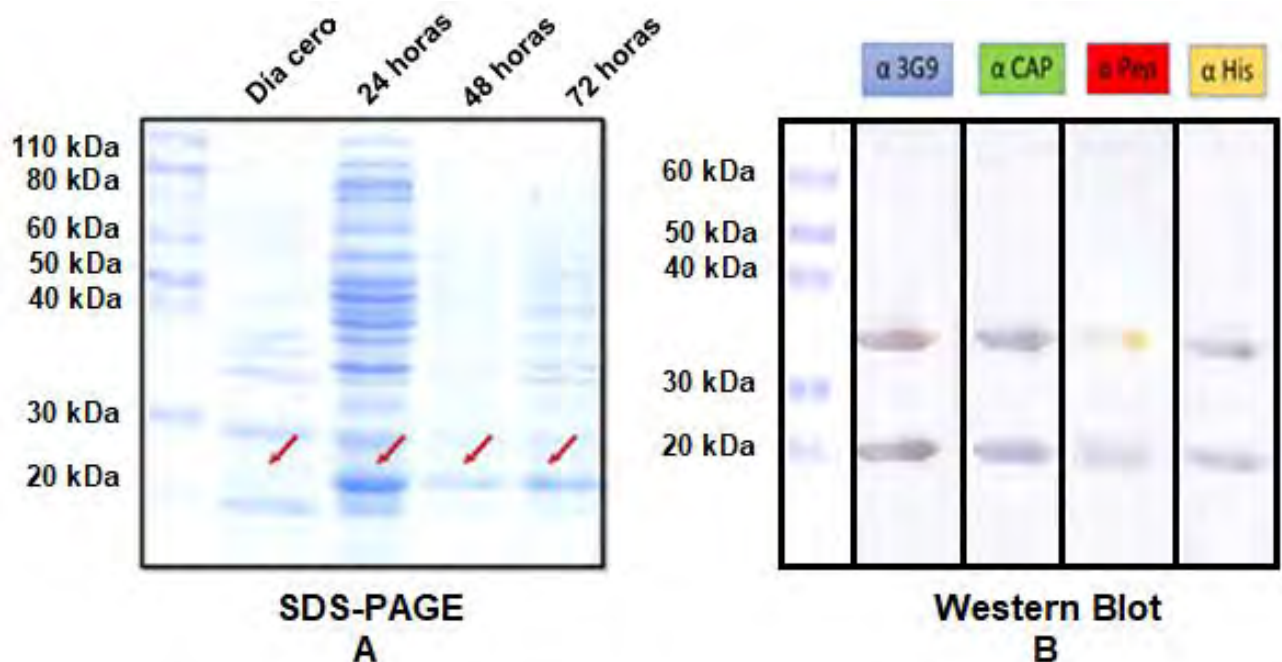


Imagen 2. (A) Cinética de expresión de hrHACD1/CAP en *E. coli* BL 21 inducida con IPTG. (B) Inmunodetección por Western Blot de hrHACD1/CAP después de 24hr de inducción mediante: α 3G9, α CAP, α Péptido y α His. La batería de anticuerpos reconoce especie monomérica (*Mr* 20kDa) y otra con mayor peso molecular (*Mr* 40kDa).

Purificación de la especie de hrHACD1/CAP de mayor peso molecular.

En el primer paso de purificación de la especie de mayor peso molecular se realizó una cromatografía de intercambio catiónico. En el cromatograma (Imagen 3) se puede apreciar la fracción del extracto crudo que no tuvo interacción con la columna (1), el intervalo de lavado de las proteínas no unidas a la columna (2), la fracción de proteínas con afinidad a la hidroxiapatita con un rango de elución de 100mM a 220mM de fosfato de sodio dibásico

con 100mM de NaCl pH 6.8 en agua desionizado (3) y el lavado final de la columna con 500 mM de fosfato de sodio con 100mM de NaCl (4) . Del extracto crudo (carril 2) pico 3 del cromatograma (carril 3 a 7) y pico 4 del cromatograma (carril 8 y 9) se realizó electroforesis SDS-PAGE (Imagen 4).

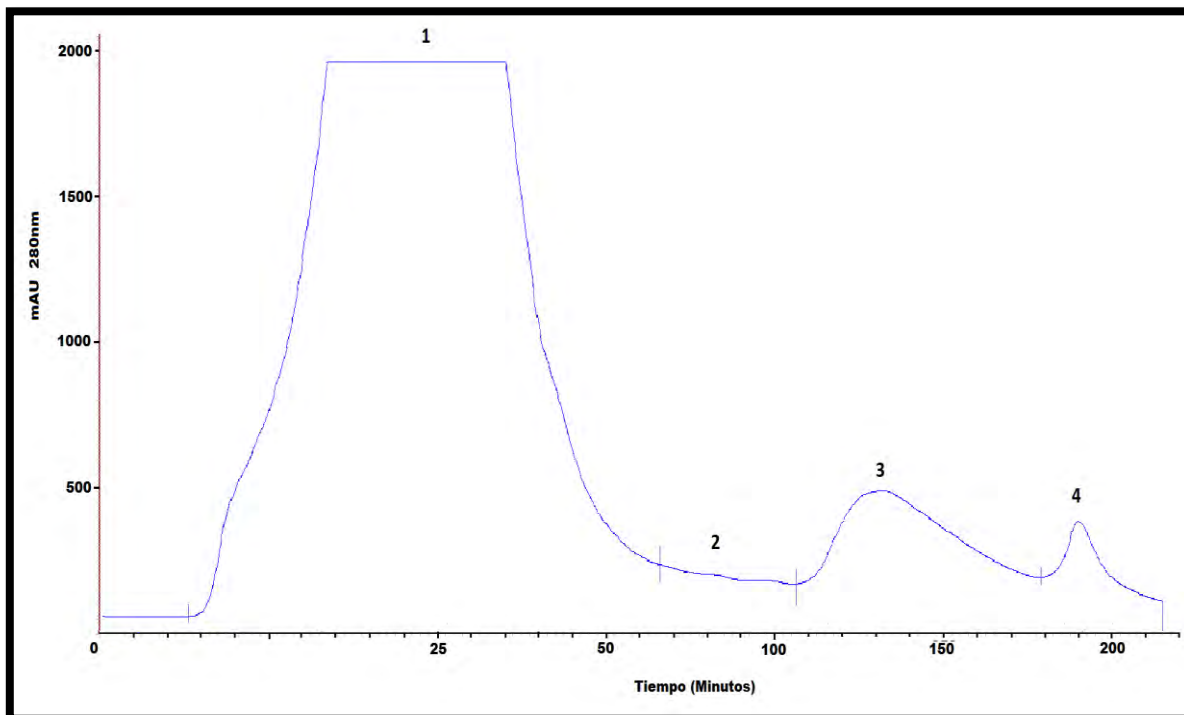


Imagen 3. Cromatografía de intercambio catiónico. Primer paso de purificación de hrHACD1/CAP. 1 Fracciones no unidas a la columna. 2 Región de lavado. 3 Rango de elución de la proteína hrHACD1/CAP en 100mM y 220 mM de fosfato de sodio . 4 Lavado final con 500mM de fosfato de sodio.

Tabla 1. Porcentajes de captura de la cromatografía de intercambio catiónico (Primer paso de purificación)

Número de pico	Inicial	1	2	3	4	Total final
Porcentaje de fracción	100%	77.76%	2.06%	15.48%	4.66%	99.96%
Miligramos de proteína	392mg	304.81mg	8.07mg	60.68mg	18.26mg	391.82mg

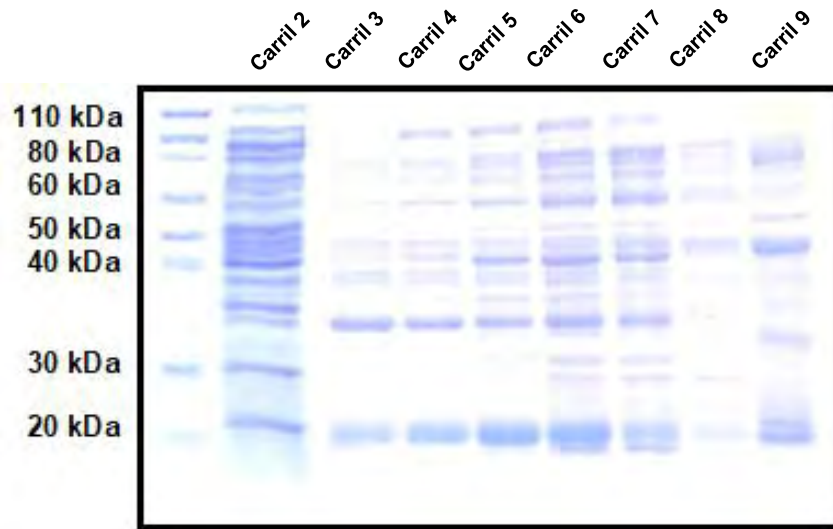


Imagen 4. Electroforesis SDS-PAGE del primer paso de purificación de hrHACD1/CAP. Extracto crudo (carril 2) pico 3 del cromatograma (carril 3 a 7) y pico 4 del cromatograma (carril 8 y 9).

Como segundo paso de purificación se realizó una cromatografía de afinidad a iones metálicos (Níquel) con un gradiente lineal de 10mM a 200mM de Imidazol más 100mM de NaCl en PBS 1X pH 6.8, como extracto crudo se usaron las fracciones correspondientes al pico 3 de la cromatografía previa, juntándolas en una sola fracción, sin concentrar y sin dializar. El cromatograma del segundo paso de purificación (Imagen 5) mostró 5 fracciones, los cuales corresponden a la fracción del extracto crudo que no tuvo interacción con la columna (1), el intervalo de lavado de las proteínas no unidas a la columna (2), la fracción de proteínas con afinidad a níquel con un rango de elución de 24mM a 60mM (3), la fracción de proteínas con afinidad a níquel con un rango de elución de 60mM a 80mM de imidazol (4) y el lavado final de la columna con 200 mM de imidazol (5).

El resultado de la cromatografía de visualizó por electroforesis SDS-PAGE (Imagen 6).

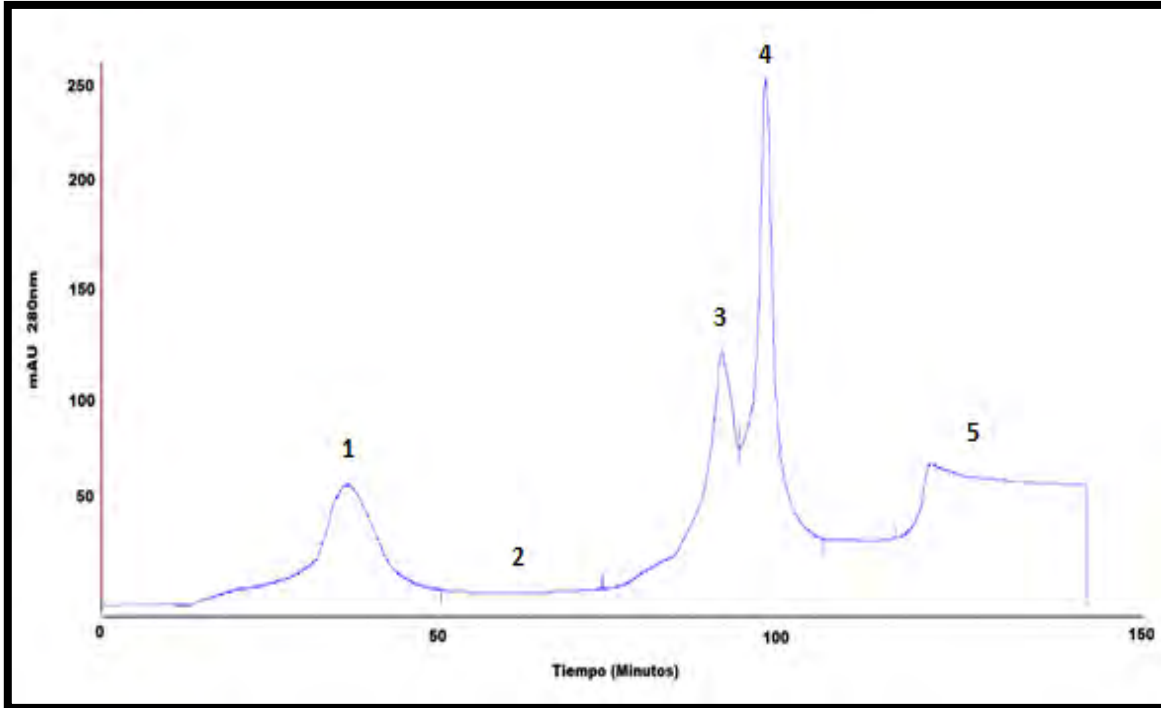


Imagen 5. Cromatograma del segundo paso de purificación de hrHACD1/CAP por cromatografía de afinidad a iones metálicos (níquel). 1 Fracción de proteínas no unidas a la columna. 2 Región de lavado. 3 Rango de elución de proteínas de 24mM a 60 mM de imidazol. 4 Rango de elución de proteínas de 60mM a 80 mM de imidazol. 4 Lavado final de la columna con 200mM de imidazol.

Tabla 2. Porcentajes de captura de la cromatografía de afinidad a iones metálicos. (Segundo paso de purificación)

Número de pico	Inicial	1	2	3	4	5	Total final
Porcentaje de fracción	100%	13.90%	9.13%	17.19%	24.40%	35.38%	100%
Miligramos de proteínas	60.68mg	8.43mg	5.55mg	10.43mg	14.80mg	21.47mg	60.68mg

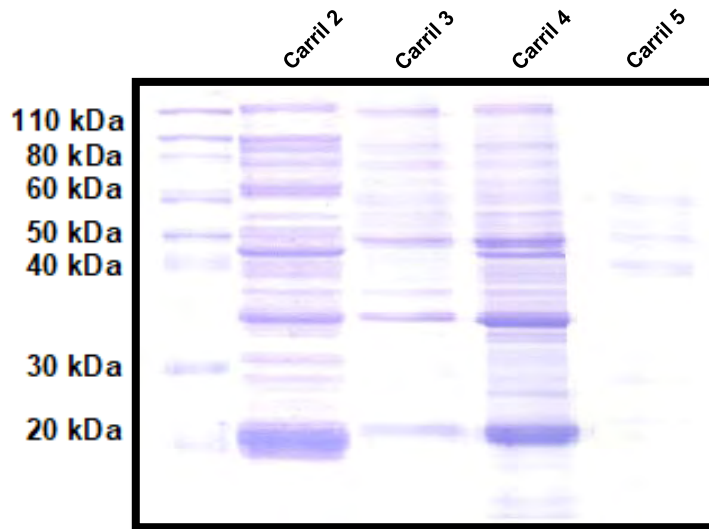


Imagen 6. Electroforesis SDS-PAGE del cromatograma del segundo paso de purificación de hrHACD1/CAP por cromatografía de afinidad a iones metálicos (níquel). Extracto Crudo (carril 2) pico 3 del cromatograma (carril 3), pico 4 del cromatograma (carril 4) y pico 5 del cromatograma (carril 5).

Para el tercer paso de purificación se empleó una cromatografía de intercambio catiónico con una columna de carboximetil celulosa CM-650c, utilizando un gradiente escalonado con acetato de sodio con 100mM de NaCl pH 5, con eluciones de 60 mM, 80 mM, 100 mM, 200 mM y 300 mM. Como extracto crudo, se utilizaron las fracciones correspondiente a los picos 3 y 4 de la cromatografía anterior, dializada contra el amortiguador de elución (acetato de sodio 20mM con 100mM de NaCl pH 5).

El resultado de la cromatografía de visualizó por electroforesis SDS-PAGE (Imagen 7).

