

51421  
10



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

**Aislamiento del ADN de proteínas no colágenas del cemento dental humano.**

**Biología Celular y Molecular en el Área Odontológica**

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
CIRUJANO DENTISTA  
P R E S E N T A :  
SEBASTIÁN GALLEGOS MAGOS



DIRECTOR: DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ  
ASESOR: Q.B.P. Ma. AMELINA DEL CARMEN AMIL ESTRADA

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE DEL 2003

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recensional.

NOMBRE: SEBASTIÁN GALLEGOS GALGOS

FECHA: 12/10 OCTUBRE 2003

FIRMA: [Firma manuscrita]

Dedico este trabajo a la Memoria de mi Padre.  
Oscar Gallegos Gamas  
1942 - 2003

Gracias Papá

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2

A la mujer que limpio mis lagrimas  
y me ha ayudado a superar mis obstáculos,  
simplemente me dio la vida...  
a ti Madre.  
Gracias por todo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

A ti Dios.

Por haberme puesto en este camino de rosas llamado vida,  
Con sus pétalos que son las personas que me rodean  
y que he encontrado en el camino,  
así como de espinas que son todos los obstáculos  
que debo de superar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La vida es mi sendero,  
Mis sueños mis zapatos,  
Y mis ganas de seguir, es el andar.  
Hay seres que pisan mis zapatos  
Y que interrumpen mi andar  
Y aun así sigo en mi sendero  
Entre piedras y barrancos,  
Con mis zapatos muy gastados,  
Caminando, soñando  
Sin querer despertar.

Sebastián.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

5

# ÍNDICE

CONTENIDO	Pág.
INTRODUCCIÓN .....	3
JUSTIFICACIÓN .....	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	6
MARCO TEÓRICO .....	7
ÁCIDOS NUCLEICOS .....	7
DNA .....	8
RNA .....	8
PROTEÍNAS .....	9
ENZIMAS .....	10
CEMENTO .....	11
ESTRUCTURA .....	11
PROPIEDADES QUÍMICAS .....	11
CEMENTOBLASTOS .....	12
SIALOPROTEINA ÓSEA (BSP) .....	12
OSTEOPONTINA (OPN) .....	13
FOSFATASA ALCALINA (ALP) .....	13
CLONACIÓN .....	14
OBJETIVOS .....	15
GENERAL .....	15
ESPECÍFICOS .....	15
HIPÓTESIS .....	16
METODOLOGÍA .....	17
TIPO DE ESTUDIO .....	17
UNIVERSO DE ESTUDIO .....	17
VARIABLES .....	17
OPERACIONALIZACIÓN .....	18
TECNICA .....	20
<i>Cultivo celular</i> .....	20
<i>Aislamiento de RNA</i> .....	20
<i>Reacción de Transcriptasa Reversa (RT-PCR)</i> .....	20
<i>Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR)</i> .....	21
<i>Purificación de cDNA del Gel de Agarosa</i> .....	23
<i>Clonación de los cDNAs</i> .....	24
<i>Análisis y Secuenciación de DNA</i> .....	24
RECURSOS .....	25
<i>Recursos Humanos</i> .....	25
<i>Recursos Físicos</i> .....	25
<i>Recursos Materiales</i> .....	26

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<b>CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES</b> .....	<b>28</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
<b>CULTIVO CELULAR</b> .....	<b>29</b>
<b>RNA</b> .....	<b>29</b>
<b>CDNA</b> .....	<b>30</b>
<b>VECTOR</b> .....	<b>31</b>
<b>SECUENCIAS</b> .....	<b>33</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>37</b>
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>38</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	<b>39</b>



## Introducción

Desde finales de los 70's nuevas técnicas han revolucionado el estudio del DNA y de los genes que contiene. El DNA de cualquier organismo puede ser cortado en trozos reproducibles mediante unas endonucleasas específicas del sitio llamadas enzimas de restricción, los trozos pueden unirse entonces a vectores bacterianos y ser introducidos en las bacterias huéspedes. De esta manera, casi cualquier segmento de DNA de cualquier organismo puede ser aislado y producido en cualquier cantidad simplemente cultivando bacterias. Estos procedimientos se denominan colectivamente como clonaje genético o tecnología de DNA recombinante.

Por ende, en esta investigación se utilizan técnicas empleadas para el estudio del DNA recombinante que contribuyen al conocimiento sobre el papel que juegan a nivel molecular las proteínas: Sialoproteína Ósea del inglés Bone Sialoprotein (BSP), Osteopontina del inglés Osteopontin (OPN), y Fosfatasa Alcalina del inglés Alkaline Phosphatase (ALP), en la expresión del fenotipo cementoblástico y sobre el origen del cemento radicular.

Se sabe que el cemento es una forma altamente especializada de tejido conectivo calcificado que cubre la superficie radicular del diente. El cemento es considerado como el tejido más blando con respecto al esmalte y la dentina, es avascular, no presenta inervación y no sufre remodelación fisiológica. Los estudios bioquímicos han demostrado que tiene una composición similar al hueso pero con pequeñas variaciones: el contenido orgánico del cemento está constituido principalmente por proteínas de colágena de los tipos I y tipo III, proteínas no colágenas como la OPN, BSP, ALP, entre otras glicoproteínas y proteoglicanos<sup>1,2</sup>. Por otro lado, es el tejido menos estudiado del organismo humano y a sus células progenitoras (cementoblastos) no se les ha logrado determinar su origen, lo que ello ha contribuido al desconocimiento de cómo se lleva a cabo el proceso de selección y diferenciación de los cementoblastos y la deposición del mineral.

En esta investigación se aisló el mRNA de las células cementoblásticas de 15 días de cultivo por extracción fenol-cloroformo en completa esterilización para evitar la degradación del RNA. Posteriormente se generó la doble cadena complementaria del ácido dextrorribonucleico (cDNA) por medio de la técnica de la transcriptasa reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Este cDNA se amplificó por la reacción de cadena de la polimerasa (PCR). Por último se clonaron los diferentes cDNAs en un plásmido (PCRII-TOPO) que funciona como vector para poder expresarlo en bacterias y lograr una mayor producción de dichos cDNAs de cada molécula, y se secuenció para analizarlos en bancos de datos de material genético para comprobar que la secuencia pertenece a dichas moléculas OPN, BSP y AP. Estos resultados nos permiten plantear estrategias a

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

futuro para estudiar el patrón de expresión génica de estas proteínas cuando se lleve a cabo la inducción de la cementogénesis *in vitro*, dado que las anteriores proteínas, están involucradas en la nucleación de los cristales de hidroxapatita en las células osteoblásticas, lo cual hace pensar que los cementoblastos podrían comportarse de manera similar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Justificación

El cemento radicular es el tejido mineralizado menos estudiado del organismo humano y a sus células progenitoras (cementoblastos) no se les ha logrado determinar su origen, lo que ha contribuido al desconocimiento de cómo se lleva a cabo el proceso de selección y diferenciación de los cementoblastos y la deposición del mineral. Por tal motivo, se desconocen los mecanismos moleculares que regulan la homeostasis de expresión de las moléculas que intervienen en el proceso de mineralización durante la cementogénesis, así como las vías metabólicas que controlan estos mecanismos. Por tal motivo la secuenciación de proteínas no colágenas da pauta para empezar a contribuir en este campo.<sup>3</sup>

El aislamiento del DNA de proteínas no colágenas del cemento nos ayudará en un futuro a realizar estrategias terapéuticas en donde esté implicada la salud del cemento radicular, así como saber más acerca del origen de este tejido y poder aportar conocimiento y métodos innovadores en el estudio de la cementogénesis.

## **Planteamiento del Problema**

¿En el proceso de mineralización del cemento dental humano, el aislamiento del cDNA de proteínas no colágenas, ayudará a conocer más sobre la cementogénesis?

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Marco Teórico

La era moderna de la biología molecular y celular empezó en 1953 cuando dedujeron la estructura de doble hélice del DNA incluyendo su composición: las cuatro bases de ácidos nucleicos timina, citosina, adenina y guanina.