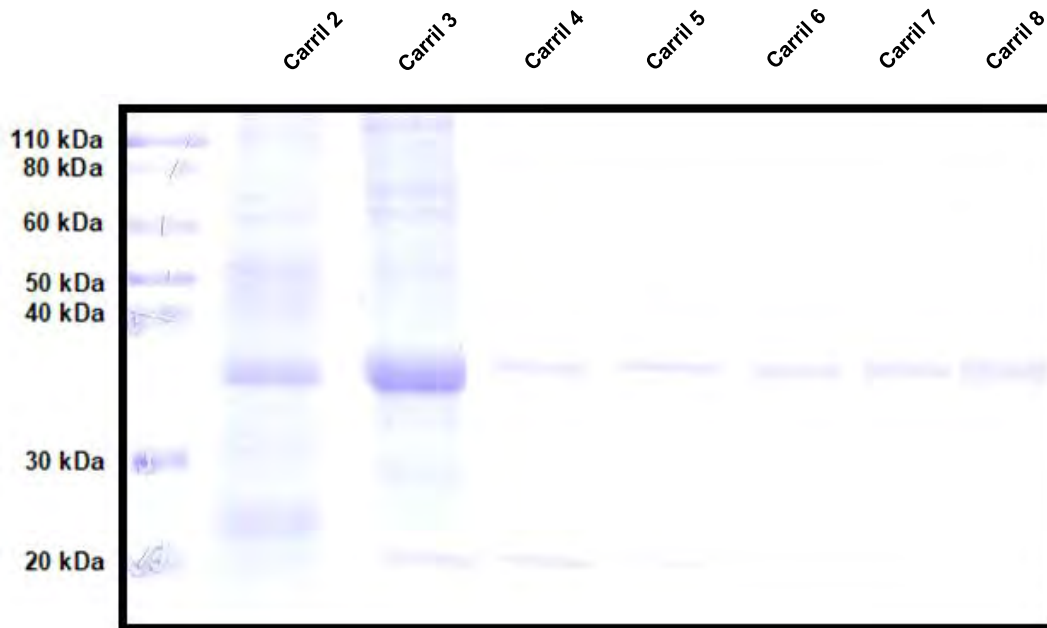


Imagen 7. Electroforesis SDS-PAGE del tercer paso de purificación de la especie de mayor peso molecular de hrHACD1/CAP por cromatografía de intercambio catiónico (carboximetil celulosa CM-650c). Extracto Crudo (carril 2), 20mM (carril 3), 60mM (carril 4), 80mM (carril 5), 100mM (carril 6), 200mM (carril 7) y 300mM (carril 8).

Se concentraron las fracciones correspondientes a los carriles 6 – 8 (100mM-300mM) de la cromatografía del tercer paso de purificación mediante filtros para centrifuga de 10kDa de tamaño de poro (Amicon Ultra 0.5 mL) y dializados contra HEPES 10mM pH 7.2. El resultado se visualizó por electroforesis y geles SDS-PAGE (Imagen 8). Se llevó a cabo una cuantificación de proteína para conocer el rendimiento mediante el método de Bradford, obteniendo como resultado 3.14 mg de proteína purificada por litro de cultivo.

Tabla 3. Porcentajes de captura de la cromatografía de intercambio catiónico. (Tercer paso de purificación)

Fracción	Inicial	Lavado-60mM	80mM-300mM	Total final
Porcentaje de fracción	100%	87.55%	12.55%	100%
Miligramos de proteínas	25.23mg	22.09mg	3.14mg	25.23mg

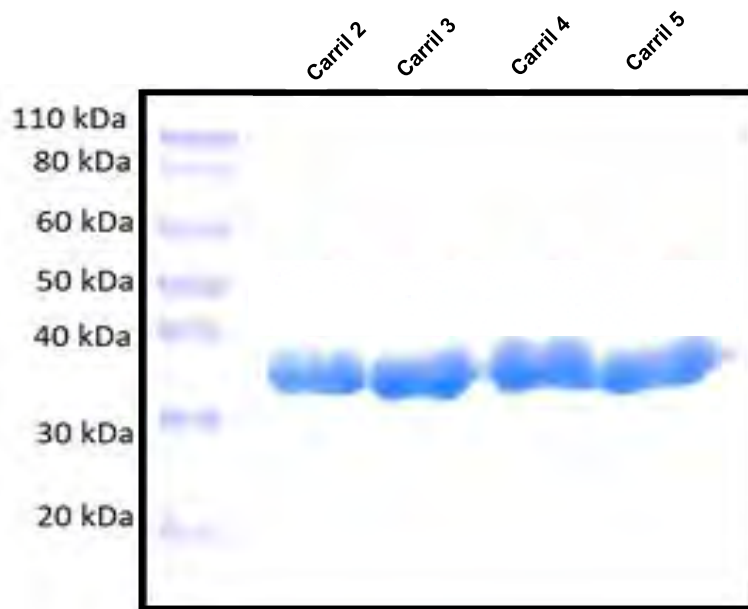


Imagen 8. Electroforesis SDS-PAGE de la especie de mayor peso molecular de hrHACD1/CAP, concentrado y dializado contra HEPES 10mM pH 7.2. Carril 2, 10 μ g de proteína, carril 3, 20 μ g de proteína, carril 4, 25 μ g de proteína y carril 5, 30 μ g de proteína.

Purificación de monómero de hrHACD1/CAP

Para aislar el monómero de hrHACD1/CAP se decidió emplear una metodología diferente a la antes mencionada, para el primer paso de purificación se empleó una cromatografía de intercambio catiónico (hidroxiapatita) utilizando un gradiente escalonado de 25mM, 50mM, 75mM, 100mM, 150mM, 200mM, 300mM y 500mM de fosfato de sodio dibásico pH 6.8. En el cromatograma se puede apreciar dos fracciones importantes, la primera (Imagen 9. 1 y 2) representa a las proteínas que no se unieron a la columna, mientras que en la segunda (Imagen 9. 3 - 9) representa un grupo de proteínas con afinidad creciente a la hidroxiapatita con un rango de elución de 25mM a 500mM de fosfato de sodio dibásico pH 6.8. El resultado de la cromatografía se visualizó por electroforesis SDS-PAGE (Imagen 10).

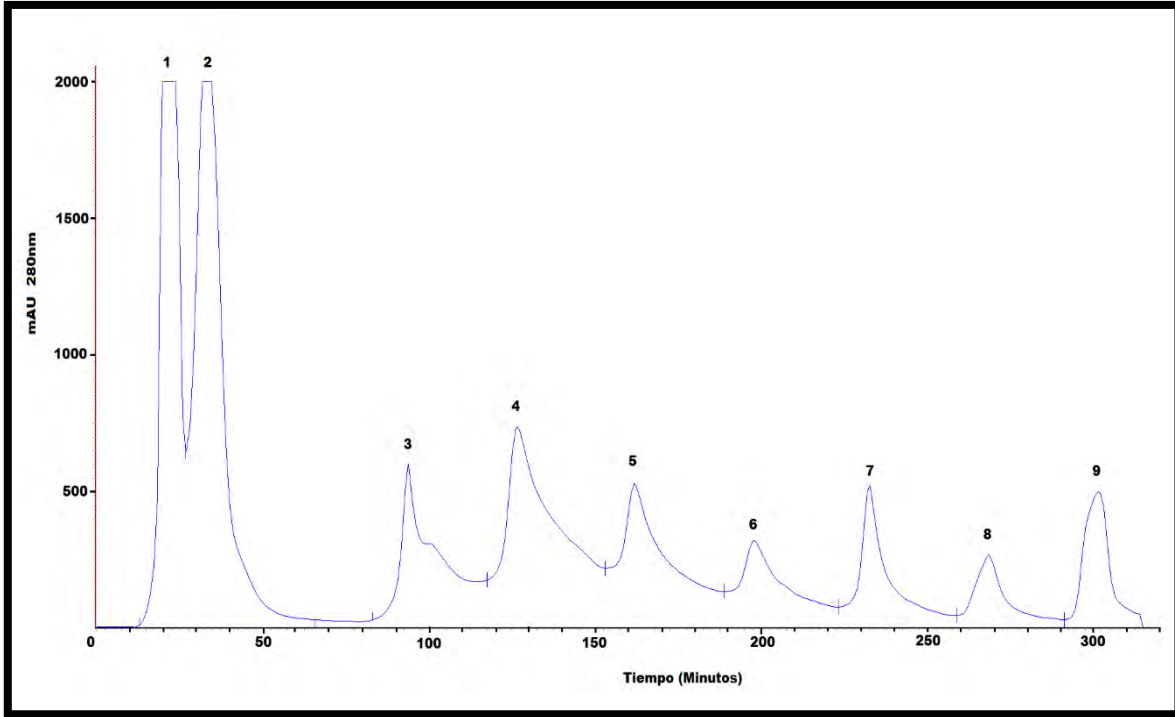


Imagen 9. Cromatograma del primer paso de purificación del monómero de hrHACD1/CAP por cromatografía de intercambio catiónico (Hidroxiapatita). 1 y 2 Fracciones de proteínas no unidas a la columna. 3 – 9 Rango de elución de proteínas con afinidad a la hidroxiapatita (25mM – 500mM de Fosfato de sodio dibasico pH 6.8).

**Tabla 4. Porcentajes de captura de la cromatografía de intercambio cationico.
(Primer paso de purificación)**

Número de pico	Inicial	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Total final
Porcentaje de fracción	100%	16.89%	24.6%	9.57%	16.35%	10.41%	6.21%	6.40%	3.32%	5.4%	99.15%
Miligramos de proteína	479mg	80.90mg	117mg	45.8mg	78mg	49.8mg	29.7mg	30.7mg	15.9mg	26.29mg	472.4mg

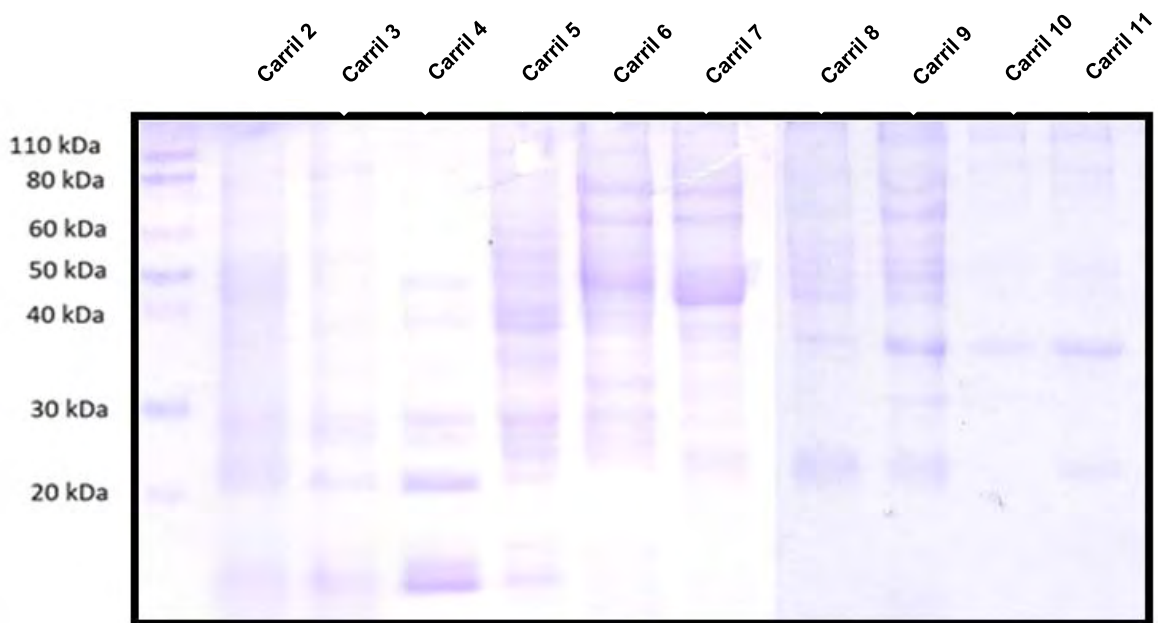


Imagen 10. Electroforesis SDS-PAGE del primer paso de purificación del monómero de hrHACD1/CAP por cromatografía de intercambio catiónico (Hidroxiapatita). Extracto Crudo (carril 2), 25mM (carril 3), 50mM (carril 4), 75mM (carril 5), 100mM (carril 6), 150mM (carril 7), 200mM (carril 8 y 9) y 300mM (carril 10 y 11).

Para el segundo paso de purificación del monómero se empleó una cromatografía de exclusión molecular (HiPrep Sephacryl S-100 HR - GE Healthcare Life Sciences), utilizando las fracciones correspondientes a los picos 6 y 7 de la cromatografía previa y empleando PBS 1X como eluyente. En el cromatograma (Imagen 11) se puede apreciar dos fracciones importantes, (Imagen 11.2) las proteínas con mayor peso molecular y (Imagen 11.3) las proteínas con menor peso molecular, es esta última fracción se encontraba con mayor pureza el monómero de hrHACD1/CAP. A su vez, esta fracción se empleó como crudo para el último paso de purificación, sin dializar ni concentrar.

El resultado de la cromatografía se visualizó por electroforesis SDS-PAGE (Imagen 12).

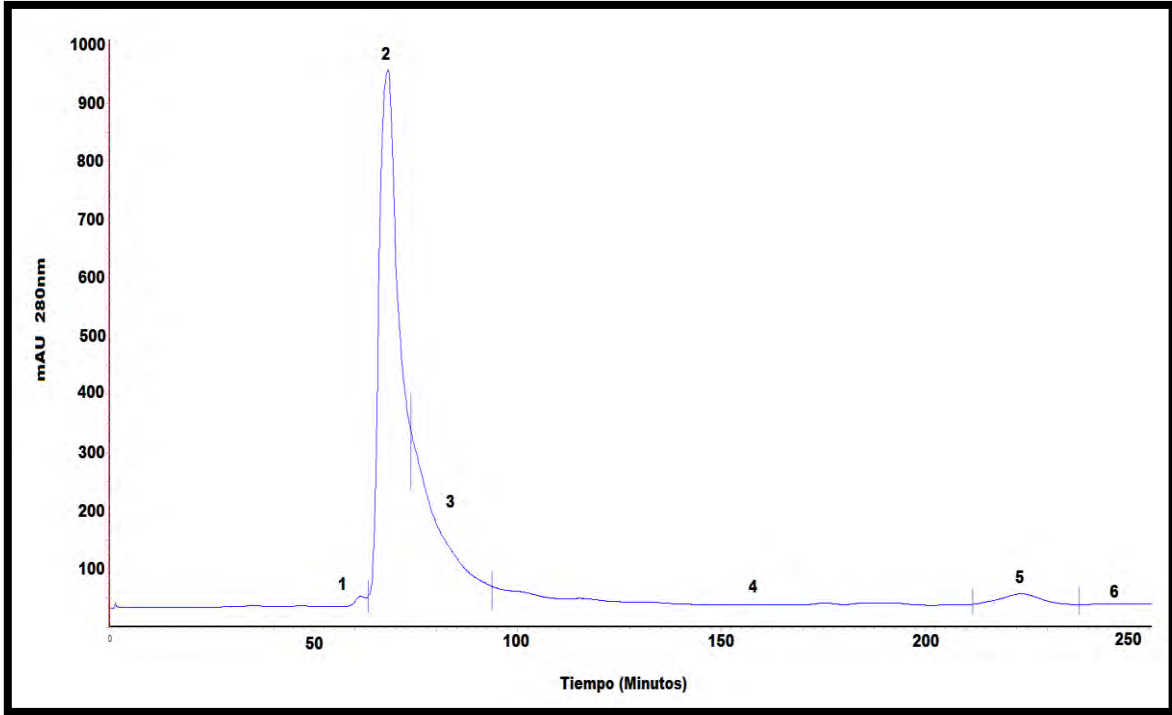


Imagen 11. Segundo paso de la purificación del monómero de la proteína hrHACD1/CAP Cromatografía de exclusión molecular, PBS 1X como eluyente. 2. Proteínas con mayor peso molecular. 3. Fracción que contiene al monómero de la proteína.

Tabla 5. Porcentajes de captura de la cromatografía de exclusión molecular.

Número de pico	Inicial	1	2	3	4	5	6	Total final
Porcentaje de fracción	100%	13.80%	30.14%	16.33%	28.51%	4.66%	6.01%	99.45%
Miligramos de proteína	60.4mg	8.33mg	18.20mg	9.86mg	17.22mg	2.81mg	3.63mg	60.05mg

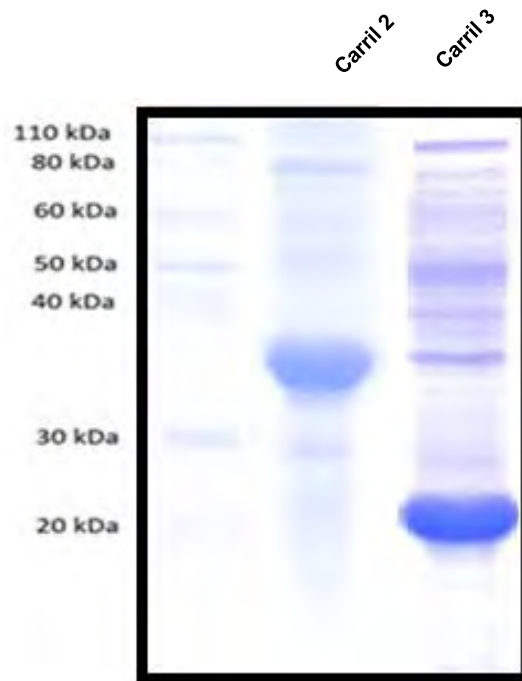


Imagen 12. Electroforesis SDS-PAGE del cromatograma del segundo paso de purificación del monómero hrHACD1/CAP por cromatografía de exclusión molecular. Pico 2 del cromatograma (carril 2), pico 3 del cromatograma (carril 3).