El desarrollo de la biología molecular y celular también se basó en tres avances significativos (1) la prueba de que el RNA mensajero ( mRNA) lleva la información del DNA a la maquinaria sintetizadora de proteínas; (2) el descubrimiento del código genético, mediante el cual la información se almacena en los ácidos nucleicos; y (3) el descubrimiento de que las proteínas son traducidas por el RNA de transferencia (tRNA) y los ribosomas.

A finales de 1970, el clonaje genético o tecnología del DNA recombinante revolucionó el estudio del DNA. Dado que cualquier material genético podría ser cortado en trozos reproducibles por medio de unas endonucleasas específicas llamadas enzimas de restricción. Los trozos de DNA entonces pueden ser unidos a vectores bacterianos (Virus de DNA o plásmidos capaces del crecimiento independiente) y ser introducidos en bacterias huéspedes. De esta manera, todo segmento de DNA de cualquier organismo puede ser aislado y producido en grandes cantidades simplemente cultivando bacterias.<sup>4</sup>

## Ácidos Nucleicos

Las células reciben las instrucciones sobre qué proteínas deben sintetizar de los ácidos nucleicos –las moléculas que almacenan y transmiten la información en las células-. En las células existen dos moléculas portadoras de la información: el ácido desoxirribonucleico (DNA) y el ácido ribonucleico (RNA).

La estructura interna del DNA y el RNA consiste cada uno en una combinación de sólo cuatro monómeros, llamados nucleótidos. Un nucleótido tiene tres partes: un grupo fosfato, una pentosa y una base orgánica. En el RNA, la pentosa siempre es una ribosa y en el DNA es una desoxirribosa. La diferencia entre los monómeros de DNA y RNA se encuentra en una de las bases el "uracilo" que se encuentra sólo en el RNA. Las bases adenina, guanina y citosina se encuentran tanto en DNA y RNA y la timina sólo en el DNA.

Las cadenas de los ácidos nucleicos tienen una orientación química: el extremo 3' tiene un grupo hidroxilo libre unido al carbono 3' del azúcar; el extremo 5' tiene un hidroxilo libre o un fosfato unido al carbono 5' del azúcar. Esta direccionalidad ha dado lugar al convenio por el cual las secuencias polinucleotídicas se escriben y se leen en la dirección 5' - 3' (de izquierda a

derecha); la orientación de una cadena de ácido nucleico es una propiedad extremadamente importante para la formación celular.<sup>4</sup>

## DNA

Las dobles hélices del DNA son dos cadenas entrelazadas de azúcares-fosfatos; y los pares de bases están apilados entre las cadenas. La orientación de las dos cadenas es antiparalela conservando el sentido 5' - 3'. Además de estar unidas por enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Las bases de las cadenas opuestas se aparean según un registro preciso: A con T, mediante dos enlaces de hidrógeno; G con C, mediante tres enlaces de hidrógeno.<sup>4</sup>

## RNA

El RNA es bastante similar al DNA en cuanto a su composición química: el azúcar que forma parte del RNA tiene un grupo hidroxilo más, y la timina del DNA es reemplazada por el uracilo en el RNA. Estas diferencias son relativamente menores, por lo que el RNA puede tomar las mismas conformaciones que el DNA; puede ser cadena doble o sencilla, lineal o circular. También puede formar una hélice híbrida, con una cadena de RNA y otra de DNA.

El DNA almacena la información genética en una forma de doble cadena monótona. El RNA es más versátil, con muchas funciones y estructuras. La mayoría del RNA es de cadena sencilla. Las moléculas pequeñas de RNA, tales como las del RNA de transferencia (tRNA), adoptan en solución una arquitectura tridimensional definida. Las conformaciones del RNA guardan cierta analogía con la estructura de las proteínas. La estructura de un RNA se determina principalmente por el apareamiento local de bases que sigue las mismas reglas que en el DNA; en las células, la mayor parte del RNA está unido a proteínas en grandes complejos de estructura específica.

La analogía con la estructura de las proteínas va más allá: el RNA puede actuar catalíticamente, tomando las propiedades de una enzima. El RNA puede haber servido al mismo tiempo como reservorio genético así y como las primeras enzimas en el caldo.

El DNA dirige la síntesis del RNA, y el RNA a su vez, dirige la síntesis de proteínas; y unas proteínas esenciales catalizan la síntesis tanto del RNA como del DNA. El flujo de información de DNA a RNA, y de RNA a proteínas ocurre en todas las células y ha sido llamado el **"dogma central"** de la biología molecular.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las proteínas son los componentes activos, es decir, los que realizan el trabajo en el interior de la maquinaria celular. Mientras el DNA almacena la información para la síntesis de proteínas, y el RNA es el que lleva a cabo las instrucciones codificadas en el DNA, por lo tanto, la mayor parte de las actividades biológicas son realizadas por las proteínas. Dado que el orden lineal de los aminoácidos en cada proteína determina su función, el mecanismo que mantiene este orden durante la síntesis de proteínas es crítico.

Tres clases de RNA juegan papeles diferentes pero cooperativos. El RNA mensajero (mRNA) codifica la información genética copiada del DNA en forma de una secuencia de bases nucleotídicas que especifica una secuencia de aminoácidos. El RNA de transferencia (tRNA) es la clave para el código: los aminoácidos especificados por la secuencia de bases de una molécula de mRNA son traídos y depositados en el extremo creciente de una cadena polipeptídica por moléculas específicas de tRNA. Por último, el RNA ribosómico (rRNA) se combina con un grupo de proteínas para formar los ribosomas, que tienen sitios de unión para todas las moléculas necesarias para la síntesis de proteínas (mRNA, tRNA y factores proteicos.). Los ribosomas que llevan tRNAs y proteínas especiales, pueden moverse físicamente a lo largo de la cadena de mRNA para traducir su información genética codificada. La traducción se refiere a todo el proceso mediante el cual la secuencia de bases del mRNA se usa para ordenar y unir aminoácidos en una proteína. Estos tres tipos de RNA participan en esta vía esencial de síntesis de proteínas en todas las células; el desarrollo de las tres funciones diferentes del RNA fue probablemente la clave molecular para el origen de la vida.<sup>5</sup>

## Proteínas

Las proteínas son moléculas que realizan el trabajo en las células. Catalizan un rango extraordinario de reacciones químicas, proporcionando rigidez estructural, controlan la permeabilidad de las membranas, regulan las concentraciones de los metabolitos, reconocen y se unen no covalentemente a otras biomoléculas, producen movimientos y controlan la función de los genes. Estas tareas, se llevan a cabo por moléculas sintetizadas a partir de sólo 20 aminoácidos diferentes.

Los monómeros que constituyen las proteínas se llaman aminoácidos porque, con una excepción, cada uno contiene un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) y un grupo carboxilo ácido (-COOH). La excepción, la prolina, tiene un grupo imino (-NH-) en vez de un grupo amino. Todos los aminoácidos están contruidos de acuerdo a un diseño básico: un átomo de carbono central llamado carbono  $\alpha$  (C <sub>$\alpha$</sub> ) porque es el adyacente al grupo carboxilo, a un átomo de hidrógeno y a un grupo variable, llamado cadena lateral o grupo R.

El enlace peptídico, es un enlace químico que conecta dos aminoácidos en un polímero, se forma entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo carboxilo de otro. Esta reacción, llamada condensación, libera una molécula de agua al unirse dos aminoácidos.

Una proteína no es una simple cadena de aminoácidos, esta cadena debe plegarse para formar una estructura tridimensional específica que puede ser una varilla extendida, como en las proteínas fibrosas que dan rigidez a los tejidos, o una esfera compacta llamada proteína globular, como en muchas proteínas que catalizan reacciones químicas (enzimas), o una combinación de esferas y varillas, como la globulina o la sialoproteína ósea.<sup>5</sup>

## Enzimas

Las proteínas catalizadoras de reacciones químicas en un periodo corto de tiempo son llamadas enzimas, encargadas de mediar los eventos dinámicos de la vida; prácticamente todas las reacciones químicas en la célula están catalizadas por una enzima debido a que aumentan la velocidad de las reacciones que ya son energéticamente favorables directa e inversamente en igual grado.

El nombre de la enzima generalmente indica su función, y el sufijo *-asa-* se agrega al final del nombre de la molécula sobre la que actúa la enzima como por ejemplo la DNAsa que es la encargada de degradar al ADN, la peptidasas que son las encargadas de degradar proteínas inespecíficamente.

La mayoría de las enzimas se encuentran dentro de las células, pero cierto número de ellas son secretadas por las células y funcionan en la sangre, el tracto digestivo u otros espacios extracelulares para llevar a cabo la síntesis de proteínas, de ácidos nucleicos y de fosfolípidos, la conversión de glucosa y oxígeno a dióxido de carbono y agua, lo que produce mayor parte de la energía química que se usa en las células de un organismo.

Dos propiedades sorprendentes que caracterizan a todas las enzimas son: su enorme poder catalítico y su especificidad. La especificidad de una enzima se determina por las diferentes velocidades con que catalizan las reacciones químicas muy relacionadas o por su capacidad de distinguir entre sustratos muy similares. Las moléculas de enzima presentan dos regiones importantes o sitios catalíticos: uno que reconoce y se une al (los) sustrato(s), y otro que cataliza la reacción una vez que el (los) sustrato(s) se hayan unido, pero en algunas enzimas el sitio catalítico es parte del sitio de unión del sustrato, es decir solo presentan un dominio funcional<sup>5</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **Cemento**

El cemento es un tejido mineralizado que se cree su origen mesodermal. Este presenta muchas funciones entre la principal permitir la inserción de las fibras de colágena del ligamento periodontal. El cemento empieza en la porción cervical del diente en la unión cementoamantina y continúa hasta el ápice.<sup>5</sup> Además el cemento es un tejido conectivo especializado que comparte algunas características físicas, químicas y estructurales con el hueso, pero a diferencia del hueso el cemento humano es avascular, carece de inervación, de drenaje linfático, y no presenta remodelado fisiológico como la resorción y aposición.

## **Estructura**

Con el microscopio óptico pueden diferenciarse dos tipos de cemento: acelular y celular. El cemento acelular puede cubrir la dentina radicular desde la unión cementoamantina hasta el ápice, pero a menudo falta el tercio apical de la raíz. Aquí el cemento puede ser en su totalidad de tipo celular. Las células incorporadas al cemento celular, cementocitos, son parecidos a los osteocitos. Se encuentran en espacios denominados lagunas. Un cementocito típico posee numerosas prolongaciones celulares o canaliculos que se irradian a partir de su cuerpo celular. Estas prolongaciones pueden ramificarse y con frecuencia establecen anastomosis con las de una célula vecina.<sup>7</sup>

## **Propiedades Químicas**

El cemento contiene aproximadamente 45 a 50% de sustancias inorgánicas, 50 a 55% de material orgánico y agua. La porción inorgánica consiste principalmente de calcio y fosfato en forma de cristales de hidroxiapatita. La porción orgánica del cemento esta constituida fundamentalmente por colágena de tipo I y tipo III, polisacáridos proteicos como proteoglicanos y proteínas no colagenas como la BSP, OPN, ALP, entre otros.<sup>8</sup>

## **Cementoblastos**

Los Cementoblastos son la unidad estructural del cemento, éstos sintetizan colágena y polisacáridos proteicos que constituyen la matriz mineralizada del cemento radicular. Los Cementoblastos presentan numerosas mitocondrias, un aparato de Golgi bien desarrollado y grandes cantidades de retículo endoplásmico granular.

La matriz secretada por los cementoblastos que aun no calcifica se conoce como fase cementoide. En condiciones normales el crecimiento de la matriz mineralizada del cemento es un proceso rítmico que se puede observar a manera de líneas incrementales de crecimiento, y a medida que se forma una nueva capa cementoide la más antigua calcifica.

Este tejido cementoide se encuentra tapizado por Cementoblastos, fibras de tejido conectivo del ligamento periodontal que se insertan entre los Cementoblastos hacia la fase mineral del cemento. Estas fibras que incluidas en el cemento al mineralizar sirven para unir el diente al hueso que lo rodea recibiendo el nombre de fibras de Sharpey.<sup>8</sup>

Los Cementoblastos son activos biológicamente ya que producen proteínas y polisacáridos, entre las que se encuentran: proteína Colágena I (ColI), Osteopontina (OPN), Fosfatasa Alcalina (ALP), Osteocalcina (Ostc), Sialoproteína Ósea (BSP), entre otros.<sup>9,10,11,12,13</sup>

## **Sialoproteína Ósea (BSP)**

La Sialoproteína Ósea esta compuesta de 327 aminoácidos, tiene un peso molecular de 33-34 kDa y en su secuencia presenta una región Arg-Gly-Asp (RGD) que es un dominio para promover la adhesión celular y un sitio rico en aminoácidos de ácido aspártico (poly-D) que es un dominio de unión al ión calcio y a cristales de hidroxapatita.

La sialoproteína ósea en la formación de la raíz del diente juega un papel importante ya que ha sido localizada en los primeros estadios de mineralización dado que BSP es considerado un potencial nucleador de los cristales de hidroxapatita y un marcador específico de osteoblastos y cementoblastos. Además, constituye entre un 8% a un 12% del total del contenido de proteínas no colágenas en hueso y cemento.

A la fecha BSP ha sido purificada de hueso de humano, vaca, rata, conejo y cerdo, así como la primera secuencia (cDNA) de BSP fue obtenida de rata en 1988 y después de humano en 1990<sup>14,15</sup>.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **Osteopontina (OPN)**

La osteopontina es una fosfoproteína glucosilada y sulfatada, con un peso molecular de 41kd, presente en hueso y en las líneas de crecimiento del cemento.

Osteopontina tiene características estructurales únicas, sus terminales amino y carboxilo contienen ocho hélices  $\alpha$  que constituyen el 41% de 301 aminoácidos. En medio de la molécula contiene una región muy ácida (ácido glutámico), con una típica secuencia de adhesión celular Arg-Gly-Asp (RGD) flanqueado sobre ambos lados por dos segmentos  $\beta$ .

Osteopontina es considerado un principal componente de hueso; esta molécula es encontrada en tejidos no mineralizados como riñón, células musculares, y células epiteliales atribuyéndoseles una función inhibidora del crecimiento mineral, ya que en estos tejidos esta desfosforilada lo que lo hace diferente a la OPN de hueso y cemento.

En células preosteoblasticas en temprana formación de hueso y en osteoblastos en sitios de remodelación ósea se han observado altos niveles de osteopontina. En particular OPN juega un papel de regular el crecimiento del cristal y en hueso en la resorción ósea. La síntesis de OPN es regulada por hormonas osteotrópicas tal como la vitamina D<sub>3</sub>, y esta es expresada durante la cementogenesis<sup>14, 16</sup>.

## **Fosfatasa Alcalina (ALP)**

Las fosfatasas alcalinas son un grupo de enzimas no específicas que hidrolizan muchos tipos de ésteres de monofosfato en muchas células. El sustrato natural de la ALP es actualmente desconocido. Se dan altas concentraciones de fosfatasa alcalina en osteoblastos, mucosa intestinal, células de conductos renales, hígado y placenta. Cada tejido tiene su propia isoforma de ALP para hueso y cemento predomina la isoforma conocida como fosfatasa no específica de tejido.

Esta proteína es de naturaleza glicoproteica con un peso de 160 kDa, y ha sido encontrada en osteoblastos, preosteoblastos, osteocitos, células de osteosarcoma y en menores concentraciones en otros lineajes celulares.

La mayor parte de su actividad se asocia a las áreas relacionadas con la mineralización, fundamentalmente en sitios adyacentes a hueso, cartilago calcificado y cemento, lo cual indica que existe una estrecha interrelacion entre la producción de iones fosfato en estas superficies y la formación de mineral.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La función de esta fosfatasa es mayor en el cemento celular que en el cemento acelular y existe una relación entre su actividad y la producción de este último tipo de cemento. Con la finalidad de establecer la relación entre la disposición espacial de la ALP, se ha descubierto que la distribución de la enzima en las células del ligamento priondotal es heterogénea, y que existen también diferencias en las concentraciones de los fosfatos en los distintos sitios estudiados<sup>17</sup>.