Para el tercer paso de purificación se empleó una cromatografía de intercambio catiónico (hidroxiapatita) utilizando un gradiente escalonado de 25mM, 50mM, 75mM 100mM, 150mM, 200mM, 300mM y 500mM de fosfato de sodio dibasico pH 6.8. En el cromatograma (Imagen 13) se puede apreciar dos fracciones importantes, la primera (Imagen 13. 1) representa a las proteínas que no se unieron a la columna, mientras que en la segunda (Imagen 13. 2 - 8) representa un grupo de proteínas con afinidad creciente a la hidroxiapatita con un rango de elucion de 25mM a 500mM de fosfato de sodio dibásico pH 6.8.

El resultado de la cromatografía de visualizó por electroforesis SDS-PAGE (Imagen 14).

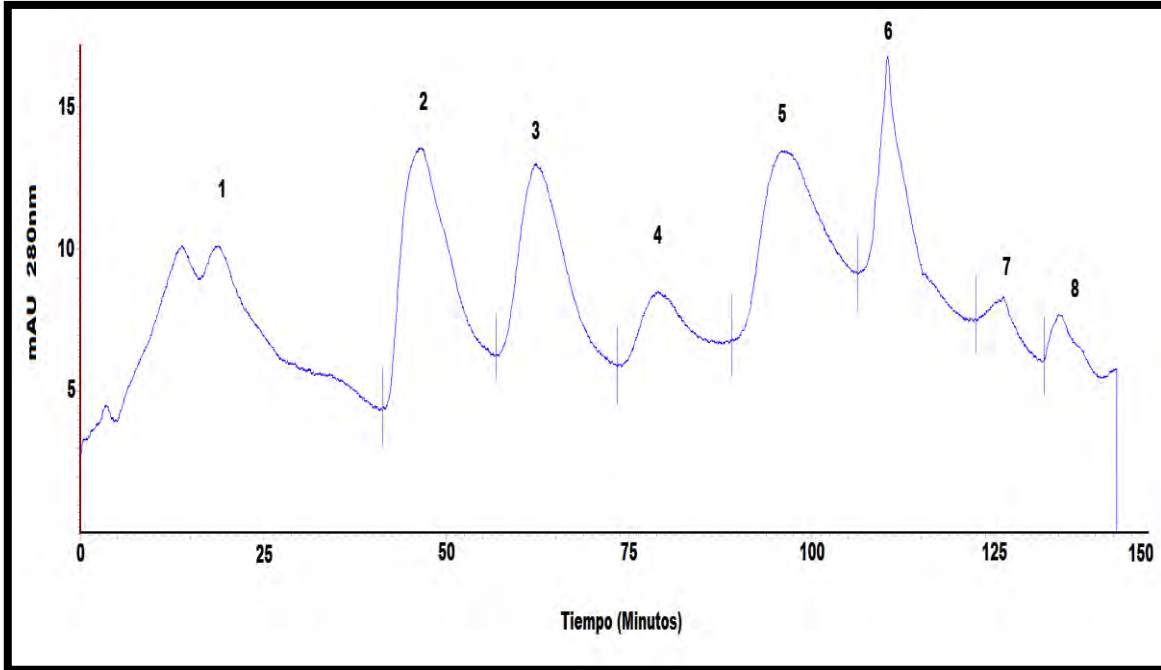


Imagen 13. Cromatografía de intercambio catiónico. Tercer paso de purificación de monómero de hrHACD1/CAP. 1. Proteínas no unidas a la columna. 5 y 6 Rango de elución del monómero de la proteína hrHACD1/CAP en 100 mM y 150 mM de Fosfato de sodio dibásico pH 6.8 en agua desionizada.

Tabla 6. Porcentajes de captura de la cromatografía de intercambio catiónico

Número de pico	Inicial	1	2	3	4	5	6	7	8	Total final
Porcentaje de fracción	100%	24.87%	10.65%	11.15%	7.44%	14.81%	14.53%	7.85%	8.69%	99.99%
Miligramos de proteínas	9.86mg	2.45mg	1.05mg	1.09mg	0.73mg	1.46mg	1.43mg	0.77mg	0.85mg	9.83mg

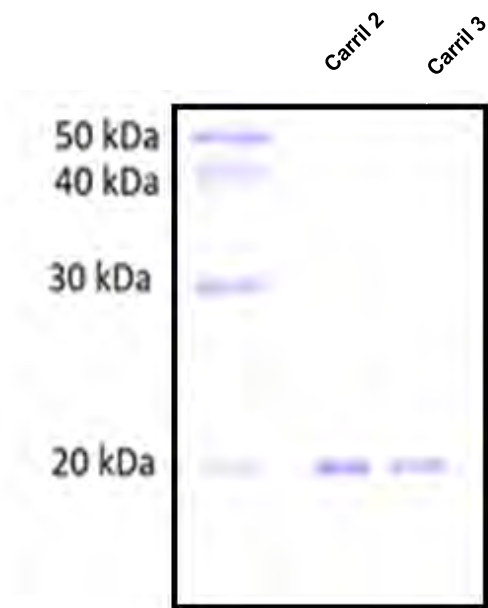


Imagen 14. Electroforesis SDS-PAGE. Cromatografía de intercambio catiónico. Último paso de purificación del monómero de hrHACD1/CAP. Carril 2 (pico 5 del cromatograma) y carril 3 (Pico 6 del cromatograma).

Se concentraron las fracciones correspondientes a los carriles 2 y 3 (100mM y 150mM) de la cromatografía del tercer paso de purificación mediante filtros para centrífuga de 10kDa de tamaño de poro (Amicon Ultra 0.5 mL) y dializados contra HEPES 10mM pH 7.2. El resultado se visualizó por electroforesis y geles SDS-PAGE (Imagen 15). Se llevó a cabo una cuantificación de proteína para conocer el rendimiento mediante el método de Bradford, obteniendo como resultado 2.89mg de proteína purificada por litro de cultivo.

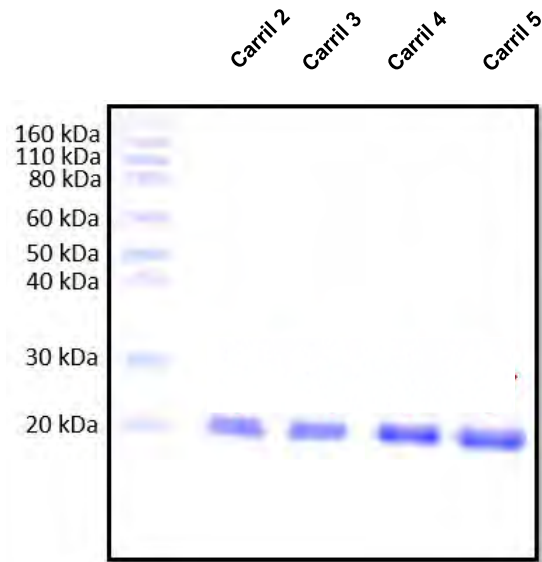


Imagen 15. Electroforesis SDS-PAGE del monómero de hrHACD1/CAP, concentrado y dializado contra HEPES 10mM pH 7.2. Carril 2, 4 μ g de proteína, carril 3, 6 μ g de proteína, carril 4, 8 μ g de proteína y carril 5, 10 μ g de proteína.

El rendimiento final de la purificación del monómero es equivalente a 2.89 mg de proteína por cada litro de cultivo, mientras que para la especie de mayor peso molecular, el rendimiento final fue de 3.14 mg por cada litro de cultivo.

Con estos resultados pudimos determinar que la especie con el mayor rendimiento es la especie de mayor peso molecular, por lo cual, a partir de este punto optamos por trabajar con esta última, debido a que los experimentos posteriores exigían una cantidad grande de proteína.

La identificación de la proteína recombinante se realizó por inmunodetección mediante Western Blot, para el monómero (A) y para la especie de mayor peso molecular (B) utilizando la batería de anticuerpos antes mencionada (α 3G9, α CAP, α Péptido CAP y α HIS). Imagen 16.

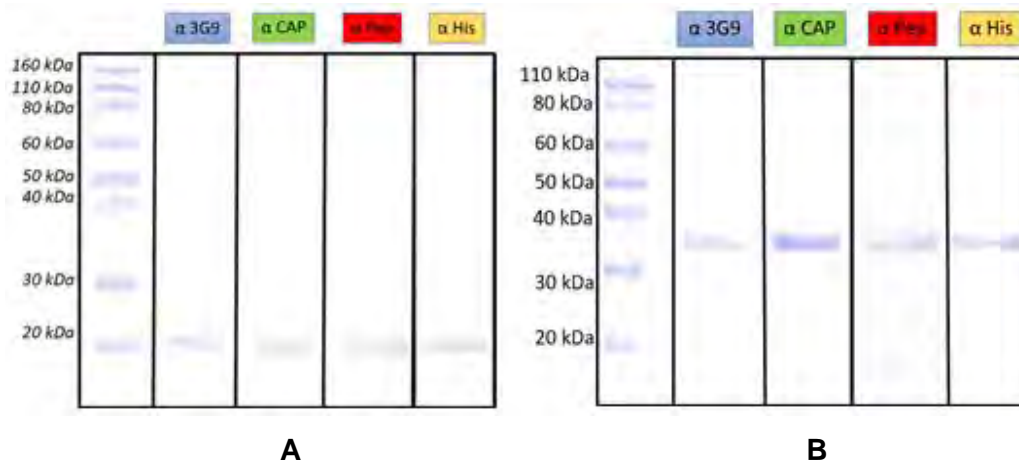


Imagen 16. Inmunodetección por Western Blot. α 3G9, α CAP, α Péptido CAP y α His para el monómero de hrHACD1/CAP (A) y para la especie de mayor peso molecular (B).

Así mismo se hizo una electroforésis en gel SDS-PAGE de la especie de mayor peso molecular purificado sin reductores (Imagen 17 A) y de la misma muestra tratada con agentes reductores como β -Mercaptoetanol, DTT y urea 8 M (Imagen 17 B), para determinar si esta especie se trataba de un dímero de la proteína formado por puentes disulfuro. Como resultado obtuvimos la presencia de las dos especies, monómero y un posible dímero cuando la muestra se trataba con reductores, confirmando así la hipótesis de la formación de puentes di sulfuro que promueven la dimerización del monómero de hrHACD1/CAP.

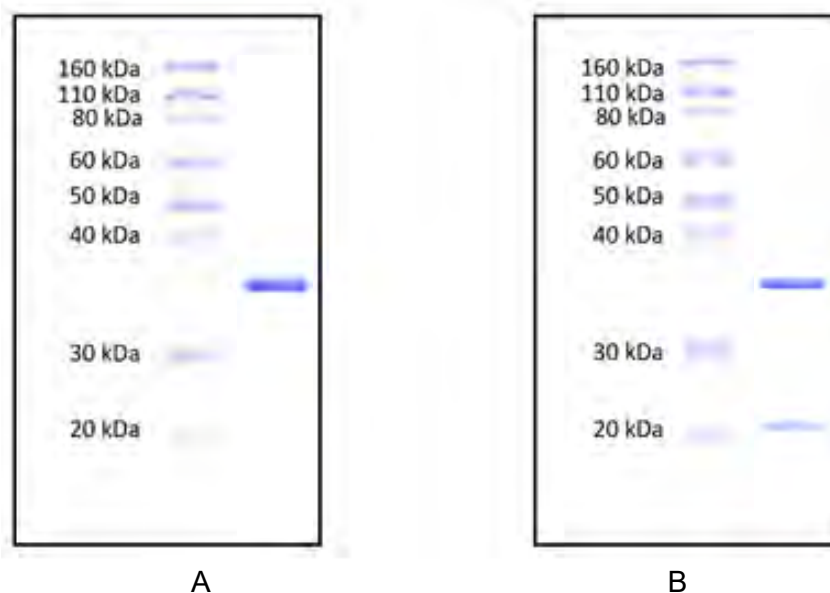


Imagen 17. (A) muestra sin reductores. (B) Muestra tratada con agentes reductores β -Mercaptoetanol, DTT y Urea 8 M.

Determinación de la masa molecular

Para confirmar experimentalmente la masa molecular de la proteína se realizó la espectrometría de masas MALDI-TOF. Al realizar la espectrometría de masas se observó en el espectro dos picos, el de mayor intensidad con una masa de 36,824.811 Da y el segundo con una masa de 19,375.721 Da (Imagen 18).

En el espectro de masas también se puede apreciar que solo se encuentran estas dos especies, lo cual indica que la proteína tiene un grado de pureza ideal para los estudios posteriores.

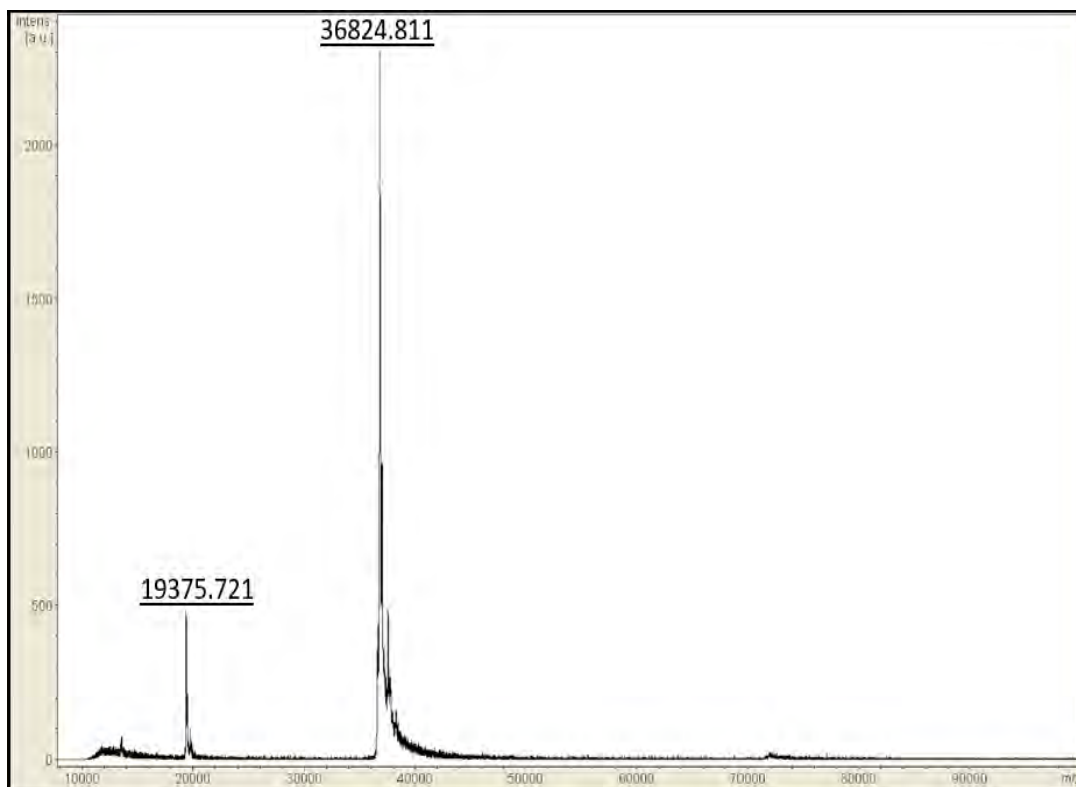


Imagen 18. Espectro de masas MALDI – TOF de hrHACD1/CAP. Proteína purificada a una concentración de 1mg/ml dializada en amortiguador de HEPES 10mM pH 6.8. La matriz inicial empleada en el procedimiento fue ácido 2' 5' – Dihidroxibenzoico. Pico de 19,375.721 Da y pico de 36,824.811 Da.