## Clonación

El término clonación se refiere en general a la producción de copias idénticas de un individuo de manera asexual. En el proceso de la clonación del ADN, se introducen fragmentos de ADN de eucarionte o procariontes a células bacterianas. Conforme las células proliferan para formar una colonia, la molécula sencilla de DNA tomada por el individuo bacteriano fundador de la colonia se replica con rapidez por las enzimas presentes en las células bacterianas, al final del crecimiento el número de copias de la secuencia ajena se ha amplificado de manera importante.

La clonación se puede utilizar como técnica para producir grandes cantidades de una secuencia particular de DNA; pero más importante es que pueden utilizarse a fin de aislar en forma pura por completo un fragmento específico de ADN entre una población de moléculas de ADN grande y heterogénea.

Para lograr lo anterior, el ADN debe encontrarse unido con el ADN de un vector que normalmente se replique en el ambiente bacteriano. Los dos vectores que se usan con frecuencia en los procedimientos de clonación son los plásmidos bacterianos y el cromosoma de bacteriófago lambda.

El ADN extraño que va a ser clonado se inserta en el plásmido para formar la molécula de ADN recombinante. Este plásmido modificado se agrega entonces al cultivo bacteriano como DNA desnudo, y un pequeño porcentaje de bacterias, introducirá estas moléculas del medio. Una vez que se incorpora el plásmido, se replica de manera autónoma dentro de la bacteria y pasa por su progenie durante la división celular. Numerosos plásmidos contienen los genes que contienen la resistencia a la tetraciclina y/o a la ampicilina. Estos son de particular importancia, debido a que permiten seleccionar las bacterias que contienen uno de estos plásmidos. Solo las bacterias que tomaron el plásmido (junto con el fragmento de ADN) son capaces de sobrevivir en un ambiente que contenga alguno de los dos antibióticos antes mencionados y por lo cual aislarse de manera individual para poder obtener el DNA de interés.<sup>18</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Objetivos

### General

Llevar a cabo el aislamiento y clonación a nivel molecular de proteínas como la osteopontina (OPN), sialoproteína ósea (BSP) y fosfatasa alcalina (ALP), para entender y conocer la regulación del complejo mecanismo de la cementogénesis.

### Específicos

- Cultivar células cementoblásticas
- Aislar el RNA total de un cultivo de células cementoblásticas.
- Complementar el RNA aislado por medio de la técnica RT-PCR para formar un DNA complementario (cDNA).
- Amplificar e identificar DNA de proteínas por medio de la técnica PCR.
- Clonar y aislar DNA de las proteínas AP, BSP y OPN.
- Secuenciar el DNA de las proteínas no colágenas.
- Comparar con el banco genético en la Red Mundial de Genes.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **Hipótesis**

Al utilizar técnicas de clonación genética o tecnología de DNA recombinante en células cementoblásticas para obtener las secuencias de proteínas importantes en el papel de mineralización (AP, OPN, BSP), podremos comparar la secuencia de las proteínas obtenidas con las ya registradas pertenecientes a hueso y aportar conocimientos sobre el origen, formación y mineralización del cemento.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Metodología

### Tipo de Estudio

Experimental, Prolectivo, Longitudinal y Comparativo.

El tipo de estudio y el diseño, se ha seleccionado con base a los objetivos propuestos y a la disponibilidad de los recursos.

### Universo de Estudio

Nuestro universo de estudio es el linaje celular del tejido mineral de cemento humano y esta dado por millones de celulas de cultivo.

### Variables

#### Dependientes

- Células Cementoblásticas:
  - RNA.
  - DNA.
- Células Bacterianas.

#### Independientes

- Factores:
  - Físicos:
    - Temperatura
    - Tiempo
  - Químicos:
    - Soluciones
    - pH
  - Biológicos:
    - Humedad
    - Contaminación
    - Degradación

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Operacionalización

**DNA.** (*Ácido Desoxirribonucleico*) Biomolécula formada por cuatro nucleótidos (A,G,C,T) que en su combinación forma una secuencia específica, para obtener el DNA de la proteína en estudio (BSP, OPN, AP) se extrae el total de RNA mensajero de la célula (cementoblasto), especificando y complementando cada proteína por medio del RT-PCR (Reacción de Transcriptasa Reversa), adicionando oligo-dT libre, esta técnica complementa la cadena sencilla de RNAm, esta se liga a la cola de poli-A libres en el RNAm, sirviendo de iniciador para la enzima de transcriptasa reversa para así complementar el DNA. Una vez obtenida se amplifica por medio de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), para así obtener una gran cantidad de DNA y así logra identificar el DNA específico por medio de su peso molecular, utilizando la electroforesis; obteniendo 10 µg de DNA por cada 1ml de muestra. Variable Cuantitativa de Intervalo ya que su unidad de medida es de 10 µg/ml. Los microgramos por mililitros de DNA se obtiene por seguir la medición por espectrofotometría de luz ultravioleta en líquido la cual existe una constante de densidad óptica con  $DO = 1$  a longitud de onda de  $260 = a$  50 µg/ml con lo cual se obtiene la concentración de nuestra muestra experimental.

**RNA m.** (*Ácido Ribonucleico Mensajero*) Polímero lineal formado por cuatro nucleótidos (A,G,C,U), utilizado para obtener la secuencia específica de las proteínas en estudio (BSP, OPN, AP), complementándolo a DNA. El RNAm se obtiene por medio del método de Chomczynski y Sacchi, desnaturalizando la célula y obteniendo el total de RNAm de la célula. Es una variable cuantitativa de intervalo y la unidad de medida es de U1 µg/ml. La cual se obtiene similar a la medida de DNA donde  $DO = 1$  a longitud de onda de  $260 = a$  40 µg/ml

**Cementoblastos.** Células del tejido dental humano, obtenidas de un cementoblastoma y cultivadas in vitro, de estas se obtienen el RNA total para obtener las proteínas del estudio. Variable Cuantitativa Intervalo y su unidad de medida es de  $2 \times 10^6$  células/pozo.

**Bacterias.** *Escherichia Coli* (*E. Coli*) Son las células competentes en la técnica de recombinación del ADN o clonación; éstas son las portadoras del material genético, y son cultivadas en un agar para su duplicación, una vez comprobada la clonación del material genético estas son cultivadas en medio LB en grandes cantidades, para obtener una gran cantidad del material genético y así poder secuenciar. Es variable cuantitativa intervalo y su unidad de medida es de  $1 \times 10^9$  cfu/µg

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### **Factores Físicos:**

**Tiempo.** Valor importante en la realización de los experimentos, ya que si se realiza alguno alterando el protocolo (refiriéndose a tiempo), el experimento se alterara y por ende se degradarían las moléculas estudiadas. Esta es una variable cuantitativa intervalo. Sera medido en horas (hrs.), minutos (min.) o segundos (seg.) dependiendo la técnica que se lleve a cabo.

**Temperatura.** Es el calor o frío que se aplica sobre los cuerpos, en técnicas como RT-PCR o PCR es de suma importancia que se encuentre a la temperatura indicada e ideal para la amplificación de las proteínas en estudio así como la temperatura de trabajo para células y bacterias. Es una variable cuantitativa de intervalo. Esta se medirá en grados Centígrados ( $^{\circ}$  C).

### **Factores Químicos:**

**Soluciones:** Son las mezclas que resulta al reunir cualquier sustancia en un líquido. Estas son utilizadas durante el proyecto, y las mezclas son variables según la sustancia con la que se mezcle, estas son utilizadas ya sea para mantener un pH ideal, para lavado o bien para separar ciertas estructuras moleculares de otras. Variable Cuantitativa de Razón. Su unidad de medida será en Litros (L), Mililitros (ml), Microlitros ( $\mu$ l), varia según la mezcla.

**pH:** Es el índice que expresa el grado de acidez o alcalinidad de una disolución. De importancia para la solución buffer utilizada durante el proyecto. Es una variable cuantitativa de razón. Su unidad de medida varía ya que entre 0 y 7 la disolución es ácida, y de 7 a 14, básica.