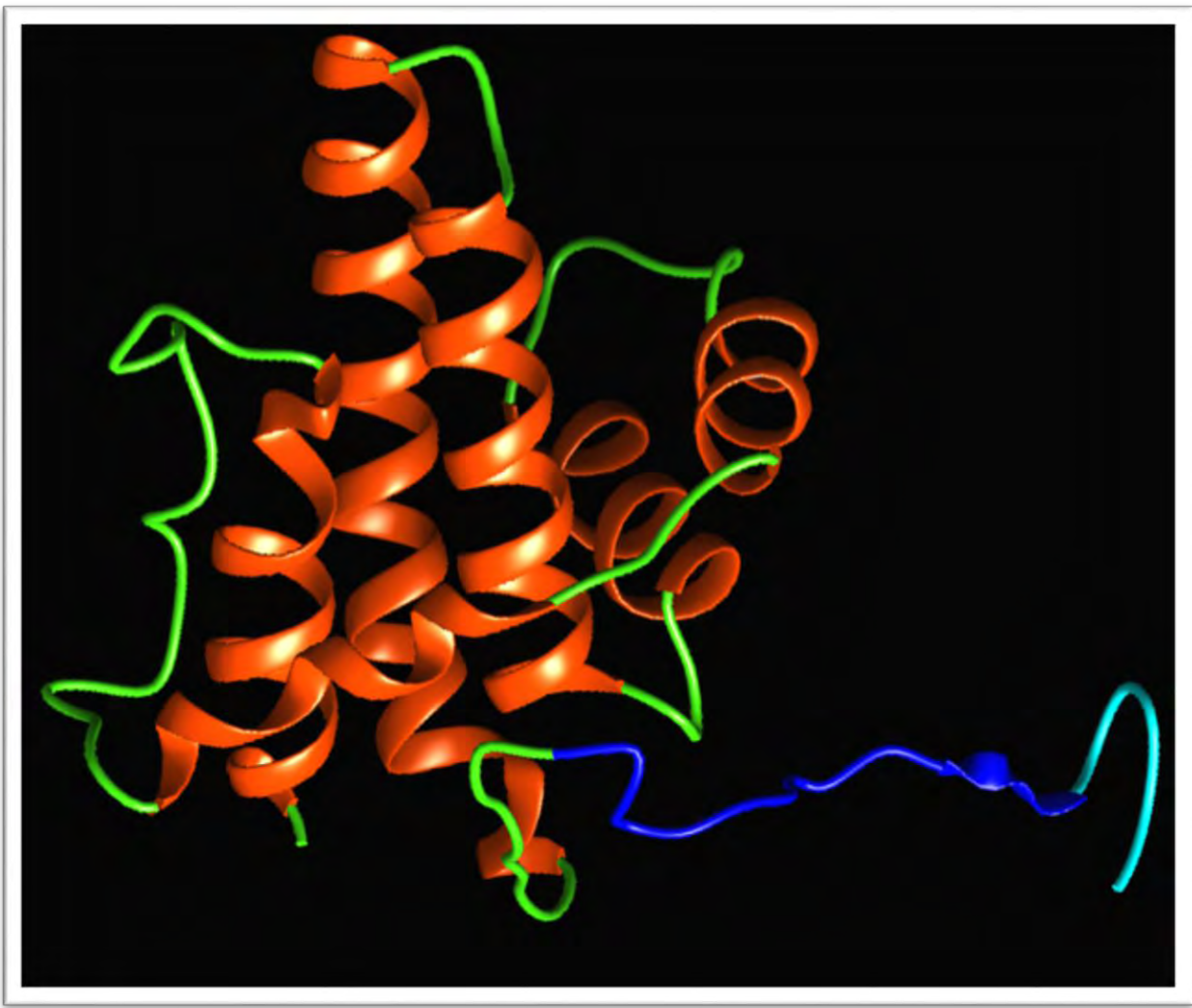
Elaboración del modelo tridimensional teórico de hrHADC1/CAP

Se utilizó el servidor informático I-TASSER para realizar la construcción de un modelo tridimensional teórico de hrHADC1/CAP, empleando la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante.

```
1 MGRLTEAAAAGSGSRAAGWAGSPPTLLPLSPTSPRCAATMASSDEDGTNG
51 GASEAGEDREAPGERRRLGVLATAWLTFYDIAMTAGWLVLAIAMVRFYME
101 KGTHRGLYKSIQKTLKFFQTFALLEVSFPSCCFSAVIFMGKPIPPLLGG
151 LDSTHHHHHH
```

Secuencia de aminoácidos de hrHADC1/CAP,

A partir del modelo que el servidor generó (Imagen 19) y mediante el empleo del software UCSF Chimera (Gasteiger *et al*, 2005; Zhang, 2008), se hizo un análisis de la estructura, cuantificación del porcentaje de estructura secundaria y posibles interacciones interatómicas que pudieran explicar la formación de la especie dimérica que el modelo predice. El porcentaje de estructura secundaria de la predicción es de 58.75% de alfa hélice y 41.25% de estructura aleatoria (Tabla 7). La posibilidad de una interacción de tipo cistina fue predicha en el modelo en las cisteínas de posición 36 (Imagen 20).

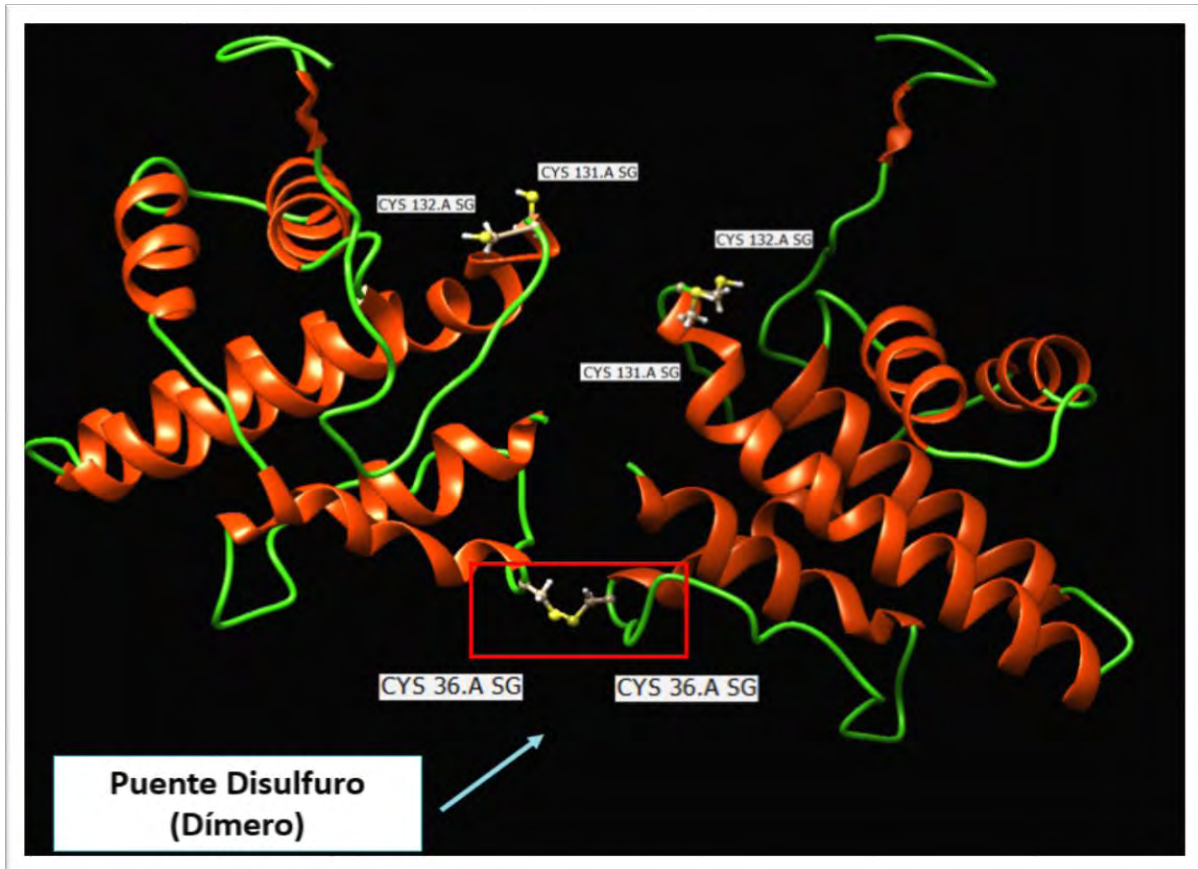


1 MGRLTEAAAAGSGSRAAGWAGSPPTLLPLSPTSPRCAATMASSDEDGTNG
 51 GASEAGEDREAPGERRLGVLATAWLTFYDIAMTAGWLVLAIAMVRFYME
 101 KGTHRGLYKSIQKTLKFFQTFALLEVSFPSCCFSAIVIFMGKPIPPLL
 151 LDSTHHHHHH

Imagen 19. Modelo tridimensional teórica de hrHACD1/CAP.

Alfa Hélice (Rojo)	58.75 %
Estructura aleatoria (Verde)	41.25 %
Bandera V5 (Azul) y Bandera 6xHis (Cian)	

Tabla 7. Porcentaje de estructura secundaria obtenido a partir del análisis del modelo tridimensional teórico de la proteína recombinante hrHACD1/CAP.



```

1 MGRLTEAAAAGSGSRAAGWAGSPPTLLPLSPTSPRCAATMASSDEDGTNG
51 GASEAGEDREAPGERRRLGVLATAWLTFYDIAMTAGWLVLAIAMVRFYME
101 KGTHRGLYKSIQKTLKFFQTFALLEVSFPSCCFSAIVIFMGKPIPPLLGG
151 LDSTHHHHHH

```

Imagen 20. Posibles interacciones inter atómicas que pudieran llevar a la especie monomérica de hrHACD1/CAP a formar un dímero mediante puentes de sulfuro con las cisteínas de la secuencia (color rojo) en la posición 36, 131 y 132.

Determinación del contenido de estructura secundaria.

El contenido de estructura secundaria fue determinado mediante Dicroísmo Circular (D.C.) (Kelly, 2005) en el espectro de luz UV lejano (190-260nm). El espectro final fue el promedio de tres acumulaciones individuales realizadas cada nanómetro a una velocidad de barrido de 20 nm/min (Imagen 21).

En el espectro de dicroísmo circular se observó un perfil característico de proteínas enriquecidas en hélices alfa con valores máximos negativos en 208 - 222 nm y positiva entre 191 - 193 nm (Venyaminov y Yang, 1996; Zimmer, 1974). Se realizó la deconvolución de los datos y el análisis de estos con el software en línea Dicroweb®. El algoritmo de selección fue K2D (Neural Network), el cual se basa en comparar el espectro de dicroísmo circular con espectros de dicroísmos circulares de proteínas con estructura resuelta y cuyos datos se encuentran en el Protein Data Bank (Bohm *et al*; Greenfield, 2006), este algoritmo es ideal para proteínas enriquecidas de α hélices (Sreerama, 1999; Hennesy y Johnson, 1981). El resultado experimental fue de 34% de α hélices, un 16% de láminas β y un 50% de estructura aleatoria (Tabla 8).

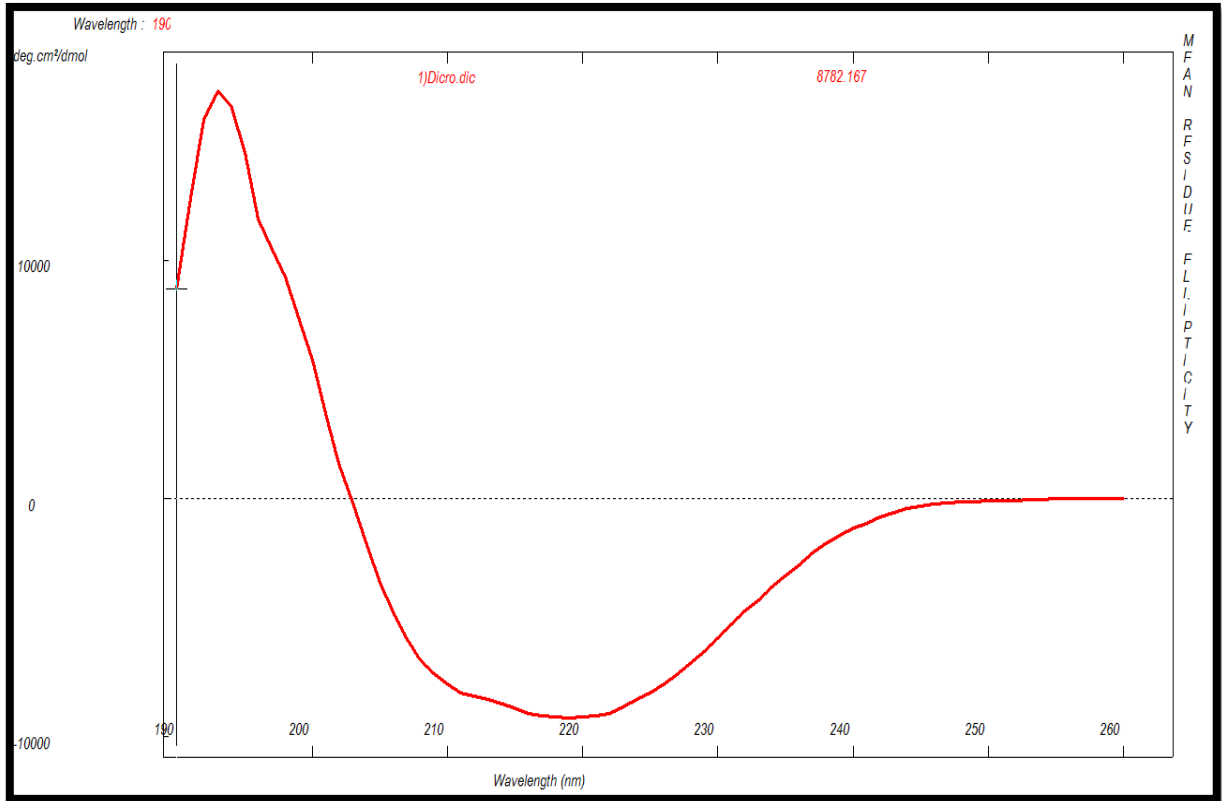


Imagen 21. Espectro de Dicroísmo circular de hrHACD1/CAP

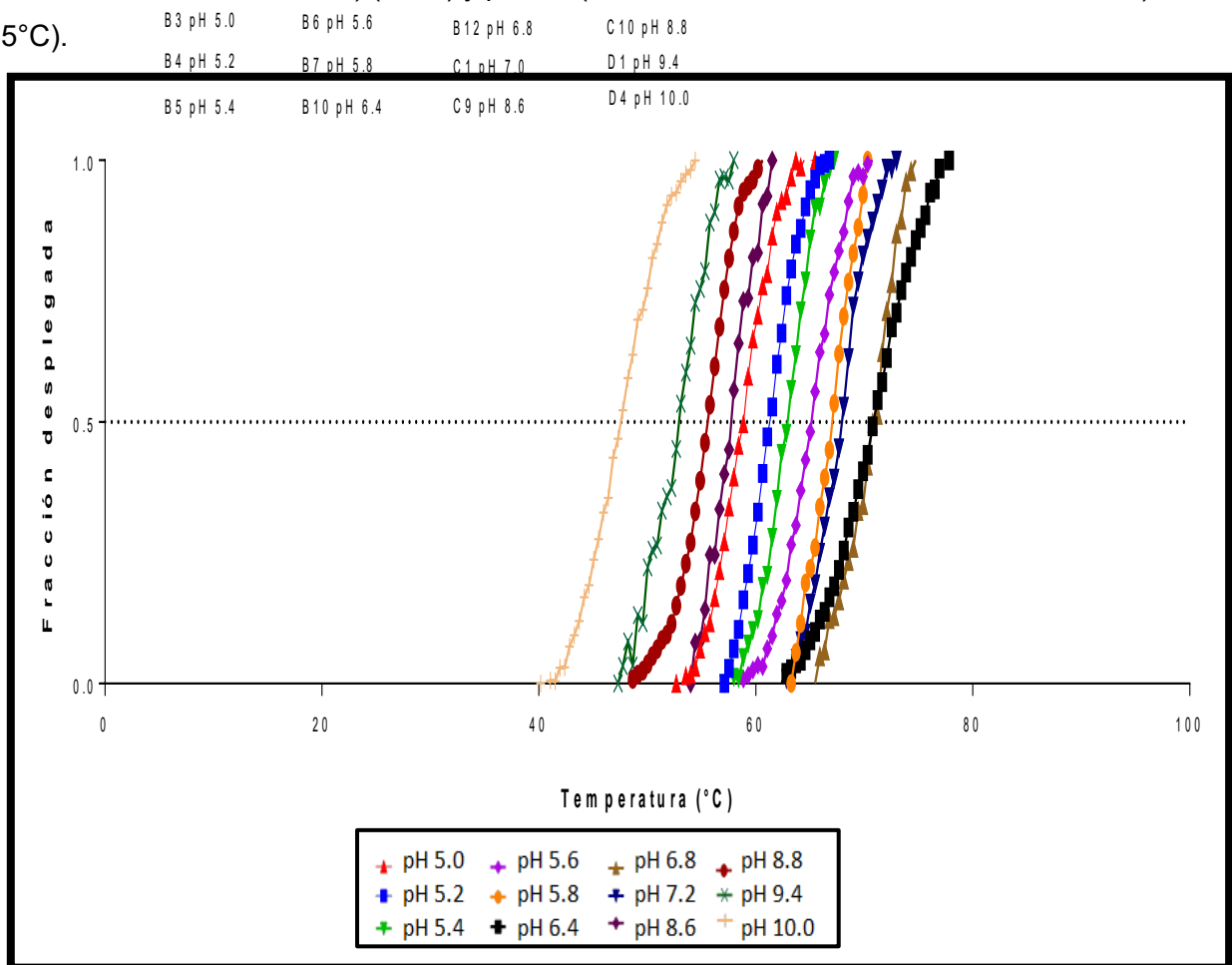
Hélice alfa	Lámina beta	Estructura aleatoria
34%	16%	50%

Tabla 8. Porcentajes de estructura secundaria mediante el uso del algoritmo K2D en el servidor Dicroweb®

Ensayos de desplazamiento térmico de hrHACD1/CAP (pH)

Los ensayos de desplazamiento térmico se realizaron con la finalidad de identificar los niveles de pH que pudieran modificar la estructura de hrHACD1/CAP. Se encontraron 12 condiciones de pH que promueven la estabilidad estructural de la proteína a altas temperaturas (Gráfica 1) entre las cuales resalta el pH 7.2 (1.0 M HEPES de sodio), donde la T_m es de 67°C y pH 6.8 (1.0 M Cacodilato de sodio trihidratado) y 6.4 (1.0 M Cacodilato de sodio trihidratado) con una de T_m 70°C y 70.8°C respectivamente (Tabla 9).

Por otra parte, se puede observar en la gráfica 1 y a su vez la tabla 9, los valores de pH que no favorecen el plegamiento de hrHACD1/CAP, como son pH 8.8 (1.0 M TRIS HCl) (55°C), pH 9.4 (0.5 M CAPSO) (52°C), pH 10 (0.5 M CAPS) (47.8°C), pH 5.0 (1.0 M Citrato de sodio tribásico dihidratado)(59°C), pH 5.2 (1.0 M Citrato de sodio tribásico dihidratado) (61°C), pH 5.4 (1.0 M Citrato de sodio tribásico dihidratado) (63°C), pH 5.6 (1.0 M Citrato de sodio tribásico dihidratado) (64°C) y pH 5.8 (1.0 M Citrato de sodio tribásico dihidratado) (65°C).



Gráfica 1. T_m de la proteína hrHACD1/CAP en diversos niveles de pH.

pH	Amortiguador	Titulante	Tm
5.0	1.0 M Citrato de sodio tribásico dihidratado	HCl	59°C
5.2	1.0 M Citrato de sodio tribásico dihidratado	HCl	61°C
5.4	1.0 M Citrato de sodio tribásico dihidratado	HCl	63°C
5.6	1.0 M Citrato de sodio tribásico dihidratado	HCl	64°C
5.8	1.0 M Citrato de sodio tribásico dihidratado	HCl	65°C
6.4	1.0 M Cacodilato de sodio trihidratado	HCl	70.8°C
6.8	1.0 M Cacodilato de sodio trihidratado	HCl	70°C
7.2	1.0 M HEPES de sodio	HCl	67°C
8.6	1.0 M TRIS HCl	NaOH	57°C
8.8	1.0 M TRIS HCl	NaOH	55°C
9.4	0.5 M CAPSO	NaOH	52°C
10	0.5 M CAPS	NaOH	47.8°C

Tabla 9. *T_m* de la proteína hrHACD1/CAP en diversos niveles de pH. Condiciones que favorecen el plegamiento (Rojo) y condiciones que no favorecen el plegamiento (Azul, pH ácido y verde, pH básico) (APÉNDICE 1. Tabla completa de las condiciones empleadas en el experimento)

Comportamiento de oligomerización / monodispersidad en solución de hrHACD1/CAP.

Para determinar el comportamiento de oligomerización de la proteína se realizaron ensayos de DLS utilizando incrementos de temperatura en la misma solución de proteína. Con dicho ensayo se comprobó que hrHACD1/CAP no permanece en estado monomérico, sino que busca interacciones con ella misma de tipo hidrofóbico (Tabla 10).

Se observó que, en las temperaturas de 20, 25 y 30°C (Imagen 22. A, B Y C respectivamente) existe polidispersidad en las moléculas, esto significa que la proteína se encuentra en múltiples estados de oligomerización o estados de asociación entre ella misma. Por otro lado, se encontró una variante importante al modificar la temperatura a 37°C, ya que la diferencia radica en que solo aparece una población específica, lo que demuestra que la proteína hrHACD1/CAP en una solución de fosfato de sodio 10mM pH 6.8 a una temperatura de 37°C es monodispersa (Imagen 22. D).

Con estos datos, se observa la formación de tres poblaciones que se mantienen constantes (Población 1: 105.6 ± 37.5 kDa, población 2: $1.12e+6$ kDa y población 3: $3.8e+8$) en todas las temperaturas, excepto en 37°C donde sólo se observa la población 2. A partir de los estimados de masa molecular se calculó el número de unidades monoméricas (1 unidad monomérica = 19.3 KDa) que forman estas poblaciones.

Población 1, conformada por: 2 – 5 unidades monoméricas, población 2, conformada por: 58,000 unidades monoméricas y población 3, conformada por: 160,000 unidades monoméricas.

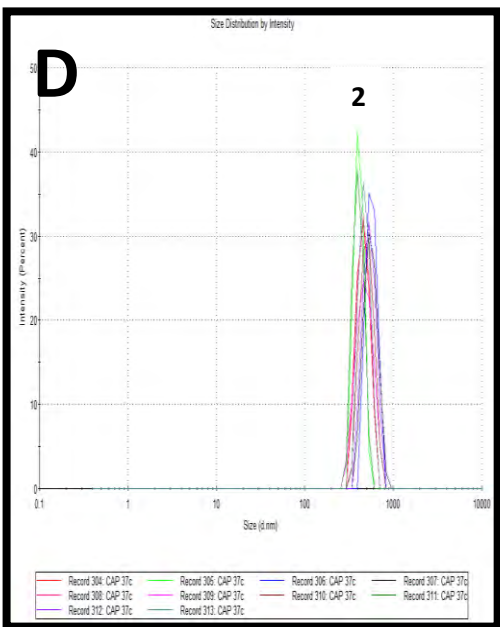
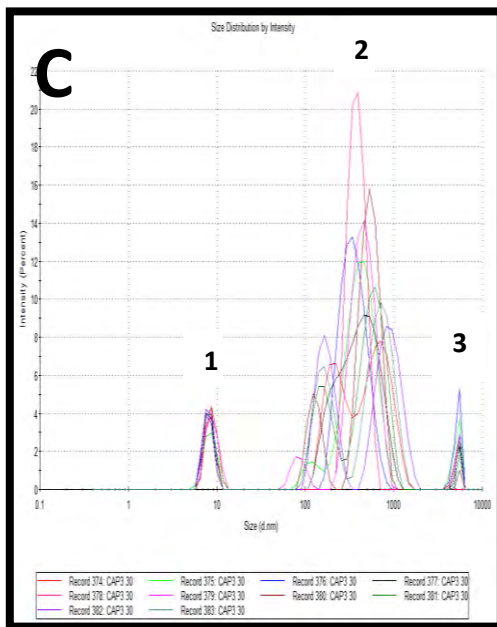
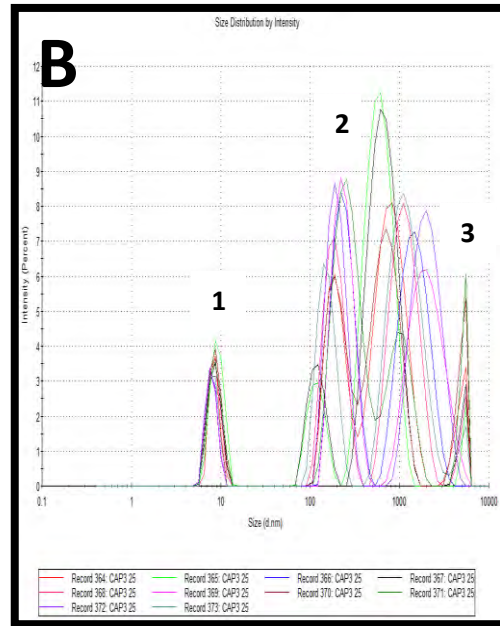
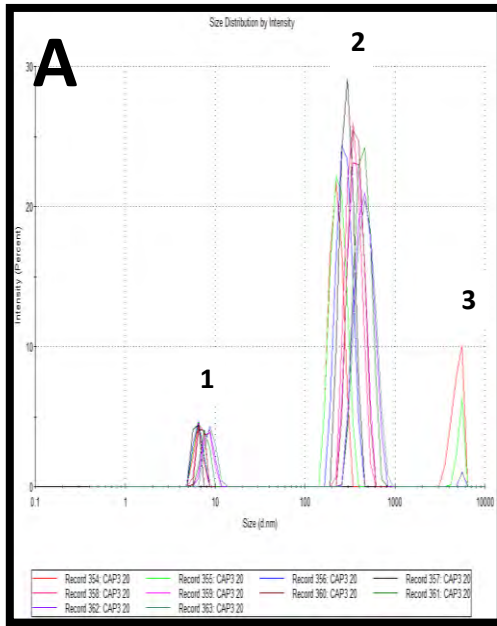


Imagen 22. Ensayos de DLS. A, B y C. Temperaturas de 20, 25 y 30°C respectivamente. hrHACD1/CAP se encuentra en múltiples estados de oligomerización o estados de asociación entre ella misma. hrHACD1/CAP a 37°C se encuentra en un estado de monodispersidad. D.

Temperatura	Pico	Radio Hidrodinámico	Porcentaje poblacional
20°C	1	6.503 ± 0.6349 nm	8.3%
	2	220.2 ± 36.34 nm	67.3%
	3	5560 ± 641.9 nm	24.4%
25°C	1	8.721 ± 0.9769 nm	11.6%
	2	190.1 ± 55.37 nm	27.3%
	3	825.0 ± 314.9 nm	37.7%
30°C	1	8.721 ± 1.212 nm	11%
	2	220.2 ± 61.09 nm	34.6%
	3	712.4 ± 242.9 nm	50.2%
37°C	2	458.7 ± 76.21	100%

Tabla 10. Análisis de DLS de hrHACD1/CAP. Temperatura de 20, 25, 30 y 37°C. Se observan las variantes de temperatura y su relación con la presencia de número de picos presentes en el espectro, su respectivo radio hidrodinámico y su porcentaje poblacional.

Finalmente, la proteína en solución a 37°C fue sometida a un cambio de temperatura llevándola a 16°C (Imagen 23. B), con el objetivo de poder observar si la proteína al haber alcanzado la estabilidad estructural unimodal podía mantenerse a pesar de un cambio abrupto en la temperatura. El resultado obtenido fue una distribución trimodal con un porcentaje poblacional mayoritario para el Pico 3 (Tabla 11). Estos resultados demuestran que la estabilidad en la organización de la proteína es sensible a la temperatura y que puede ser reversible a estados desorganizados al hacer un cambio en la temperatura.

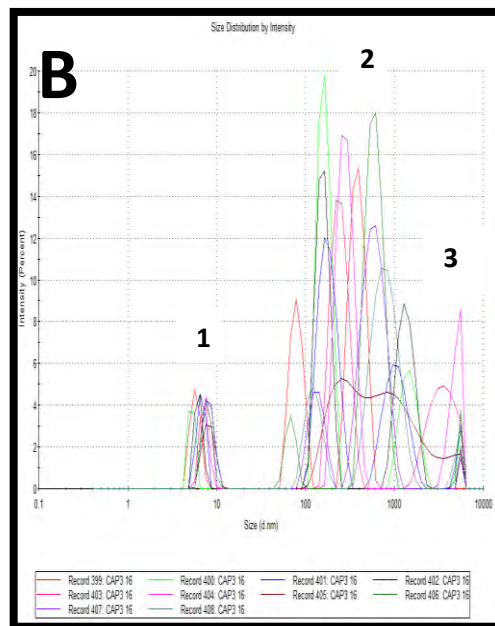
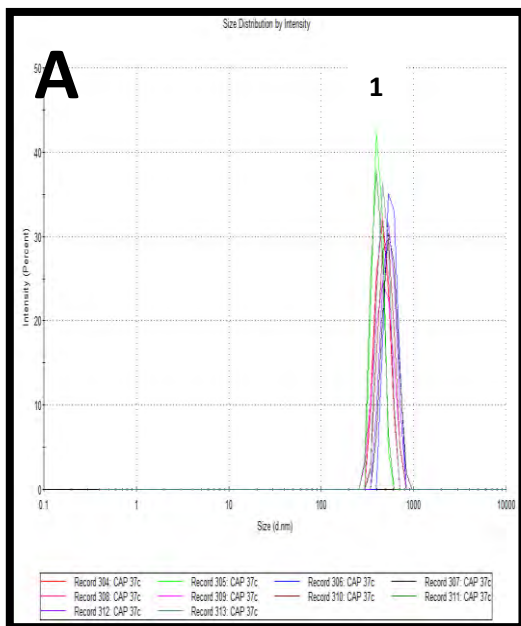


Imagen 23. Ensayos de DLS. Temperaturas de 37°C (A) y 16°C (B). Cuando a hrHACD1/CAP se le aplica una disminución en la temperatura cuando se encuentra en un estado monodisoerso (A), la proteína cambia a múltiples estados de oligomerización o estados de asociación entre ella misma (B).

Temperatura	Pico	Radio Hidrodinámico	Porcentaje poblacional
16°C	1	5.615 ± 0.7100 nm	12.3%
	2	78.82 ± 13.37 nm	16.8%
	3	396.1 ± 76.94 nm	20.0%
37°C	1	458.7 ± 76.21	100%

Tabla 11. Análisis de DLS de hrHACD1/CAP. Temperatura de 16 y 37°C. Se observan las variantes de temperatura y su relación con la presencia de número de picos presentes en el espectro, su respectivo radio hidrodinámico y su porcentaje poblacional.

Como dato importante, el índice de hidrofobicidad de la proteína (GRAVY: Grand average of hydropathicity) es de -0.011 (<https://web.expasy.org/protparam/>), según este dato, que denota el potencial hidrofílico o hidrofóbico de una proteína donde a mayor valor de GRAVY más hidrofóbico es la proteína y con un análisis al modelo tridimensional de hrHACD1/CAP (Imagen 24) podemos inferir que la proteína es parcialmente hidrofílica, teniendo una región en su superficie que podría exponer secuencias de aminoácidos hidrofóbicos, esto es de interés debido a que estos datos podría explicar la formación de oligómeros de hrHACD1/CAP, promovidos por la interacción entre estas superficies hidrofóbicas.

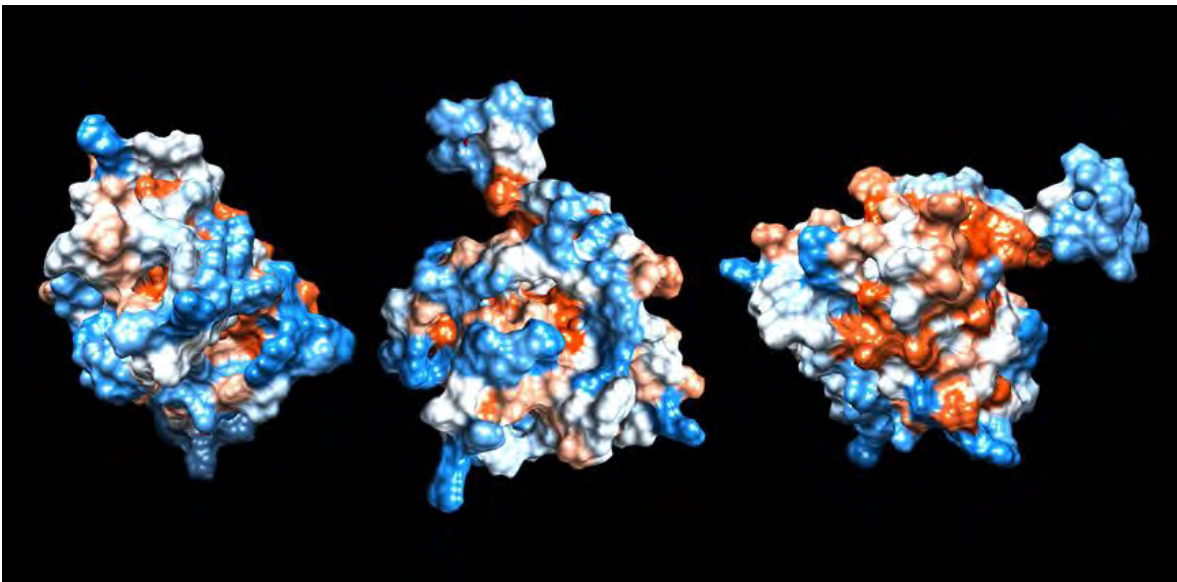


Imagen 24. Modelo de accesibilidad solvente de hrHACD1/CAP. Superficie hidrofílica (azul), zonas neutras de interacción hidrofílica (blanco) y zonas de interacción hidrofóbica (rojo).