### **Factores Biológicos:**

**Humedad.** Es la cantidad de agua que contiene el aire ambiental, en este caso, el laboratorio o campana de cultivo celular, de este depende la esterilidad del mismo, si esta se altera puede ó no haber esterilidad o bien alteración en el crecimiento celular. Es una variable cuantitativa de razón. Y su unidad de medida es en porcentaje. 90% de humedad.

**Contaminación:** Es todo aquello que altera la pureza de un medio por agentes externos al experimento. Variable Cualitativa Nominal.

**Degradación:** Es el momento en el cual moléculas o proteínas pierden su función ya sea por contaminación o su estructura se torne en una más sencilla. Variable Cualitativa Nominal.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **TECNICA**

### **Cultivo celular.**

Las células derivadas del cementoblastoma humano (actualmente expandidas y congeladas en nuestro laboratorio), se mantendrán en medio de cultivo Dobleico minium esencial medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), una solución de antibióticos (penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y fungisona (0.3 µg/ml), 100mM de aminoácidos no esenciales y 100mM de piruvato de sodio. Para el trabajo experimental se utilizarán cultivos celulares en el 1<sup>er</sup> pasaje. Los cultivos serán mantenidos a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, con 100% de humedad.

### **Aislamiento de RNA**

El RNA fué aislado por utilizar el método de Chomczynski y Sacchi <sup>19</sup> que se basa en que las células (cementoblastos) son desnaturalizadas por la solución D que contienen: ácido de tiocinato de guanidina (4M), citrato de sodio (25 mM) pH 7, 0.5% de sarcosyl y 2-mercaptoetanol (0.1M). Inmediatamente después de adicionar la solución D a las células estas se homogenizan para garantizar la completa desnaturalización celular, se agrega 0.1 ml de acetato de sodio 2 M a pH 4 y el material genético se extrae por medio de adicionar una solución saturada de fenol-cloroformo. La suspensión final se centrifuga a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Después de la centrifugación el RNA está presente en la fase acuosa superior mientras que el DNA, proteínas y restos celulares en la fase correspondiente al fenol (inferior). La fase acuosa se precipita 1 hora a -74°C con 1 ml de siopropanol, se sedimenta el RNA por centrifugar a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C, el pellet se lava con alcohol al 75% frío se seca a vacío y se resuspende en 10 microlitros (µL) de agua estéril tratada con dietil pirocarbonato que inhibe la acción de las enzimas que degradan al RNA (RNAsa). Para asegurar que el material genético extraído de los cementoblastos no se ha degradado por el procedimiento se observó en un gel de agarosa al 1.2%.

### **Reacción de Transcriptasa Reversa (RT-PCR)**

Para formar la cadena complementaria del ácido desoxirribonucleico (cDNA) a partir del ácido ribonucleico (RNA) se utiliza la enzima transcriptasa reversa del virus murino causante de la leucemia de Moloney (MMLV-RT). La reacción se lleva de la siguiente manera: 5 µL del material genético (RNA), 3 µL

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

de cloruro de magnesio 25 mM (MgCl<sub>2</sub>), 2 µL del amortiguador de reacción RT (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3), 2 µL de los trifosfatos de desoxirribonucleósidos (dNTPs), 1 µL del oligo poly dT, 1 µL de inhibidor de RNAsa, 0.5 µL de la enzima MMLV-RT que corresponde a 20 unidades y 8 µL de agua tratada con dietil pirocarbonato. La anterior solución de reacción se somete a los siguientes ciclos de temperatura 1) 25°C por 10 minutos, 2) 42°C por 30 minutos y 3) 95°C por 50 minutos, para garantizar la formación del cDNA.

El DNA copiado a partir de mRNA es denominado DNA complementario (cDNA). El cDNA tiene la ventaja de no presentar intrones. Es relativamente fácil diferenciar el mRNA de los RNA de transferencia (tRNA) y ribosomal (rRNA), ya que el extremo 3' de los mRNA consiste de una secuencia de 50 a 250 residuos de adenina (A), conocida como cola de poli-A. Con dicha característica es posible reconocer a los mRNAs con la adición de un oligo-dT libre, que hibridiza la cola de poli-A de cada mRNA, sirviendo de iniciador para la enzima Transcriptasa Reversa (nativamente se encuentra en los retrovirus), dicha enzima sintetiza una cadena de DNA complementaria para cada molécula de mRNA presente. Obteniendo una cadena de cDNA sencilla sobre una de mRNA.<sup>20</sup> (Fig 1)

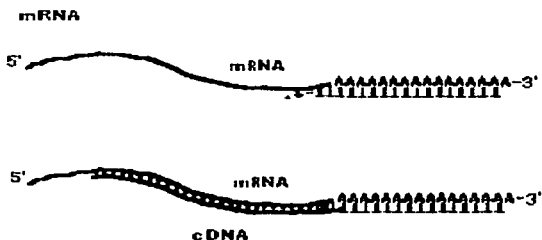


Fig. 1 Esquema representativo de la Técnica RT-PCR, se muestra la RNAm obteniendo como total el cDNA

### Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción de la PCR es una técnica en la cual se amplifica el número de copias de una región en específico del DNA o de una secuencia de cDNA previamente obtenida por la reacción de la RT, con el fin de que sea más fácil detectar su presencia. (Fig. 2)

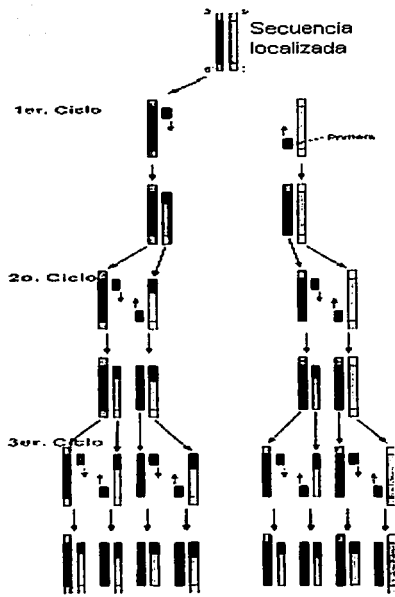


Fig. 2. Esquema representado la amplificación de un segmento de DNA

El cDNA sintetizado por la reacción de RT-PCR se utilizó para amplificar y detectar los correspondientes cDNAs de las proteínas no colágenas (BSP, OPN y ALP) al llevar a cabo la reacción de PCR. Lo anterior se logra por usar

oligonucleótidos específicos de las proteínas BSP, OPN y ALP de humano que son los iniciadores de la reacción. Para BSP el oligo superior 5'-AAAGTAAGGAAAGCGACGAGG-3' correspondiente al nucleótido en la posición 64-85; el oligo inferior 5'-CCCCTTGTAGTAGCTGTATTCG-3' correspondiente a los nucleótidos en la posición 489-510. Para OPN el oligo superior 5'-AGGAAGCCAGCCAAGGACCAACTA-3' nucleótidos 51-74 y el oligo inferior 5'-CACGCTTGGTTTCATCCAGCTGACT-3' nucleótidos 716-739. Para ALP el oligo superior es 5'-CCCCCACCTTCCCCACCCATCTG-3' nucleótidos 96-119 y oligo inferior 5'-CCCACGACTTCCAGCATCTTG-3' nucleótidos 614-637.

La reacción de amplificación para cada uno de los cDNAs es la siguiente: se adiciona a un tubo eppendorf 4  $\mu$ L del cDNA, 5  $\mu$ L de buffer de reacción, 5  $\mu$ L de los dNTPs, 3  $\mu$ L de  $MgCl_2$ , 0.5  $\mu$ L de los oligos específicos superior e inferior, 33  $\mu$ L de agua esteril y 1  $\mu$ L de la enzima Taq polimerasa. La reacción de amplificación se incuba a diferentes ciclos de temperatura: 95°C por 5 minutos (1 ciclo), 94°C 1 minuto para desnaturalizar garantizando la separación de la doble cadena de DNA, 55°C 1 minuto para alinear la cadena sencilla del DNA con los oligos, 72°C 2 minutos para extensión y todo lo anterior hasta completar 40 ciclos con lo que se garantiza amplificar varios millones de veces el cDNA.

Los productos de PCR se separan para correr las muestras en un gel de electroforesis de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio para observar el DNA amplificado de BSP que debe tener un peso molecular de 380 pares de bases, OPN de 335-450 pares de bases y ALP alrededor de 500 pares de bases.<sup>16</sup>

### Purificación de cDNA del Gel de Agarosa

Los productos de PCR se extraen del gel electroforético para su posterior purificación por medio del uso de perlas activadas de sílica. El fragmento de DNA correspondiente a cada secuencia de proteína no colágena se corta del gel, se pasa a un tubo eppendorf y se le adicionan 300  $\mu$ L de solución 1 para solubilizar el gel (acetato de sodio, perclorato de sodio y TBE), se incuba a 50 °C hasta visualizar completamente disuelto el gel de agarosa. Posteriormente se adicionan 4  $\mu$ L de perlas de sílica y se incuba a 50°C por 15 minutos homogenizando cada 3 minutos para garantizar que el DNA se una a las perlas de sílica, pasado el tiempo se centrifuga a 14,000 rpm por 2 minutos se tira el líquido y se le adiciona la solución 2 para lavar las perlas resuspendiendo por agitación, se centrifuga a 14,000 rpm y se repite el paso dos veces más, para garantizar que el DNA quede completamente limpio de agarosa. Se seca por incubar a 37°C y sé resuspende en 10  $\mu$ L de agua o TE pH 7.

### Clonación de los cDNAs

Para llevar a cabo la clonación de los cDNAs purificados se realizan los siguientes pasos: 4 $\mu$ L de cada cDNA se mezcla por separado en un vector pCRII-TOPO linearizado, se incuban a temperatura ambiente por 10 minutos. Con esto se garantiza que la enzima topoisomerasa ligue el cDNA al vector con lo cual el vector se recirculariza. Posteriormente, la reacción se adiciona a bacterias *E. coli* se mantienen las bacterias en hielo por 20 minutos y después se les somete a un choque térmico de temperatura a 42°C para garantizar que el vector con nuestro DNA unido se introduzca a la bacteria. Dicha bacteria se siembra en una caja de petri con medio LB conteniendo ampicilina, x-galactosidasa e IPTG, se incuba toda la noche a 37°C para detectar las colonias positivas. Las bacterias clonadas, es decir, aquellas que tienen el inserto de cDNA con el vector se observan en la caja de petri blancas (positivas) y aquellas que no presentan clonado nuestro vector con una coloración azul. (Fig. 3)

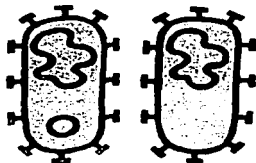


Fig. 3 Representación de bacteria clonada (con vector) y no clonada

### Análisis y Secuenciación de DNA

Las bacterias clonadas se cultivan en medio LB líquido con ampicilina (50  $\mu$ g/ml) toda la noche a 37°C para aislar el DNA por medio del procedimiento de preparación alcalina grande (big-prep) que se prepara para obtener grandes cantidades de la bacteria clonada, en donde posteriormente se extrae el DNA de la gran cantidad de bacterias que se cultivaron en el medio. Brevemente, el cultivo de bacterias de toda la noche se centrifuga, se tira el medio y al pellet bacteriano se le adicionan las siguientes soluciones: solución 1 (50 mM de glucosa, 10 mM de EDTA, 25 mM de Tris pH 8), solución 2 (0.2 M de NaOH, 1% de SDS) y solución 3 (7.5 M de acetato de amonio) entre cada adición de solución se debe solubilizar y

dejar incubando 10 minutos en hielo. Se centrifuga a 3500 rpm 15 minutos y pasar el sobrenadante a un tubo nuevo, adicionar isopropanol e incubar 10 minutos en hielo, centrifugar nuevamente y resuspender el pellet de DNA con 200  $\mu$ L de TE, adicionar RNAsa e incubar 30 minutos a 37°C, adicionar fenol-cloroformo y pasar la fase acuosa a un tubo nuevo, adicionar dicha fase a una columna de sefarosa CL4B para purificar completamente el DNA, se precipita el DNA con acetato de sodio y etanol al 100% incubando a -74° C 30 minutos y se resuspende en 40  $\mu$ L de agua.

Para comprobar que el fragmento de DNA se clonó en el vector se llevan a cabo digestiones del mismo. La reacción es la siguiente: 3 $\mu$ L de DNA, 2 $\mu$ L de buffer de digestión, 1 $\mu$ L de enzima EcoRI, 14 $\mu$ L de agua esteril, incubar a 37°C tres horas y observar en gel de agarosa al 1.2%. Una vez que se ha comprobado que el fragmento de DNA si esta clonado en el vector se manda a secuenciar, para estar seguros y compararlo en los bancos de datos genéticos.<sup>21</sup>

## **Recursos**

### **Recursos Humanos**

- Dr. Marco Alvarez Pérez  
Director
- Q.B.P. Maria Emelina del Carmen Amil Estrada  
Asesor
- Sebastian Gallegos Magos  
Participante

### **Recursos Físicos**

- Laboratorio de Biología Celular y Molecular
- Edificio de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

## Recursos Materiales

- Medios de Cultivo:
  - LB Medium Cápsulas
  - LB Agar Medium Cápsulas
- Suero Fetal Bovino
- Antibióticos:
  - Ampicilina
  - Kanamicina
  - Tetraciclina
  - Estreptomina
  - Fungisona
- Centrifuga Eppendorf
- Cajas de Petri
- Guantes de Latex, Uniseal
- Tubos Eppendorf 1.5 ml
- Tubos Corning 50 ml y de 5 ml
- Tubos Falcon 15 ml
- Kit "Concert" Nucleic Acid Purification System, Life Technologies
- Topo TA Cloning Kit, Invitrogen <http://www.invitrogene.com>
- PCR Cloning Kit, Invitrogen <http://www.invitrogene.com>
- Incubadora Universal Bio-Dynamics
- Estufa Felisa
- Shak-R-Bath, Lab Line
- Caja de Electroforesis, Life Tecnologies
- Lámpara de Rayos UV, Life Tecnologies
- Vortex
- Refrigerador :
  - -70° C
  - 4° C
  - -20° C
- Fotómetro
- Autoclave Famsa
- Horno de microondas, Samsung
- Cámara fotográfica Digital Kodak
- Kodak ID Image Analysis Software Molecular Biology
- Computadora HP
- Máquina de PCR, Programable Thermal Controller
- Cementoblastoma Humano, donado por el laboratorio de Fisiopatología
- Enzima Eco RI
- Enzima Taq Polimerasa

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



- Oligos Específicos para:
  - BSP
  - OPN
  - AP
- Oligo poly dT
- Soluciones Buffer
- Isopropanol
- Agua :
  - Bidestilada
  - Milli-Q
  - Esteril
- Agarosa
- Piruvato de Sodio
- Solución D (ácido de tiocinato de guanidina (4M), citrato de sodio (25 mM) pH 7, 0.5% de sarcosyl y 2-mercaptoetanol (0.1M).
- Acetato de Sodio
- Fenol-cloroformo
- Isopropanol
- Alcohol :
  - 100%
  - 75%
  - 10%
- Liofilizador
- RNAsa
- Enzima MMLV-RT
- Solución TE ph 7.5
- X-galactosidasa
- IPTG
- Solución 1 (50 mM de glucosa, 10 mM de EDTA, 25 mM de Tris pH 8)
- Solución 2 (0.2 M de NaOH, 1% de SDS)
- Solución 3 (7.5 M de acetato de amonio)
- Tubo de cromatografía
- Micropipetas eppendorf :
  - 1000  $\mu$ l
  - 200  $\mu$ l
  - 20  $\mu$ l
  - 2.5  $\mu$ l

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Cronograma de Actividades

Actividades Año 2002-2003	Mes	Noviembre					Diciembre					Enero				Febrero			
	Sem	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Revisión Bibliográfica		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Cultivo Celular		X	X																
Aislamiento del RNA				X	X														
Técnica RT-PCR						X	X												
Técnica PCR								X	X										
Clonación												X	X						
Secuenciación														X	X	X			
Análisis de Resultados																		X	X

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Resultados

### Cultivo Celular

El cultivo celular a partir de un cementoblastoma de humano manifiesta una morfología extendida, plana, compacta y multipolar específicamente cuando se encuentra en confluencia (Fig. 4). Estas células han sido caracterizadas en el laboratorio manifestando el poder de formar mineral *in vitro* y la producción del único marcador específico a la fecha la proteína de adhesión de cemento, lo cual garantiza que las células utilizadas para este estudio expresen en su totalidad un fenotipo cementoblástico.