Prueba de actividad biológica

Caracterización morfológica de cristales inducidos con hrHACD1/CAP

Para demostrar que nuestra proteína presenta actividad biológica asociada a la mineralización y que esta corresponde con los resultados previos obtenidos con otras moléculas asociadas a biomineralización (Fan D, et al 2011; Romo, 2016; Villareal E, et al 2009) se utilizó el sistema de contradifusión en gel de silicato para determinar si tiene la capacidad de actuar como un nucleador y/o regulador de cristales de fosfato de calcio.

Como se puede observar en la Imagen 25 (A y B) se muestran los cristales inducidos por hrHACD1/CAP a los 10 días de incubación, dichos cristales tienen forma de esferoides del orden de los 400 μm de diámetro, estos presentan estructuras tipo drusa que emergen de un centro de nucleación.

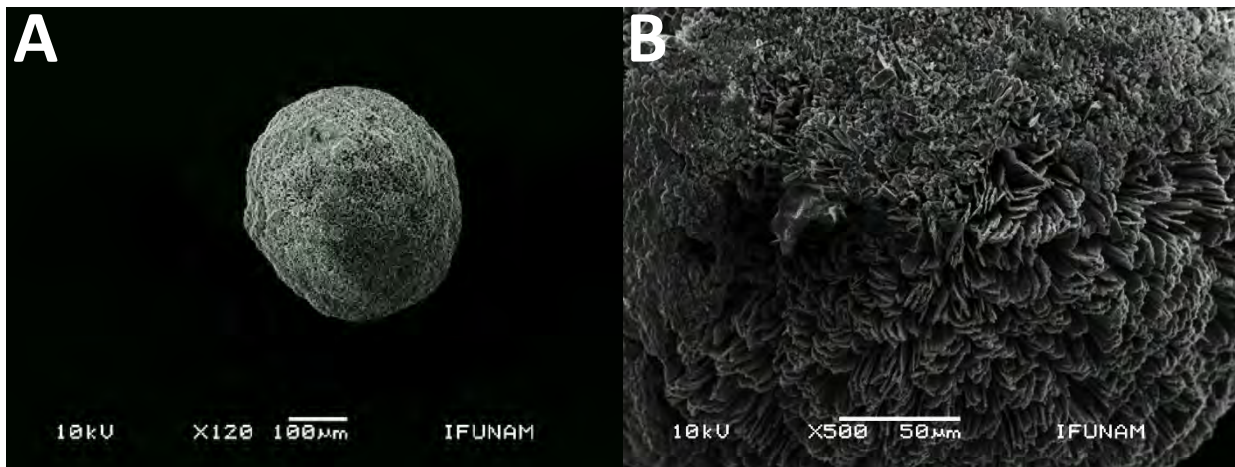


Imagen 25. A. Formación de esferoides del orden de los 400 μm de diámetro a los 10 días de incubación. B. Detalle de la superficie de la estructura de la imagen A, donde se observan las prolongaciones que emergen del centro del esferoide.

En la imagen 26. A. Se muestra la formación de esferoides del orden de los 800 μm de diámetro a los 14 días de incubación inducidos con hrHACD1/CAP. B. detalle de la superficie del esferoide, presencia de estructuras similares a las obtenidas a los 10 días de incubación.

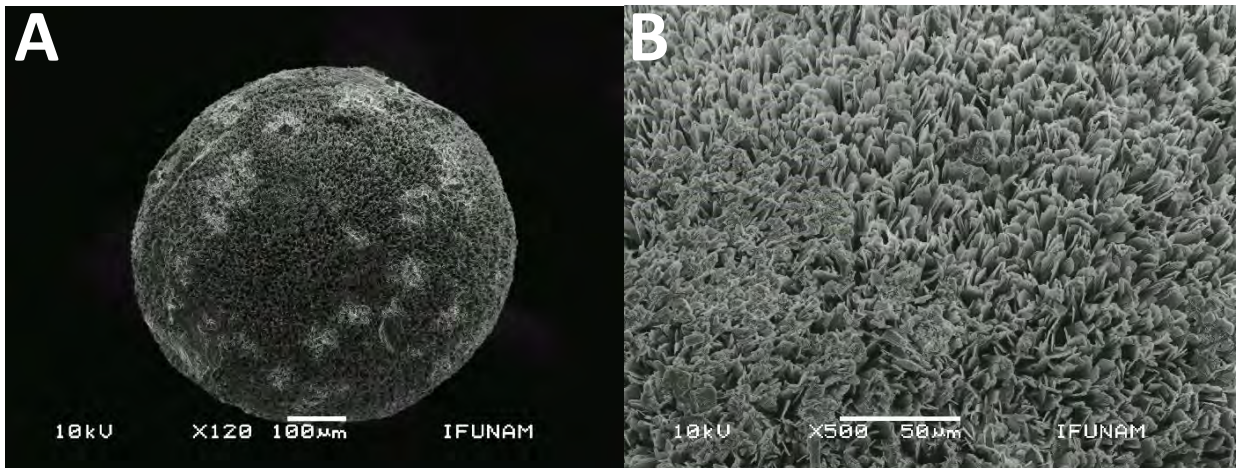


Imagen 26. A. Formación de esferoides del orden de los 800 μm de diámetro a los 14 días de incubación. B. Detalle de la superficie de la estructura de la imagen A, donde se observan las prolongaciones que emergen del centro del esferoide.

En la imagen 27 (A y B) puede observarse que hasta los 21 días de incubación sigue existiendo formación de cristales con características muy similares a los tiempos de 10 y 14 días, a su vez puede observarse y confirmarse en la imagen 28 A, que estas estructuras se originan a partir de un centro de nucleación, la imagen 28 B corresponde al grupo control en ausencia de la proteína hrHACD1/CAP, en dicho grupo no hay formación de las estructuras minerales esféricas.

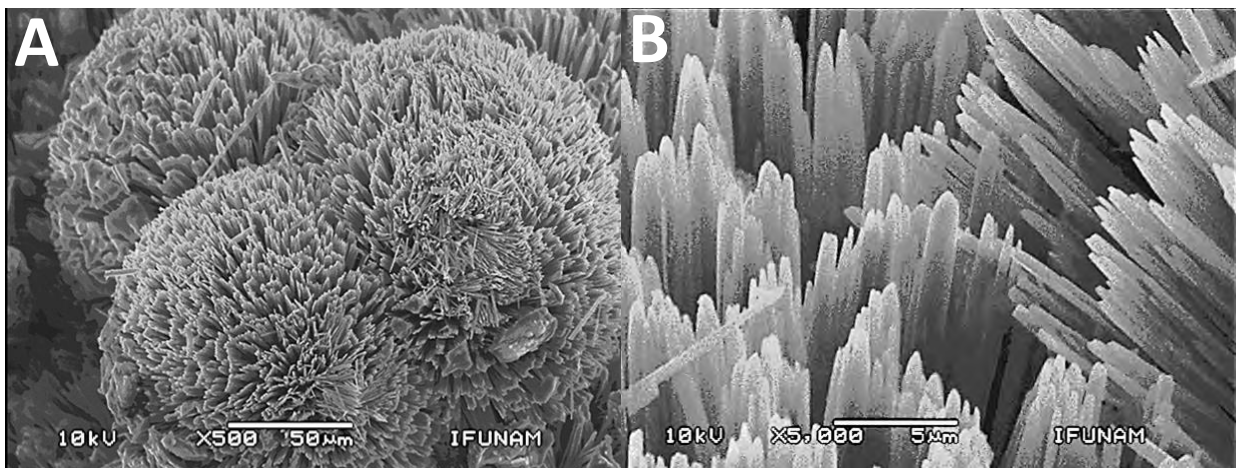


Imagen 27. A. Formación de esferoides del orden de los 200 μm de diámetro a los 21 días de incubación. B. Estructuras tipo drusa que emergen de un centro de nucleación.

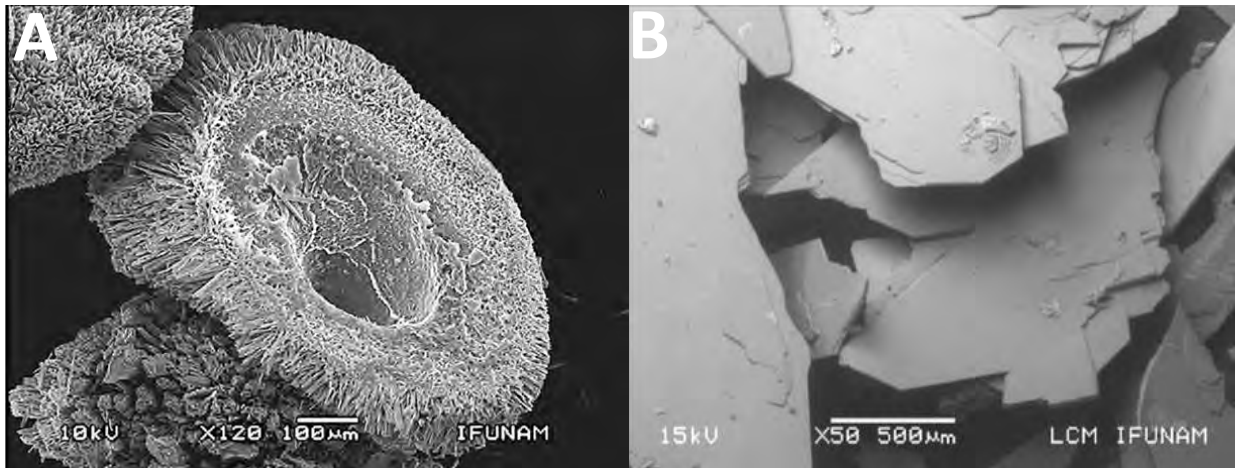


Imagen 28. A. Formación de cristales a partir de un centro de nucleación a los 21 días de incubación inducidos con hrHACD1/CAP. B. Control sin proteína a los 21 días de incubación

A su vez puede observarse en la Imagen 29 A y B los mismos patrones de formación de esferoides con proyecciones cristalinas tipo drusa a los 21 días de incubación inducidos con la proteína.

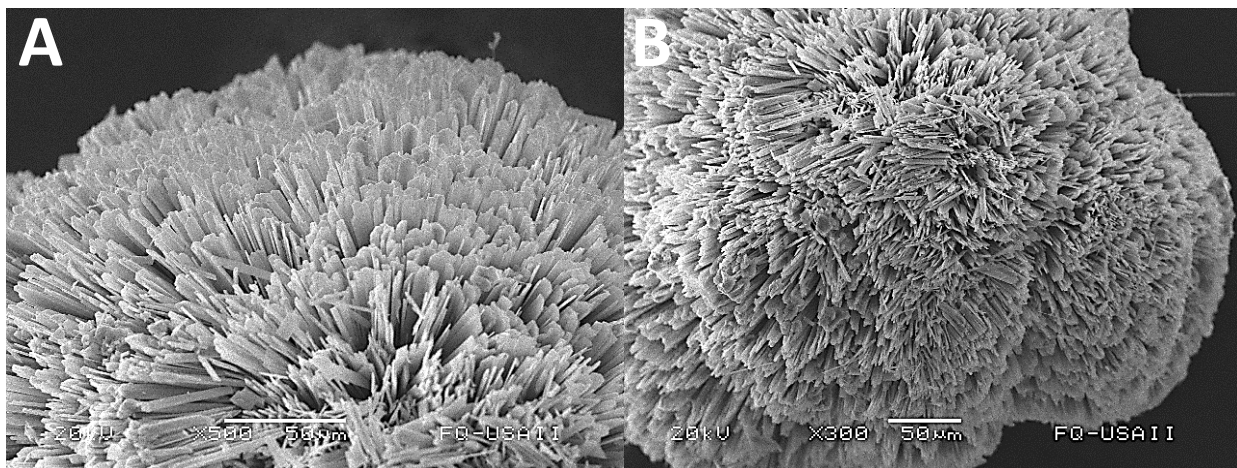


Imagen 29. A. Estructuras tipo drusa que emergen de un centro de nucleación. B. Formación de esferoides del orden de los 300 µm de diámetro a los 21 días de incubación.

En la imagen 30 A, se puede observar la formación de esferoides del orden de los 400 μm de diámetro a los 21 días de incubación, mientras que, en B, se observa nuevamente las estructuras tipo drusa que emergen de un centro de nucleación.

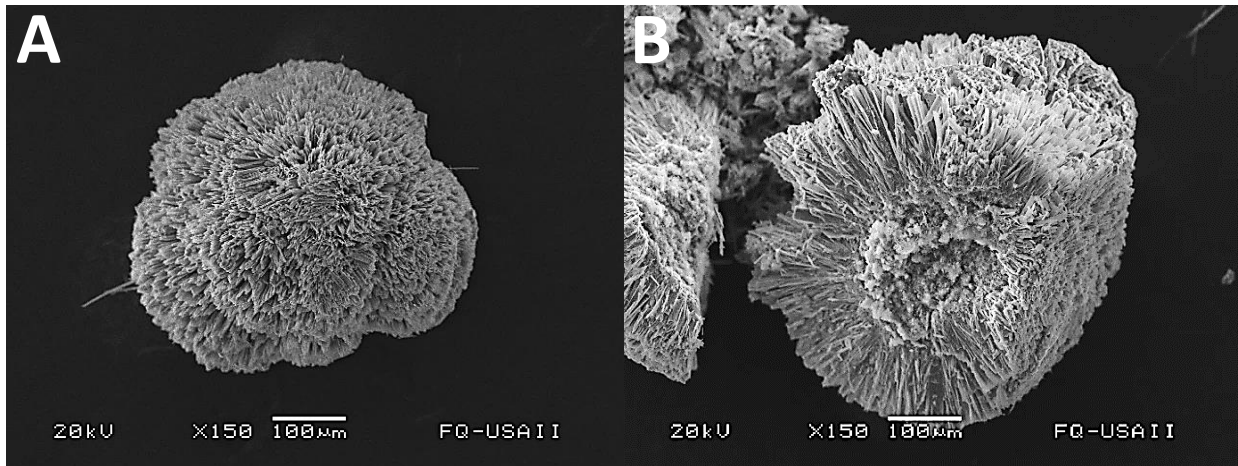


Imagen 30. A. Formación de esferoides del orden de los 400 μm de diámetro a los 21 días de incubación con hrHACD1/CAP. B. Estructuras tipo drusa que emergen de un centro de nucleación.

Caracterización de composición de cristales inducidos con hrHACD1/CAP

Se llevó a cabo el análisis de composición elemental mediante EDS sobre las estructuras esferoides de un tiempo de incubación de 21 días para conocer sus componentes elementales, en el espectro de EDS en la imagen 31 A, se puede apreciar la composición de los cristales inducidos con hrHACD1/CAP, dichos cristales están formados principalmente por calcio como el elemento más abundante seguido del fósforo.

La Imagen 31 B es el espectro del grupo control sin proteína incubado durante 21 días, donde se demuestra que las placas están compuestas principalmente de fósforo, seguidas de calcio. Para conocer a qué fase mineral de las estructuras formadas corresponde, se analizó la relación de calcio / fósforo (Ca/P) la cual tiene la función de servir como un marcador de diversos estados de mineralización, para obtenerla se tomaron los conteos de intensidades atómicas del espectro de EDS tomando en cuenta al calcio y al fosforo como el 100% de los elementos presentes en la muestra.

El resultado para los cristales inducidos con hrHACD1/CAP fue una relación Ca/P de 1.36, este dato fue comparado con tablas de referencia de estados de mineralización, dicha tabla nos indica que las estructuras esferoides obtenidas están formadas por fosfato octacálcico, el cual es un precursor de la hidroxiapatita, mientras que la relación Ca/P del grupo control fue de 0.95, que corresponde a fosfato dicálcico (Tabla 12).

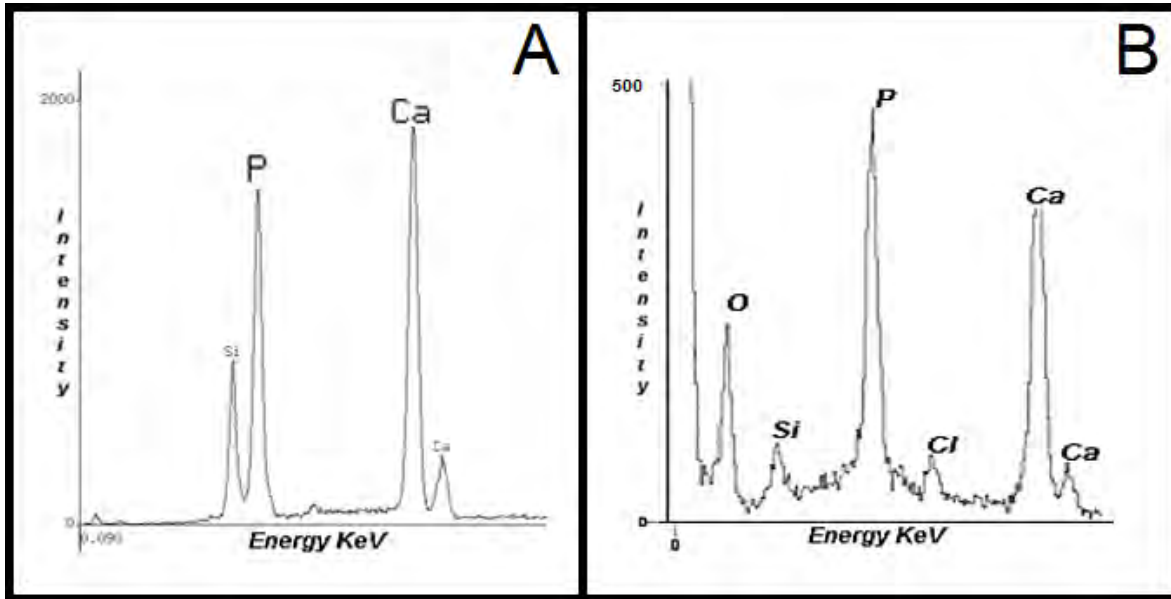


Imagen 31. Espectros EDS de los cristales inducidos con la proteína (A), cuya relación Ca/P es de 1.36, correspondiente a la fase mineral de fosfato octacálcico. Espectros EDS de las placas formadas en el grupo control sin proteína (B) cuya relación Ca/P 0.95, correspondiente a fosfato dicálcico.

Relación Ca/P de referencia

Relación Ca/P	Fórmula	Fase Mineralizada
1	CaHPO_4	Monetita (Fosfato dicálcico)
1	$\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Brushita (Fosfato dicálcico dihidratado)
1.33	$\text{Ca}_8 (\text{HPO}_4)_2 (\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Fosfato octacálcico
1.43	$\text{Ca}_{10} \text{HPO}_4 (\text{PO}_4)_6$	Whitlockita
1.67	$\text{Ca}_{10} (\text{PO}_4)_6 (\text{OH})_2$	Hidroxiapatita

Tabla 12. Relación de Ca/P de referencia de los fosfatos de calcio de relevancia biológica en mamíferos. (Romo, 2014).

Para determinar de manera exacta la fase mineral de las estructuras esferoides formadas en el sistema de contradifusión de gel de silicato, se decidió someter a las muestras al análisis mediante Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM). Debido a que EDS es un análisis semicuantitativo pueden existir variantes en los resultados obtenidos, pues dependerá de la zona seleccionada al hacer el análisis de la composición de la estructura. El emplear la técnica de HRTEM permite obtener datos que confirmaran la composición de los cristales formados.

Con esta técnica se logró determinar la distancia interplanar a través de la transformada rápida de Fourier y con ayuda del programa Digital Micrograph se midieron las distancias interplanares, utilizando tablas internacionales de valores cristalográficos para determinar la fase cristalina.

Se hizo el análisis de los cristales inducidos con hrHACD1/CAP de 10 días de incubación (Imagen 32). En este análisis se logró determinar que las estructuras obtenidas corresponden a la fase mineral de hidroxiapatita.

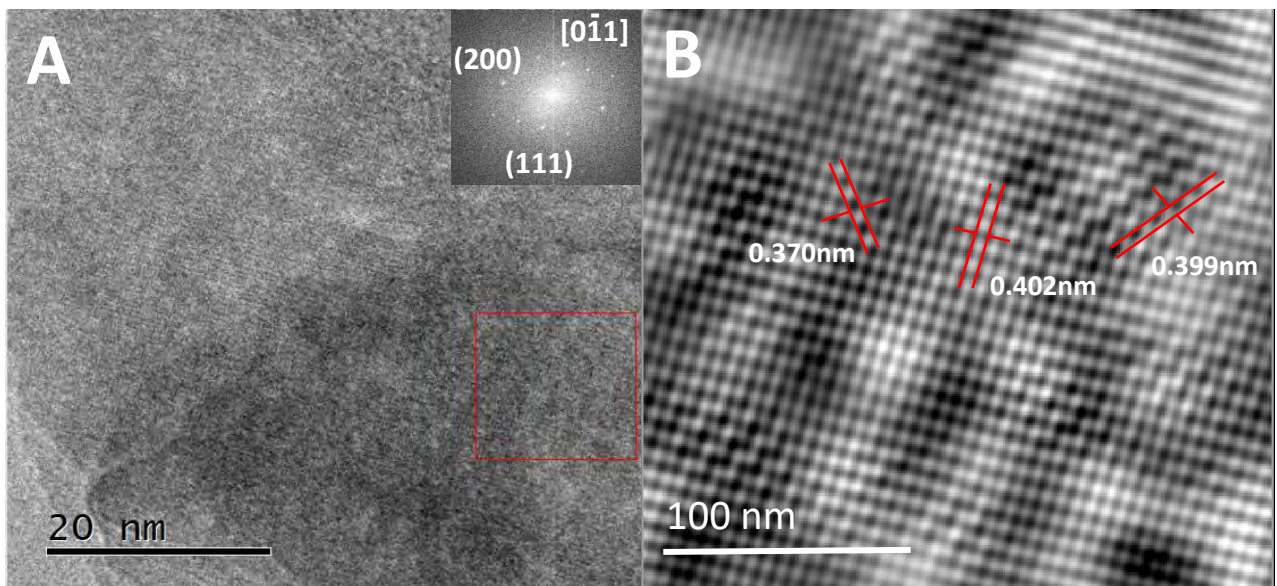


Imagen 32. (A) Plano cristalino de la muestra de 10 días inducida con hrHACD1/CAP. En la parte superior derecha de la imagen (A) se muestran los planos cristalinos (200 y 111) obtenidos mediante transformada rápida de Fourier. Imagen (B) Zona de alta resolución de la imagen (A) donde se observan las distancias interplanares (0.370, 0.402 y 0.399 nm) correspondientes a la fase mineral de hidroxiapatita.

DISCUSIÓN

En la actualidad existen pocos estudios relacionados con las características estructurales y bioquímicas de proteínas asociadas a procesos de mineralización y de manera particular no hay antecedentes de análisis bioquímicos realizados a la proteína de adhesión del cemento HACD1/CAP, además, no se cuenta con homólogos estructurales significativos resueltos a nivel tridimensional, pero, principalmente es la limitada distribución anatómica del cemento radicular dental lo que ha generado que sus proteínas específicas permanezcan poco estudiadas.

Uno de nuestros objetivos a mediano plazo era determinar cuáles son las condiciones óptimas de purificación, estabilidad estructural, y plegamiento tridimensional, para que sean antecedentes en estudios futuros para producir cristales de la proteína y mediante difracción de rayos X resolver y generar un modelo experimental tridimensional de hrHACD1/CAP que nos permita conocer cómo es que lleva a cabo sus funciones biológicas descritas y/o determinar sus zonas activas asociadas a la formación de cristales de hidroxiapatita. El estudio estructural de las proteínas cemento específicas es de suma importancia ya que han demostrado contener regiones que se pueden emplear favorablemente para el tratamiento de lesiones óseas como defectos críticos y en la osteoporosis (Salgado; 2017).

La expresión recombinante en células de *E. coli*. resolvió el problema de obtención de proteína a partir de su limitada fuente nativa (Lara, 2011). No se ve limitada la cantidad de proteína que se puede purificar, nosotros en este trabajo mediante nuestro sistema de expresión recombinante obtuvimos un rendimiento de hrHACD1/CAP de 2.89mg por cada litro de cultivo para el monómero y de 3.14mg/litro para la especie de mayor peso molecular, el cual es superior a lo reportado para otras proteínas asociadas a mineralización y expresadas de forma recombinante como hrCEMP-1 expresada en *Pichia pastoris* (0.940mg/litro) (Romo *et al*, 2016).

Cabe resaltar que se tiene la hipótesis de que una fuerte carga iónica generada por concentraciones de NaCl en la solución con hrHACD1/CAP pudiera estar modificando el estado de oligomerización de la misma, pues la obtención de la especie de mayor peso molecular se encontraba fuertemente relacionada con la incorporación de sales al medio (Kazumasa *et al*, 2001).

Tener una fuente eficiente de expresión y un protocolo adecuado de purificación de proteína fue indispensable para los estudios realizados en este trabajo y será de utilidad para los experimentos planeados en el futuro. Nosostros generamos con la metodología utilizada en el presente trabajo una proteína que carece de modificaciones post traduccionales, lo cual no compromete su actividad biológica asociada a la formación mineral y es de mucha importancia en el estudio estructural planteado en un futuro mediante su cristalización, favorecida por la estabilidad estructural de la proteína. (Patiño, 2014).

La purificación de hrHACD1/CAP se realizó mediante cromatografía de afinidad a hidroxiapatita (Tiselius, 1956), confirmando así su alta afinidad por dicha fase mineral, hecho que también ha sido observado en péptidos sintéticos derivados de esta y con otras proteínas asociadas al proceso de mineralización como CEMP-1 (Montoya *et al*, 2015; Romo *et al*, 2016).

En este trabajo se demostró que hrHACD1/CAP opta por formar oligómeros desde los identificados en el perfil electroforético donde la especie predominante fue la de mayor peso molecular, posiblemente ocasionadas por los puentes disulfuro mediante cisteínas en la posición 36 de la secuencia de aminoácidos, esto fue confirmado mediante el tratamiento de esta especie de mayor peso molecular de la proteína purificada con reductores como el β -mercaptoetanol, ditioneitol y urea 8 M (Singh, 1995), observando que después del tratamiento se observa la presencia de la especie monomérica en el purificado de esta especie de mayor peso molecular, lo que genera la hipótesis de la presencia de un dímero, hasta las asociaciones supramoleculares en solución demostradas por DLS donde pueden intervenir interacciones hidrofóbicas o complementariedad de cargas en la superficie de la proteína.

El modelo teórico predice estructura secundaria y plegamiento de hrHACD1/CAP, contiene un 58.75% de hélice alfa y un 41.25% de estructura aleatoria (Imagen 19). Al carecer de homólogos estructurales resueltos a nivel tridimensional, el modelo teórico solo es indicativo, pero concuerda con los resultados experimentales que demostraron que la proteína tiene un alto contenido de estructura aleatoria y hélice alfa (Tabla 8). Que hrHACD1/CAP tenga un alto contenido de estructura aleatoria y presente función biológica es una característica fundamental de las proteínas intrínsecamente desorganizadas (Cuevas, 2011). Teóricamente hrHACD1/CAP tiene varias zonas desorganizadas (50% de

estructura aleatoria, regiones: 17-36, 47-51, 61-67, 79-82, 101-103 y 132-140) esto podría incrementar su plasticidad y explicar las diferentes opciones de plegamiento que puede adoptar dependiendo de las condiciones del medio como pH, temperatura y concentración iónica (Dyson, 2005). Esto puede influir con su interacción dinámica con el medio, generando múltiples formas de organización estructural de la proteína, lo que permite que una sola proteína pueda tener múltiples funciones relacionadas a su acomodo estructural (Dyson, 2005). El estudio de estas proteínas es complejo, pues existen múltiples variables que afectaran el comportamiento final de la misma (Rhodes, 1993).

Con la finalidad de conocer las condiciones que favorecieran el plegamiento de hrHACD1/CAP se realizaron pruebas de desplazamiento térmico empleando variaciones de pH, estos estudios son un requisito fundamental en los diversos estudios bioquímicos, estructurales y pruebas cristalográficas. En este estudio demostramos por primera vez que la estabilidad estructural de la proteína es dependiente del pH.

El rango de pH cercano al que se desenvuelve en su ambiente nativo (7.4) la proteína, favorece su estabilidad estructural e incrementa su estabilidad térmica (70.8 °C). Los extremos de pH disminuyen la estabilidad estructural de la proteína, como se demostró mediante los resultados de desplazamiento térmico en solución pH 8.8 (55°C), pH 9.4 (52°C), pH 10 (47.8°C), pH 5.0 (59°C), pH 5.2 (61°C), pH 5.4 (63°C), pH 5.6 (64°C) y pH 5.8 (65°C). A partir de estos datos generamos la hipótesis de que en un ambiente en equilibrio de iones ($H^+/-OH$) las interacciones de estructura de la proteína en solución se ven favorecidas, generando así estabilidad en el plegamiento de la misma, haciéndola termoestable.

En un sistema termodinámicamente cambiante, una mayor temperatura genera un mayor movimiento molecular, la excitabilidad de moléculas, producto de la transferencia de energía térmica es equivalente a inestabilidad de enlaces moleculares, lo cual, afecta en gran medida la formación estable de enlaces débiles como lo son las fuerzas de Van der Waals y los puentes de hidrógeno, generando así plegamiento con baja resistencia a altas temperaturas (Streeter *et al*, 2000), en el caso de nuestra proteína demostramos que el plegamiento que adquiere en estos rangos de pH (6.4 - 7.2) es muy estable y no se ve afectada por este fenómeno.

Mediante estudios de DLS demostramos por primera vez que la proteína en solución cursa por estados de polidispersidad reversible y que solo se organiza en un estado monodisperso a una temperatura fisiológica (37°C). La organización intermolecular podría formar estructuras catenarias, como las observadas en estudios de microscopía de fuerza atómica (AFM), en los cuales, la proteína se organiza en uniones múltiples de nano esferas que asimilan la configuración de una cadena (Montoya *et al*, 2014).

Finalmente, la actividad biológica de hrHACD1/CAP relacionada con la nucleación y crecimiento de cristales de fosfato de calcio (Bonucci, 1992; Silverman, 2004) fue demostrada mediante el sistema de contradifusión en gel de silicato. hrHACD1/CAP tiene la capacidad de generar estructuras esféricas de un diámetro aproximado de los 200 a 800 μg , las cuales se conforman principalmente por estructuras cristalinas tipo drusa que emergen de un centro de nucleación. Su formación se detectó desde los 10 días de incubación y se mantuvieron hasta los 21 días, ya que al terminar la difusión del calcio en la parte superior del gel no se espera la formación de más estructuras. Los cristales formados en nuestros experimentos son muy similares a las que se han obtenido empleando otras proteínas relacionadas con el proceso de biomineralización (Fan D, *et al* 2011; Romo, 2016; Silverman, 2004; Villareal E, *et al* 2009). Mediante el empleo de un análisis elemental por energía dispersiva de rayos X (EDS) fue determinada la composición de estas estructuras cristalinas, las cuales están conformadas principalmente de calcio y en menor proporción fósforo (Tabla 12). La relación calcio fósforo (Ca/P) que se puede usar como indicativo de la fase mineral presente en una muestra empleando la cuantificación atómica por EDS del calcio y fósforo presente en una muestra señala que en todas nuestras muestras experimentales inducidas con hrHACD1/CAP fue de 1.33 que corresponde a fosfato octacálcico (fase mineral previa de la formación de hidroxapatita en los seres vivos), al ser un análisis semicuantitativo se decidió emplear la técnica de HRTEM para poder tener datos que confirmaran la composición de estos cristales, gracias al empleo de esta técnica de microscopía se pudo determinar que las estructuras formadas en el sistema de contradifusión de gel de silicato inducidos con hrHACD1/CAP están constituidas por hidroxapatita (PDF#860740) correspondiente a los planos cristalográficos (200) y (111). Esta diferencia de composición entre EDS y HRTEM se puede explicar debido a que en el estudio de EDS la zona analizada es mayor, por lo tanto, dentro de esta se pueden encontrar estructuras en diversas fases de mineralización, por lo tanto las relaciones de Ca

y P pueden diferir, dando como resultado una relación Ca/P correspondiente a una fase mineral previa a la formación de hidroxiapatita, sin embargo, HRTEM genera patrones específicos cuantitativos para cada fase cristalina, con los cuales mediante el uso de la transformada de Fourier se pueden obtener sus planos cristalinos, distancias interplanares y mediante el empleo de tablas internacionales de difracción de polvos (PDF/Powder Diffraction File) determinar con exactitud la fase mineral correspondiente. Estos resultados son muy similares a los obtenidos al trabajar con proteínas mineralizantes expresadas en sistemas recombinantes, como la amelogenina (hrAMEL) en el cual se ha obtenido la formación de cristales de morfología similares a los obtenidos en este trabajo, los cuales son en su mayoría cristales de fosfato octacálcico, (Lijima, 2002), o como el caso de la proteína de matriz de dentina recombinante (hrDMP1) en la cual se obtiene la formación de cristales de apatita (He *et al*, 2003) y específicamente hablando de proteínas cemento específicas como lo es CEMP-1 nativa (Villarreal *et al*, 2009) y en su forma recombinante (hrCEMP-1) (Romo, 2016), se ha demostrado que también tienen la capacidad de formar estructuras cristalinas, con un centro nucleador del cual se generan múltiples estructuras tipo drusa, las cuales tienen un componente estructural principal de hidroxiapatita.