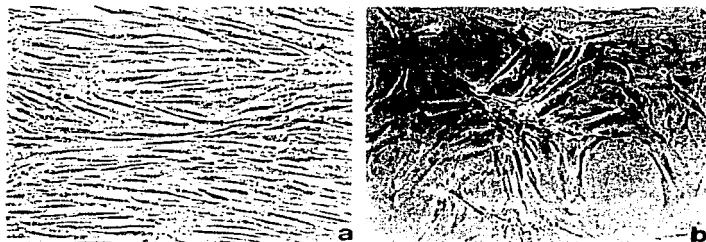


Fig.4 Morfología de cementoblastos en cultivo

### RNA

El aislamiento del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) que lleva codificada toda la información para producir las proteínas se observó en un gel de agarosa al 1.2% para detectar que no estuviera degradado debido a que en el ambiente existen cantidades grandes de enzimas RNAsas que degradan a la molécula y con lo cual no se podría proceder a formar la cadena de ácido deoxiribonucleico complementario (cDNA) de las proteínas no colágenas pertenecientes a las células de cementoblastos (Fig. 5). El RNA fue aislado de las células cementoblásticas derivadas del tumor de cemento, cuantificado por espectrofotometría de luz ultravioleta y su integridad detectada por medio de geles de electroforesis de agarosa.

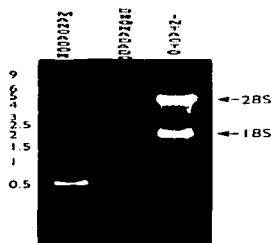


Fig.5 Gel de agarrosa en donde se muestra el RNA degradado y un RNA intacto.

## cDNA

El cDNA formado a partir del RNA se empleó para amplificar las secuencias correspondientes a cada proteína no colagena perteneciente a la información genética de las células que forman el tejido mineral de cemento. Los productos de la reacción de PCR se separan para correr las muestras en un gel de electroforesis de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio para observar el DNA amplificado de BSP que debe tener un peso molecular de 380 pares de bases, OPN de 335 a 450 pares de bases y ALP alrededor de 500 pares de bases (Fig. 6).

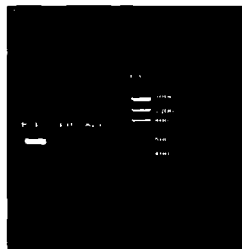


Fig.6 Amplificación de cDNAs a partir del RNA por medio de la reacción PCR.

## Vector

Los cDNAs correspondientes a las bandas observadas en la figura 6 fueron purificados del gel, una vez que la secuencia de ADN se tenía en forma pura se insertó en el vector pCRII-TOPO que es resistente a la ampicilina y que depende de  $\beta$ -galactosidasa para poder ser expresada por la técnica de clonación en bacterias *E. coli* (Figura 7).

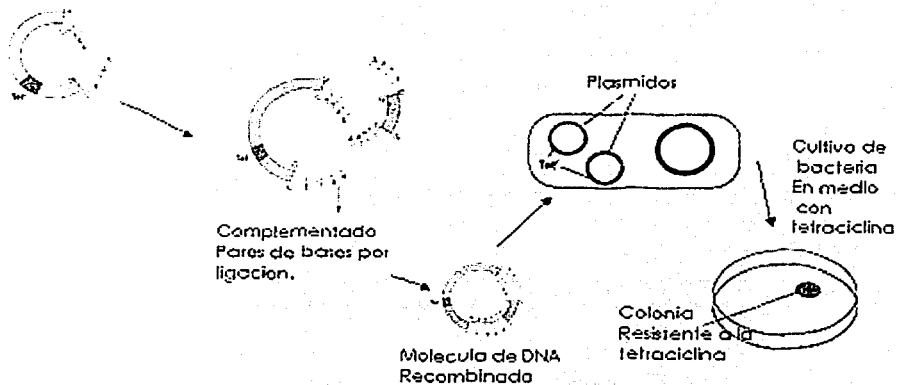


Fig. 7 Esquema que muestra el método de la clonación del cDNA

Las bacterias que presentan nuestro vector clonado se observan en la caja de petri con una coloracion blanca dado que no se recupera la secuencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa y aquellas bacterias que no presentan clonados nuestros vectores se muestran en una coloracion azul (Fig.8)

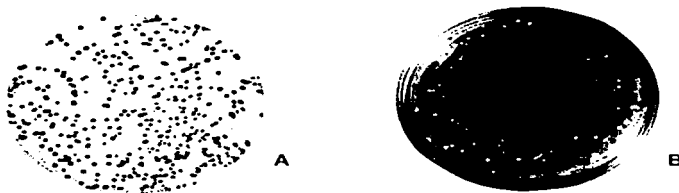


Fig. 8 La placa A control de bacterias E. Coll que no presentan insercion de material genetico y la placa B muestra la bacteria manipulada en donde se ven las colonias blancas y azules.

A partir de las colonias bacterianas positivas (blancas), que son las bacterias que presentan nuestro inserto de cDNA correspondiente a cada una de las secuencias de proteínas, se procede a crecerlas en medio líquido para purificar grandes cantidades del DNA para realizar digestiones utilizando la endonucleasa Eco-RI que ayudará a separar el fragmento de DNA del vector y comprobar la presencia de la secuencia correspondiente a BSP, OPN y ALP en nuestra preparación. En la Figura 9 se puede observar al vector en la parte superior y en la parte media del gel nuestro fragmento liberado por la enzima EcoRI que corresponden bien con los pesos moleculares mencionadas anteriormente.



Fig. 9 Gel de electroforesis, mostrando digestión de proteínas, arriba vector y abajo proteína

## **Secuencias**

Para tener la seguridad de tener la secuencia de DNA de cada proteína se llevaron a cabo reacciones de secuenciación. Para así acceder la secuencia a los datos genéticos de la red mundial de genes y confirmar el nombre de la proteína. Además de llevar una búsqueda manual del oligo específico superior e inferior para garantizar que se obtuvo la secuencia específica a partir de células derivadas de un cementoblastoma de humano.







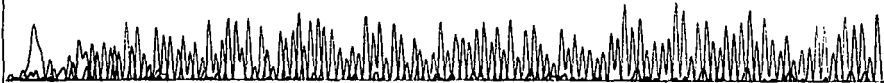
Model 310  
Version 3.4  
ABI-CE1  
Version 3.2

BSP3/Forward.F13  
Higinio Arzate  
2802  
Lane 4

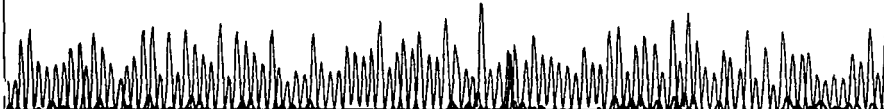
Signal G:516 A:302 T:216 C:117  
DT POP6(BD Set-Any Primer)  
BD matrix  
Points 1017 to 10200 Pk 1 Loc: 1017

Page 1  
juev., 24 mayo 2001 1:00  
miér., 23 mayo 2001 10:10  
Spacing: 12.05(12)