CONCLUSIONES

Con nuestro sistema de expresión y protocolo de purificación hemos logrado obtener un rendimiento ideal para las pruebas bioquímicas y estructurales que planteamos en un inicio, además se podría emplear para estudios de actividad biológica *in vitro* como *in vivo*, así mismo ofrece una alternativa viable para la obtención de la proteína HACD1/CAP y no depender de su fuente nativa.

Los múltiples estados de oligomerización de hrHACD1/CAP están influenciados por carga iónica y pH. Demostramos por primera vez que hrHACD1/CAP es termoestable siempre que se mantenga en un rango de pH fisiológico.

El alto contenido de estructura aleatoria, la presencia de actividad biológica, los múltiples estados de oligomerización y la plasticidad de termoprotección dependiente de pH nos indica que hrHACD1/CAP es una proteína intrínsecamente desordenada compartiendo esta característica con múltiples proteínas que están asociadas a procesos de biomineralización como la ALP, OCN y en procesos específicos de mineralización de órganos dentales, CEMP-1.

hrHACD1/CAP tiene un papel primordial en la nucleación, regulación y direccionamiento del crecimiento de cristales de hidroxiapatita, por lo cual su participación en los procesos de biomineralización es importante.

El estudio estructural de esta proteína abrirá la posibilidad de identificar y usar regiones peptídicas asociadas a funciones biológicas determinadas y ampliará el uso terapéutico en procesos asociados a la mineralización biológica.

PERSPECTIVAS

Se empleará la proteína recombinante en defectos óseos en modelos animales para evaluar si la proteína tiene un efecto remineralizante y si esta a su vez promueve la regeneración ósea *in vivo*.

Teniendo como base los resultados obtenidos con esta caracterización, se emplearán estas condiciones en pruebas de formación de cristales de proteína, para posteriormente mediante difracción de rayos X generar un patrón de difracción y poder resolver el modelo tridimensional de la proteína.

A partir del modelo tridimensional experimental se seleccionarán regiones peptídicas que pudieran mimetizar el papel biológico de la proteína completa, probando su actividad en sistemas libres de células y si es que son efectivos posteriormente en modelos animales.

REFERENCIAS

- Álvarez, M., Narayanan S, Zeichner, M., Arzate, H. (2006). "Molecular cloning, expresión and inmunolocalization of a novel human cementum derived Protein (CP23)". *Bone*, 38, pp. 409-419.
- Arzate H, Chimal, J., Hernández, L., Díaz de León, L. (1996). "Human cementum Protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells". *J Periodontol Re*, 31, pp. 144-148.
- Arzate, H., Jiménez, L., Alvarez, M., Landa, A., Bar, I., Pitaru, S. (2002) "Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein". *J Dent Res*, 81(8), pp. 541-6.
- Arzate, H., Olson, S., Page, R., Gown, A., Narayanan, A. (1992). "Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum". *FASEB J*, 6(11), pp. 2990-2995.
- Arzate, H., Olson, S., Page, R., Narayanan, S. (1992). "Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in culture". *Bone and mineral Res*, 18, pp. 15-30.
- Arzate, H., Zeichner, M., Mercado, G. (2015). "Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontum formation and regeneration". *Periodontology 2000*, 67, pp. 211-233.
- Atala, A., y Lanza, R. (2011). "Principles of Regenerative Medicine". *Academic Press*, 40, pp 733-745.
- Baab, D., Page, R., Morton, T. (1985). "Studies of a family manifesting premature exfoliation of deciduous teeth". *J Periodontol*. 56, 403-409.
- Bartold, P., y Narayanan, A. (1998). "Biology of the periodontal connective tissues". USA: Quintessence Publishing Co, Inc.
- Bohm. (1992). "Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks". *Protein Engineering*, 5(3), pp. 191-195.
- Bonucci, E. (1992). "Calcification in biological systems". *CRC press*
- Bornhorst, J. (2000). "Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags". *Methods in Enzymology*, 326, 245–254.
- Carranza, F., Neuman, M. (2006). "Clinical periodontology". 8th edition. W. B. Saunders Company.

- Cho, M., Garant, P. (2000). "Development and general structure of periodontum". *Periodontology 2000*, 24, pp. 9-27.
- Cuevas, C. (2011). "Las proteínas desordenadas y su función: una nueva forma de ver la estructura de las proteínas y la respuesta de las plantas al estrés". *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 14(2), pp. 97-105.
- Dyson, H., Wright, P. (2005). "Intrinsically unstructured proteins and their functions". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 6 (3), pp. 197-208.
- Fan, D. Lijima, M. Bromley, K. Yang, X. Mathew, S. Moradian-Oldak, J. (2011) "The Cooperation of Enamelin and Amelogenin in Controlling Octacalcium Phosphate Crystal Morphology". *Cells Tissues Organs*, 194, pp. 194-198.
- Garant, P. (2003). "Oral Cells and Tissues". EUA: Quintessence Books
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. (2005). "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server". pp. 571-607
- Greenfield, N. (2006). "Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure". *Nature protocols*, 1(6), pp. 2876-2890.
- Grøftehaug, M. K., Hajizadeh, N. R., Swann, M. J. y Pohl, E. (2015). "Protein–ligand interactions investigated by thermal shift assays (TSA) and dual polarization interferometry (DPI)". *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 71(1), pp. 36–44.
- He, G., Dahl, T., Veis, A. (2003). "Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1". *Nature materials*. 2, pp. 552-558.
- Hennessey y Johnson (1981). "Information Content in the Circular Dichroism of Proteins". *Biochemistry*, 20 (5), pp. 1085-1094.
- Hernández, F., Marichi, F., Álvarez, M. (2011). "Determinación de sialoproteína ósea en ligamento periodontal al inducir fuerzas ortodónticas". *Revista Odontológica mexicana*, 15(1), pp. 21-26.
- Huynh, K. y Partch, C. (2015). "Current Protocols in Protein Science: Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay". *Current Protocols in Protein Science*, 28(9) pp. 1–28.
- Ivanovski, S., Komaki, M., Bartold, P., Narayanan, A. (1999). "Periodontal-derived cells attach to cementum attachment protein via $\alpha 5\beta 1$ integrin". *J Period Res*, 34, pp. 154-159.

- Kagayama, M., Sasano, Y., Zhu, J., Hirata, M., Mizohuchi, I., Kamakura, S. (1998). "Epithelial rest colocalize with cementoblast forming acellular cementum but not with cementoblast forming celular cementum". *Acta Anat*, 163, pp. 1-9.
- Kazumasa, S. Motohisha, O. (2001). "Salt-dependent monomer–dimer equilibrium of bovine-lactoglobulin at pH 3". *Protein Science*, 10, pp. 2325–2335.
- Kelly, S. (2005). "How to study proteins by circular dichroism". *Biochim Biophys Acta*, 1751(2), pp. 119-39.
- Lara Alvaro. (2011). "Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*". *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(2). pp 209-223.
- Lehninger, A. (2009). "Principios de Bioquímica: Lehninger". 5° edición. España: OMEGA.
- Lian, B., Stein, G., Stein, J., van Winjen, A. (1998). "Osteocalcin gene promoter: Unloking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation". *J Cell Bio Supplements*, 30, pp. 62-72.
- Lijima, M. (2002). "Elongated Growth of octacalcium phosphate crystals in recombinant amelogenin gels under controlled ionic Flow". *SAGE Journals*,81(1), pp. 69-73.
- Lindhe, J. (2003). "Periodontología clínica e implantología odontológica". España, Médica Panamericana.
- McCulloch, C., Lekic, P., McKee, M. (2000). "Role of physical forces regulating the form and function of the periodontal ligament". *Periodontology 2000*, 24, pp. 56-72.
- Montoya, G., Arenas, J., Romo, E., Zeichner, M., Alvarez, M., Narayanan, A., Velázquez, U., Mercado, G., Arzate, H. (2014). "Human recombinant cementum attachment protein (hrPTPLa/CAP) promotes hydroxyapatite crystal formation in vitro and bone healing in vivo". *Bone*, pp. 154–164.
- Nakae, H., Narayanan, A., Raines, E., Page, R. (1991). "Isolation and partial characterization of mitogenic factors from cementum". *Biochemistry*, 20, pp. 7047-7052.
- Nanci, A., Bosshardt, D. (2006). "Structure of periodontal tissue in health and disease". *Periodontology 2000*, 40, pp. 11-28.
- Nanci, A. (2007). "Ten Cate's oral histology: Development, structure, and function". E.U.A, Mosby.

- Page, R., Engel, D., Narayanan, A., Clagett, J. (1978). "Chronic inflammatory gingival and periodontal disease". *JAMA*, 240, pp. 545-550.
- Patiño, E. (2014). "Cristalización y predicción de la estructura tridimensional de la proteína homóloga del receptor activado para la quinasa c (lack) de leishmania". *Química orgánica y bioquímica*, 43(3), pp. 17-23.
- PDF#860740
- Pitaru, S., McCulloch, C., Narayanan, S. (1994). "Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing". *J Periodontal Res*, 29, pp. 81-94.
- Pitaru, S., Narayanan, S., Olson, S., Savion, N., Hekmati, H., Alt, I., Metzger, Z. (1995). "Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces". *J Periodont Res*, 30, pp. 360-368.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. (2009). "Detergent binding anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins". *PNAS*, 106 (6), pp. 1760-1765.
- Rhodes, G. "Crystallography Made. Crystal Clear: A guide for users of macromolecular models". Second edition. USA. Elsevier Science.
- Roach, H. (1994). "Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption". *Cell Biol Int*, 18, 617-628.
- Romo, E., Arzate, H., Montoya, G., Rodriguez, Adela. (2016). "High-level expression and characterization of a glycosylated human cementum Protein 1 with lectin activity". *FEBS Lett.*, 590(1), pp. 129-138.
- Saito, M., Iwase, M., Maslan, S., Nozaki, N., Yamauchi, M., Handa, K., Takahashi, O., Sato, S., Kawase, T., Teranaka, T., Narayanan, A. (2001). "Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogénesis". *Bone*, 29(3), pp. 242-8.
- Salgado Chavarría, F. (2017) *Desarrollo de la fase preclínica de fármacos peptídicos derivados de la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento radicular (HACD1/CAP) y su potencial eficacia en el tratamiento de la osteoporosis*. Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México
- Saygin, N., Giannobile, W., Somerman, M. (2000). "Molecular and cell biology of cementum". *Periodontology 2000*, 24, pp. 73-98.

- Schroeder, H., Listgarten, M. (1997). "The gingival tissues: the architecture of periodontal protection". *Periodontology 2000*, 13, pp. 91-120.
- Silverman, L. (2004). "Diffusion systems for evaluation of biomineralization". *Calc Tiss Int*, 75, pp. 494-501.
- Singh, R. (1995). "Reagents for rapid reduction of Disulfide bonds in proteins" *Academic Press*.
- Sreerama, N., Venyaminov, S., Woody, R. (1999). "Estimation of number of a helical and b strand segments in proteins using CD spectra". *Protein Science*, 8(2), pp. 370-380.
- Streeter, V., Wyle, E., Bedford, K. (2000). "Mecánica de los fluidos". México: McGraw-Hill Interamericana.
- Tiselius, A. (1956). "Protein chromatography on calcium phosphate columns". *Arch Biochem Biophys*, 65, pp. 132-155.
- Valdés De Hoyos, A., Hoz-Rodríguez, L., Arzate, H., Narayanan, A. (2012). "Isolation of Protein-Tyrosine Phosphatase-like Member-a Variant from Cementum". *Journal of Dental Research*, 91(2), 203–209.
- Venyaminov, S. y Yang, J. (1996). "Determination of protein secondary structure In Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules". EUA.: Fasman, pp. 69–107.
- Villarreal, E., Moreno, A., Mas, J., Chávez, J., Narayanan, A., Gil, I., Arzate, H. (2009) "Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): Primary role in biomineralization". *BBRC*, 384, pp. 49-54.
- Whyte, M., Peck, W. (1989). "Alkaline phosphatase: physiological role explored in hypophosphatais". *Bone and mineral research*, 6 pp. 175-218.
- Wu, D., Ikezawa K., Parker, T., Saito, M., Narayanan, A. (1996). "Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein". *J Bone Miner Res*, 11(5), pp. 686-692.
- Zhang. (2008). "I-TASSER server for protein 3D structure prediction". *BMC Bioinformatics*, 9, pp. 40.
- Zimmer, C., Birch-Hirschfeld, E., y Weiss, R. (1974). "CD studies on the conformation of some deoxyoligonucleotides containing adenine and thymine residues", *Nucleic Acids Research*, 1(8), pp. 1017–1030.

Apéndice 1

Número de Reactivo	pH	Condición (Reactivo)	Titulante
1	2.2	1.0 M Ácido Cítrico	NaOH
2	2.4	1.0 M Ácido Cítrico	NaOH
3	2.6	1.0 M Ácido Cítrico	NaOH
4	2.8	1.0 M Ácido Cítrico	NaOH
5	3.0	1.0 M Ácido Cítrico	NaOH
6	3.2	1.0 M Ácido Cítrico	NaOH
7	3.4	1.0 M Ácido Cítrico	NaOH
8	3.6	1.0 M Ácido Cítrico	NaOH
9	3.8	1.0 M Ácido Cítrico	NaOH
10	4.0	1.0 M Acetato de Sodio Trihidratado	HCl
11	4.2	1.0 M Acetato de Sodio Trihidratado	HCl
12	4.4	1.0 M Acetato de Sodio Trihidratado	HCl
13	4.6	1.0 M Acetato de Sodio Trihidratado	HCl
14	4.8	1.0 M Acetato de Sodio Trihidratado	HCl
15	5.0	1.0 M Citrato de sodio tribásico dihidratado	HCl
16	5.2	1.0 M Citrato de sodio tribásico dihidratado	HCl
17	5.4	1.0 M Citrato de sodio tribásico dihidratado	HCl
18	5.6	1.0 M Citrato de sodio tribásico dihidratado	HCl
19	5.8	1.0 M Citrato de sodio tribásico dihidratado	HCl
20	6.0	1.0 M Cacodilato de sodio trihidratado	HCl
21	6.2	1.0 M Cacodilato de sodio trihidratado	HCl
22	6.4	1.0 M Cacodilato de sodio trihidratado	HCl
23	6.6	1.0 M Cacodilato de sodio trihidratado	HCl
24	6.8	1.0 M Cacodilato de sodio trihidratado	HCl

25	7.0	1.0 M HEPES de sodio	HCl
26	7.2	1.0 M HEPES de sodio	HCl
27	7.4	1.0 M HEPES de sodio	HCl
28	7.6	1.0 M HEPES de sodio	HCl
29	7.8	1.0 M HEPES de sodio	HCl
30	8.0	1.0 M TRIS HCl	NaOH
31	8.2	1.0 M TRIS HCl	NaOH
32	8.4	1.0 M TRIS HCl	NaOH
33	8.6	1.0 M TRIS HCl	NaOH
34	8.8	1.0 M TRIS HCl	NaOH
35	9.0	0.5 M CAPSO	NaOH
36	9.2	0.5 M CAPSO	NaOH
37	9.4	0.5 M CAPSO	NaOH
38	9.6	0.5 M CAPSO	NaOH
39	9.8	0.5 M CAPSO	NaOH
40	10	0.5 M CAPS	NaOH
41	10.2	0.5 M CAPS	NaOH
42	10.4	0.5 M CAPS	NaOH
43	10.6	0.5 M CAPS	NaOH
44	10.8	0.5 M CAPS	NaOH
45	11.0	0.5 M CAPS	NaOH