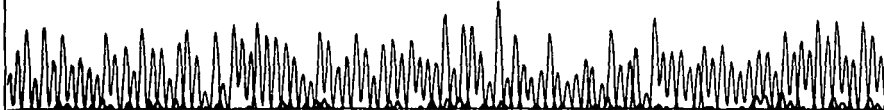
TGNTTGTAAACCACTGCATAGAGGCAGATGGCCCTCAGATGCACTCCAGCGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAAATCGCCCTTGTCCCTCCGCACCTGCCTCAGCTCTCAAGAC  
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120



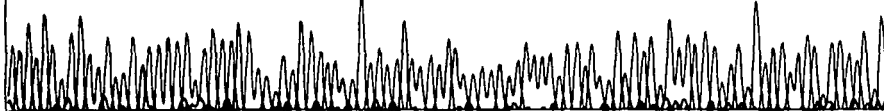
ACTTGGACCATGTCACTGCTCTGGCTCTGGCAGGTGTCCTCCCTCACACCCAGAGTGTGAGAAATCCCTGGGGAGAGGGTGCATCTCTGATAGTGGAGC  
140 150 160 170 180 190 200 210 220 230



CCTCTGGCAGGGAGCGGTGCAGAGAAACCTGCAGGGTCTTCTGGAAAAGGAAGAGCAAACAAGTCAAGGTCAGAAATTCGAAATTTGGTGGAACTGCTGGC  
240 250 260 270 280 290 300 310 320 330



GACACA GGATGTGATCACCTGGGATGCTTTCAGCTGCAAGATGTGCAATCAAATTCGAAAAGCTCAAGCATGAGGGCTGTGAGATCTCCTAGGATGAGA  
340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440



GTGGAAA GTGTGCCAAGGGCGAATTCACGCAAC TGGCGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGATCAAGCTTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCCCTGT  
450 460 470 480 490 500 510 520 530 540



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

35



## Discusión

La tecnología del DNA recombinante ha permitido aislar secuencias de DNA correspondientes a proteínas durante años. Y en este estudio nos permitió aislar proteínas que son expresadas por células derivadas por un cementoblastoma, y que son reportadas como las responsables del proceso de mineralización del cemento dental humano como BSP, OPN y ALP.

Los resultados de las secuencias de las proteínas obtenidas fueron ingresados al banco genético de la red mundial de genes y al compararlas con las existentes resultaron ser similares a las proteínas expresadas por células de tejido óseo que intervienen en el proceso de mineralización del mismo en un 99% de homología, los genes de BSP, OPN, ALP producen proteínas de semejante estructura y función, incluyendo la regularización de mineralización y mediador de adhesión celular, con lo cual esto nos garantiza que las secuencias de las proteínas no colágenas aisladas se podrán utilizar en posteriores estudios de investigación en cuanto se refiera a tratar de marcar la expresión de estas secuencias durante el desarrollo del cemento radicular en un modelo in vitro.

Por otro lado, esto nos abre brechas a seguir estudiando mas a fondo y buscar una proteína ó marcador específico de los cementoblastos, ya que hasta ahora la proteína de adhesión de cemento carece de una secuencia de ADN reportada y a nivel mundial se estan haciendo intentos por tratar de encontrar el gen que la codifica. Pero la obtención de las secuencias de OPN, BSP y ALP ha sido un gran avance en la biología celular y molecular del cemento a nivel nacional ya que se ha logrado su aislamiento lo cual nos llevara a tratar de abarcar mas conocimiento sobre como actúan estos genes en el origen de este tejido y en el proceso mas importante como la cementogénesis. Asimismo, experimentar in vitro la expresión de proteínas de las células cementoblásticas y poder llegar a manipular la mineralización, para así poder aportar en un futuro teorías que serían aplicadas para nuevas técnicas ó métodos revolucionarios para tratamientos relacionados con este tejido y la regeneración periodontal.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Conclusión

En este trabajo logramos conocer y manejar las técnicas de biología molecular y aplicarlas en el campo de la Odontología, lo cual nos permitió aislar y clonar por primera vez las secuencias de ADN de las proteínas no colágenas expresadas en un cultivo celular de cementoblastos derivados de un tumor de cemento humano.

La comparación de las secuencias de ADN de estas proteínas en el banco mundial de genes nos dio la pauta para garantizar que las células aisladas a partir del tumor son un modelo perfecto para estudiar la cementogénesis y la producción de proteínas específicas *in vitro* y que su característica celular proveniente del tumor no afecta la expresión general de la información genética, ya que la homología del más del 90% con respecto a las reportadas en hueso, nos estimula para llevar a cabo futuras investigaciones *in vitro*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Referencias Bibliograficas

- <sup>1</sup> Bartold M., Narayana S. Biology of the periodontal Connective Tissues. Quintessence Publishing CO, Inc, Chicago, 1998. pp. 93, 187, 188, 189, 190
- <sup>2</sup> Gage J, Francis O, Triffitt J. Collagen Dental Matrices. Wriht, London, 1989. pp. 85, 86, 87, 88
- <sup>3</sup> Arzate H, Jimenez-G., Alvarez-P., Landa, Bar-K., Pitaru. Immunolocalization of Human Cementoblastoma-conditioned Medium- derived Protein. J Dent Res 81: pp.541. 2002.
- <sup>4</sup> Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky L, Matsudaria P, Darnell J. *Molecular Cell Biology. Third Edition 1995. Scientific American Books.* pp. 2-12
- <sup>5</sup> Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. *Biologia Molecular de la Celula. Tercera Edicion 1996. Ediciones Omega S.A.* pp 49, 102
- <sup>6</sup> Lazzari E. *Bioquimica Dental Interamericana, Mexico, 1980.* pp 56, 64
- <sup>7</sup> Schluger S, Yuodelis R, Page R. *Enfermedad Periodontal: Fenomenos Basicos. CIA. Editorial Continental S.A. de C.V. 1997.* pp. 59-63
- <sup>8</sup> Lawson R, Binne W, Barret A, Wright J. *Color Atlas of Oral Disease, Mosby-Wolfe, Mexico, 2001.* p. 6.19 - 6.12
- <sup>9</sup> Arzate H., Alvarez MA., Aguilar ME., Alvarez O. Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells *in vitro.* *J Periodont Res* 33 pp. 249-258, 1998.
- <sup>10</sup> Arzate H. Preliminary characterization of epithelial root sheath cells *in vitro.* *Bol Est Med Biol Mex* 42 pp.27-30, 1994.
- <sup>11</sup> Arzate H, Olson SW, Page RC, Grown AM, Narayanan AS. Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J* 6 pp.2990-2995, 1992.
- <sup>12</sup> Arzate H, Olson SW, Page RC, Narayanan AS. Insolation of human tumor cels that produce cementum proteins in culture. *Bone Miner.* 18 pp.15-30. 1992
- <sup>13</sup> Arzate H, Chimal-Monroy J, Hernandez-Lagunas L, Díaz de León L. Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *J Periodontal Res* 31:144-148. 1996.

<sup>14</sup> G. Robey P. Bone Matrix Proteoglycans and Glycoproteins. Principales Of Bone Biology. 155-165. 1996.

<sup>15</sup> Ganss B., R.H. Kim., J. Sodek. Bone Sialoprotein. Critical Review Oral Biology Med. 10 (1): 79- 98 1999.

<sup>16</sup> T. Bluter W., L. Ridall A., D. McKee M., Osteopontin. Principales of Bone Biology. 167-181. 1996.

<sup>17</sup> Henthorn P. Alkaline Phosphatase. Principales of Bone Biology. 197-206. 1996.

<sup>18</sup> Karp G. Biología Celular. Segunda Edición. Ed. MacGraw-Hill. 1987. pp. 539

<sup>19</sup> Chomczynski P., Sacchi N., Single-step method of RNA Insolation by Acid guanidinium Thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156-159, 1987.

<sup>20</sup> Arredondo-Peter R. Reacción en cadena de la Polimerasa, PCR: un impacto reciente en la biología Molecular. El Faro, UNAM. pp. 3-14, 2000

<sup>21</sup> Somerman MJ, Argraves WS, Foster RA, Dickerson K, Norris K, Sauk JJ. Cell attachment activity of cementum: bone sialoproteine II identified in cementum. *J Periodontal Res* 26: pp.10-16. 1991.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN